



Tesis doctoral

**PAPEL DEL RECEPTOR DE
ESTRÓGENOS β EN LOS EFECTOS DE
LA EXPOSICIÓN PRENATAL AL
BISFENOL-A EN LA CÉLULA β
PANCREÁTICA**

Memoria presentada por

Talía Boronat Belda

Para optar al grado de doctor

Dirigida por

Dr. Ángel Nadal Navajas

Codirectora Dr. Paloma Alonso Magdalena

Programa de doctorado en Bioingeniería

Instituto de Bioingeniería

Universidad Miguel Hernández de Elche

Elche 2020

PREFACIO

Como requisito de la normativa vigente de la Universidad Miguel Hernández de Elche, este documento, correspondiente a la tesis doctoral titulada: “Papel del receptor de estrógenos β en los efectos de la exposición prenatal al bisfenol-a en la célula β pancreática”, comprende:

- Una introducción en la que se presenta la investigación realizada y en la que el propósito de esta tesis doctoral es explicado y justificado.
- Un resumen de los materiales y métodos empleados en la investigación.
- Un resumen de los resultados obtenidos, su discusión y conclusiones finales.

El presente trabajo es presentado junto con el siguiente artículo:

Bisphenol-A exposure during pregnancy alters pancreatic β -cell division and mass in male mice offspring: A role for ER β

Talía Boronat-Belda, Hilda Ferrero, Ruba Al-Abdulla, Iván Quesada, Jan-Ake Gustafsson, Ángel Nadal, Paloma Alonso-Magdalena

Food Chem Toxicol, doi: 10.1016/j.fct.2020.111681

Publicación encuadrada en el primer cuartil (Q1) de JCR. Factor de impacto 4.679

empleado como indicio de calidad para la presentación de la tesis doctoral mediante compendio de publicaciones y cumpliendo así con la normativa del RD99/2011 y la normativa vigente de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

INDICIOS DE CALIDAD

La tesis doctoral titulada “***Papel del receptor de estrógenos β en los efectos de la exposición prenatal al bisfenol-a en la célula β pancreática***”, realizada por Dña. TALIA BORONAT BELDA, con DNI: 21689723-X, bajo la dirección de los profesores Ángel Nadal Navajas y Paloma Alonso Magdalena, se presenta bajo la modalidad de Tesis compendio de publicaciones con los siguientes índices de calidad según el Campo de la ANECA de Ciencias de la Salud, Ciencias Biomédicas.

Publicaciones Científicas:

Bisphenol-A exposure during pregnancy alters pancreatic β -cell division and mass in male mice offspring: A role for ER β

Talía Boronat-Belda, Hilda Ferrero, Ruba Al-Abdulla, Iván Quesada, Jan-Ake Gustafsson, Ángel Nadal, Paloma Alonso-Magdalena

Food Chem Toxicol, doi: 10.1016/j.fct.2020.111681

Publicación encuadrada en el primer cuartil (Q1) de JCR. Factor de impacto 4.679

Los abajo firmantes, el Dr. **ÁNGEL NADAL NAVAJAS**, Catedrático de Fisiología de la Universidad Miguel Hernández de Elche, y la Dra. **PALOMA ALONSO MAGDALENA**, Profesora Titular de Nutrición y Bromatología de la misma Universidad.

INFORMAN:

Que la memoria presentada para optar al grado de Doctor por la Universidad Miguel Hernández de Elche por **Dña. TALIA BORONAT BELDA**, con DNI: 21689723-X, titulada "***Papel del receptor de estrógenos β en los efectos de la exposición prenatal al bisfenol-a en la célula β pancreática***", ha sido realizada bajo nuestra dirección.

Que han revisado los contenidos científicos y los aspectos formales del trabajo y dan su conformidad para su presentación a la Comisión de Doctorado de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, firmamos el presente documento en Elche a

Fdo. Ángel Nadal Navajas

Catedrático de Fisiología

Universidad Miguel Hernández

Fdo. Paloma Alonso Magdalena

Profesora Titular de Nutrición y Bromatología

Universidad Miguel Hernández

Dr. **PIEDAD N. DE AZA MOYA**, Coordinadora del Programa de Doctorado en Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche por Resolución Rectoral 3120/19, de 09 de diciembre de 2019

INFORMA

Que la tesis doctoral titulada ***“Papel del receptor de estrógenos β en los efectos de la exposición prenatal al bisfenol-a en la célula β pancreática”***, ha sido realizada por **Dña. TALÍA BORONAT BELDA**, con DNI: 21689723-X, bajo la dirección de los Profesores **ANGEL NADAL NAVAJAS** (director) y **PALOMA ALONSO MAGDALENA** (codirectora), y da su conformidad para que sea presentada a la Comisión de Doctorado de la Universidad Miguel Hernández.

Y para que así conste, y a los efectos oportunos, firma el presente documento en Elche a

Profesora Piedad N. De Aza Moya.
Coordinadora del Programa de Doctorado en Bioingeniería

Financiación

La presente investigación fue financiada por los proyectos: Generalitat Valenciana PROMETEOII/ 2015/016 (IP Ángel Nadal), EFSD/Lilly Fellowship Program ref 94224 (IP Paloma Alonso-Magdalena), Sociedad Española de Diabetes (SED) ref CY1002IL (IP Paloma Alonso-Magdalena), Ministerio de Economía y Competitividad SAF2014-58 335-P (IP Ángel Nadal), FEDER/Ministerio de Ciencia e Innovación-Agencia Estatal de Investigación BPU2017-86579-R (IP Ángel Nadal).



FEDER
Fondo Europeo de Desarrollo Regional

Una manera de hacer Europa



**GENERALITAT
VALENCIANA**

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS y TABLAS	15
ABREVIATURAS	17
RESUMEN	23
ABSTRACT	25
INTRODUCCIÓN	27
1. EL ISLOTE DE LANGERHANS	28
1.1. Desarrollo embrionario del islote de Langerhans	29
1.2. Regulación del desarrollo embrionario del islote de Langerhans	30
2. FUNCIONAMIENTO Y CARACTERÍSTICAS DE LA CÉLULA β PANCREÁTICA	32
3. LA DIABETES MELLITUS	35
3.1 Diabetes Mellitus tipo 2	36
4. DISRUPTORES ENDOCRINOS (EDCs) Y DIABETES MELLITUS	39
4.1 Definición y tipos de EDC	39
4.2 Mecanismos de actuación de los EDCs	42
5. BISFENOL-A	45
5.1 Características químicas del BPA	45
5.2 Efectos de la exposición a BPA durante el desarrollo: implicaciones para el desarrollo de la DMT2	47
6. MECANISMOS MOLECULARES DE ACCIÓN DEL BPA	53
OBJETIVOS	56
MATERIAL Y MÉTODOS	58

1. DESCRIPCIÓN DE LOS MODELOS ANIMALES DE ESTUDIO	59
1.1 Modelo animal	59
1.2 Características del modelo BERKO	60
2. AISLAMIENTO DE LOS ISLOTES DE LANGERHANS	61
3. CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS AISLADAS DEL ISLOTE DE LANGERHANS	62
4. CUANTIFICACIÓN DE LA TASA DE PROLIFERACIÓN EN CÉLULAS AISLADAS DEL ISLOTE DE LANGERHANS	62
5. ESTUDIO HISTOLÓGICO DEL TEJIDO PANCREÁTICO DEL RATÓN	64
5.1 Inclusión y obtención en bloques parafinados del páncreas entero de ratón	65
5.2 Estudio de la masa de célula β por Inmunohistoquímica (IHQ)	65
5.3 Estudio de la proliferación de célula β mediante IHQ utilizando Ki67	66
5.4 Estudio de la proliferación de célula β mediante IHQ utilizando BrdU	68
5.5 Estudio de la apoptosis de célula β mediante el kit TUNEL	69
6. TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA INTRAPERITONEAL (ipGTT)	70
7. SECRECIÓN DE INSULINA ESTIMULADA POR GLUCOSA <i>IN VIVO</i> (GSIS)	70
8. DETERMINACIÓN DE LA SECRECIÓN ESTÁTICA DE INSULINA <i>EX VIVO</i>	70
9. MEDICIONES HORMONALES Y BIOQUÍMICAS DEL SUERO SANGUÍNEO	71
9.1 ELISA de insulina	71

9.2 ELISA de leptina	71
9.3 Método enzimático (ACS-ACOD) para la cuantificación de ácidos grasos no esterificados	72
10. OBTENCIÓN DE ARN Y RT-PCR CUANTITATIVA	73
10.1 Extracción de ARN de islote de Langerhans	73
10.2 Retrotranscripción (RT)	73
10.3 qRT-PCR	74
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	76
RESULTADOS	78
1. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A BPA SOBRE LA MASA DE CÉLULA β DURANTE LA GESTACIÓN EN RATONES OF1	79
2. LA EXPOSICIÓN <i>IN UTERO</i> AL BPA ALTERA EL DESARROLLO DE LA CÉLULA β PANCREÁTICA EN LA DESCENDENCIA A TRAVÉS DE ER β	84
3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES EN CÉLULAS β PROCEDENTES DE ANIMALES WT y BERKO EXPUESTOS A BPA <i>IN UTERO</i>	89
4. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A BPA DURANTE EL DESARROLLO EN LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA Y LA SENSIBILIDAD A LA INSULINA EN RATONES WT Y BERKO	92
5. EFECTO DEL BPA SOBRE LA CAPACIDAD DE REPLICACIÓN DE LA CÉLULA β PANCREÁTICA	96
6. EFECTO DEL AGONISTA WAY200070 SOBRE LA CAPACIDAD DE REPLICACIÓN DE LA CÉLULA β DE RATONES NEONATOS Y ADULTOS	100
7. EFECTOS DEL AGONISTA ESPECÍFICO DE ER α , PPT, Y LA HORMONA 17 β -ESTRADIOL SOBRE LA TASA DE DIVISIÓN CELULAR EN LA CÉLULA β DE RATONES ADULTOS	103

DISCUSIÓN	106
1. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A BPA <i>IN UTERO</i> SOBRE LA MASA Y LA FUNCIÓN DE LA CÉLULA β PANCREÁTICA DE LA DESCENDENCIA	108
2. ESTUDIO <i>IN VITRO</i> DEL EFECTO DEL BPA EN LA CÉLULA β PANCREÁTICA A TRAVÉS DE ER β	117
CONCLUSIONES	121
REFERENCIAS	123
ANEXO I	149
AGRADECIMIENTOS	192

ÍNDICE FIGURAS Y TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Citoarquitectura comparada del islote de Langerhans en el ratón y el humano.

Figura 2. Funcionamiento de la célula β pancreática: acoplamiento estímulo-secreción.

Figura 3. Esquema general de los múltiples mecanismos de actuación de los disruptores endocrinos (EDCs) sobre los receptores nucleares (NR).

Figura 4. Diagrama esquemático de la hidrólisis del enlace éster entre los monómeros de BPA que forman el plástico de policarbonato.

Figura 5. Representación esquemática de los efectos multigeneracionales y transgeneracionales tras la exposición gestacional del BPA en F0.

Figura 6. Estructura del BPA, del WAY200070, del PPT y del 17 β -estradiol.

Figura 7. Condiciones del programa convencional de retrotranscripción.

Figura 8. Condiciones programadas para la qRT-PCR.

Figura 9. Efecto de la exposición a BPA en la evolución del peso corporal en ratones OF1.

Figura 10. Efecto de la exposición a BPA durante el desarrollo en el páncreas endocrino en animales a día P30 en ratones OF1.

Figura 11. Determinación de la tasa de proliferación y apoptosis de la célula β pancreática en ratones OF1 a día P30.

Figura 12. Ilustración del modelo animal.

Figura 13. Efecto de la exposición a BPA durante el desarrollo en el páncreas endocrino en día P0.

Figura 14. Efecto de la exposición a BPA durante el desarrollo en ratones macho F1 en día P30.

Figura 15. Determinación de la tasa de proliferación de la célula β pancreática en animales P30.

Figura 16. Expresión génica en islotes de Langerhans de los machos F1 que han sido expuestos al BPA *in utero* entre los días 9-16 de gestación.

Figura 17. Análisis de la tolerancia a la glucosa en los machos F1 al mes de vida.

Figura 18. GSIS en animales F1 al mes de vida expuestos *in utero* a BPA.

Figura 19. Secreción de insulina de islotes pancreáticos en respuesta a concentraciones crecientes de glucosa (3, 8 y 16 mM).

Figura 20. Porcentaje de proliferación de las células β pancreáticas en cultivos celulares expuestos a diferentes dosis de BPA (1, 10 y 100 nM).

Figura 21. Imágenes representativas de células pancreáticas procedentes de neonatos WT con marcaje positivo para insulina (rojo), para el marcador nuclear de proliferación BrdU (verde) y marcaje nuclear con Hoechst (azul) en los grupos Control y BPA 1 nM.

Figura 22. Imágenes representativas de células pancreáticas procedentes de machos adultos WT con marcaje positivo para insulina (rojo), para el marcador nuclear de proliferación BrdU (verde) y marcaje nuclear con Hoechst (azul) en los grupos Control y BPA 1 nM.

Figura 23. Porcentaje de proliferación de células β pancreáticas en cultivos celulares expuestos a diferentes dosis de WAY200070 (1, 10 y 100 nM).

Figura 24. Tasa de proliferación control de células β pancreáticas en machos y hembras.

Figura 25. Porcentaje de proliferación de células β pancreáticas en cultivos celulares expuestos a diferentes dosis (1, 10 y 100 nM) de PPT y 17 β -estradiol.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cebadores empleados en el genotipado del modelo experimental de estudio.

Tabla 2. Mezcla de reactivos utilizada para la reacción de retrotranscripción.

Tabla 3. Secuencia de cebadores utilizados en la qRT-PCR.

Tabla 4. Reactivos utilizados en la reacción de la qRT-PCR.

Tabla 5. Valores plasmáticos de hormonas y metabolitos en animales F1 al mes de vida tras la exposición *in utero* a BPA.

ABREVIATURAS

β -HCB	Hexaclorobenceno
ACh	Acetilcolina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADP	Adenosina difosfato
AhR	Receptor de hidrocarburos de arilo
AMPC	Adenosina monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARs	Receptores de andrógenos
Arx	Homeobox relacionado con Aristaless
ATP	Adenosina trifosfato
AUC	Área bajo la curva
BAX	Proteína X asociada a Bcl-2
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-xl	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BDE-47	Éter de pentabromodifenilo
BERKO	<i>Knockout</i> del receptor ER β
BETA2	Microglobulina β 2
bHLH-PAS	Dominios <i>basic helix loop helix</i>
BPA	Bisfenol-A
BrdU	Bromodesoxiuridina
BSA	Albúmina de suero bovino.
CAR	Receptor constitutivo de androstano
CDC	Centro de Control y Prevención de enfermedades

DAB:	3'-diaminobencidina
DAG	Diacylglicerol
DDE	Dicloro difenil tricloroetileno
DDT	Dicloro difenil tricloroetano
DEHP	Bis (2-etilhexilo)
DES	Dietiestilbestrol
DIDP	Ftalato de diisodecilo
DINP	Ftalato de diisononilo
DM	Diabetes mellitus
DMG	Diabetes mellitus gestacional
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT1	Diabetes mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes mellitus tipo 2
DOHaD	Teoría de los Orígenes del Desarrollo de la Salud y la Enfermedad
DPN	Diarilpropiolnitrilo
EDC	Disruptor endocrino
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EGFR	Receptor para el factor de crecimiento epidermal
ELISA	<i>Enzym Linked Immunoabsorbent Assay</i>
EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
ER	Estrés de retículo
ERs	Receptores de estrógenos
ER α	Receptor de estrógeno α
ER β	Receptor de estrógeno β
ERE	Elementos de respuesta a estrógenos
ERKs	Quinasas reguladoras extracelulares

ERRγ	Receptor gamma relacionado con el estrógeno
F0	Generación gestante
F1	Primera generación
F2	Segunda generación
F3	Tercera generación
FADH ₂	Flavin adenín dinucleótido
FBS	Suero fetal bovino
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Foxa1	Proteína A1 de la caja de Forkhead
Foxa2	Proteína A2 de la caja de Forkhead
GLP-1	Péptido similar al glucagón tipo 1
GLUT1	Transportador de glucosa 1
GLUT2	Transportador de glucosa 2
GLUT3	Transportador de glucosa 3
GLUT4	Transportador de glucosa 4
GPER/GPR30	Receptor de estrógenos acoplado a la proteína G
GR	Receptores de glucocorticoides
GSIS	Secreción de insulina estimulada por glucosa
GTP	Guanosín trifosfato
H19	<i>Imprinted maternally expressed transcript.</i>
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
Hnf1α	Factor nuclear hepático nuclear 1 α
Hnf4α	Factor nuclear hepático nuclear 4 α
Hnf1β	Factor nuclear hepático nuclear 1 β
IAPP	Polipéptido amiloide
Igf2	Factor de crecimiento similar a la insulina 2

ipGTT	Test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal
ipITT	Test de resistencia a la insulina intraperitoneal
IRS	Receptor de insulina
K _{ATP}	Canal de potasio sensible a ATP
LOAEL	Nivel de efecto tóxico mínimo observable
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MODY	<i>Maturity Onset Diabetes of the Young</i>
MODY1	<i>Maturity Onset Diabetes of the Young 1</i>
MODY2	<i>Maturity Onset Diabetes of the Young 2</i>
MODY3	<i>Maturity Onset Diabetes of the Young 3</i>
MODY4	<i>Maturity Onset Diabetes of the Young 4</i>
MODY5	<i>Maturity Onset Diabetes of the Young 5</i>
MODY6	<i>Maturity Onset Diabetes of the Young 6</i>
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NHANES	Encuesta Nacional de Examen de Salud y Nutrición
NEFA	Ácidos grasos no esterificados
NeuroD1	Diferenciación neurogénica 1
Ngn3	Neurogenina 3
Nkx2.2	Homeobox protein Nkx-2.2
Nkx6.1	Homeobox protein Nkx-6.1
Nkx6.2	Homeobox protein Nkx-6.2
NOAEL	Nivel sin efecto adverso observable
NR	Receptor nuclear
OH	Grupo hidróxido
p21	Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1

p53	Proteína supresora de tumores
Pax4	<i>Paired Box Gene 4</i>
Pax6	<i>Paired Box Gene 6</i>
PBDE	Retardantes de llama polibromados
PBS	Tampón fosfato salino
PCBs	Policlorados bifenilos
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
Pdx-1	<i>Pancreatic and duodenal homeobox 1</i>
PFA	Paraformaldehído
PFCs	Perfluororcarburos
PFOA	Perfluorooctanoico
PFOS	Sulfonato de perfluorooctano
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
POPs	<i>Persistent Organic Pollutans</i>
PPARs	Receptores activados por proliferadores peroxisómicos
PPAR γ	Receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma
PPT	Propil pirazol triol
Ptf1a	Factor de transcripción del páncreas 1 subunidad alfa
PVC	Policloruro de vinilo
PXR	Receptor X de pregnano
RI	Resistencia a la insulina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
RT	Retrotranscripción

RXR	Receptor X retinoide
sc	Vía subcutánea
SCD-1	Enzima estearoil-CoA desaturasa
SERM	Moduladores selectivos de los receptores de estrógeno
Shh	Vía de señalización Sonic hedgehog
SREBP-1C	Factor 1 de transcripción de unión a elementos reguladores de esteroides
TBBPA	Tetrabromobisfenol A
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina
TDI	Ingesta diaria tolerable
TRs	Receptores de hormona tiroidea
TUNEL	<i>Terminal desoxynucleotidil transferasa dUTP nick end labeling</i>
WT	<i>Wild type</i>

RESUMEN

La exposición al disruptor endocrino BPA, durante la gestación, conduce a alteraciones metabólicas en la descendencia produciendo efectos adversos en la homeostasis de glucosa y, por tanto, a un aumento del riesgo en la aparición de enfermedades metabólicas como la diabetes mellitus tipo 2. Por otro lado, se tienen constancia de que el BPA, a través de la activación de receptores de estrógenos, pone en marcha diferentes vías de señalización que pueden alterar la función y la expresión de genes en la célula β pancreática. En el presente trabajo analizamos cuál es el efecto del BPA sobre la masa y la función de la célula β pancreática durante el primer mes de vida en la descendencia y la posible implicación de los receptores de estrógenos.

Para investigar los efectos del BPA sobre el desarrollo de la célula β pancreática en la descendencia se utilizaron ratones de la cepa OF1. Asimismo, para esclarecer la implicación del receptor de estrógenos, ER β , se utilizaron ratones de la colonia *knockout* para este receptor. Para el estudio de la masa y proliferación de la célula β pancreática se llevaron a cabo experimentos *in vivo* en los animales al mes de vida mediante técnicas de inmunohistoquímica. Para el estudio de la función de este tipo celular en los descendientes al mes de vida se analizó la tolerancia a la glucosa, la sensibilidad a la insulina, la capacidad secretora de las células β pancreáticas en respuesta a glucosa tanto *in vivo* como *ex vivo*, posibles cambios en la expresión génica, así como en los niveles de hormonas plasmáticas importantes en el control de la homeostasis glucémica y energética. Además, para corroborar la implicación del receptor ER β en el efecto proliferativo directo del BPA se realizaron análisis *in vitro* mediante el cultivo primario de células aisladas del islote de Langerhans de animales procedentes de la colonia *knockout* para ER β . Las células aisladas se incubaron con diferentes dosis de BPA; el agonista específico de ER β , WAY200070; el agonista específico de ER α , PPT; y la hormona natural 17 β -estradiol.

Los resultados obtenidos mostraron cómo la exposición a BPA durante el desarrollo embrionario conducía a un aumento estadísticamente significativo del área y la masa de células β pancreáticas en los descendientes de la cepa OF1. Estos cambios se asociaron con un aumento de la proliferación y una disminución de la apoptosis. Además, observamos que estos cambios se producían también en animales WT de la colonia BERKO mientras que aquellos animales que carecían del receptor ER β no mostraban cambio fenotípico alguno. Los experimentos realizados *in vitro* demostraron que el BPA, a dosis medioambientalmente relevantes, aumentaba la tasa de proliferación de la célula β a través de un mecanismo dependiente de ER β . No obstante, no podemos descartar la participación de otros receptores como ER α dado que agonistas específicos como el PPT condujeron asimismo a un aumento de la proliferación.

Por otro lado, el tratamiento con la hormona 17β -estradiol no produjo ningún efecto en la división de la célula β . Por lo que respecta a los estudios de la función de la célula β en los descendientes jóvenes tras la exposición intraútero a BPA no se observaron diferencias significativas en cuanto a la tolerancia a la glucosa, sensibilidad a la insulina ni en los niveles hormonales. Sin embargo, observamos que los animales BERKO *per se* presentaban una disminución en la secreción de insulina estimulada por glucosa.

En conclusión, la exposición *in utero* a BPA promueve cambios tempranos en la morfología del páncreas endocrino que requieren de la participación del receptor de estrógenos ER β . El BPA, a dosis dentro del rango de exposición humana, modula la división de las células β pancreáticas, incrementando la masa de este tipo celular durante el desarrollo. Este hallazgo contribuye a ampliar nuestro conocimiento sobre los mecanismos subyacentes a la acción del BPA en la homeostasis de la glucosa.

ABSTRACT

Gestational exposure to BPA leads to metabolic disorders in the offspring which may increase the risk of developing diseases like type 2 diabetes. BPA is also known to activate different signalling pathways through activation of estrogen receptors (ERs) which may alter gene expression and pancreatic β -cell function. In the present work, we analyse the effects of gestational exposure to BPA on pancreatic β -cell function and mass in the offspring during first month of life as well as the role of ERs.

We use OF1 mice to investigate the effects of BPA on pancreas development in the offspring exposed. To uncover the possible participation of ER β animals from BERKO colony were included in the study. Pancreatic β -cell mass and proliferation was analysed in the offspring at postnatal day 0 (P0) and 30 (P30) by means of histological and morphometric procedures. Pancreatic β -cell function was explored at P30. Glucose tolerance, insulin sensitivity, *in vivo* and *ex vivo* insulin secretion response, changes on gene expression as well plasma levels of hormones key in glucose and energy homeostasis were analysed. In addition to that, in order to explore ER β role in the proliferative effect of BPA in pancreatic β -cells, a series of *in vitro* experiments were performed. Dispersed pancreatic islet cells from adult male WT and BERKO mice were cultured in the presence of vehicle or BPA, a specific agonist of ER β , WAY200070, a specific agonist of ER α , PPT, or the natural hormone 17 β -estradiol.

We found that gestational exposure to BPA led to a significant increase of pancreatic β -cell area and mass in the OF1 male offspring. This increment was related to enhanced pancreatic β -cell proliferation rate and decreased apoptosis. Similar results were observed in WT exposed animals from the BERKO colony while mice lacking ER β did not show any change. *In vitro* experiments revealed that BPA, at environmentally relevant doses, promoted increased pancreatic β -cell division in an ER β -dependent manner. Nevertheless, we cannot discard that other ERs like ER α may also play a role since the treatment with the selective agonist of ER α , PPT, also increased β -cell replication rate. On the contrary, the treatment with 17 β -estradiol, in the same range of doses, did not promote any change on β -cell proliferation neither in males nor in females WT. As regards the *in vivo* study of glucose homeostasis, no significant effects were observed on glucose tolerance, insulin sensitivity or plasma hormone levels in the male offspring *in utero* exposed to BPA at P30. However, we do observe that BERKO animals showed decreased insulin secretion in response to stimulatory glucose concentrations.

In summary, in the present study we demonstrate that *in utero* exposure to BPA promote early changes in the morphology of the endocrine pancreas in an ER β -dependent manner. In addition, we found that BPA, at doses within the range of human exposure, modulates pancreatic β -cell division leading to an increment of pancreatic β -cell mass during development. This finding will contribute to expand our knowledge on the mechanisms underlying BPA action which may have an impact on glucose homeostasis.

INTRODUCCIÓN

1. EL ISLOTE DE LANGERHANS

El páncreas es una glándula mixta de aspecto elongado unida por un extremo, al duodeno y por el otro, al bazo. Su definición etimológica formada por [*pan* = todo; *kreas* = carne], se explica, posiblemente, por su apariencia macroscópica. Este órgano glandular, anexo al aparato digestivo, está constituido por dos organizaciones claramente diferenciadas, tanto a nivel fisiológico como estructural: la parte exocrina y la parte endocrina. La porción exocrina está compuesta del tejido glandular acinar y racimoso, donde se secretan enzimas digestivas que serán liberadas al duodeno. La porción endocrina está formada por “micro-órganos” que son unidades funcionales constituidas por agrupaciones de células denominadas islotes de Langerhans y su función es sintetizar y liberar al torrente sanguíneo diferentes hormonas implicadas en la homeostasis de la glucosa. Los islotes pancreáticos están bien vascularizados además de presentar inervación del sistema autónomo, simpático y parasimpático.

La masa de células endocrinas del páncreas apenas constituye un 1 % del total del órgano, y se agrupa en poblaciones generalmente de 1000-3000 células formando los islotes de Langerhans, aunque estas agrupaciones pueden variar su densidad celular. Los islotes de Langerhans están formados por 5 tipos celulares clasificados según las hormonas que secretan. La célula alfa (α) es la productora del glucagón y es el segundo tipo celular más abundante del islote pancreático. La célula beta (β) responsable de producir la insulina, es la que forma la mayor parte de la masa celular endocrina. La célula delta (δ) y la célula PP son dos tipos celulares menos abundantes en el islote. La célula δ secreta la somatostatina y la célula PP secreta el polipéptido pancreático. El último tipo celular es la célula épsilon (ϵ) que sintetiza el polipéptido ghrelina. Cabe destacar que la citoarquitectura y la composición porcentual de los distintos tipos celulares es variable en las diferentes especies animales (figura 1). En los islotes humanos, las poblaciones celulares se encuentran distribuidas de forma heterogénea, con un porcentaje aproximado del 65 % de células β , 30 % de células α y el resto de los otros tipos celulares minoritarios (Brissova et al., 2005, Cabrera et al., 2006, Arrojo e Drigo et al., 2015). En los islotes murinos, la distribución es más homogénea y está compuesta principalmente por las células β (60-80 %), presentes en la zona central del islote; rodeadas de células α (15 %); y los demás tipos celulares distribuidos en la periferia del islote (Arrojo e Drigo et al., 2015).

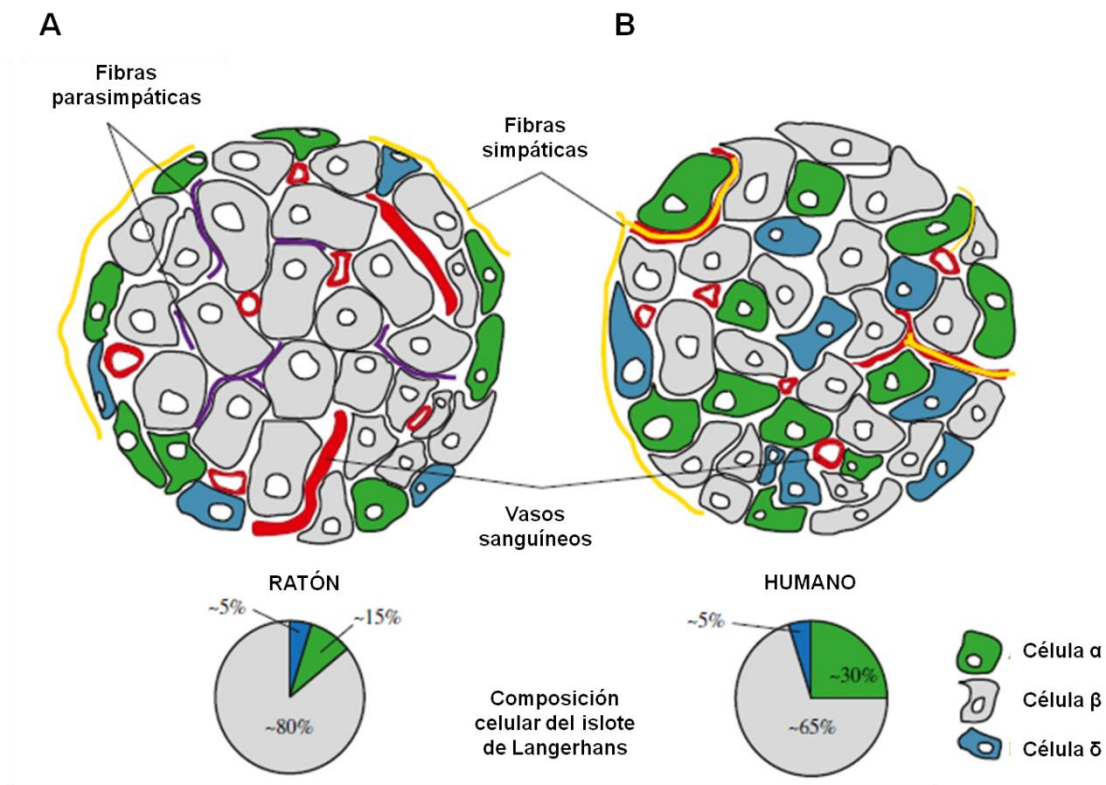


Figura 1. Citoarquitectura comparada del islote de Langerhans en el ratón (A) y el humano (B). En la especie murina, la célula β se ubica en el centro insular y en la periferia las células α y δ . Por el contrario, los islotes de los primates y la especie humana presentan una distribución más heterogénea de las células β , α y δ . Imagen modificada de Arrojo E Drigo *et al.*, Diabetología 2015.

1.1. Desarrollo embrionario del islote de Langerhans.

El páncreas, al igual que otros órganos gastrointestinales, deriva de la capa germinal denominada endodermo durante el proceso de gastrulación. Este proceso está bien caracterizado en el ratón, siendo aproximadamente en el día 8.5-9 de gestación (G8.5-9) cuando surge el páncreas, a través de la formación de dos evaginaciones del tubo endodérmico, una dorsal y otra ventral. A partir del día de gestación G9.5 y hasta el día G12, el tejido pancreático invade el mesénquima, formando unas estructuras ramificadas denominadas ductos. Durante estos días, el tejido pancreático sufre una gran expansión y ramificación. Este epitelio pancreático temprano, contiene células pancreáticas progenitoras multipotentes que pueden dar lugar a todos los tipos celulares pancreáticos. Aproximadamente, en los días G11.5-12.5, ambas evaginaciones, dorsal y ventral, se fusionan dando paso a una reorganización epitelial con la aparición de dos tipos celulares: las células de los extremos (del inglés, *tips cells*) y las células troncales (del inglés, *trunk cells*). Las células de los extremos darán lugar a las células exocrinas acinares; y las células troncales, a las células endocrinas

y a las células ductales. Este evento marca el inicio del proceso que se denomina segunda transición. La segunda transición ocurre entre los días G13.5-G15.5, donde los diferentes tipos celulares se van a diferenciar. En el día G18, ya serán visibles los 5 tipos celulares endocrinos que conocemos del islote de Langerhans: célula β , célula α , célula δ , célula ϵ y célula PP.

Las células β pancreáticas, una vez formadas, van a multiplicarse y renovarse hasta alcanzar la masa celular necesaria para el organismo adulto. En roedores, la mayor expansión de la masa de célula β se produce en la última etapa de la gestación y también, durante la primera semana postnatal, con un incremento que puede llegar a doblar la población en un día. El aumento de la masa de célula β tiene lugar mediante dos procesos: la neogénesis y la proliferación. La neogénesis, se define como la formación de nuevas células β , mediante diferenciación de los precursores endocrinos pancreáticos, siendo el principal mecanismo de generación de este tipo celular, contribuyendo hasta un 80%, antes de la primera semana postnatal. Por lo que concierne al proceso de proliferación, es la autorreplicación celular y, su porcentaje de participación es alrededor de un 20 % durante este periodo. Además, en el mantenimiento de la masa de célula β durante los primeros días neonatales, también juega un papel importante el proceso de apoptosis (Scaglia et al. 1997).

A partir de la primera semana de nacimiento, el porcentaje de participación de estos procesos se invierte. La expansión de la población de célula β se producirá principalmente a través del proceso de proliferación, si bien el proceso de diferenciación celular, conocido como neogénesis, continúa a lo largo de la vida adulta, pero con una tasa muy baja (Bonner-Weir, 2000b, Dor et al., 2004).

En la edad adulta, la tasa de proliferación de la célula β se reduce al 1 % por lo que disminuye la expansión de la masa de la célula β . El páncreas endocrino, no obstante, se considera un tejido de gran plasticidad, debido a su capacidad de adaptación a las variaciones metabólicas que ocurren durante la vida adulta como adaptación a ciertas situaciones fisiológicas como la gestación, o patológicas como la obesidad. En ambas condiciones se desarrolla una resistencia a la insulina que condicionará un incremento en la demanda de insulina como compensación. El páncreas endocrino se adapta a dicha demanda aumentando la secreción de insulina, así como la masa de células β mediante procesos fundamentalmente de proliferación celular (Bonner-Weir, 2000a, Nadal et al., 2009).

1.2 Regulación del desarrollo embrionario del islote de Langerhans.

El destino del islote de Langerhans se rige por una red bien orquestada de señales extracelulares, provenientes de los tejidos adyacentes; y de factores de

transcripción que van a determinar el paso de las células progenitoras multipotentes a las células maduras, utilizando mecanismos como la diferenciación, el crecimiento y el linaje celular, determinando los diferentes tipos celulares pancreáticos.

Las células iniciales denominadas progenitores pancreáticos, expresan Pdx-1 (del inglés, *Pancreatic and Duodenal Homeobox 1*) y Ptf1a (del inglés, *Pancreas-specific Transcription Factor 1*) en los días G8.5 y G9.5, respectivamente. La expresión de Pdx-1 y Ptf1a se manifiesta en todos los progenitores pancreáticos, indicando que los tipos celulares exocrinos, endocrinos y ductales, tienen un origen común. Sin embargo, la expresión de Pdx-1 se restringe a las células acinares y endocrinas justo antes de nacer, y en el adulto principalmente a las células β productoras de insulina. Por otro lado, la expresión de Ptf1a se limita a las células acinares a partir del día G13.5. Con respecto al desarrollo endocrino, destaca el factor de transcripción Ngn3 (del inglés, *Neurogenin 3*). Este factor de transcripción se encuentra ya expresado en el día G9.5, y es en el día G15.5 donde aumenta de forma notoria su expresión, debido a la ola de diferenciación endocrina que sufren las células. El Ngn3 es expresado por los precursores endocrinos que dan lugar a todos los tipos de células pancreáticas productoras de hormonas.

Existen diferentes factores de transcripción activados por Ngn3 que se expresan en la fase más tardía de la gestación y que determinan el tipo celular endocrino. Estos son: el factor Pax4 (del inglés, *Paired Box Gene 4*) de expresión restringida solo en las células β y el factor Arx (del inglés, *Aristaless-Related Homeobox*) que se expresa en las células α y ϵ (Rojas et al., 2010). La familia de factores de transcripción Nkx, como el Nkx2.2, Nkx6.1 y el Nkx6.2, también están involucrados en la determinación del linaje celular. Por ejemplo, el Nkx2.2 se expresa en las células β , α y PP maduras. En la maduración de las células β , intervienen diferentes factores de transcripción que regulan el gen de la insulina, como el Pax6, el NeuroD1 y el Pdx-1, el cual, además de tener un papel crucial en el desarrollo precoz del páncreas, es esencial para la supervivencia de las células β . Otro grupo de genes implicados en la maduración de la célula β son Hnf1 α y Hnf4 α . Los factores anteriormente mencionados son los que tienen una mayor participación en el desarrollo embrionario del páncreas endocrino, no obstante, existen otros muchos factores no detallados tales como los factores Gata4 y Gata6, que se expresan en el endodermo pancreático y, cuya expresión posterior se restringe a las células acinares en el caso de Gata4, y a las células endocrinas en el caso de Gata6 (Ketola et al., 2004). Otros factores como Foxa, Foxa1 y Foxa2 se expresan muy temprano y persisten en todos los tipos celulares durante el desarrollo y a lo largo de la vida adulta; siendo además esenciales para la expresión de Pdx-1 (Gao et al., 2008). En cuanto a las señales extracelulares, cabe destacar la vía de señalización Notch, la cual desempeña

un papel clave en la diferenciación y proliferación de las células progenitoras que expresan Pdx-1. La activación de la vía Notch actúa como freno para la diferenciación celular pancreática y activa la proliferación de estas células progenitoras (Artavanis-Tsakonas et al., 1999).

Estudios sobre el desarrollo del páncreas en humanos muestran que los eventos morfogénicos están altamente conservados entre las especies murina y humana. La formación del páncreas en los humanos se inicia en una etapa equivalente a la del ratón, sin embargo, algunos estudios han puesto de manifiesto que existen algunas diferencias entre estas dos especies. Por ejemplo, la diferenciación de los distintos tipos celulares endocrinos en humanos se produce durante el primer trimestre de gestación, detectándose a las 8 semanas postconcepción las células β , y a las 9 semanas células α y δ dispersas que, en el ratón, aparecen posteriormente, entorno a los días 13 y 15 de gestación. La agrupación de estas células endocrinas en los llamados islotes de Langerhans tiene lugar antes en el ratón que, en los humanos, justo al nacer en los primeros, y entre las semanas 11 y 14 del embarazo en los segundos (Piper et al., 2004, Jeon et al., 2009). Los factores de transcripción que regulan la formación del páncreas fetal humano son los mismos que se expresan en el ratón, si bien existen algunas diferencias en lo que se refiere al tiempo en el que ocurre la expresión; por ejemplo, el factor de transcripción Pdx-1 se expresa de forma más tardía durante el desarrollo fetal humano, cuando la evaginación dorsal se separa de la notocorda y de la aorta, en cambio en el ratón el factor Pdx-1 ya está presente en el tubo endodérmico (Jennings et al., 2015). Cabe destacar que los estudios genéticos en humanos han identificado diversas mutaciones en factores de transcripción que producen alteraciones pancreáticas. Por ejemplo, mutaciones homocigotas en Pdx-1 y Ptf1a producen agenesia pancreática, y mutaciones heterocigotas de pérdidas de función en Pdx-1 se asocian con el desarrollo de un tipo de diabetes mellitus en individuos jóvenes conocida como MODY4 (Stoffers et al., 1997).

2. FUNCIONAMIENTO Y CARACTERÍSTICAS DE LA CÉLULA β PANCREÁTICA

La célula β pancreática es la responsable de la síntesis y liberación de la insulina en respuesta a diversos factores como nutrientes, hormonas y estímulos nerviosos. La insulina es esencial para la supervivencia del organismo, ya que es la única hormona que ejerce una acción hipoglucémica y, por tanto, es clave en la regulación de la homeostasis de la glucosa. Su descubrimiento se remonta al año 1921. Es una hormona polipeptídica de pequeño tamaño formada por 51 aminoácidos (aa), con una cadena A (21 aa) y una cadena B (30 aa) unidas a

través de puentes disulfuro intracatenarios, cuya síntesis requiere de varias etapas (Bell et al., 1980).

La glucosa es el principal estímulo que desencadena la secreción de insulina por parte de las células β pancreáticas. Los mecanismos que regulan dicho proceso se integran en el fenómeno conocido como acoplamiento estímulo-secreción que se describe a continuación en el caso del ratón (figura 2): La glucosa penetra en la célula β mediante transportadores específicos tipo GLUT2 que permiten la entrada rápida de la misma al citosol. Posteriormente, la glucosa se metaboliza por vía anaeróbica a piruvato a través del proceso de glucólisis. El piruvato, se incorpora al ciclo de Krebs en la mitocondria, dando lugar a la producción de GTP, CO_2 y nucleótidos NADH y FADH_2 . Estos nucleótidos con poder reductor, transfieren electrones a la cadena respiratoria, facilitando la generación de un gradiente de H^+ a ambos lados de la membrana mitocondrial interna, el cual activa la ATP sintasa con la posterior generación de ATP. El ATP es transferido al citosol incrementando la razón ATP/ADP lo que produce el cierre de los canales de K^+ sensibles a ATP (K_{ATP}). El cese del flujo de salida de K^+ se traduce en una despolarización progresiva de la membrana. Esta despolarización de la membrana conlleva la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje, incrementando los niveles de calcio intracelulares y permitiendo su entrada desde el exterior. El incremento del Ca^{2+} citosólico es la señal final que desencadena la exocitosis de las vesículas de insulina. La exocitosis es un proceso complejo, que consiste en una fusión de gránulos de insulina con la membrana plasmática y en la apertura de pequeños poros temporales entre el lumen y el medio extracelular (Eliasson et al., 2008). Finalmente, se produce la liberación de la insulina al torrente sanguíneo, que posteriormente actuará sobre los tejidos diana como comunicador de la presencia de glucosa en sangre (Ashcroft and Rorsman, 2013). Tanto a nivel de la actividad eléctrica, como de la señal de Ca^{2+} , se genera un patrón oscilatorio y sincrónico debido a la existencia de un alto grado de acoplamiento celular mediado por uniones tipo gap (del inglés, *gap-junctions*), que permiten el funcionamiento en forma de sincitio de grupos de células β (Santos et al., 1991, Valdeolmillos et al., 1993). Este acoplamiento, en células β pancreáticas murinas, se cree que es indispensable para una adecuada liberación de insulina (Santos et al., 1991, Nadal et al., 1999). Con respecto al acoplamiento estímulo-secreción en humanos, existen ciertas discrepancias en la identidad molecular de los participantes en este mecanismo con respecto al ratón. Por ejemplo, una de las principales diferencias en la especie humana, es la expresión de cantidades más elevadas del transportador de glucosa GLUT1 y GLUT3 en oposición a la mayor expresión de GLUT2 en roedores (De Vos et al., 1995). Además, en 2008, se observaron diferencias en la dotación de canales de la célula β en humanos (Braun et al., 2008). Con respecto a los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, ambas especies activan en la fase de despolarización, canales de tipo L, pero los canales de tipo R solo

se activan en ratón y los canales tipo T y P/Q solo en humanos. Otra diferencia en humanos, es la activación de canales de Na^+ dependientes de voltaje, la cual no ocurre en la especie murina (Barnett et al., 1995, Rorsman and Braun, 2013).

Cabe destacar que además del mecanismo de secreción de insulina dependiente de K_{ATP} , existen otros mecanismos para la regulación de la secreción de la insulina, independientes de K_{ATP} . A estos procesos se les llama vías amplificadoras (Henquin, 2000). Estas vías amplificadoras pueden dividirse en dos subgrupos: vías de amplificación metabólica, en la que estarían implicados el ATP u otros mensajeros como el adenosín monofosfato cíclico (AMPc), el NADPH, intermediarios del ciclo del ácido cítrico etc., o bien vías de amplificación neurohormonal, mediante la activación de la proteína quinasa C (PKC) o proteína quinasa A (PKA) por Acetilcolina (ACh) o el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) (Henquin, 2009). Además, se han propuesto otros moduladores como los ácidos grasos no esterificados (NEFA), que podrían potenciar la secreción de insulina a través de la acilación de proteínas reguladoras, o bien, a través de la formación de otros metabolitos como el diacilglicerol (DAG), implicado en la activación de la PKC.

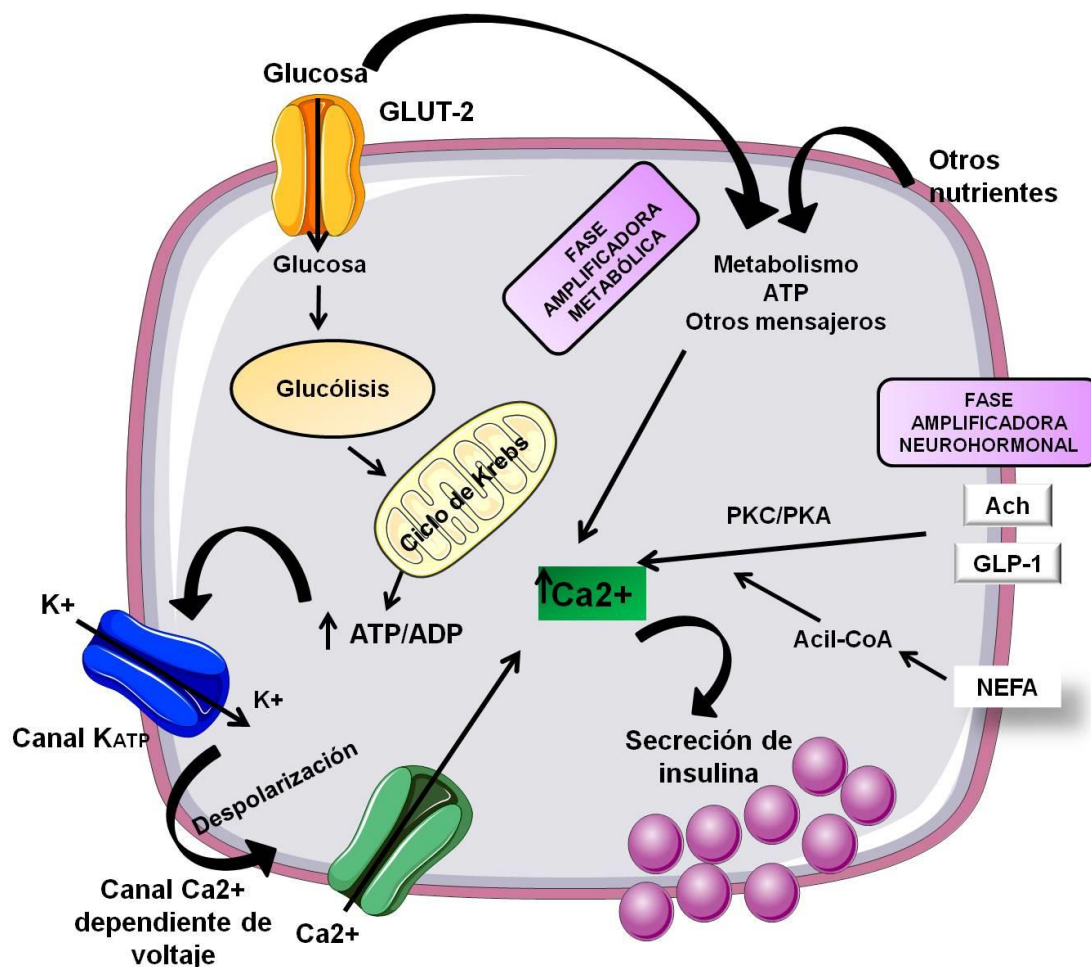


Figura 2. Funcionamiento de la célula β pancreática: acoplamiento estímulo-secreción. Esquema de los flujos, canales y receptores que intervienen en la secreción de los gránulos de insulina. Modificada del libro: *Islets of Langerhans Second Edition* Md. Shahidul Islam.

3. LA DIABETES MELLITUS

La Diabetes Mellitus (DM) es uno de los desórdenes metabólicos más comunes. Es un trastorno de origen multifactorial y caracterizado principalmente por niveles de glucosa altos en sangre (estado de hiperglucemia). Esta desregulación de la glucosa puede ser causada por un defecto en la producción de insulina en el páncreas, y/o a una insuficiente captación de la glucosa por parte de los tejidos periféricos, principalmente el músculo, el hígado y el tejido adiposo, fenómeno que se conoce como resistencia a la insulina. Además, las complicaciones secundarias más comunes de la diabetes incluyen trastornos agudos, como las retinopatías, nefropatías y neuropatías entre otros, afectando por tanto a múltiples tejidos corporales como el sistema nervioso y el vascular, principalmente. La incidencia de la diabetes se ha incrementado durante las últimas décadas, convirtiéndose en un problema de salud pública a escala mundial. En 2005, un total de 333 millones de personas en todo el mundo padecían este desorden metabólico, y en 2015 esta cifra ascendió a 435 millones, incrementándose en un 30.6 % (Ingelfinger and Jarcho, 2017). Se prevé que para el año 2030, el 7.7 % de la población adulta de entre 20 y 79 años de edad padecerá DM (Chen et al., 2012). En 2010, la Asociación Americana de Diabetes estableció los criterios para la confirmación del diagnóstico de DM. De esta manera se consideraba diabético al paciente que presentara cualquiera de los tres factores: glucemia ≥ 200 mg/dL en cualquier momento del día, con presencia de síntomas clásicos de diabetes (poliuria, polidipsia, pérdida inexplicable de peso); glucemia ≥ 126 mg/dL en ayunas (8 horas); hemoglobina glicosilada (HbA1c) $\geq 6,5$ % y glucemia ≥ 200 mg/dL a las 2 h de una sobrecarga oral de 75 g de glucosa (Association, 2010).

Se distinguen cuatro tipos principales de DM: la diabetes tipo 1 (DMT1), la diabetes tipo 2 (DMT2), la diabetes gestacional (DMG) y la diabetes tipo MODY (del inglés *Maturity Onset Diabetes of the Young*), siendo diferentes sus causas y sintomatología. La DMT1 es una enfermedad autoinmune que se caracteriza por la destrucción de las células β pancreáticas productoras de insulina, a causa de un proceso destructivo selectivo. La enfermedad suele manifestarse en la infancia o adolescencia, en el momento en que aproximadamente un 80% de las células β han desaparecido (Eizirik et al., 2009). Con respecto a la DMG esta aparece durante el embarazo cuando no existe una adaptación adecuada de las células β pancreáticas para hacer frente a la resistencia a la insulina que

acontece de manera fisiológica durante esta etapa con el fin de adaptarse a la elevada demanda nutricional del feto (Schneider et al., 2012). En cuanto a la diabetes tipo MODY, ésta es causada por mutaciones en genes que participan en la función de la célula β o en la acción de la insulina. Se han clasificado diversos tipos MODY, algunas de ellas son: MODY3, los pacientes presentan mutaciones en el factor nuclear hepático nuclear 1 α (Hnf1 α); MODY1, mutaciones en el factor nuclear hepático nuclear 4 α (Hnf4 α); MODY2, mutaciones en la glucoquinasa; MODY4, mutaciones en Pdx-1; MODY5, mutaciones en el factor nuclear hepático nuclear 1 β (Hnf1 β) y MODY6, mutaciones en NeuroD1/BETA2. Los pacientes con diabetes de tipo MODY son no insulino dependientes y se diagnostican usualmente antes de los 25 años.

La DMT2 es el tipo más común entre los pacientes diabéticos, su origen es multifactorial y en su etiología los componentes ambientales y la predisposición genética juegan un papel esencial. Se caracteriza por la aparición de resistencia a la insulina por parte de los tejidos periféricos encargados de la homeostasis de la glucosa acompañada de una disfunción progresiva de la célula β pancreática. A continuación, la abordaremos con más detenimiento.

3.1 La Diabetes Mellitus tipo 2

La DMT2 es una de las enfermedades con mayor impacto sociosanitario, dada su elevada prevalencia (90-95 % de todos los casos de DM) y su morbilidad por complicaciones crónicas. Existen dos fenómenos claves en el desarrollo de la DMT2: la resistencia a la insulina (RI) en tejidos periféricos como el músculo, el hígado y/o el tejido adiposo y el fallo de la célula β pancreática.

La RI se define como la reducción de la sensibilidad a la acción de la insulina en sus tejidos diana, dando lugar a una disminución de la captación periférica de glucosa y de la capacidad de suprimir la gluconeogénesis hepática, y a una alteración en el metabolismo de los carbohidratos, los lípidos y las proteínas. Las principales consecuencias de la RI sobre el metabolismo de los carbohidratos se traducen en un exceso de la producción de glucosa hepática mediado por la gluconeogénesis y a un incremento de la glucogenólisis que conlleva una hiperglucemia en ayunas y una resistencia hepática a la insulina. En cuanto a las alteraciones sobre el metabolismo lipídico, se produce un aumento de la concentración plasmática de ácidos grasos debido a la lipólisis de la grasa almacenada, así como la activación de la enzima lipasa presente en los adipocitos que produce la hidrólisis de los triglicéridos almacenados en forma de ácidos grasos que se liberan al torrente sanguíneo. Las alteraciones sobre el metabolismo proteico debidas a la RI consisten fundamentalmente en una disminución de los niveles de proteína debido a un aumento de los procesos de

catabolismo, y como consecuencia, a un incremento en la concentración de aminoácidos en sangre. En respuesta a la RI la célula β pancreática incrementa la secreción de insulina generando un estado de hiperinsulinemia compensatorio. La RI es además el eje central del síndrome metabólico, una condición clínica en la que confluyen otros factores de riesgo como obesidad central, dislipidemia e hipertensión arterial, y que se considera precursora de patologías como la DMT2 y las enfermedades cardiovasculares.

En el ámbito molecular se han propuesto diversos mecanismos que generan defectos en la vía de transducción de señales de la hormona insulina y que pueden conducir al desarrollo de RI. Algunos de estos mecanismos son por ejemplo, alteraciones en el receptor de insulina y la subsiguiente cascada de señalización (Tanti et al., 1994, Withers et al., 1998), la desensibilización del receptor de insulina (Dunaif et al., 1995, Zhou et al., 1999), inhibición de la actividad y/o expresión de los IRS (Araki et al., 1994, Laustsen et al., 2002), inhibición de las cascadas dependientes de la PI3K (Sopasakis et al., 2010) y defectos en la translocación del transportador de glucosa GLUT4 (Ryder et al., 2001) entre otros. También cabe señalar que la desregulación de la actividad de enzimas hepáticas disminuye la capacidad de la insulina para inhibir la producción de glucosa (Pessin and Saltiel, 2000).

Existen diferentes factores de riesgo que conducen a la RI como la obesidad, la inflamación, los ácidos grasos (lipotoxicidad), la disfunción mitocondrial o el estrés oxidativo. La obesidad se caracteriza por un exceso o una acumulación excesiva y general de grasa en el cuerpo. Esta acumulación de lípidos, especialmente los ácidos grasos, en otros tejidos diferentes al tejido adiposo se conoce como lipotoxicidad. El aumento del tejido adiposo se ha relacionado con el aumento de la infiltración de células del sistema inmunitario y su consecuente respuesta proinflamatoria (Sun et al., 2011) secretando citoquinas proinflamatorias que inducen a la RI. Otros factores desencadenantes de la RI son la disfunción mitocondrial y la formación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) que causan estrés oxidativo. La obesidad y la diabetes aumentan los niveles de ROS provocando alteraciones en la función mitocondrial (West, 2000). Aunque estos factores se han estudiado en muchas ocasiones de forma independiente, cada vez son más las evidencias que los interrelacionan. Así, la obesidad se caracteriza por un estado de inflamación crónico de bajo grado que se considera un componente clave en la RI. Además, la hipertrofia e hiperplasia del tejido adiposo asociadas a la obesidad pueden causar hipoxia, y la activación de distintas respuestas celulares entre las que se incluyen el estrés oxidativo (Kahn et al., 2006).

Además de la RI, en la DMT2 el fallo de la célula β es otro factor clave. En general es debida a defectos en la secreción de insulina y una reducción de la masa de

células β frente a la excesiva demanda en estados de RI. Entre los principales factores responsables de dicha disfunción destacan aspectos tales como la glucotoxicidad, la lipotoxicidad, el estrés oxidativo, el acúmulo de depósitos de amiloide y los procesos inflamatorios (Prentki et al., 2020).

La hiperglucemia crónica deteriora tanto la función como la viabilidad de las células β pancreáticas. Asimismo, se ha descrito que la hiperlipidemia podría alterar la capacidad secretora de las células β si bien existen ciertas discrepancias sobre el papel de los ácidos grasos sobre la expresión de insulina. Algunos estudios muestran que la elevación de ácidos grasos sólo tendría un efecto negativo sobre la función de la célula β en combinación con altas concentraciones de glucosa. Esta condición de elevación crónica de los niveles de glucosa y ácidos grasos recibe el nombre de glucolipotoxicidad (Prentki et al., 2002).

La glucolipotoxicidad conduce a una alteración de la expresión del gen de insulina, a una reducción de la secreción de insulina, y a un aumento de la apoptosis de células β todo ello sustentado por una serie de mecanismos que aún no han sido completamente descifrados. Uno de estos mecanismos es la disfunción mitocondrial progresiva que cursa acompañada de la producción de los radicales libres de oxígeno (ROS) a los que las células β son muy sensibles debido a que presentan un bajo contenido en enzimas antioxidantes. Los ROS provocan un estrés oxidativo en la célula β que terminará con la aparición del fallo de este tipo celular (Robertson et al., 2007). Otro mecanismo involucrado en la glucotoxicidad es el estrés de retículo (ER) que aparece por la alta demanda en la síntesis de la insulina. Esto conlleva un desequilibrio entre la secreción y la producción de insulina que acarreará el agotamiento celular y, por tanto, en el fallo de la célula β pancreática (Poitout and Robertson, 2002). Además, esta situación conduce a una acumulación de proteínas mal plegadas que serán autofagocitadas por la vía proteolítica mediada por chaperonas. También se han propuesto otros mecanismos que producen una disfunción de la célula β como la activación de vías antiinflamatorias, incrementando la liberación de citoquinas proinflamatorias (Mandrup-Poulsen, 2001), y la acumulación del polipéptido amiloide (del inglés, IAPP). Sin embargo, estos procesos aún no están bien esclarecidos. A término, todos estos mecanismos conducen a la vía de muerte celular programada. No obstante, la célula β presenta mecanismos de defensa con la capacidad de contrarrestar gran parte de las señales exógenas de muerte que está recibiendo. Por ello, el destino final de la célula resulta de la capacidad que tienen sus sistemas de defensa para contrarrestar el ataque.

4. DISRUPTORES ENDOCRINOS (EDCs) Y DIABETES MELLITUS

4.1 Definición y tipos de EDCs

Los disruptores endocrinos (en adelante, EDCs, del inglés *Endocrine Disrupting Chemicals*) se definen como compuestos químicos exógenos, o mezcla de ellos, que pueden interferir con el funcionamiento del sistema endocrino (Zoeller et al., 2012). Uno de los primeros ejemplos de la acción negativa de los EDCs en humanos lo encontramos en el dietiestilbestrol (DES) que causó daños graves en las hijas de mujeres que lo consumieron durante el embarazo. El DES es un estrógeno sintético que se prescribió a mujeres embarazadas para prevenir abortos espontáneos entre los años 40 y 70. Con el paso de los años se hizo evidente que las hijas de aquellas madres que habían tomado DES durante su embarazo padecían una mayor incidencia de cáncer de células claras de vagina, así como a otras anomalías del sistema reproductor. Efectos similares se han descrito también en las nietas de estas mujeres. Este hecho, junto con otras muchas evidencias sobre los efectos negativos de ciertos contaminantes ambientales en la fauna silvestre y en animales de laboratorio, hicieron crecer la preocupación entre la comunidad científica sobre el peligro de ciertos compuestos químicos. En el año 1991 se celebra la Conferencia de Wingspread (Wisconsin, EE.UU); conferencia en la que se reúne un grupo de expertos en endocrinología, biología reproductora y otras especialidades y en la que se acuña por primera vez el término de disruptor endocrino. Desde entonces, los datos experimentales y epidemiológicos han puesto de manifiesto el papel de ciertos disruptores en el origen de enfermedades tales como el cáncer, enfermedades del aparato reproductor, enfermedades metabólicas, problemas en el neurodesarrollo etc. En el año 2009, la “*Endocrine Society*” publica el primer informe científico sobre los disruptores endocrinos (Diamanti-Kandarakis et al., 2009). Este documento constituye una revisión exhaustiva sobre el concepto de disruptor, sus mecanismos de actuación, así como las evidencias en animales de laboratorio, en cultivos celulares, y estudios epidemiológicos en humanos sobre el efecto negativo de estos compuestos en la salud. En el año 2015, debido al incremento exponencial de la investigación sobre disruptores endocrinos se publica el segundo informe científico que revisa más de 1300 artículos científicos (Gore et al., 2015).

Los EDCs constituyen un grupo heterogéneo de compuestos químicos muy diferentes en origen, estructura y uso. Estos compuestos se encuentran en productos de uso común como por ejemplo pesticidas, herbicidas o fungicidas (p. ej. plaguicidas organoclorados), plásticos y resinas (bisfenol-A y ftalatos), emisiones de la industria química (dioxinas, bifenilos policlorados), retardantes de llama (polibrominados de bisfenol-A), disolventes (estireno, triclorobenceno), ingredientes de cosméticos (parabenos, triclosan), productos de limpieza (alquilfenoles) o utensilios de cocina (perfluorocarbonos) entre otros. Estos

EDCs se dividen en dos grandes grupos: contaminantes orgánicos persistentes (del inglés, *Persistent Organic Pollutants*, POPs), químicos que por su naturaleza lipofílica se pueden acumular en el tejido adiposo de los seres vivos, y que debido a sus propiedades físico-químicas son difícilmente biodegradables y se acumulan durante largos periodos del tiempo en el ecosistema; y el grupo de los disruptores endocrinos no persistentes que se metabolizan rápidamente en el cuerpo humano y cuya acumulación no es significativa aunque pueden ser compuestos de exposición continuada. Dentro de los contaminantes orgánicos persistentes se incluyen principalmente las dioxinas, los Policlorados Bifenilos (PCBs), pesticidas como el dicloro difenil tricloroetano (DDT), los perfluorocarburos (PFCs) y los retardantes de llama polibromados (PBDE). Dentro de los disruptores endocrinos no persistentes se encuentran los ftalatos, los parabenos, y el bisfenol-A (BPA) entre otros.

Dentro de la familia de los POPs, los ejemplos más destacados son:

- El TCDD catalogado como la dioxina clorada más potente que se encuentra en subproductos industriales no deseados. Este compuesto se genera fundamentalmente en procesos de combustión y procesos industriales (ej. en la incineración de residuos). Años atrás, se empleó para producir el Agente Naranja, un herbicida y defoliante muy utilizado durante la guerra de Vietnam por las fuerzas armadas estadounidenses (Schechter et al., 1995).
- Los PCBs, incluyen del orden de 209 tipos; son compuestos orgánicos sintéticos, ampliamente utilizados como plastificantes, en solventes de tinta, en equipos eléctricos etc.
- El DDT un pesticida organoclorado que se utilizó fundamentalmente como insecticida. En el año 70 el DDT fue prohibido, no obstante, debido a su carácter persistente sigue presente a niveles relativamente altos en muchas zonas del planeta (Fernández-González et al., 2015).
- Los PFCs, como el ácido perfluorooctanoico (PFOA) y sulfonato de perfluorooctano (PFOS) son también un ejemplo de POPs y se utilizan por sus propiedades antiadherentes e impermeabilizantes. Las principales fuentes de exposición a estos compuestos son la ropa y el calzado, muebles, utensilios de cocina y envases de alimentos entre otros (Coperchini et al., 2017).
- Los retardantes de llama (PBDE). Dentro de la familia de los PBDE se encuentra el tetrabromobisfenol A (TBBPA) uno de los disruptores más utilizados para preparar policarbonatos ignífugos. Estos se acumulan en el ambiente, en los sedimentos, en lodos de depuradoras y en el polvo de los hogares (Butt et al., 2014).

Dentro de los EDCs clasificados como no persistentes se incluyen los ftalatos como el bis (2-etilhexilo) (DEHP), el DIDP (ftalato de diisodecilo) y el DINP (ftalato de diisononilo). El DEHP es un plastificador muy utilizado en la fabricación del PVC. Está presente en chupetes, en juguetes infantiles, en envases de alimentos, en instrumental médico etc (Wang et al., 2019). Los parabenos son otro grupo de EDCs no persistentes que se utilizan habitualmente en la industria cosmética y en la industria alimentaria. Uno de los más utilizados es el propilparabeno que se encuentra en champús, cremas hidratantes y geles para el afeitado entre otros productos (Nowak et al., 2018). Otra familia son los alquilfenoles, como el p-nonilfenol que está presente en los productos de limpieza como los detergentes (Soares et al., 2008). Por último, el BPA, nuestro EDC de estudio, es un componente orgánico sintético ampliamente utilizado en la fabricación de plásticos policarbonatados y resinas epoxi. Se encuentra frecuentemente en envases de alimentos, en botellas de agua, en latas de conserva, en implantes dentales, en el papel térmico etc (Pjanic, 2017).

Como se puede observar, los EDCs se encuentran ampliamente extendidos en nuestro día a día y tienen una importante presencia medioambiental. Nos encontramos en constante exposición a estos compuestos ambientales por vía oral, a través de la ingesta de alimentos y bebidas, así como por otras vías como la inhalatoria, debido a la presencia de los EDCs en los gases y partículas del aire, y también a través de la vía dérmica (Gore et al., 2015). Los niveles de exposición de EDCs en humanos han sido objeto de investigación por varios autores. Además, el Centro de Control y Prevención de enfermedades (siglas del inglés, CDC) biomonitoriza la presencia de EDCs en la sangre y orina de la población estadounidense adulta. En 2019 se publicó el último informe donde se observaba la presencia de niveles detectables de varios EDCs altamente extendidos. Entre ellos se encontraban los retardantes de llama polibromados (PBDE) que se acumulan en el tejido adiposo. En concreto, el PBDE llamado BDE-47 se encontró en el suero de todos los participantes y los niveles medios fueron de 20.5 ng/g. Con respecto a los compuestos perfluorocarburos (PFCs), el ácido perfluorooctanoico (PFOA) se encontró en la mayoría de las muestras analizadas (> del 99%) y sus niveles medios encontrados en el suero fueron de 3.09 µg/L. Por lo que refiere al BPA se observó en más del 92.6 % de las muestras de orina de la población estadounidense en concentraciones medias de 1.87 µg/L, con concentraciones más elevadas en niños 2.29 µg/L respecto a los adultos 1.88 µg/L (<https://www.cdc.gov/exposurereport/index.html>). En cuanto a los niveles proporcionados por la EFSA (*European Food Safety Authority*), la concentración de BDE-47 en el suero fue de 0.16-7 ng/g. Con respecto al PFOA se encontraron niveles en el suero de los adultos de 2.1 µg/L. Los niveles observados de BPA en muestras de orina en los estudios europeos fueron de 1.1–3.6 µg/L (<http://www.efsa.europa.eu/>).

Además, la presencia de EDCs también se ha detectado en la placenta, en el líquido amniótico y en la sangre del cordón umbilical. En la placenta y en el cordón umbilical se han observado niveles similares de diferentes POPs como DDE (0.08 ng/g), varios PCBs (0.03 ng/g hasta 0.12 ng/g) y PBDEs en concentraciones muy pequeñas (inferiores a 0.010 ng/g) (Leino et al., 2013, Vizcaino et al., 2014). En cuanto al BPA, también se ha demostrado su presencia en la placenta, en la sangre neonatal, en el fluido amniótico, en la leche materna y en la sangre del cordón umbilical en niveles de ng/mL que se detallarán más adelante (Vandenberg et al., 2007).

4.2 Mecanismos de actuación de los EDCs

Los EDCs pueden interferir con el funcionamiento del sistema endocrino a través de varios mecanismos. Así, pueden mimetizar los efectos de hormonas naturales como el estradiol, la testosterona o las hormonas tiroideas, antagonizar la acción hormonal (antiestrógenos o antiandrógenos), alterar el patrón de síntesis y metabolismo hormonal y/o modificar los niveles de receptores hormonales (Gore et al., 2015). Muchos EDCs actúan a través de receptores nucleares, a través de su acción clásica como factores de transcripción, o a través de vías de señalización alternativas iniciadas fuera del núcleo (Nadal et al., 2001, De Coster and van Larebeke, 2012). A continuación, se describen los mecanismos de señalización más comunes.

Los EDCs actúan uniéndose a receptores hormonales, la mayoría de los cuales pertenecen a la gran familia de los receptores nucleares. Los receptores nucleares a los que se unen los EDCs incluyen los receptores de estrógenos (ERs), receptores de andrógenos (ARs), receptores de glucocorticoides (GR), receptores de hormona tiroidea (TRs), los receptores activados por proliferadores peroxisómicos (PPARs), el receptor X retinoide (RXR) y aún por esclarecer mejor, los receptores que detoxifican compuestos xenobióticos como el receptor X de pregnano (PXR) y el receptor constitutivo de androstano (CAR). Hay que destacar que no todos los receptores nucleares residen en el núcleo, muchos de ellos tienen una localización extranuclear, encontrándose también en el citosol, asociados a la membrana plasmática y en organelas como la mitocondria. Este es el caso de ER α y ER β , nuestros receptores de estudio, que se ubican tanto fuera como dentro del núcleo.

Los EDCs pueden activar vías de señalización clásicas a través de su unión a receptores nucleares específicos. Tras la unión a los receptores, estos forman homodímeros o heterodímeros que se unirán a los promotores de los elementos de respuesta a estrógenos (ERE). Existen múltiples mecanismos de señalización que median los efectos de los EDCs a través de los receptores nucleares (figura

3). Estos compuestos químicos pueden actuar como agonistas o antagonistas directos, ocupando el lugar del ligando endógeno. Cuando actúan como agonistas van a reclutar moléculas llamadas coactivadores, desencadenando la activación de la transcripción génica (figura 3a). En cambio, cuando actúan como antagonistas, se van a producir cambios conformacionales que permiten el reclutamiento de los correpresores y la inhibición de la transcripción génica (figura 3b). Además, existen mecanismos indirectos, como la unión de los EDCs a diferentes receptores a la vez. Por ejemplo, la unión a un receptor (NR2) va a producir alteraciones en otro receptor (NR1), a través de interacciones moleculares, como la competencia por los activadores o por los sitios de unión al ADN (figura 3c y e). Otro mecanismo indirecto, es la unión de NR1 y NR2 al mismo gen, produciendo sinergismos o inhibiciones en la expresión génica (figura 3d). El último mecanismo indirecto conocido es la unión a NR2, que resulta en la degradación de NR1 a través de la activación del proteasoma (figura 3f) (Casals-Casas and Desvergne, 2011). Por tanto, a través de estos mecanismos, los EDCs pueden desencadenar la activación, el bloqueo, la alteración de la síntesis y la degradación de las hormonas naturales, además de alterar procesos de señalización celular entre otros efectos.

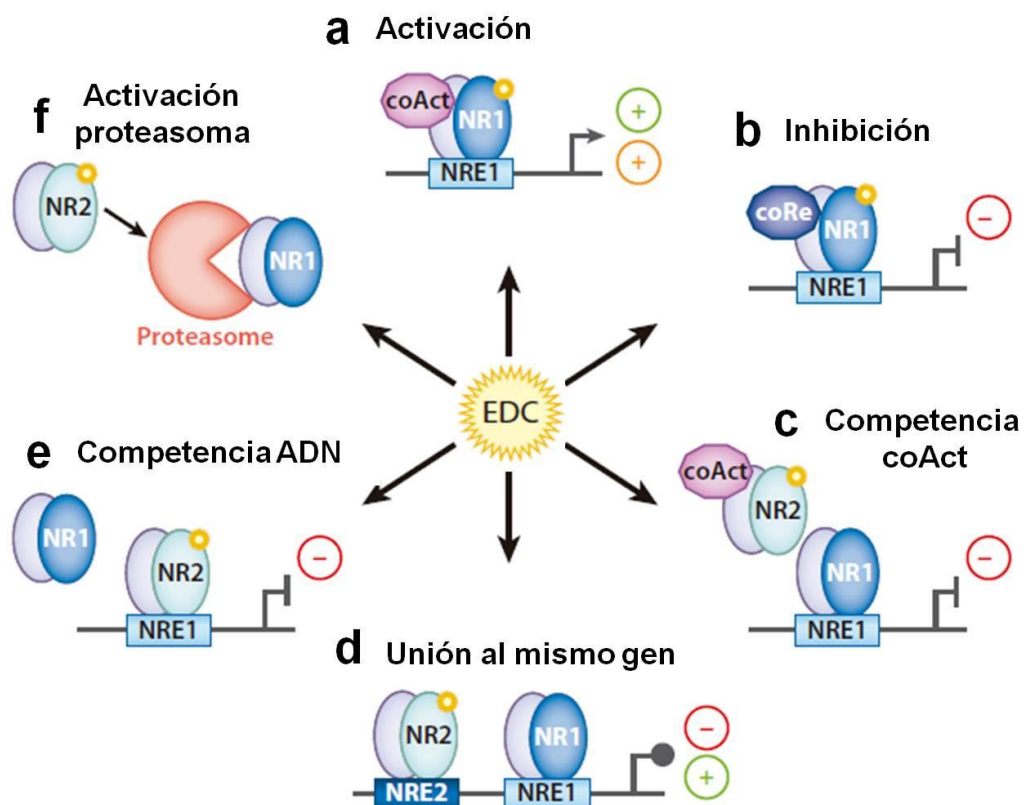


Figura 3. Esquema general de los múltiples mecanismos de actuación de los disruptores endocrinos (EDCs) sobre los receptores nucleares (NR). Imagen modificada de (Casals-Casas and Desvergne, 2011).

Así, existen diferentes EDCs que actúan mimetizando la acción de los estrógenos como algunos PCBs, PBDEs, ftalatos y el BPA, a través de la activación de ERs (Hu et al., 2011, Takeuchi et al., 2011, Vom Saal et al., 2012). Sin embargo, algunos de estos compuestos que se unen a los ERs pueden promover también efectos antiestrogénicos como algunos PBDEs y PCBs (Hamers et al., 2006, Oh et al., 2007). La mayoría de EDCs que se unen al receptor androgénico (AR) tienen efectos antiandrogénicos, es por ejemplo el caso de varios PCBs y del DDE (Bonefeld-Jørgensen et al., 2001, Orton et al., 2011). Además, muchos EDCs también interaccionan con el receptor de la hormona tiroidea, contribuyendo a la disrupción de la función tiroidea como el BPA, algunos PBDE y los PFCs (Hofmann et al., 2009). En el caso del BPA, este es capaz de interaccionar con otros receptores nucleares como los PPARs (Riu et al., 2011) y PXR/CAR actuando como un agonista (Sui et al., 2012). Como se puede observar, un mismo disruptor endocrino puede interferir con diferentes receptores nucleares ejerciendo efectos diversos.

Otros mecanismos de actuación de los EDCs incluyen la unión a los receptores nucleares y la posterior activación de vías de señalización iniciadas fuera del núcleo. Estas vías alternativas pueden ser iniciadas en la membrana, en el citoplasma, y en la mitocondria; y dar lugar a efectos muy diversos como la modulación de la actividad de canales iónicos, la activación de cascadas de señalización en el citoplasma y/o la regulación de la expresión de genes (Hammes and Levin, 2011). Algunos EDCs utilizan esta vía de señalización para promover efectos rápidos (desde segundos a minutos) no genómicos. Este es el caso de los alquilfenoles y de pesticidas organoclorados que provocan acciones no genómicas, a través de receptores extranucleares, activando la vía de las quinasas reguladoras extracelulares (ERKs). Esta vía de transducción de señales activada por alquilfenoles y pesticidas organoclorados, provoca cambios en la proliferación celular, la secreción de prolactina o la liberación de calcio intracelular en las células tumorales pituitarias y en la línea celular prolactinoma (Bulayeva and Watson, 2004, Wozniak et al., 2005). Otros estudios han descrito efectos rápidos ocasionados por el DDT en células musculares lisas que conducen a la activación de canales de calcio y de potasio (Ruehlmann et al., 1998). En cuanto al BPA y al DES, estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio demostraron que ambos compuestos son capaces de desencadenar acciones rápidas no genómicas en islotes de Langerhans, provocando modificaciones en la señal de calcio intracelular a través de la activación de receptores de estrógenos extranucleares (Nadal et al., 2000, Alonso-Magdalena

et al., 2005, Nadal et al., 2009). Este fenómeno se abordará de manera más extensa cuando nos refiramos al BPA. Las acciones extranucleares desencadenadas por los receptores extranucleares también pueden alterar la expresión génica. Por ejemplo, en líneas celulares humanas de cáncer de mama, el DDT y el β -HCB activan receptores de estrógenos fuera del núcleo, lo que pone en marcha la cascada de señalización de las ERKs y conlleva la regulación de genes diana mediante la activación de factores de transcripción (Silva et al., 2010).

Por otro lado, se ha visto que algunos EDCs como el BPA y los PBDEs también son capaces de unirse a receptores de otras familias como al receptor de hidrocarburos de arilo (AhR), perteneciente a la familia de los factores de transcripción con dominio bHLH-PAS (del inglés, *basic helix loop helix*), que regulan enzimas implicadas en el control del metabolismo hormonal (Puga et al., 2009).

Otra característica importante de los EDCs es que no siguen un patrón de respuesta lineal (mayor dosis, mayor efecto), sino que, la relación dosis-respuesta sigue, en muchos casos, un patrón no monotónico en forma de U o de U invertida (Vandenberg et al., 2012). De este modo, es común observar efectos negativos de EDCs a dosis bajas que no son visibles cuando las dosis de exposición aumentan. En este sentido, los efectos a dosis bajas de los EDCs se definen como aquellos que producen cambios biológicos cuando ocurren en el rango típico de las exposiciones humanas, o bien, tienen lugar a dosis más bajas que las ensayadas en los estudios de toxicología clásicos (Melnick et al., 2002). Dentro del concepto de bajas dosis, también se hace referencia a dosis por debajo del nivel de efecto más bajo observado para una alteración biológica (del inglés, LOAEL) (Welshons et al., 2006) y, a aquellas dosis administradas a un animal que producen concentraciones sanguíneas del EDC en el mismo rango medido en los estudios de exposición humana (dosis medioambientalmente relevantes) (Vandenberg et al., 2007).

5. BISFENOL-A

5.1 Características químicas del BPA

El BPA es un monómero que se utiliza, fundamentalmente, en la fabricación de plásticos, así como en la producción de resinas epoxi. Como se ha mencionado anteriormente, se encuentra en un gran número de productos cotidianos: en envases de alimentos, en botellas de agua, en latas de conserva, en implantes dentales, en el papel térmico (ej. los tiques de la compra), en juguetes infantiles, electrodomésticos, aparatos electrónicos y muchos otros. Fue sintetizado por primera vez por Dianin en 1891 y en el año 1936 fue identificado como un

estrógeno sintético (Doods and Lawson, 1936). En los años 50 se introdujo en la industria del plástico, y actualmente, su fabricación alcanza grandes volúmenes con una producción que ascienden a la cifra de 6 mil millones de toneladas cada año. Además, en la producción anual se liberan más de 100 toneladas a la atmósfera (Vandenberg et al., 2009). El BPA se ha detectado en el agua, en el aire y en el suelo. En los ambientes marinos, el BPA está presente debido a la migración de este compuesto desde los productos desechados en vertederos que no son reciclados y de las aguas residuales (Kang et al., 2007).

La estructura química del BPA está compuesta por dos anillos fenoles enlazados al segundo carbono de una molécula de propano (4,4'-(propano-2,2-diil)difenol). Se tiene constancia de que en presencia de altas temperaturas o en respuesta a cambios bruscos de pH, el enlace éster entre los monómeros de BPA se rompe, y se libera del polímero de policarbonato pasando a estar en contacto con el agua y la comida (figura 4). El BPA también se utiliza como plastificador en otros tipos de plásticos, como el PVC. Aquí no está unido covalentemente, sino por uniones más débiles, tipo puentes de hidrógeno o fuerzas de van der Waals, por ello migra incluso con más facilidad que desde el plástico de policarbonato (López-Cervantes and Paseiro-Losada, 2003). La alimentación constituye una de las principales fuentes de exposición humana al BPA, si bien las vías dermal o inhalatoria también juegan un papel importante (Schechter et al., 2010, Hehn, 2016).

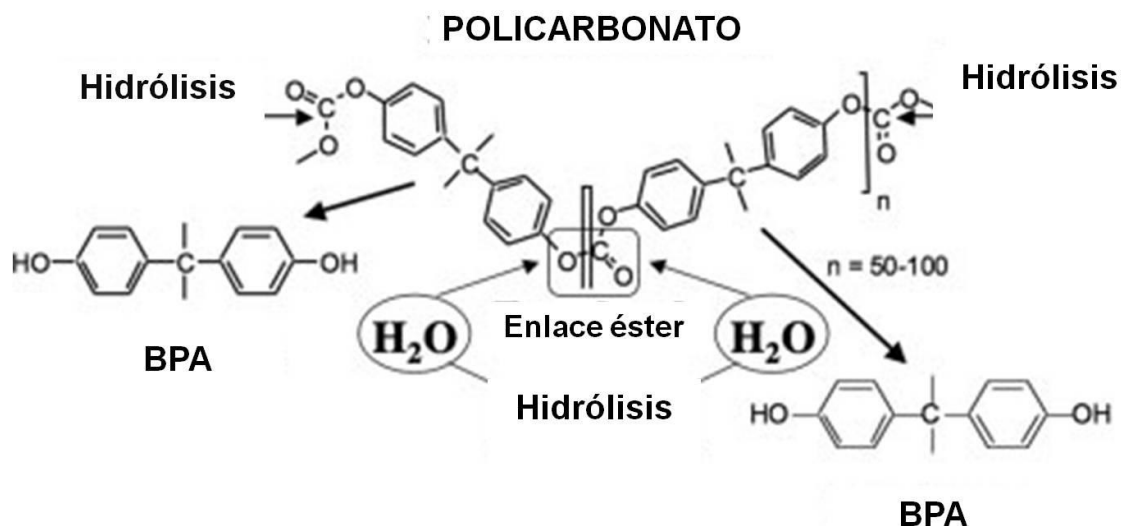


Figura 4. Diagrama esquemático de la hidrólisis del enlace éster entre los monómeros de BPA que forman el plástico de policarbonato. Imagen modificada de (Welshons, Nagel, and vom Saal 2006).

Una de las características del BPA es su rápida metabolización después de la ingesta hacia compuestos conjugados inactivos, como el BPA-glucurónido y el

BPA-sulfato. Hay que destacar que los procesos de metabolismo y excreción del BPA presentan diferencias entre distintas especies. En humanos predominan las formas de BPA conjugadas con respecto al BPA libre (no conjugado) y estas formas conjugadas de BPA se excretan principalmente a través de la orina, mientras que en roedores la mayor parte del BPA se excreta a través de las heces (Völkel et al., 2002, Kurebayashi et al., 2003, Vandenberg, et al., 2007).

Debido a la alta presencia del BPA en el medioambiente, prácticamente la totalidad de la población se encuentra expuesta, como demuestra el hecho de que el BPA se detecte en la orina del 93 % de personas estadounidenses examinadas (Calafat et al., 2005). Asimismo, se ha detectado la presencia de BPA en el suero humano a concentraciones en el rango 0.2-1.6 ng/mL (0.88-7.0 nM) (Sajiki et al., 1999, Takeuchi and Tsutsumi, 2002). Estos datos sugieren que a pesar de su rápida metabolización y excreción existe una exposición continua al BPA. Aunque el BPA no es considerado un contaminante persistente también hay evidencias que indican que el BPA puede acumularse en el tejido adiposo humano (Fernandez et al., 2007, Rubin and Soto, 2009). No solamente se ha detectado su presencia en el suero humano sino también en otros tejidos como en el cordón umbilical, en el fluido amniótico, en la sangre materna, en la sangre de los neonatos y en la leche materna en concentraciones de 0.28 hasta 8.3 ng/mL. Además, se han detectado concentraciones más elevadas en la placenta (11.2-104.9 ng/g). La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (siglas en inglés, EPA) y la Administración de Alimentos y Medicamentos (siglas en inglés, FDA) han establecido como segura, la dosis diaria de exposición al BPA de 50 µg/kg/día, basándose en estudios tradicionales de toxicología. En cambio, la autoridad homóloga en Europa de Seguridad Alimentaria (siglas en inglés EFSA) estableció el límite tolerable de exposición en 10 µg/kg/día basándose en las numerosas evidencias de estudios que demostraban efectos perjudiciales del BPA a dosis por debajo de la establecida por la EPA. Recientemente, la EFSA ha modificado sus recomendaciones estableciendo el límite tolerable de exposición en 4 µg/kg/día (EFSA 2015). No obstante, el establecimiento de los límites tolerables de exposición diaria a BPA, sigue siendo un punto no exento de controversia.

5.2 Efectos de la exposición a BPA durante el desarrollo: implicaciones para el desarrollo de la DMT2.

El desarrollo es definido en términos generales, como el periodo que se extiende desde la preconcepción hasta la infancia y la adolescencia. Perturbaciones ambientales durante el desarrollo prenatal y postnatal como pueden ser las alteraciones en la nutrición, el estrés y la exposición a EDCs juegan un papel clave en el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas cuando el individuo en

desarrollo alcanza la vida adulta (Heindel et al., 2015). Esta premisa tiene su origen en la “hipótesis del origen temprano de las enfermedades en la edad adulta” planteada por Barker, Hales y colaboradores, y establece que la exposición a estímulos adversos, durante períodos críticos de la vida fetal, puede causar modificaciones estructurales y/o funcionales que originan consecuencias permanentes en el individuo (Hales and Barker, 1992). Este concepto fue posteriormente ampliado a otros periodos de plasticidad del desarrollo como el período postnatal temprano sentando las bases de la teoría de los Orígenes del Desarrollo de la Salud y la Enfermedad (DOHaD) (Osmond and Barker, 2000, Moor and Davies, 2001).

A principio de los años noventa, un estudio llevado a cabo en Hertfordshire, Inglaterra, evidenció por vez primera que las personas con bajo peso al nacer tenían una mayor prevalencia de DMT2 en su vida adulta (Barker and Osmond, 1986, Barker et al., 1993). Posteriormente, los estudios en modelos animales de experimentación mostraron como estados de malnutrición durante el periodo gestacional pueden conducir al desarrollo de alteraciones en la homeostasis de la glucosa como intolerancia a la glucosa, cambios en la masa de la célula β pancreática y en última instancia al desarrollo de la DMT2 en la descendencia cuando alcanza la vida adulta (Garofano et al., 1997).

Más recientemente, se ha puesto de manifiesto que ciertos contaminantes ambientales como los EDCs, son también factores que pueden interferir con la programación metabólica fetal. Numerosos estudios en animales han demostrado que la exposición al BPA durante la gestación conduce a alteraciones metabólicas en la descendencia produciendo efectos adversos en el balance energético y la homeostasis de glucosa.

En el año 1999, Howdeshell y colaboradores observaron por primera vez que el tratamiento de ratonas gestantes con BPA a través de la alimentación, a una dosis de 2.4 $\mu\text{g/kg}$ durante los días 11 a 17 de gestación, producía en la descendencia un aumento de peso corporal en el día 22 postnatal. Curiosamente, el efecto dependía de la posición del feto de modo que el incremento era mayor cuando el feto estaba situado entre dos fetos hembra (Howdeshell et al., 1999). Se observaron efectos similares cuando la exposición de BPA se producía a través del agua de bebida. Así, en experimentos realizados en rata, exposiciones orales a bajas dosis de BPA, (0.1 mg/kg/día) desde el día 6 de gestación hasta el final de la lactancia evidenciaron un aumento en el peso corporal de las crías, tanto en machos como en hembras, siendo además el efecto dosis dependiente (dosis altas no producían efectos en el peso corporal) (Rubin et al., 2001). Asimismo, la administración de BPA a la dosis de 1 mg/L en el mismo tiempo de exposición que en el estudio anterior, condujo a un incremento de la adipogénesis, del peso corporal y de la expresión de genes lipogénicos como PPAR γ , SREBP-1C y SCD-1 en las crías hembras al momento

del destete (Somm et al., 2009). Cabe destacar que, los efectos de la exposición al BPA durante la gestación no se restringen a cambios en el peso corporal, sino que incluyen alteraciones claves en el desarrollo de la DMT2 y síndrome metabólico. En el año 2010, nuestro laboratorio demostró por primera vez que la exposición intraútero a dosis de BPA de 10 µg/kg/día, entre los días 9 a 16 de gestación, provocaba en la descendencia masculina un estado de hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina a los seis meses de edad (Alonso-Magdalena et al., 2010). En estudios posteriores, Angle y colaboradores mostraron como la administración de BPA durante el periodo gestacional y lactancia, en un rango de dosis de 5 a 50000 µg/kg/día, conducía a un aumento del peso corporal, incremento del número de adipocitos y volumen de grasa abdominal, intolerancia a la glucosa y alteración de los niveles de leptina, insulina y adiponectina en la descendencia (Angle et al., 2013). Ese mismo año, se publicó un estudio en el que se analizaban los efectos del BPA en diferentes ventanas de exposición incluyendo el estado de preimplantación, fetal y/o neonatal. Los resultados mostraron un deterioro de la tolerancia a la glucosa en la descendencia masculina a la edad de 3 meses tras la exposición *in utero* a BPA, fenómeno que persistió a la edad de 8 meses en aquellos ratones macho que habían estado expuestos a BPA durante la etapa fetal (Liu et al., 2013).

Además, se observó que, cuando se combinaba la exposición prenatal a BPA con una dieta rica en grasa se producía un agravamiento de las alteraciones metabólicas descritas anteriormente. Por ejemplo, la secreción de insulina estimulada por glucosa se veía claramente disminuida en los grupos tratados con BPA junto con una dieta rica en grasa en relación a los grupos control (García-Arevalo et al., 2014). En ratas, también se demostró que la combinación de la exposición intraútero a BPA con una dieta rica en grasas exacerbaba la disfunción de la célula β pancreática (Wei et al., 2011, Ding et al., 2014). Resultados similares se han encontrado en modelos superiores como en el caso de la oveja. En esta especie, la exposición prenatal a BPA junto con modelos de sobrealimentación condujo a alteraciones metabólicas que se agravaban en el periodo postnatal (Veiga-Lopez et al., 2016).

En algunos estudios no se han observado efectos negativos del BPA sobre el metabolismo de los animales en su vida adulta. Este es el caso del trabajo realizado por Ryan y colaboradores, en el que ratonas gestantes fueron expuestas a BPA (1 ppb) a través de la dieta desde el día 0 embrionario hasta el momento del destete. Los autores observaron que los ratones descendientes que habían sido expuestos a BPA intraútero presentaban un mayor peso corporal y una mayor longitud en el destete, pero las diferencias de peso con respecto a los animales control desaparecieron en el estado adulto. No encontraron efectos sobre la tolerancia a la glucosa ni a las ocho ni a las quince semanas de edad,

si bien cabe destacar que no se analizaron otros parámetros metabólicos fundamentales como la sensibilidad a la insulina o la secreción de insulina. Tampoco se analizaron posibles cambios a edades más tardías a las que se pusieron de manifiesto anomalías metabólicas en otros estudios citados anteriormente (Ryan et al., 2010). Hay que mencionar que la dosis administrada, la cepa utilizada, el sexo de los animales, la alimentación y el tiempo de exposición son factores clave que podrían explicar diferencias entre estudios (Richter et al., 2007).

Por otro lado, en nuestro laboratorio también se ha demostrado que la exposición a BPA durante la preñez, no solo tiene consecuencias metabólicas para la descendencia, sino también complicaciones en la madre a corto y largo plazo. Mediante una serie de experimentos realizados en ratonas gestantes mostramos que, el tratamiento con una dosis de BPA de 10 µg/kg/día durante los días nueve a dieciséis de gestación, provocaba una profunda alteración de la tolerancia a la glucosa y un empeoramiento de la resistencia a la insulina característico de la preñez. Observamos, además, que estas alteraciones metabólicas remitían tras el parto, pero que a los cuatro meses postparto dichas alteraciones volvían a ponerse de manifiesto. Seis meses después del parto las ratonas que habían sido expuestas a BPA durante la gestación mostraban una marcada resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa y sobrepeso. Además, a los siete meses observamos una clara disfuncionalidad de la célula β pancreática (Alonso-Magdalena et al., 2010, Alonso-Magdalena et al., 2015).

Otro aspecto importante a destacar es que los cambios inducidos por la exposición temprana a EDCs pueden ser heredables y, por tanto, transmitirse a las siguientes generaciones a pesar de que éstas pueden no haber estado expuestas de manera directa a estas sustancias. Los cambios pueden ser transmitidos mediante herencia multigeneracional o transgeneracional. La herencia multigeneracional se produce cuando los cambios se transmiten por contacto directo a la exposición de EDCs. En este sentido, los cambios observados en la primera generación (F1) y en la segunda generación (F2) tras la exposición de una mujer embarazada (F0) a EDCs son transmitidos por herencia multigeneracional, ya que el embrión (F1) y sus células germinales (F2) han estado presentes en el momento de la exposición. En cambio, la herencia transgeneracional se define como los cambios que se transmiten sin haber estado en contacto directo a la exposición de EDCs. Un ejemplo de herencia transgeneracional son los cambios observados en la tercera generación (F3) (Skinner, 2008) (figura 5).

Un mecanismo clave en la transmisión de los cambios inducidos por la exposición temprana a EDCs reside en la aparición de cambios epigenéticos (Jirtle and Skinner, 2007, Skinner et al., 2010). Los cambios epigenéticos se definen como

cambios heredables en la expresión génica que ocurren sin cambios en la secuencia del ADN. Los principales mecanismos de regulación epigenética son: metilación de histonas y ADN, acetilación de histonas, ubiquitinación, sumoilación, fosforilación, glucosilación y regulación de elementos de ARN no codificantes; si bien los cambios en el patrón de metilación y acetilación han sido estudiados en mayor profundidad. Estudios recientes en ratones de la cepa C57BL/6J, demostraron que la exposición perinatal a BPA, desde dos semanas antes de la cópula hasta el momento del destete de las crías, conducía a una alteración de la secreción de insulina estimulada por glucosa (GSIS), la masa de célula β y la viabilidad celular entre otros procesos, en las generaciones F1 y F2. Cabe destacar que estos efectos multigeneracionales eran dependientes de la dosis de exposición y el sexo de los animales. Así, se observó que la exposición al BPA alteraba la secreción de insulina en los machos F1 y F2, pero no en las hembras. También observaron efectos dependientes de la dosis de BPA en los islotes de Langerhans, de modo que la dosis más alta testada (10 mg/kg/día) alteraba la función mitocondrial, mientras que la dosis más baja (10 μ g/kg/día) producía una disminución de la masa de célula β y un incremento de la apoptosis de este tipo celular que persistía hasta la generación F2 (Bansal et al., 2017). Dichos cambios se relacionaron de manera directa con un aumento de metilación del gen llamado factor de crecimiento similar a la insulina 2 (*Igf2*) en islotes de Langerhans (Susiarjo et al., 2015). Asimismo, el desarrollo de intolerancia a la glucosa y disfunción de las células β pancreáticas en la F2 macho ha sido relacionado con una disminución de la expresión de *Igf2* y *H19* y una hipermetilación de *Igf2* en islotes de rata (Mao et al., 2015). Además, también se han evidenciado efectos transgeneracionales en la generación F3 por la exposición perinatal de BPA en la F0. Un estudio de Bansal y colaboradores demostró que exposiciones prenatales a BPA producían aumento en el peso corporal, disminución en la masa de la célula β a la dosis más a baja de BPA y alteraciones en la secreción de insulina estimulada por glucosa en los machos de la generación F3. En las hembras F3 no se observaron cambios significativos en estos parámetros, por lo que se concluyó que los efectos del BPA sobre la F3 también eran dependientes del género de los animales (Bansal et al., 2019).

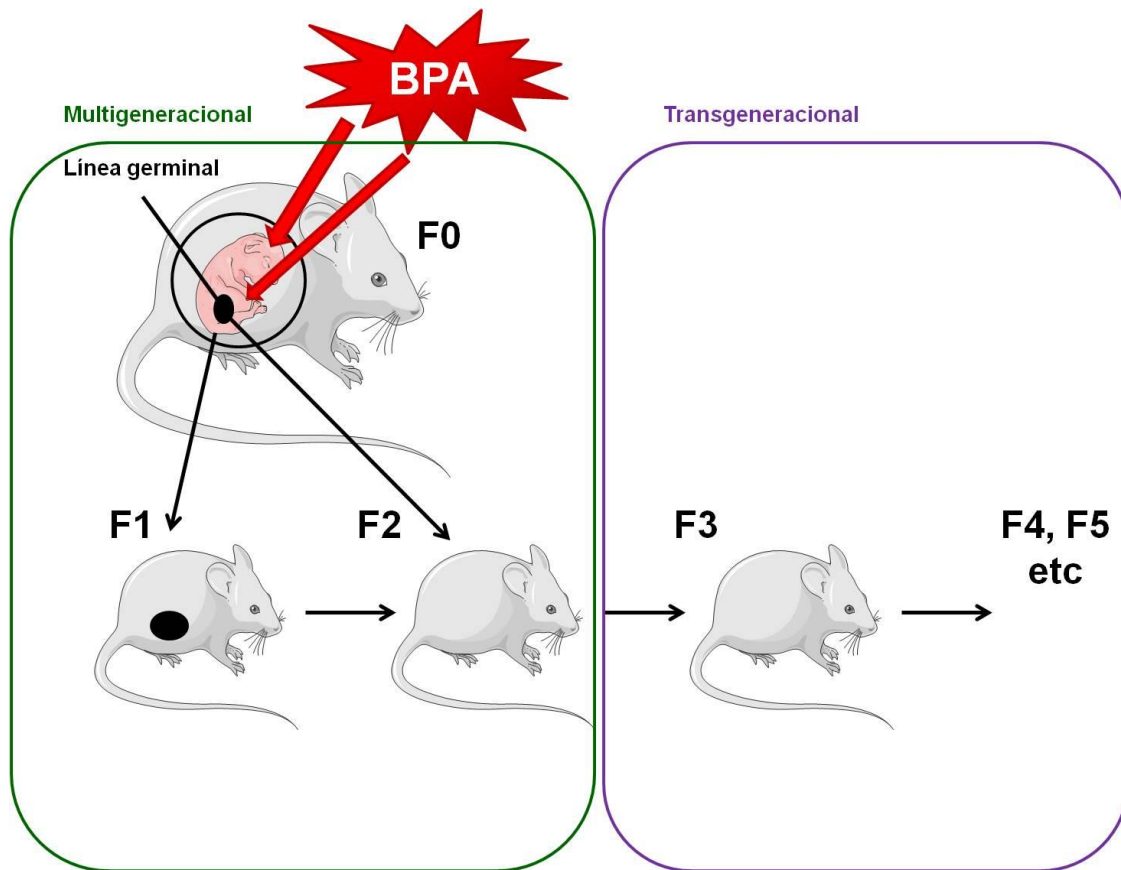


Figura 5. Representación esquemática de los efectos multigeneracionales y transgeneracionales tras la exposición gestacional del BPA en F0.

Numerosos estudios epidemiológicos han demostrado una correlación positiva entre la concentración de BPA en la orina y el desarrollo de DMT2. Una de las primeras investigaciones en corroborar dicha relación se llevó a cabo en el marco del programa del Centro Nacional de Estadísticas de Salud, NHANES (Encuesta Nacional de Examen de Salud y Nutrición) que biomonitorizaba la presencia de BPA en la orina de la población estadounidense adulta (Silver et al., 2011). Otros autores también demostraron esta asociación directa entre niveles de BPA y la incidencia de la DMT2 en la población adulta de los Estados Unidos (Lang et al., 2008), así como la correlación entre la concentración de BPA y el desarrollo de la resistencia a la insulina en la población adulta de China (Wang et al., 2012). En el año 2014 se demostró que la asociación entre el BPA y la resistencia a la insulina presentaba diferencias en cuanto al género de los individuos analizados; siendo mucho más evidente en los hombres que en las mujeres (Beydoun et al., 2014). Además, esta evidencia epidemiológica del comportamiento diabetogénico del BPA no solo se observó en los adultos, sino que también se observó en niños y adolescentes. Se encontraron asociaciones entre niveles de BPA en la orina y el incremento de la obesidad en edades tempranas, así como

aumentos en el índice de masa corporal (Trasande et al., 2012, Wang et al., 2012).

Todos estos datos mostrados ponen de manifiesto que el disruptor endocrino, BPA, puede ser un factor importante en la programación metabólica de desórdenes metabólicos como la DMT2.

6. MECANISMOS MOLECULARES DE ACCIÓN DEL BPA

El BPA actúa fundamentalmente como un xenoestrógeno, es decir como un estrógeno artificial, a través de la activación de receptores de estrógenos. De este modo se ponen en marcha una gran variedad de vías de señalización que pueden producir diferentes respuestas celulares. Estas vías de señalización se dividen en vías clásicas y vías alternativas. En las vías de señalización clásicas, el BPA se une a los receptores de estrógenos que actúan como factores de transcripción nucleares. De esta manera, el BPA es capaz de unirse a los receptores ER α y ER β localizados en el citosol o en el núcleo celular, produciendo cambios conformacionales en la estructura ligando-receptor. Este complejo ligando receptor permite la unión a sitios específicos del ADN, llamados elementos de respuesta a estrógeno (siglas del inglés, ERE). Estos ERE se encuentran entre las regiones promotoras de los genes. La unión de los ERs sobre los ERE produce el control de la regulación génica (Matthews et al., 2001). Además, cabe mencionar que en este proceso también intervienen diferentes correguladores (coactivadores o correpresores) que son específicos de cada tejido e interaccionan de diversas formas según los genes diana y según el ER en cuestión (Klinge, 2000, Routledge et al., 2000). La actuación del BPA a través de estas vías clásicas nucleares induce acciones genómicas con cambios en la expresión génica. En cuanto a las vías de señalización alternativas del BPA, éstas son mediadas por receptores ER α y ER β extranucleares, anclados a la membrana plasmática o presentes en el citoplasma. También existen otros receptores transmembrana asociados a la proteína G, como el GPER que pueden mediar efectos del BPA fuera del núcleo (Thomas and Dong, 2006). Estas vías de señalización extranucleares iniciadas por el BPA regulan diferentes mecanismos celulares como la modulación de la actividad de canales iónicos y la activación de cascadas de señalización en las que participan distintas quinasas (Nadal et al., 2005, Soriano et al., 2016), dando lugar a respuestas rápidas no genómicas que pueden durar desde segundos a minutos. Además, el BPA a través de estas vías extranucleares también puede modificar procesos de transcripción génica a través de la activación de distintas cascadas de señalización (Farach-Carson and Davis, 2003, Alonso-Magdalena et al., 2008, Wong et al., 2010, Li et al., 2010).

Cabe destacar que el BPA, tradicionalmente, se clasificó como un xenoestrógeno débil debido a que su afinidad de unión por los receptores ER α y ER β era de 1000 a 10.000 veces menor que la de la hormona natural, el 17 β -estradiol (Kuiper et al., 1997). Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado que el BPA puede ejercer efectos con la misma potencia que el 17 β -estradiol a través de las vías iniciadas fuera del núcleo o vías alternativas (Nadal et al., 2000, Quesada et al., 2002, Bulayeva et al., 2004, Zsarnovszky et al., 2005).

A continuación, se describe brevemente los efectos del BPA sobre la célula β pancreática, así como los mecanismos de señalización subyacentes a través de los receptores de estrógenos:

En el año 2000, nuestro grupo de investigación demostró que las células β pancreáticas expresaban los receptores de estrógenos ER α y ER β los cuales se localizaban tanto en la membrana plasmática como en el citosol (Nadal et al., 2000, Alonso-Magdalena et al., 2008). Mediante experimentos realizados *ex vivo* observamos que el tratamiento del islote de Langerhans durante 48 horas, con la hormona 17 β -estradiol o BPA, a las mismas dosis (100 pM-10 nM), producía un marcado aumento en el contenido de insulina que era dependiente de ER α . En el caso del 17 β -estradiol se demostró, además, que dicho incremento se producía a través de un mecanismo de señalización que incluía activación de ERK1/2 quinasas, fosforilación del factor de transcripción NeuroD1 y posterior sobreexpresión del gen que codifica para la insulina (Alonso-Magdalena et al., 2008, Wong et al., 2010). Se demostró que el mecanismo de actuación del BPA es muy parecido. Experimentos *in vivo* mostraron, además, que tanto el tratamiento con 17 β -estradiol como con BPA promovía un aumento del contenido y secreción de insulina (Alonso-Magdalena et al., 2006).

Por otro lado, con respecto a nuestro receptor de estudio, ER β , demostramos que su activación en respuesta a 17 β -estradiol y BPA conducía al cierre del canal K_{ATP}, provocando un aumento en la concentración de Ca²⁺ intracelular y posteriormente a un aumento rápido en la secreción de insulina (Soriano et al., 2009, Soriano et al., 2012). En islotes humanos, se observó el mismo efecto insulínico (Alonso-Magdalena et al., 2013). Además, más recientemente, demostramos que el receptor ER β estaba involucrado en las acciones del BPA sobre la expresión de los canales iónicos de las células β pancreáticas. Así, en 2017 se demostró que el tratamiento a dosis bajas de BPA (1 nM) durante 48 h reducía la expresión del canal de Ca²⁺ activado por voltaje, el Cav2.3, a través de ER β en las células β pancreáticas de ratón (Villar-Pazos et al., 2017). Estudios posteriores pusieron de manifiesto que el tratamiento con BPA en islotes, conducía a una modulación de la expresión de subunidades pertenecientes a los canales Na⁺ y K⁺, así como a una disminución de las corrientes eléctricas de

estos canales iónicos. Por el contrario, en las células β pancreáticas procedentes de los animales BERKO no se observaba ningún cambio con respecto a la expresión y actividad eléctrica de los canales de Na^+ y K^+ , por lo que se concluyó que los efectos descritos del BPA en las células β pancreáticas de los islotes murinos requerían de la participación de $\text{ER}\beta$ (Martinez-Pinna et al., 2019). Todos estos estudios de alteraciones en la actividad eléctrica y expresión de canales iónicos implicaban al receptor $\text{ER}\beta$ en los efectos del BPA sobre la función de la célula β pancreática. Es por ello que centramos nuestra atención en la importancia de este receptor. Estos cambios observados en la función de la célula β pancreática podían estar contribuyendo a la acción diabetogénica del BPA.

Asimismo, el BPA puede actuar a través de un receptor distinto a $\text{ER}\alpha$ y $\text{ER}\beta$, el receptor de estrógenos acoplado a proteína G (GPER o GPR30) al que el 17 β -estradiol es capaz de unirse (Filardo et al., 2002, Thomas et al., 2005, Revankar et al., 2005, Filardo et al., 2007). Estudios con modelos animales *knockout* para el GPER han puesto de manifiesto la posible participación de este receptor en el metabolismo de la glucosa, pues estos animales presentan hiperglucemia e intolerancia a la glucosa (Mårtensson et al., 2009). Además, se ha visto que la activación de GPER en islotes de ratonas hembras conduce a una potenciación de la secreción de insulina estimulada por glucosa y a la inhibición de la secreción de glucagón y somatostatina. Además, la activación de este receptor también promueve una disminución de los niveles de apoptosis en respuesta a citoquinas en los islotes de ratones hembra (Balhuizen et al., 2010). Con respecto a los efectos del BPA sobre la función de la célula β pancreática se conoce que el BPA es capaz de regular la expresión de GPER, lo que conlleva cambios en la expresión del microRNA miR-338, y posteriormente, a una disfunción de la capacidad secretora de la célula β (Wei et al., 2017).

Por tanto, podemos observar que las acciones celulares desencadenadas por el BPA se encuadran en un sistema de señalización hormonal de enorme complejidad, cuyas acciones van a depender de multitud de variables. Como hemos mencionado, el BPA puede actuar activando las vías de señalización nucleares clásicas o bien vías de señalización extranucleares que pueden implicar o no efectos transcripcionales. El estudio de estas vías de señalización puede ayudar a comprender los mecanismos de acción del BPA y su implicación en la etiología de la DMT2.

OBJETIVOS

El BPA es uno de los compuestos químicos con mayor producción a nivel mundial. Nos encontramos diariamente expuestos a este disruptor endocrino que se utiliza en la producción de los plásticos de policarbonato, y resinas epoxi, apareciendo en muchos productos de uso cotidiano en nuestra vida diaria como envases de alimentos y bebidas. Las principales vías de exposición al BPA se producen a través de la ingesta y del contacto dérmico.

El BPA es un EDC capaz de interferir en el balance hormonal, provocando efectos negativos en la salud de los individuos expuestos y/o en su descendencia. La existencia de estudios en animales y en humanos ha puesto de manifiesto la relación causal entre la exposición a este disruptor y un mayor riesgo de desarrollar diferentes patologías, como la DMT2.

El objetivo general de la presente tesis es estudiar los efectos de la exposición intraútero a dosis medioambientalmente relevantes de BPA en el desarrollo del páncreas endocrino, así como investigar los mecanismos de señalización subyacentes.

Los objetivos específicos de la presente Tesis se exponen a continuación:

- Estudio de los efectos tempranos de la exposición gestacional a BPA en los animales OF1 en el crecimiento de la célula β pancreática.
- Estudio de los efectos tempranos de la exposición gestacional a BPA en los animales WT y BERKO en en la homeostasis de glucosa, y el desarrollo y crecimiento del páncreas endocrino en la descendencia.
- Estudio del papel de ER β en la división y crecimiento de la célula β pancreática en cultivo primario producido por BPA.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. DESCRIPCIÓN DE LOS MODELOS ANIMALES DE ESTUDIO.

Los primeros experimentos de esta tesis doctoral se realizaron con ratones macho de un mes de vida de la cepa OF1, procedentes de ratones hembras gestantes proporcionados por Charles River (Barcelona, España). Estas hembras preñadas fueron individualizadas y mantenidas bajo condiciones óptimas en el bioterio. Las gestantes fueron alimentadas durante todo el tiempo de gestación y lactancia con la dieta de mantenimiento de roedores 2014 Teklad Global 14 % de proteína de Harlan Laboratories (Barcelona, España). En el presente trabajo también se emplearon ratones *knockout* para el receptor ER β (BERKO). Inicialmente, los ratones heterocigotos (ER β +/-) con base C57BL/6J procedieron del laboratorio del Prof Jan-Åke Gustafsson (Karolinska, Suecia). A partir de esos ratones iniciales, se estableció una colonia en el Servicio de Experimentación Animal (SEA) de la UMH. Los ratones ER β deficientes se generaron por la inserción de un gen de resistencia a la neomicina en el exón 3 del receptor ER β por recombinación homóloga en células embrionarias (Krege et al., 1998). Los animales se mantuvieron controlados en condiciones óptimas, con una temperatura aproximada de 22 °C, un ciclo de 12 horas luz/oscuridad y con disponibilidad *ad libitum* a comida y agua. Se utilizó la dieta de mantenimiento de roedores 2014 Teklad Global 14 % de proteína de Harlan Laboratories para alimentar a los ratones. El Comité de Ética de la UMH “Comisión de Ética en la Investigación Experimental (CEIE)” revisó y aprobó este estudio (identificación de aprobación UMH.IB.ANN.01.14; UMH.IB.ANN.02.17). Los procedimientos fueron realizados garantizando el menor sufrimiento para el animal.

1.1 Modelo animal.

Los procedimientos *in vivo* de esta tesis se realizaron con dos cepas diferentes de ratón, OF1 y los *knockout* para ER β con base C57BL/6J. Los primeros experimentos se llevaron a cabo en la cepa OF1. Las ratonas gestantes OF1 se trataron con BPA (Cat. no. 155118, MP Biomedicals) disuelto en aceite de maíz libre de tocoferoles (Cat. no. 901415, MP Biomedicals) y administrado por vía subcutánea (sc) con una dosis diaria desde el noveno al decimosexto día de gestación. La dosis subministrada a las gestantes fue de 10 μ g y 100 μ g de BPA por kg de peso corporal en un volumen constante de 100 μ L. Al grupo de las gestantes controles OF1 se les suministró 100 μ L de vehículo (aceite). En cuanto al procedimiento con la cepa BERKO con base C57BL/6J, se cruzaron machos y hembras BERKO heterocigotas. De igual manera que a las madres OF1, las gestantes BERKO heterocigotas fueron tratadas con BPA disuelto en aceite de maíz libre de tocoferoles y administrado por vía subcutánea (sc) con una dosis diaria desde el noveno al decimosexto día de gestación. La dosis subministrada

a las gestantes fue solo la dosis más baja, 10 µg de BPA por Kg de peso corporal, en un volumen constante de 100 µL. Al grupo de las gestantes controles se les suministró 100 µL de vehículo.

Después del nacimiento, los neonatos de ambas cepas se sexaron y, solo los ratones de la colonia *knockout* para ERβ, se genotiparon a día 0 postnatal (P0). En este estudio se utilizaron machos neonatos OF1, *Wild type* (WT) y BERKO homocigotos, así como machos OF1, WT y BERKO homocigotos a día 30 postnatal (P30). Tras el parto, las crías se distribuyeron en un número aproximado de 7-8 animales por camada para que todas las gestantes tuvieran el mismo número de crías que alimentar. A día 21 postnatal (P21) se procedió al destete, sexado y genotipado de las crías. El genotipado de los animales de la colonia BERKO se realizó mediante el kit *REDEExtract-N-AmpTM Tissue PCR* (Cat. no XNAT-100RXN, Sigma-Aldrich) siguiendo el protocolo del fabricante. Los cebadores utilizados para el genotipado de muestras se muestran en la Tabla 1. En nuestros experimentos seguimos la evolución de los descendientes macho WT y BERKO hasta el día P30. Para los experimentos *in vitro*, se utilizaron neonatos WT y BERKO a día 3-5 postnatal (P3-P5) y también machos y hembras WT y BERKO adultos de 2 o 3 meses de edad.

Tabla 1. Cebadores empleados en el genotipado del modelo experimental de estudio.

Nombre Cebador	Secuencia (5' - 3')
C1WT	CCGTCATGACATAAGCATACCCCT
B1-2 SP	ATCAGCCCATGGGCAGAGTGTG
Neo 25	GCAGCCTCTGTTCCACATACACTTC

1.2 Características del modelo BERKO.

Para crear este modelo se modificó el gen que codifica para ERβ interrumpiendo su expresión. Este proceso se llevó a cabo mediante la recombinación homóloga en las células madre embrionarias de ratón que incorporaron una secuencia modificada del gen no funcional. Estas células madre se inocularon en los blastocistos que fueron trasplantados a hembras para generar más descendientes con el nuevo gen ERβ delecionado. Este modelo, concretamente, se produjo por la inserción de un gen de resistencia a la neomicina en el exón 3 del gen que codificaba para ERβ. Este inserto, generaba un codón stop que evitaba la expresión del gen que codifica para el receptor ERβ (Krege et al., 1998). En cuanto a las características de estos animales, cabe destacar que los machos BERKO no presentan problemas de fertilidad, en cambio las hembras BERKO son subfértiles, ya que tienen camadas de menor tamaño y paren con menor frecuencia, en comparación con las hembras WT. Esto se debe a que la

eficiencia ovárica está reducida en estos animales. Sin embargo, el desarrollo mamario y el periodo de lactación son normales. Se trata de un modelo *knockout* global por lo que hay una delección del gen que codifica para ER β en todos los tejidos en los que este receptor se encuentra presente.

2. AISLAMIENTO DE LOS ISLOTES DE LANGERHANS.

Tras esterilizar y preparar todo el material quirúrgico, los ratones fueron sacrificados mediante decapitación, permitiendo la obtención de muestras de sangre del animal para su posterior procesamiento y obtención de suero. A continuación, se practicó una laparotomía media completa para dejar al descubierto los órganos abdominales. La masa intestinal y los lóbulos hepáticos se retiraron hacia un lado para una mejor manipulación y localización del conducto colédoco que pertenece a una estructura fácilmente reconocible, llamada ampolla de Vater o papila duodenal mayor. El colédoco deriva en su parte más proximal de la confluencia del conducto hepático común y del conducto cístico, drenando en el duodeno tras la fusión con el conducto pancreático en su parte más distal. Para realizar la canulación del conducto colédoco, se hizo una ligadura en la parte más distal del conducto, y así, obturar la comunicación con el duodeno. A continuación, se realizó una pequeña incisión en la parte proximal del colédoco que permitió introducir una cánula, anudándola con una sutura quirúrgica. Se acopló una jeringa a la cánula y se inyectó una solución con 0.5 mg/mL de la enzima colagenasa (tipo V, Ref. C9263 Sigma) hasta tener el páncreas perfundido de la solución de aislamiento [composición en mM: 115 NaCl, 5 KCl, 10 NaHCO₃, 1.1 MgCl₂, 1.2 NaH₂CO₄, 2.5 CaCl₂, 25 HEPES, 0.25 % BSA y 5 glucosa, con pH 7.4]. Inmediatamente se aisló el páncreas del resto de tejidos adyacentes, intestino y bazo, y se introdujo en un tubo cónico de 15 mL. Éste se puso en un baño termostatzado a 37 °C durante un tiempo variable de 7 a 10 minutos dependiendo de la actividad de la colagenasa, que varía en función del lote, por lo que la digestión del páncreas se siguió visualmente hasta observar una disgregación en pequeños fragmentos pancreáticos. Para detener la digestión enzimática de la colagenasa se añadió medio de aislamiento frío y se dejó reposar 5 minutos en hielo y en posición vertical para permitir la precipitación del disgregado pancreático. Pasado este tiempo, el sobrenadante se volcó en placas Petri estériles y se añadió más medio de aislamiento frío al tubo cónico. Este proceso se repitió tres veces, con la finalidad de lavar el disgregado. Los islotes de Langerhans se recolectaron uno a uno bajo una lupa estereoscópica con la ayuda de una micropipeta. Una vez obtenidos, se dejaron en un incubador a 37 °C con una atmósfera de 5 % de CO₂ durante al menos una hora para permitir su recuperación antes de cualquier procedimiento experimental.

3. CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS AISLADAS DEL ISLOTE DE LANGERHANS.

Pasado el tiempo de recuperación, los islotes fueron transferidos a un vial y se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos. A continuación, se retiró el sobrenadante y el pellet con los islotes se resuspendió en una solución comercial de Tripsina al 0.25 % (Ref. 25200-056, Gibco). El vial se incubó a 37 °C durante 3 minutos para permitir la actividad peptidasa de la tripsina, posteriormente, se realizó un suave pipeteo que facilitó la disgregación. Se agregó medio de cultivo RPMI 1640 con 11 mM glucosa y sin rojo fenol, suplementado con 200 U/mL penicilina, 0.2 mg/mL estreptomycin, 2 mM L-glutamina y 8 % de suero bovino fetal (FBS) *charcoal-stripped*. El *stripping* del suero mediante los filtros de carbón activado (*charcoal*) permite retirar sustancias lipofílicas como son las hormonas esteroideas que podrían interferir con los niveles basales de activación estrogénica de las muestras. El medio de cultivo se añadió en un volumen al menos dos veces el utilizado en la disgregación, para finalizar la actividad enzimática. Se centrifugó de nuevo la suspensión celular a 1000 rpm durante 10 minutos, posteriormente, se desechó el sobrenadante y al pellet restante se le agregó un volumen de medio de cultivo determinado en función de la densidad celular deseada en la siembra. Para la siembra celular, se utilizaron cubreobjetos redondos de vidrio de 24 mm. Estos cubreobjetos fueron previamente tratados con 0.01 % de poli-L-lisina durante al menos 1 hora para permitir la adherencia de las células; al cabo de ese tiempo se retiró la poli-L-lisina y se lavó tres veces con agua destilada estéril (dH₂O). Una vez sembrada la suspensión celular, los cubreobjetos se incubaron a 37 °C durante 90 minutos antes de añadir el medio de cultivo con el tratamiento adecuado.

4. CUANTIFICACIÓN DE LA TASA DE PROLIFERACIÓN EN CÉLULAS AISLADAS DEL ISLOTE DE LANGERHANS.

El cultivo primario de células aisladas a partir del islote de Langerhans se mantuvo durante 48 horas en medio RPMI 1640 con 11 mM glucosa y sin rojo fenol. Las células fueron tratadas con BPA; con el agonista específico de ER β , WAY200070 (Cat.no. 3366, Tocris); con el agonista específico de ER α , el Propil pirazol triol PPT (Cat.no. 1426, Tocris); o 17 β -estradiol (Sigma-Aldrich) (figura 6). Estos compuestos fueron solubilizados en dimetilsulfóxido (DMSO) (Ref: D8418, Sigma) ya que son de naturaleza hidrofóbica. Además, el DMSO se utilizó como vehículo en el tratamiento control de manera isovolumétrica. En todos los tratamientos se añadió la bromodesoxiuridina (BrdU o 5-bromo-2-desoxiuridina) (Ref: B23151, Invitrogen) a una concentración de 10 μ M. El BrdU actúa como un marcador de proliferación celular, ya que se incorpora a las células en la fase de síntesis de ADN del ciclo celular y, por tanto, nos permitió

identificar las células que estaban en proliferación durante el periodo de incubación. El cultivo celular se mantuvo a 37 °C y 5 % de CO₂ y los tratamientos fueron renovados a las 24 horas.

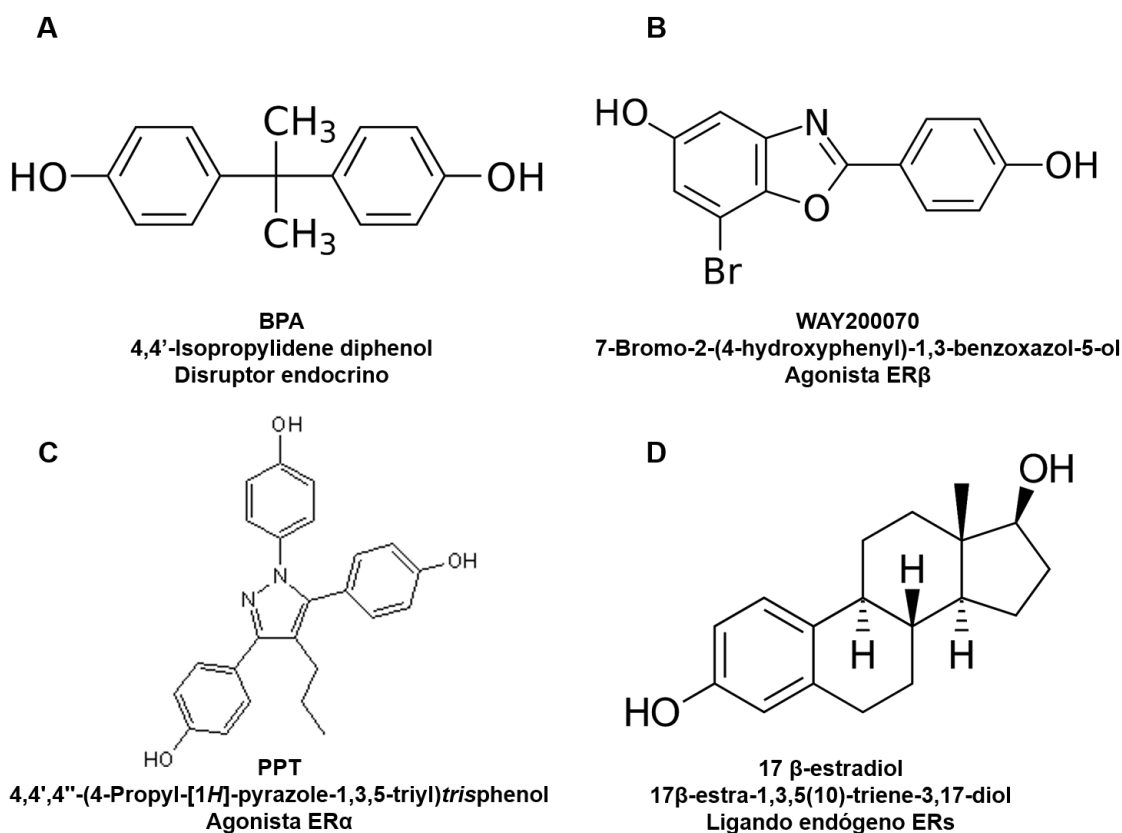


Figura 6. Estructura del BPA (A), del WAY200070 (B), del PPT (C) y del 17 β -estradiol (D). Estructura, nombre comercial, nomenclatura IUPAC y actividad específica.

A continuación, mediante inmunofluorescencia se cuantificó la tasa de proliferación de las células β pancreáticas tras 48 horas de tratamiento. En la cuantificación de este ensayo se aceptó como positivo las células doblemente marcadas para insulina y BrdU. El protocolo específico del ensayo fue el siguiente:

- 1) Fijación de las células con paraformaldehído (PFA) (Ref: P6148, Sigma) al 4 % durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, lavado con PBS durante 10 minutos; se repitió este paso 3 veces.
- 2) Permeabilización de las células con Tritón X-100 al 0.5 % (Ref. 1869, Merck) durante 3 minutos. A continuación, lavado con PBS.
- 3) Bloqueo con BSA al 3 % (Ref. A3294, Sigma) durante 2 horas.

- 4) Incubación con el anticuerpo primario Anti-insulin rabbit mAb C27C9 (Ref. 3014, Cell Signaling) (1:200) en BSA 3 % *overnight* a 4°C. A continuación, lavado con PBS.
- 5) Incubación con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit (Ref. A11010, Invitrogen) (1:500) en PBS y 0.3 % BSA durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, lavado con PBS.
- 6) Se volvió a fijar las células con PFA al 4 % durante 5 minutos. A continuación, lavado con PBS.
- 7) Incubación con etanol al 70 % durante 30 minutos a 4 °C. A continuación, lavado con PBS.
- 8) Se trató con HCl 2N durante 20 minutos.
- 9) Se trató con Borato 0.1 M (pH 9.36) durante 15 minutos. A continuación, lavado con PBS.
- 10) Bloqueo con 3 % BSA.
- 11) Incubación con el anticuerpo primario Anti-BrdU monoclonal mouse (Ref. M0744, Dako) (1:100) en 3 % BSA *overnight* a 4 °C. A continuación, lavado con PBS.
- 12) Incubación con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 goat anti-mouse (Ref. A11001, Invitrogen) (1:500) en PBS y 0.3 % BSA durante 2 horas a temperatura ambiente. A continuación, lavado con PBS.
- 13) Tinción de los núcleos de las células con Hoechst 33342 (Ref. H3570, Molecular Probes) (10 µg/mL) durante 5 minutos. A continuación, lavado con PBS.
- 14) Los cubreobjetos se montaron con ProLong Gold Antifade Reagent (Ref. P36930, Invitrogen) y se guardaron a -20 °C hasta su cuantificación.

Una vez montados los cubreobjetos se procedió a la cuantificación celular con un microscopio de fluorescencia convencional Axiovert 200 equipado con una lámpara de mercurio FluoArc de Zeiss y una cámara Hamamatsu C4742-96. Con el objetivo de 40x se realizó un doble conteo manual de las células insulino-positivas con un marcaje citoplasmático en rojo y las células BrdU-positivas con un marcaje nuclear en verde. Así, los datos se mostraron como la razón de las células β en proliferación y el número de células β total.

5. ESTUDIO HISTOLÓGICO DEL TEJIDO PANCREÁTICO DEL RATÓN.

Tras el sacrificio de los animales a día 0 o 30 postnatal (P0 o P30) por dislocación cervical, se realizó una disección del ratón en la cual se extrajo el páncreas completo y se pesó. Posteriormente se introdujeron los páncreas en los casetes histológicos previamente identificados y se sumergieron en PFA al 4 % (Sigma) durante 24 horas a 4 °C. Tras la fijación con PFA se lavaron los páncreas a PBS

durante 24 horas a 4 °C. A continuación, se procedió a la realización de la inclusión de los páncreas en parafina.

5.1 Inclusión y obtención en bloques parafinados del páncreas entero de ratón.

Una vez fijados los tejidos, se llevó a cabo una secuencia de deshidratación del tejido siguiendo el protocolo descrito a continuación:

- 1) Sumergir los casetes con los tejidos en etanol al 70 % durante una hora.
- 2) Cambiar a etanol 90 % durante una hora; repetir el paso una vez más.
- 3) Sumergir en etanol absoluto durante 1 hora; repetir el paso dos veces más.
- 4) Sumergir en xileno durante 30 minutos; repetir el paso una vez más.
- 5) Introducir los páncreas, correctamente identificados, en parafina líquida durante 2 horas a 65 °C.
- 6) Sumergir los páncreas en parafina líquida nueva y dejar toda la noche a 65 °C.
- 7) Montar los bloques de parafina y guardar a 4 °C hasta ser cortados con el micrótopo Leica RM2245 en secciones de 5 µm separadas por 100 o 200 µm.

5.2 Estudio de la masa de célula β por Inmunohistoquímica (IHQ).

Una vez seleccionados los cortes de animales P0 y P30, se procedió al marcaje inmunohistoquímico de insulina para la posterior cuantificación de la masa de células β pancreáticas y su área en el páncreas. Para ello se llevó a cabo el siguiente protocolo:

- 1) Desparafinar los cortes de tejido:
 - 1.1 Introducir los portaobjetos a 65 °C durante 30 minutos.
 - 1.2 Sumergir los cortes en xileno durante 10 minutos; repetir el paso 2 veces más.
- 2) Rehidratar el tejido mediante una secuencia de etanoles:
 - 2.1 Sumergir en etanol absoluto durante 5 minutos; repetir el paso una vez más.
 - 2.2 Sumergir en etanol al 95 % durante 5 minutos; repetir el paso una vez más.
 - 2.3 Sumergir en etanol al 70 %.
 - 2.4 Lavar con agua destilada durante 2 minutos y a continuación, lavar con PBS durante 5 minutos.
- 3) Para la recuperación antigénica, se preparó tampón citrato (10 mM; pH 6) y se calentó en el microondas y una vez alcanzada la temperatura de ebullición se sumergieron las muestras en el tampón durante 20 minutos.
- 4) Dejar enfriar una hora a temperatura ambiente.
- 5) Delimitar con *pap-pen* el tejido.

- 6) Lavar con PBS durante 5 minutos; repetir el paso una vez más.
- 7) Bloquear la actividad de la peroxidasa endógena con agua oxigenada (H₂O₂) 3 % en metanol al 50 % durante 30 minutos. A continuación, lavar con PBS.
- 8) Bloquear las uniones inespecíficas con BSA 3 % durante una hora.
- 9) Incubar con el anticuerpo primario Anti-insulin rabbit mAb C27C9 (1:400) en BSA 3 % toda la noche a 4°C. A continuación, lavar con PBS durante 30 minutos.
- 10) Incubar con el anticuerpo secundario Biotinylated goat anti-rabbit (Lot. ZA0324, Vector Laboratories) (1:200) en BSA 3 % durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, lavar con PBS durante 40 minutos.
- 11) Añadir el kit Vectastain ABC (Ref. PK-6100, Vector Laboratories) durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, lavar con PBS durante 30 minutos.
- 12) Revelar con la solución de 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloreto (DAB) (Ref. K3467, Dako) y parar la reacción con PBS. A continuación, lavar con H₂O destilada durante 2 minutos.
- 13) Teñir del tejido con hematoxilina Harris (Ref. 253949.1611, Panreac) y lavar con abundante H₂O destilada.
- 14) Deshidratar el tejido mediante una secuencia de etanoles:
 - 14.1 Sumergir en etanol 70 % durante 2 minutos.
 - 14.2 Sumergir en etanol 95 % durante 2 minutos.
 - 14.3 Sumergir en etanol absoluto durante 2 minutos; repetir el paso una vez más.
- 15) Reparafrinar con xileno durante 10 minutos; repetir el paso una vez más.
- 16) Montar la preparación con medio de montaje Vitro-Clud (Ref. A20250, Deltalab).

Una vez montadas las láminas histológicas se realizaron fotografías con el programa uEye Cockpit, a través de un microscopio invertido Olympus IX71 con el objetivo de 20x para el mapeo de las células insulino-positivas y con un objetivo de 4x se realizaron las fotografías de toda la superficie pancreática. Las imágenes fueron procesadas con el programa MetaMorph para el cálculo del porcentaje de área y masa de células β pancreáticas.

5.3 Estudio de la proliferación de célula β mediante IHQ utilizando Ki67.

Para el marcaje de la proliferación y de la insulina en tejido se utilizó el kit “EnVision G/2 Doublestain System Rabbit/Mouse (DAB⁺/Permanent red) (K5361, Dako)”. Una vez seleccionados los cortes de animales P30 se llevó a cabo el siguiente protocolo:

- 1) Desparafrinar los cortes de tejido
 - 1.1 Introducir los portaobjetos a 65 °C durante 30 minutos.

- 1.2 Sumergir los cortes en xileno durante 10 minutos; repetir el paso 2 veces más.
- 2) Rehidratar el tejido mediante una secuencia de etanoles:
 - 2.1 Sumergir en etanol absoluto durante 5 minutos; repetir el paso una vez más.
 - 2.2 Sumergir en etanol 95 % durante 5 minutos; repetir el paso una vez más.
 - 2.3 Sumergir en etanol 70 %.
 - 2.4 Lavar con agua destilada durante 2 minutos y a continuación, lavar con PBS durante 5 minutos.
- 3) Para la recuperación antigénica, sumergir las muestras en tampón citrato (10 mM; pH 6) hirviendo durante 20 minutos.
- 4) Dejar enfriar una hora a temperatura ambiente.
- 5) Delimitar con *pap-pen* el tejido.
- 6) Lavar con PBS durante 5 minutos; repetir el paso una vez más.
- 7) Incubar los portaobjetos con la doble enzima endógena durante 5 minutos a temperatura ambiente y a continuación lavar con PBS 5 minutos.
- 8) Bloquear las uniones inespecíficas con BSA 3 % durante una hora. A continuación, lavar con PBS.
- 9) Incubar con el anticuerpo primario Anti-Ki67 rabbit (D3B5) (Ref. 12202 Cell Signaling) (1:400) en BSA 3 % toda la noche a 4 °C. A continuación, lavar con PBS.
- 10) Incubar las muestras con el Polímero/HRP y a continuación, lavar con PBS 5 minutos.
- 11) Revelar el marcaje del anticuerpo primario anti-Ki-67 con la solución cromogénica al 5 % de 3,3'-diaminobenzidina tetrahidrocloruro (DAB), a continuación, lavar con H₂O destilada.
- 12) Incubar con la doble solución de bloqueo durante 3 minutos, a continuación, lavar con PBS durante 5 minutos.
- 13) Incubar con el anticuerpo primario anti-insulina de ratón monoclonal (Ref. I 2018, Sigma) (1:100) en BSA 3 % toda la noche a 4 °C.
- 14) Incubar con el "link" de conejo/ratón durante 20 minutos, a continuación, lavar con PBS durante 5 minutos.
- 15) Incubar con el Polímero/AP durante 10 minutos, a continuación, lavar con PBS durante 5 minutos.
- 16) Revelar el marcaje del anticuerpo primario anti-insulina con la solución cromogénica *Permanent Red*, a continuación, lavar con H₂O destilada.
- 17) Teñir el tejido con hematoxilina Harris y lavar con abundante H₂O destilada.
- 18) Montar con Faramount Aqueous Neounting Medium (Ref. S3O25, Dako).

Una vez montadas las láminas histológicas se realizaron fotografías con el programa uEye Cockpit, a través de un microscopio invertido Olympus IX71 con el objetivo de 20x para el mapeo de las células insulino-positivas y de las células Ki-67 positivas. Las imágenes fueron procesadas con el programa MetaMorph

para la obtención del porcentaje de células β pancreáticas y las células proliferativas para Ki-67.

5.4 Estudio de la proliferación de célula β mediante IHQ utilizando BrdU.

Para cuantificar la tasa de proliferación de células β pancreáticas en el tejido de los ratones OF1 previamente tratados con BrdU se llevó a cabo el siguiente protocolo:

Se realizaron los pasos 1-5 del protocolo descrito en apartado 5.2. A continuación se describe el protocolo específico del ensayo:

- 1) Cubrir la superficie del tejido con HCl 2N durante 5 minutos.
- 2) Cubrir todo el tejido con Borato (0.1 M; pH 9.36) durante 10 minutos.
- 3) Lavar con PBS durante 5 minutos; repetir este paso 2 veces.
- 4) Cubrir el tejido con tripsina (0.5 mg/mL) durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- 5) Lavar con PBS durante 5 minutos; repetir este paso 2 veces.
- 6) Bloquear con BSA al 3 % durante 1 hora a temperatura ambiente.
- 7) Incubar con los anticuerpos primarios toda la noche a 4°C. Anti-insulin rabbit Santa Cruz (1:100) en 3 % BSA (SC-9168) y anti-BrdU mouse Dako (1:100) en 3 % BSA (M0744).
- 8) Lavar con PBS durante 5 minutos; repetir este paso 2 veces.
- 9) Incubar con los anticuerpos secundarios durante 1 hora a temperatura ambiente: Alexa fluor Anti-rabbit goat 543 nm (1:500) en PBS y Alexa fluor Anti-mouse goat 488 nm (1:500) en PBS (Invitrogen, Barcelona, España).
- 10) Lavar con PBS durante 5 minutos; repetir este paso 2 veces.
- 11) Teñir los núcleos con Hoechst 33342 (Ref. H3570, Molecular Probes) (10 μ g/mL) durante 15 minutos. A continuación, lavar con PBS.
- 12) Los cubreobjetos se montaron con ProLong Gold Antifade Reagent (Ref. P36930, Invitrogen) y se guardaron a -20 °C hasta su cuantificación.

Una vez montados los cubreobjetos se procedió a la cuantificación celular con un microscopio de fluorescencia convencional Axiovert 200 equipado con una lámpara de mercurio FluoArc de Zeiss y una cámara Hamamatsu C4742-96. Con el objetivo de 40x se realizó un doble conteo manual de las células insulino-positivas con un marcaje citoplasmático en rojo y las células BrdU-positivas con un marcaje nuclear en verde. Así, los datos se mostraron como la relación de las células en proliferación y las células β y el número de células β total.

5.5 Estudio de la apoptosis de célula β mediante el kit TUNEL.

El marcaje de células apoptóticas se llevó a cabo con la utilización del kit “*In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein*” TUNEL (Cat. no. 7791-13-1, Roche). Como en el caso del ensayo de proliferación *in vivo*, se realizaron los pasos 1-5 del protocolo descrito en apartado 5.2. A continuación, se describe el protocolo específico de ese ensayo:

- 1) Lavar las muestras con PBS durante 5 minutos; repetir este paso 2 veces.
- 2) Permeabilizar los tejidos con Tris HCl 0.1 M durante 10 minutos. A continuación, lavar las secciones con PBS 3 veces.
- 3) Cubrir las muestras con el kit TUNEL según las instrucciones del fabricante. Incubar los tejidos con esta solución durante una hora a 37 °C en oscuridad y atmósfera húmeda. Previamente, una muestra fue elegida como control positivo añadiendo Tris HCl 50 mM y ADNasa I recombinante. A continuación, lavar con PBS.
- 4). Bloquear con BSA al 3 % durante 1 hora a temperatura ambiente para evitar interacciones inespecíficas.
- 5) Lavar las muestras 3 veces con PBS.
- 6) Incubar con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C; Anti-insulin rabbit Santa Cruz (1:100) en 3 % BSA (SC-9168).
- 7) Lavar con PBS durante 5 minutos; repetir este paso 2 veces.
- 8) Incubar con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente Alex fluor Anti-rabbit goat 543 nm (1:500) en PBS.
- 10) Lavar con PBS durante 5 minutos; repetir este paso 2 veces.
- 11) Teñir los núcleos con Hoechst 33342 (Ref. H3570, Molecular Probes) (10 μ g/mL) durante 15 minutos. A continuación, lavar con PBS.
- 12) Los cubreobjetos se montaron con ProLong Gold Antifade Reagent (Ref. P36930, Invitrogen) y se guardaron a -20 °C hasta su cuantificación.

Una vez montados los cubreobjetos se procedió a la cuantificación celular con un microscopio de fluorescencia convencional Axiovert 200. Con el objetivo de 40x se realizó un doble conteo manual de las células insulino-positivas con un marcaje citoplasmático en rojo y las células apoptóticas, con un marcaje nuclear en verde. Así, los datos se mostraron como la relación de las células β apoptóticas y el número de células β pancreáticas total.

6. TEST DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA INTRAPERITONEAL (ipGTT).

Para realizar el test de Tolerancia a la Glucosa se individualizaron los animales y se les dejó 6 horas en ayuno, transcurrido este periodo, se les inyectó una carga de glucosa intraperitoneal (ip) de 2 g /kg de peso corporal disuelta en PBS. Para la medición de los niveles de glucosa en sangre, se realizó un pequeño corte en la parte distal de la cola, obteniendo el volumen necesario de sangre de las venas caudales. La medición de glucosa se llevó a cabo con un glucómetro (Accu-check compact plus, Roche) a tiempo 0, 10, 20, 30, 60 y 120 minutos, considerando tiempo 0 el momento anterior a la aplicación de la carga de glucosa.

7. SECRECIÓN DE INSULINA ESTIMULADA POR GLUCOSA *IN VIVO* (GSIS).

Para llevar a cabo la medición de la secreción de insulina *in vivo*, GSIS siglas en inglés *Glucose Stimulated Insulin Secretion* (GSIS) se tomaron muestras de sangre de la vena safena lateral como se describió previamente (Hem et al., 1998) a tiempo 0, 10 y 30 minutos. Estas muestras se utilizaron para medir los niveles de insulina en plasma en el estado basal (ayuno) y después de la carga de glucosa intraperitoneal (ip) de 2 g/Kg de peso corporal. El volumen de sangre extraída en cada punto fue de aproximadamente 15 μ L. Las muestras obtenidas se centrifugaron a 7000 rpm durante 9 minutos a 4 °C y los plasmas se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

8. DETERMINACIÓN DE LA SECRECIÓN ESTÁTICA DE INSULINA *EX VIVO*.

Una vez extraídos los islotes como se explica en el apartado 2, se hicieron grupos homogéneos de 5 islotes en una placa de 24 pocillos y se preincubaron durante 2 horas en medio de secreción [composición (en mM: 140 NaCl, 5 KCl, 20 HEPES, 1 MgCl₂, 2.5 CaCl₂, 0.1% BSA con pH 7.4] con una concentración no estimuladora de glucosa (3 mM). Transcurrido este periodo, los grupos de islotes fueron transferidos a 500 μ L de buffer de secreción que incluía los estímulos estimuladores de glucosa (8 y 16 mM, según correspondiese) durante 1 hora a 37 °C y 5 % saturación de CO₂. Pasado ese tiempo, las placas fueron depositadas durante 5 minutos en un soporte frío. Los grupos de islotes fueron recuperados cuidadosamente en un volumen constante de 5 μ L de medio, y depositados en 20 μ L de buffer de lisis (70 % etanol y 0.12 % HCl). El lisado celular resultante se mantuvo toda la noche a 4 °C y en agitación para facilitar su completa homogenización. Por otro lado, el medio de secreción que había estado en contacto con los islotes se recogió en viales de vidrio, que fueron sellados y ultracongelados a -80 °C hasta el momento de la cuantificación de la insulina.

La cuantificación de la insulina secretada de los islotes se realizó mediante el kit de ELISA para insulina de ratones (Ref. 10-1247-01, Mercodia). Para ello se siguió el protocolo descrito por el fabricante empleando 10 μ L del medio de secreción de los islotes. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un espectrofotómetro iMark Microplate Reader (Bio-Rad).

9. MEDICIONES HORMONALES Y BIOQUÍMICAS DEL SUERO SANGUÍNEO

9.1 ELISA de insulina

Para medir los niveles de insulina se utilizó el suero sanguíneo, que una vez extraído, se congeló a -80 °C para su posterior utilización en el kit de ELISA ultrasensible para insulina de ratones (Ref. 90080, Crystal Chem). Este kit nos permitió cuantificar muestras pequeñas de suero (5 μ L) con una alta sensibilidad (100 pg/mL). Una vez recolectadas todas las muestras a analizar se realizó el ensayo en una microplaca de 96 pocillos proporcionada en el kit en cuya base encuentran adherido los anticuerpos para la detección de insulina. Además, el kit consta de un stock de insulina con una concentración de 6.4 ng/mL a partir del cual se realizaron diluciones seriadas para preparar los patrones de la curva patrón. El procedimiento fue el siguiente:

- 1) Pipeteo de las muestras y los estándares en sus correspondientes pocillos.
- 2) Incubación durante 2 horas a 4 °C y con ligera agitación para que la insulina de nuestra muestra se uniera al anticuerpo que se encuentra adherido a los pocillos.
- 3) Lavado de la microplaca del ensayo e incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente con la enzima conjugada anti-insulina.
- 4) Lavado de la microplaca e incubación durante 40 minutos a temperatura ambiente y oscuridad con la solución sustrato de la enzima.
- 5) Adición de la solución *stop* para parar la reacción enzimática y medición de la absorbancia a 450 y 630 nm en un lector de placas. Los valores de la concentración de cada una de las muestras se calcularon por la extrapolación de las absorbancias de las concentraciones conocidas de la curva patrón preparada previamente.

9.2 ELISA de leptina

Para medir los niveles de leptina se utilizó el suero sanguíneo, que una vez extraído, se congeló a -80 °C para su posterior medición mediante la utilización de un kit de ELISA de leptina (Ref. 90030, Crystal Chem). Este kit nos permitió cuantificar muestras pequeñas de suero (5 μ L). Una vez recolectadas todas las muestras a analizar se realizó el ensayo en una microplaca de 96 pocillos

proporcionada en el kit en cuya base se encuentran adheridos los anticuerpos para la leptina. Además, el kit consta de un stock de leptina con una concentración de 12.8 ng/mL a partir del cual se realizaron diluciones seriadas para conseguir los valores de la curva patrón. Los valores de leptina de cada muestra se obtuvieron por extrapolación a partir de la curva patrón. El procedimiento que se llevó a cabo, una vez atemperados los productos y descongeladas las muestras, fue el siguiente:

- 1) Lavado de la microplaca con la solución de lavado (dos veces).
- 2) Pipeteo del diluyente en todos los pocillos.
- 3) Pipeteo del anticuerpo guinea pig anti-mouse leptin serum en todos los pocillos.
- 4) Pipeteo de las muestras y los estándares en sus correspondientes pocillos.
- 5) Incubación toda la noche 4 °C.
- 6) Lavado de la microplaca 5 veces e incubación durante 3 horas a 4 °C con la enzima conjugada anti-guinea pig IgG.
- 7) Lavado de la microplaca 7 veces e incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente y oscuridad con la solución sustrato de la enzima.
- 8) Adición de la solución *stop* para parar la reacción enzimática y medición de la absorbancia a 450 y 630 nm en un lector de placas. Los valores de la concentración de cada una de las muestras se calcularon por la extrapolación de las absorbancias de las concentraciones conocidas de la curva patrón preparada previamente.

9.3 Método enzimático (ACS-ACOD) para la cuantificación de ácidos grasos no esterificados.

Para la realización de este ensayo se utilizó el kit NEFA-HR (2) que contiene el R1 set (Cat. no. 434-91795), R2 set (Cat. no. 436-91995) y el estándar (Cat.no 4270-77000) de Fujifilm Wako Chemicals. En esta reacción enzimática los ácidos grasos no esterificados de la muestra se convierten en Acil-CoA, AMP y ácido pirofosfórico por la acción de la enzima Acil-CoA sintetasa (ACS). El Acil-CoA obtenido es oxidado en 2,3-trans-Enoyl-CoA y peróxido de hidrógeno por la enzima Acil-CoA oxidasa (ACOD). En presencia de peroxidasa el peróxido de hidrógeno produce el 3-metil-N-etil-N-(β-Hidroxietil)-Anilina y 4-aminoantipirina que forman un color violeta.

En una microplaca de 96 pocillos se pipeteó el reactivo R1 y 5 µL de cada muestra de suero sanguíneo. A los 3 minutos se pipeteó el reactivo R2 en cada pocillo. A los 7.5 minutos se midió la absorbancia de las muestras a las longitudes de onda de 546 nm y 660 nm en un lector de placas. El cálculo de la

concentración de ácidos grasos no esterificados de nuestras muestras se obtuvo teniendo en cuenta los valores de absorbancia del estándar.

10. OBTENCIÓN DE ARN Y PCR CUANTITATIVA (qRT-PCR).

10.1 Extracción de ARN de islote de Langerhans.

La obtención y purificación del ARN total de los islotes de Langerhans se realizó mediante la utilización del kit RNeasy® Micro Kit (Ref. 74004, Qiagen). Los islotes se aislaron como se explica previamente en el apartado 2 de la presente tesis y se mantuvieron en frío para evitar la activación de la expresión de genes debido a la concentración de glucosa que lleva el medio. A continuación, los islotes de cada animal fueron transferidos a viales tipo Eppendorf, se centrifugaron y lavaron con PBS para eliminar los restos de medio de cultivo. Posteriormente, fueron ultracongelados a -80 °C con el tampón de lisis comercial RLT suplementado con 0.01 % β -mercaptoetanol hasta la obtención de todo el tamaño muestral de los cuatro grupos experimentales. Una vez recolectadas todas las muestras, se procedió a realizar la extracción de ARN del lisado de células utilizando el protocolo descrito por la casa comercial. La muestra final de ARN fue recogida en 12 μ L, los cuales se utilizarán para realizar la PCR de retrotranscripción y la cuantificación del ARN obtenido. La concentración de ARN de las muestras se cuantificó empleando el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher). La pureza de la muestra de ARN fue evaluada mediante el índice 260/280; las muestras con una razón 260/280 $\approx$ 2.0 fueron consideradas aptas para su uso. Las muestras se ultracongelaron a -80 °C hasta su posterior utilización para la retrotranscripción.

10.2 Retrotranscripción (RT).

La retrotranscripción o transcripción reversa nos permitió transformar el ARN mensajero purificado (ARNm) a ADN complementario (ADNc) de cada una de las muestras experimentales. Se empleó el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Ref 4368813, Applied Biosystems) y el termociclador CFX96 (Bio-Rad). La retrotranscripción tuvo lugar a partir de 0.5 μ g de ARN por muestra para lo que se añadió la siguiente mezcla de reactivos (Tabla 2).

Tabla 2. Mezcla de reactivos utilizada para la reacción de retrotranscripción. * La enzima fue MultiScribe Reverse Transcriptase (Ref. 4319983, Applied Biosystems). *El inhibidor de la ARNasa fue Ambion RNase Inhibitor (Ref. AM2684, Invitrogen).

Reactivos	Volumen (μL)
Tampón 10x	2
dNTPs 25x	0.8
RT Random Primers 10x	2
MultiScribe*	1
Inhibidor de ARNasa*	0.5
Agua (hasta completar volumen 20 μL)	3.7

Para la reacción de retrotranscripción se empleó el programa convencional que se muestra en la figura 7.

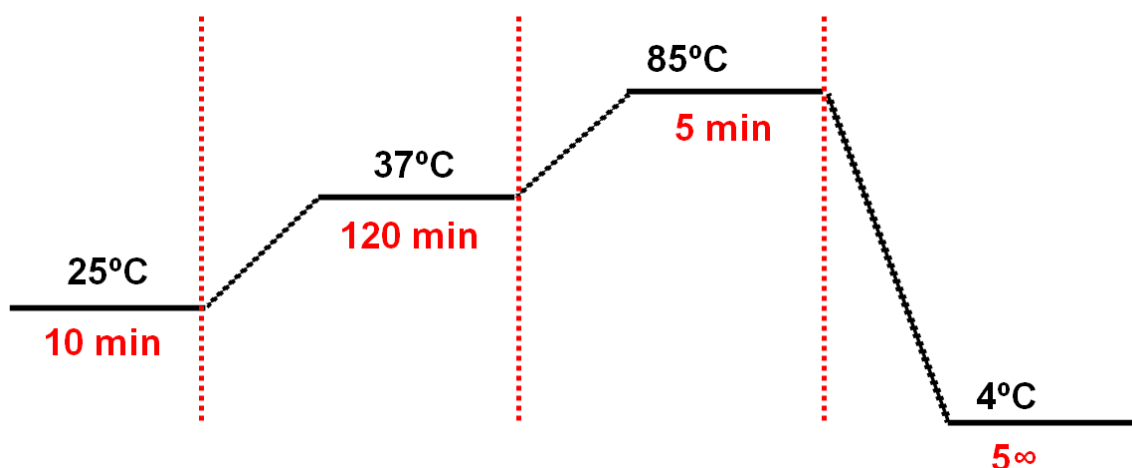


Figura 7. Condiciones del programa convencional de retrotranscripción.

10.3 qRT-PCR.

Tras la obtención del ADN complementario se procedió a la determinación cuantitativa de los niveles de expresión de los ARNm mediante la técnica de PCR cuantitativa (qRT-PCR) a tiempo real. En la amplificación de los genes de interés se utilizaron parejas de cebadores específicos que se muestran en la Tabla 3. Los cebadores se diseñaron con la ayuda de herramientas bioinformáticas como Primer-BLAST, NCBI o también PCR Primer Stats, SMS.

Tabla 3. Secuencia de cebadores utilizados en la qRT-PCR.

Gen	Directo (5'-3')	Reverso (5'-3')	Nº Acceso GenBank
Hprt	-GGTTAAGCAG TACAGCCCCA-	-TCCAACACTT CGAGAGGTCC-	NM_013556
Cdk1	-ACACGAGGT AGTGACGCTG-	-CTCTGAGTCG CCGTGGAAAA-	NM_007659.4
Ccnb1	-GTGCGCCTG CAGAAGAGTAT-	-TGCTCTTCC TCCAGTTGTCGG-	NM_172301.3
Ccnb2	-CTATCCGG CGGGCAGTTTTA-	-TCTGAGGTTT CTTCGCCACC-	NM_007630.2
Ccnd3	-GATGCTGGA GGTGTGTGAGG-	-CAATAGTCAG GGGCGTG GTT-	NM_007632.2
Cdc20	-GCCCACCAA AAAGGAGCATC-	-ATTCTGAGG TTTGCCGCTGA-	NM_023223.2
Cdca8	-TAGGTTTGA CTCCCGGGTCTT-	-CCACCTATG GGCACACTGAG-	NM_026560.4
Procr	-ACGCAAAA CATGAAAGGGAGC-	-ATTAGCAAC GCCGTCCACTT-	NM_011171.2
Spa17	-CGGTTACCC AGCAACGAGAT-	-TGCCTATATG GTACCTCTTCTTTCT-	NM_011449.2
Birc5	-TGACGCC ATCATGGGAGC-	-AAGGTGGC GATGCGGTAGT-	NM_001012273.1
Pdx-1	-AAGGTGGC GATGCGGTAGT-	-AAGGTGGC GATGCGGTAGT-	NM_008814.4
Hnf4α	-TCTGGATG ACCAGGTGGCGCT-	-GGACACACGG CTCATCTCCGC-	NM_008261.3
Golt1b	-CTTGTTTCAG GGGCTTTTTCCC-	-GTGCTGAGTAT TCTTCCAAAGGG-	NM_025872.4
Gja1	-TGAGGGAAG TACCCAACAGC-	-TCTGGGCAC CTCTCTTTCACT-	NM_010288.3
Scna9	-AGCGGCACA ACTAATCAGAT-	-ATGCTTGC TCTGCTCATGGC-	NM_001290674.1
ERα	-CAGAGATTA TGCCTGGGAAGG-	-AGAACCCAC TGACCCATTAGC-	NM_000125.4
GPER	-GTGAAGATG GAGCTGTCAC-	-AACAGTTTGG GCTGGAGTAG-	NM_029771.3

La PCR cuantitativa se realizó en un termociclador CFX96 Real Time System (Bio-Rad) y se utilizó el fluoróforo IQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) para llevar a cabo las amplificaciones. Este fluoróforo es una sonda que se une a los nucleótidos del ADN. Cuando su unión se produce en la doble hebra de ADN, la señal de fluorescencia aumenta y esto permite cuantificar el producto de PCR. Este valor de fluorescencia emitida es directamente proporcional al número de copias de ADN sintetizadas. Para las amplificaciones se partió de 1 µL de ADNc

en un volumen total de 10 µL. En la tabla 4 se muestran los volúmenes de los productos utilizados en la qRT-PCR.

Tabla 4. Reactivos utilizados en la reacción de la qRT-PCR.

Reactivos	Volumen (µL)
SYBR® Green 10x	5
Cebador Directo 10 µM	0.2
Cebador Reverso 10 µM	0.2
ADNc	1
Agua	3.6

El protocolo que se empleó fue de condiciones estándares y se recoge a continuación en la figura 8.

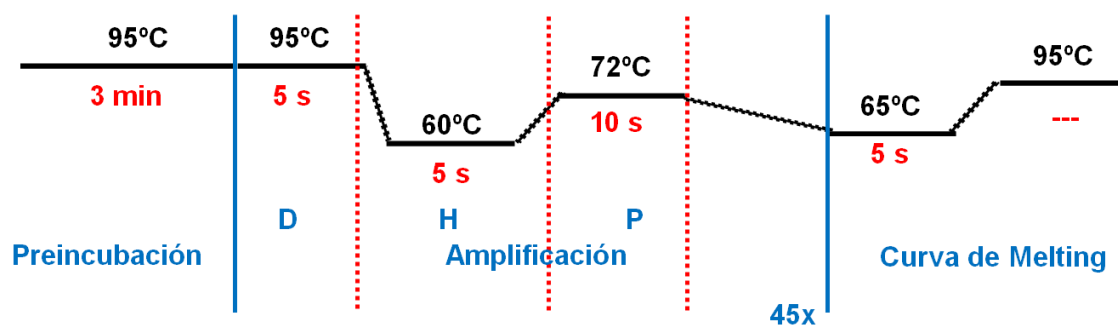


Figura 8. Condiciones programadas para la qRT-PCR. D= desnaturalización; H= hibridación; P= polimerización.

Los valores de fluorescencia se analizaron con el programa CFX Manager (v1.6, Bio-Rad) y los niveles de expresión de cada gen de interés se expresaron respecto a los niveles de expresión de un gen endógeno, caracterizado por tener una expresión constitutiva, mediante el método establecido $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak and Schmittgen, 2001) y Pfaffl (Pfaffl, 2001).

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos se expresan como la media $\pm$ el error estándar. El análisis se llevó a cabo utilizando el programa GraphPad Software v6. Para la comparación del grupo control frente a una variable se llevó a cabo el test t-test de Student, y el Análisis de la Varianza (ANOVA) para la comparación de más de una variable (de una vía o dos vías). Se utilizó estadística no-paramétrica en los casos donde el muestreo no cumplía las asunciones particulares para la aplicación de los test

paramétricos. En todos los casos, el nivel de significancia estadística entre grupos fue $p < 0.05$. El análisis estadístico empleado en cada caso se detalla en cada pie de figura.

RESULTADOS

1. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A BPA SOBRE LA MASA DE CÉLULA β DURANTE LA GESTACIÓN EN RATONES OF1.

Los estudios iniciales fueron llevados a cabo en ratones de la cepa OF1 dado que es la cepa de ratón en la que se realizaron los estudios previos en nuestro laboratorio, y en el que se han descrito los efectos del BPA sobre la homeostasis de glucemia y la función de la célula β pancreática en diferentes momentos de exposición (Alonso-Magdalena et al., 2006, Alonso-Magdalena et al., 2010, García-Arevalo et al., 2014; García-Arévalo et al., 2016).

En primer lugar, analizamos los efectos sobre el desarrollo del páncreas endocrino en el primer mes de vida del tratamiento con BPA a las dosis de 10 y 100 $\mu\text{g/kg/día}$ durante los días 9 a 16 de gestación (G9-G16). Tras el tratamiento, contamos con tres grupos experimentales: el grupo de crías procedentes de madres que han sido tratadas con vehículo durante los días G9 a G16 a las que llamamos Control, las crías procedentes de madres tratadas con BPA a la dosis de 10 $\mu\text{g/kg/día}$ durante los días G9 a G16 a las que llamamos BPA10, y el grupo de crías procedentes de madres tratadas con BPA a la dosis de 100 $\mu\text{g/kg/día}$ durante los días G9 a G16 a los que llamamos BPA100. Basándonos en el criterio de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos que establece como seguros los niveles de exposición a BPA por debajo de 50 $\mu\text{g/kg/día}$, consideramos que la dosis de 10 $\mu\text{g/kg/día}$ es una dosis baja.

Se ha descrito que el desarrollo del páncreas tiene lugar durante el último periodo de gestación que abarca aproximadamente desde los días 9 y 10 hasta el alumbramiento; y en los primeros días de vida posnatal. La extensa remodelación durante el desarrollo fetal y en la vida neonatal temprana es fundamental para establecer la masa de células β en la edad adulta. En el caso del ratón, la formación del páncreas endocrino empieza en los días 9 y 10 de gestación y será en el día 18 cuando son visibles los islotes de Langerhans (Bouwens and Rooman, 2005, Jørgensen et al., 2007, Rojas et al., 2010, Cano et al., 2014). Es por ello, que nuestro modelo de administración de BPA tiene lugar durante los días 9 al 16 de gestación, ya que en este periodo se produce la organogénesis pancreática y, por ende, se podrá evaluar su efecto en el desarrollo pancreático del feto.

Analizamos la evolución del peso corporal desde al día de nacimiento (P0) hasta el día postnatal 30 (P30). Observamos que las crías que habían sido expuestas a BPA durante la gestación presentaban un bajo peso al nacer (BPA10 $1,47 \pm 0,03$ g y BPA100 $1,60 \pm 0,04$ g) en comparación con las crías Control (Control $1,76 \pm 0,02$ g) (figura 9A). Los animales BPA10 aumentaron rápidamente de peso hasta alcanzar valores similares a los animales Control en el momento del destete en día P21, mientras que los animales BPA100 mantenían un peso reducido en comparación con los animales Control en día P21 (figura 9A). Cabe

destacar que los animales BPA100 experimentaron una ganancia de peso superior en el período comprendido entre P21 y P30 llegando a alcanzar un peso superior al de los ratones Control (figura 9A y B).

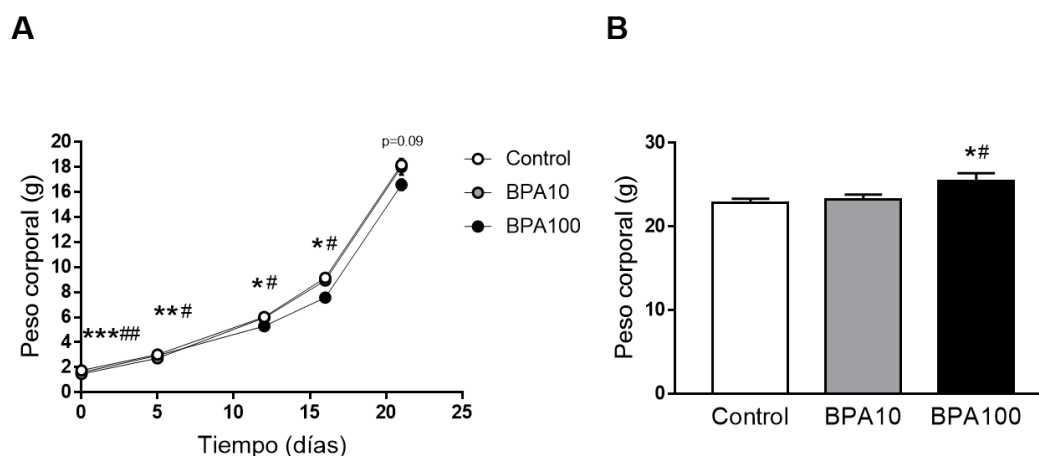


Figura 9. Efecto de la exposición a BPA en la evolución del peso corporal en ratones OF1. (A) Evolución del peso corporal desde el día P0 hasta el P21. **(B)** Peso corporal en P30. Los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar y la significancia estadística es determinada por ANOVA de una vía seguido del test post hoc Holm-Sidak en (A) P0, P5 y (B) P30 o Kruskal-Wallis seguido del test Dunn's en (A) P12 y P16. En A: $n = 42-77$ ratones de 10-12 camadas diferentes. En B: $n = 32-43$ ratones de 7-10 camadas diferentes. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ Control vs BPA10 o BPA100. # $p < 0.05$; ## $p < 0.01$ BPA10 vs BPA100.

Posteriormente analizamos posibles efectos de la exposición a BPA intraútero sobre el crecimiento y desarrollo del páncreas endocrino en los descendientes macho. Para ello, se sacrificaron los animales en día P30 y se procedió a la extracción del páncreas y a la preparación de cortes histológicos de las muestras de páncreas de los tres grupos experimentales: Control, BPA10 y BPA100. A partir de dichos cortes histológicos y mediante técnicas de inmunohistoquímica se identificaron las células β pancreáticas. A continuación, se cuantificó el área de las células insulino-positivas respecto al área total del páncreas (% área de la célula β). Los resultados mostraron un aumento del porcentaje del área de célula β en animales BPA10 en comparación con los animales Control (figura 10A). Asimismo, cuando se cuantificó la masa de célula β pancreática (calculada como la relación entre el área insulino-positiva y el área total del páncreas, multiplicada por el peso del páncreas), se observó un aumento significativo en animales BPA10 frente a los valores del grupo Control. En el caso de los ratones BPA100 observamos una tendencia al aumento en el porcentaje de célula β que no llega a ser estadísticamente significativa y a un marcado incremento en la masa de célula β (figura 10B).

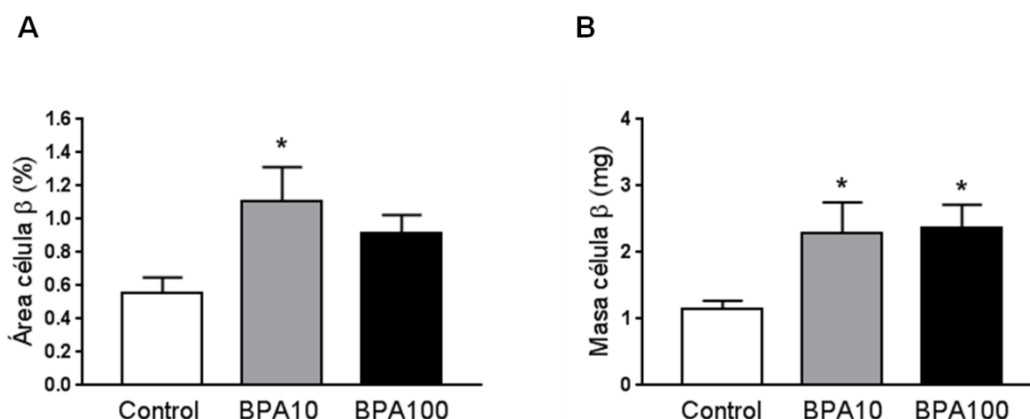


Figura 10. Efecto de la exposición a BPA durante el desarrollo en el páncreas endocrino en animales a día P30 en ratones OF1. (A) Análisis del área de la célula β (%), calculada como la razón del área insulino-positiva respecto al área total del páncreas. **(B)** Análisis de la masa de la célula β pancreática (mg) calculada como la relación del área insulino-positiva sobre el área total del páncreas, multiplicado por el peso del páncreas. Los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar y la significancia estadística es determinada por ANOVA de una vía seguido del test post hoc Holm-Sidak, $n = 5$ ratones de 5 camadas diferentes. * $p < 0.05$.

Estos resultados nos indican que la exposición a BPA, a las dosis de 10 y 100 $\mu\text{g/kg/día}$, durante la gestación, conducen a un aumento de la masa de célula β ; efecto que es significativo a las dosis de 10 y 100 $\mu\text{g/kg/día}$. Posteriormente, nos planteamos estudiar qué procesos podían estar involucrados en esta alteración del crecimiento de la célula β . Tanto la proliferación como la apoptosis son factores importantes en la regulación del ciclo celular y su balance va a determinar un correcto crecimiento celular. La formación de nuevas células β se explica en gran parte por el proceso de división celular. Analizamos, por tanto, posibles cambios en la tasa de proliferación de la célula β pancreática. Para ello, analizamos secciones de páncreas de las crías en día P30 mediante técnicas de inmunohistoquímica en las que habíamos realizado un doble marcaje frente al BrdU, que actúa como marcador de proliferación celular, y a insulina para identificar las células β . Posteriormente, cuantificamos las células doble positivas para BrdU y para insulina, encontrando un aumento significativo en la tasa de proliferación en células β procedentes de animales BPA10 y BPA100 en comparación con el Control (figura 11A). Estos resultados nos indican que bajo estas condiciones de exposición a BPA la tasa de proliferación de la célula β pancreática incrementaba.

La apoptosis es otro proceso importante a tener en cuenta en la determinación del crecimiento de la célula β pancreática. Para estudiar posibles diferencias en la tasa de muerte celular como consecuencia de la exposición a BPA durante la gestación, se realizó un ensayo de apoptosis en los cortes histológicos de las

crías al mes de vida. Para ello, se llevó a cabo un doble marcaje: de las células apoptóticas mediante la técnica TUNEL, y el marcaje frente a anticuerpos anti-insulina para la identificación de las células β pancreáticas. Los resultados mostraron una disminución significativa de la tasa de apoptosis en los grupos BPA10 y BPA100 en comparación con el grupo Control (figura 11B). A la vista de los resultados obtenidos concluimos que el aumento de masa de la célula β pancreática observado en los animales OF1 tratados con BPA intraútero se debía a un incremento de la proliferación, y a una disminución de la apoptosis de las células β pancreáticas.

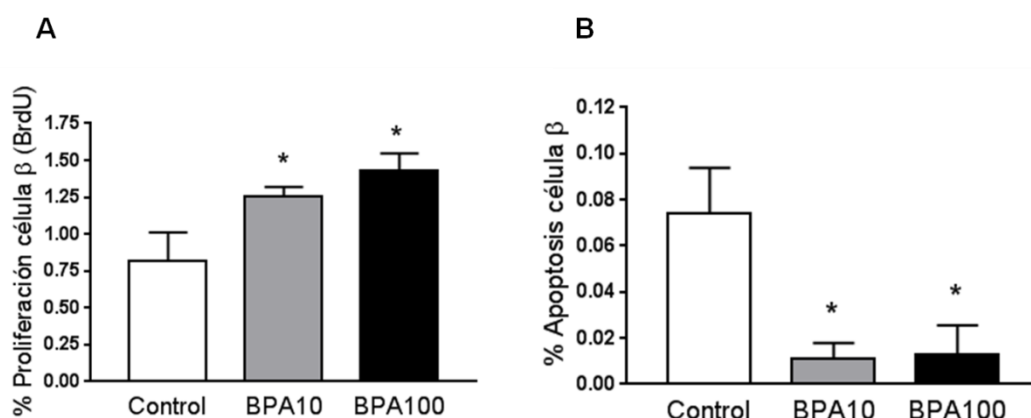


Figura 11. Determinación de la tasa de proliferación y apoptosis de la célula β pancreática en ratones OF1 a día P30. (A) Tasa de proliferación de la célula β , calculada como el porcentaje de células positivas para BrdU e insulina con respecto al número de células β totales. **(B)** Tasa de apoptosis de la célula β , calculada como el porcentaje de las células β pancreáticas apoptóticas. Los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar y la significancia estadística es determinada por ANOVA de una vía seguido del método post hoc Holm-Sidak's en (A), * $p < 0.05$, $n = 5$ por condición; y determinada por la prueba de Kruskal-Wallis seguido del test Dunn's en (B), $n = 5$ por condición, * $p < 0.05$.

A raíz de los resultados obtenidos en los animales OF1 nos planteamos estudiar si el mecanismo por el cual el BPA producía una alteración de la regulación del crecimiento de la célula β pancreática involucraba a los receptores de estrógenos. El BPA se puede unir a ambos receptores de estrógenos, ER β y ER α , presentes en la célula β . Estudios previos de nuestro grupo demostraron que el receptor ER β puede regular el crecimiento de la masa de la célula β pancreática (Alonso-Magdalena et al., 2013). Por ello, nos planteamos si los efectos del BPA sobre el páncreas endocrino en la descendencia podrían estar mediados por el receptor ER β . Para demostrarlo utilizamos machos WT y BERKO de la primera generación filial (F1) procedentes del cruce de ratones

heterocigotos BERKO para el receptor de estrógenos β . A las ratonas gestantes (F0) se les administró BPA por vía subcutánea, con una dosis diaria de 10 $\mu\text{g/kg/día}$ desde el día 9 al 16 de preñez. Solamente se administró la dosis de 10 $\mu\text{g/kg/día}$ debido a que, en nuestros estudios previos realizados en los animales de la cepa OF1, se observaba un mayor efecto del BPA a esta dosis frente a los efectos observados a la dosis de 100 $\mu\text{g/kg/día}$ en la generación F1. Además, esta dosis está mas cerca de la ingesta diaria tolerable (TDI) de 4 $\mu\text{g/kg/day}$ en la UE.

Los animales a los que llamaremos Controles son los ratones machos descendientes de las madres a las que les inyectó el vehículo. Los animales a los que nos referimos como BPA son los ratones machos descendientes de las madres a las que se les administró BPA durante los días 9 a 16 de gestación. A su vez estos dos grupos incluyen animales WT o BERKO homocigotos. Trabajamos por tanto con 4 grupos experimentales llamados: Control WT procedentes de madres tratadas con vehículo y que presentan genotipo WT; animales Control BERKO procedentes de madres tratadas con vehículo y que carecen de ER β ; animales BPA WT procedentes de madres tratadas con BPA y genotipo WT; y, por último, animales BPA BERKO procedentes de madres tratadas con BPA y con genotipo *knockout* para ER β . En el día 0 postnatal (P0) se llevó a cabo la cuantificación del área y masa de célula β pancreática, el resto de análisis se realizaron en ratones macho en el día postnatal 30 (P30) (figura 12).

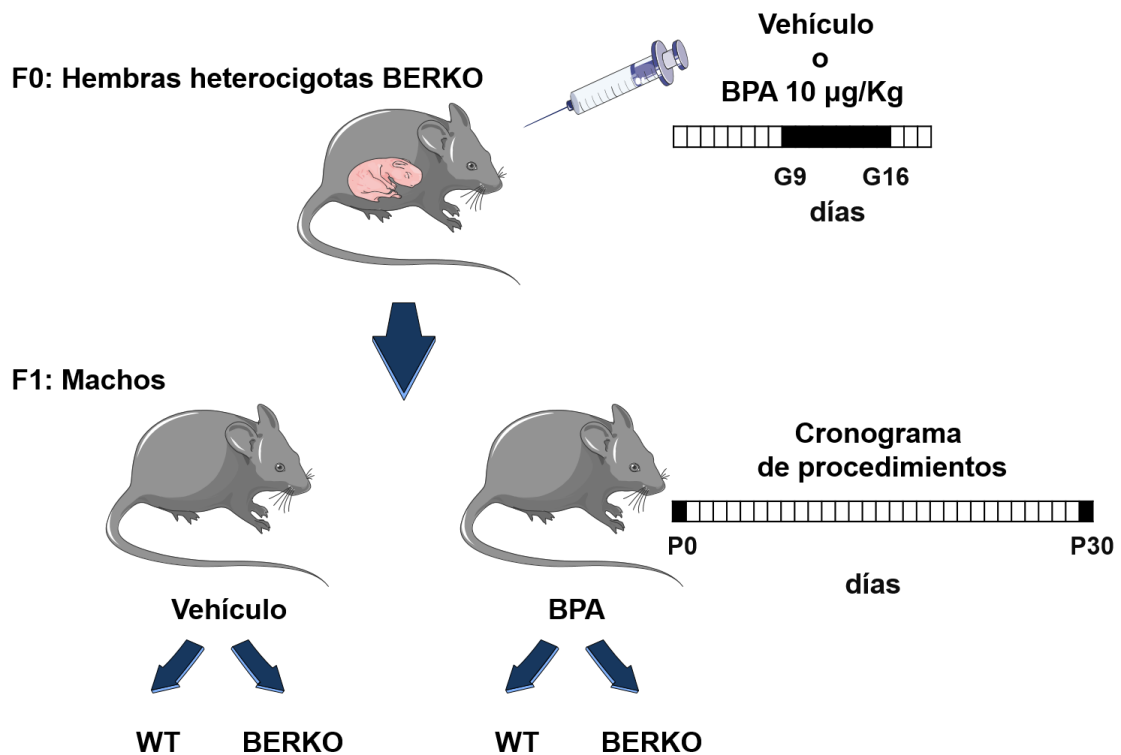


Figura 12. Ilustración del modelo animal. Las hembras gestantes F0 con genotipo heterocigoto BERKO fueron tratadas con BPA 10 µg/kg/día desde el día 9 a 16 de gestación (G9-G16). En la presente tesis nos centramos en el estudio de los efectos en los machos F1 expuestos intraútero a vehículo o BPA. Tenemos cuatro grupos experimentales: los animales expuestos al vehículo y genotipo WT (Control WT); los animales expuestos al vehículo y genotipo BERKO (Control BERKO); los animales expuestos a BPA y genotipo WT (BPA WT); y los animales expuestos a BPA y genotipo BERKO (BPA BERKO). En el cronograma de experimentación se observa que estos animales se utilizaron en día P0 o bien en P30.

2. LA EXPOSICIÓN *IN UTERO* AL BPA ALTERA EL DESARROLLO DE LA CÉLULA β PANCREÁTICA EN LA DESCENDENCIA A TRAVÉS DE ER β .

En primer lugar, analizamos el peso corporal de los recién nacidos machos, si bien no encontramos diferencias significativas entre ninguno de los cuatro grupos experimentales (figura 13A). Para examinar el efecto del BPA sobre el desarrollo de la célula β pancreática en los primeros estadios de vida, en concreto en el día P0, se llevó a cabo la cuantificación del área de la célula β pancreática. Para ello se realizaron cortes histológicos del páncreas de los descendientes machos de los cuatro grupos experimentales. A partir de dichos cortes histológicos y mediante técnicas de inmunohistoquímica se identificaron las células β pancreáticas (figura 13C). A continuación, se cuantificó el área ocupado por las células insulino-positivas respecto al área total del páncreas (% área de la célula β). Los resultados mostraron un ligero aumento del área de célula β en animales BPA WT en comparación con los animales Control WT sin alcanzar la significatividad estadística. Además, los resultados indicaron que el tratamiento con BPA conducía a un aumento significativo del porcentaje del área de la célula β pancreática (40 %) en los ratones WT frente al encontrado en los animales tratados con BPA y que carecen del receptor de estrógenos ER β (BERKO) (figura 13B). También se observó un aumento del área en animales BPA WT con respecto a los Control BERKO, si bien las diferencias entre grupos no fueron estadísticamente significativas ($p = 0.064$).

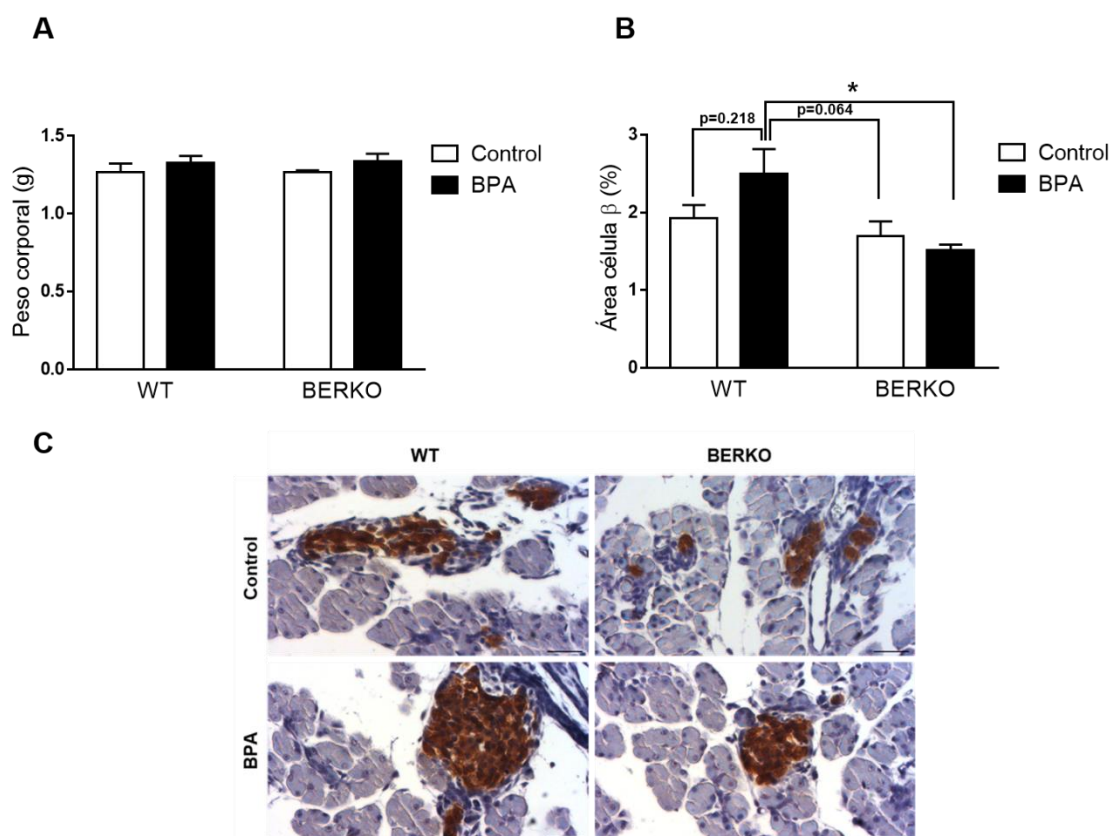


Figura 13. Efecto de la exposición a BPA durante el desarrollo en el páncreas endocrino en día P0. (A) Peso corporal medio de los ratones recién nacidos (g). **(B)** Análisis del área relativa de la célula β (%), calculada como la razón del área insulina-positiva respecto al área total del páncreas. **(C)** Imágenes representativas de cortes histológicos de páncreas con marcaje positivo para insulina tomadas a 20 aumentos. Barra de escala 50 μ m. Los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar y la significancia estadística es determinada por ANOVA de dos vías seguido del test post hoc Tukey's. En A: Control WT n = 6; BPA WT n = 4; Control BERKO n = 4; BPA BERKO n = 5. En B: Control WT n = 6; BPA WT n = 5; Control BERKO n = 5; BPA BERKO n = 5. * p < 0.05.

Posteriormente analizamos los efectos del BPA en la descendencia en el día P30. En primer lugar, se midieron los pesos corporales y los pesos pancreáticos (figura 14A y 14B, respectivamente) no observándose diferencias significativas entre grupos. En lo que se refiere a cambios en el páncreas endocrino, los resultados mostraron un aumento del área de célula β en animales BPA WT en comparación con los animales Control WT (figura 14C y E). Asimismo, cuando calculamos la masa de célula β pancreática, observamos una marcada tendencia al aumento en los animales BPA WT frente a los Controles con un p valor de 0.058. Cuando comparamos los valores del grupo BPA WT frente a BPA BERKO la diferencia es del 27.3% (figura 14D). Asimismo, al igual que observábamos en

animales recién nacidos, la exposición a BPA conducía a una disminución del área de la célula β en los ratones BERKO con respecto al grupo BPA WT.

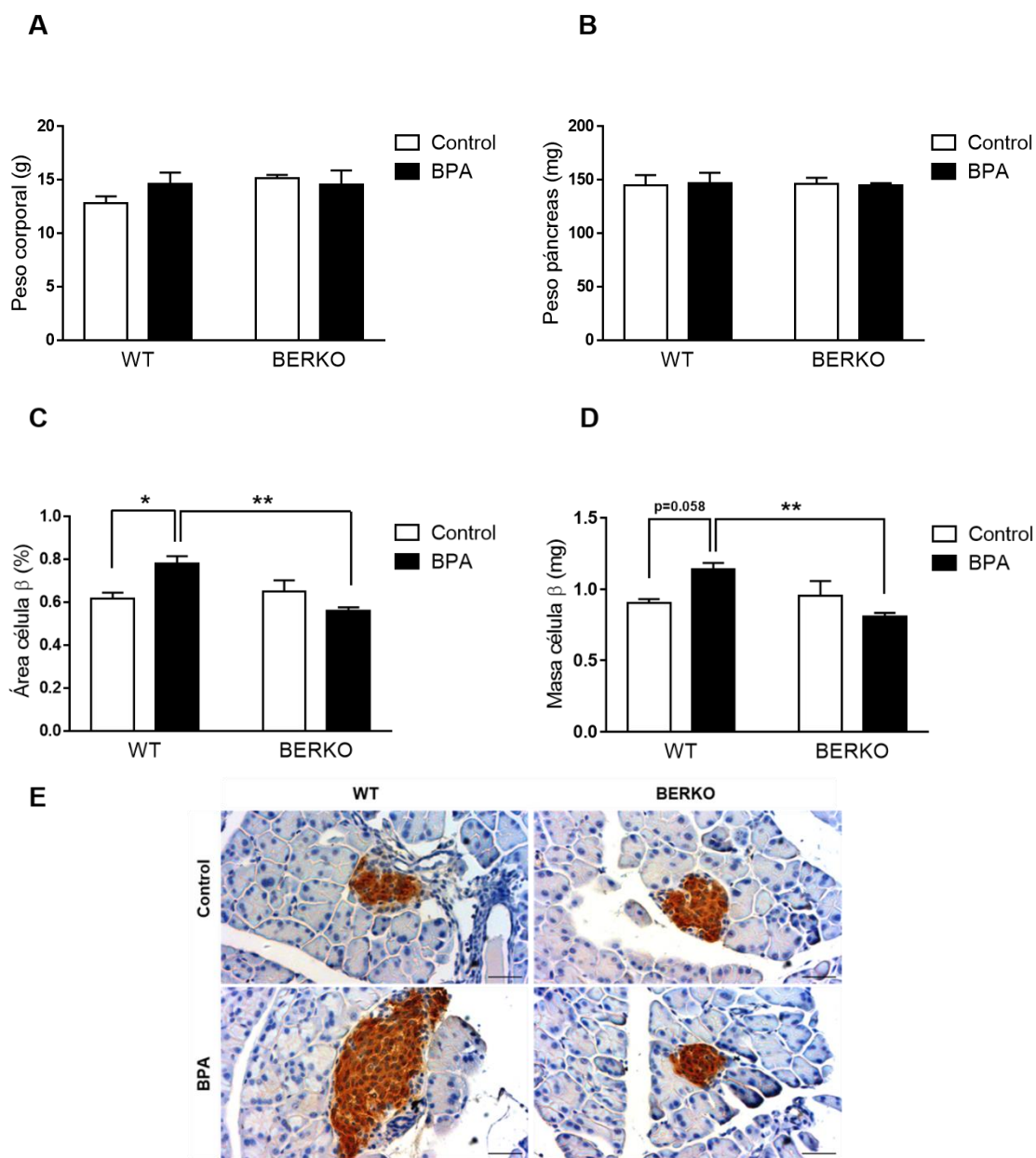


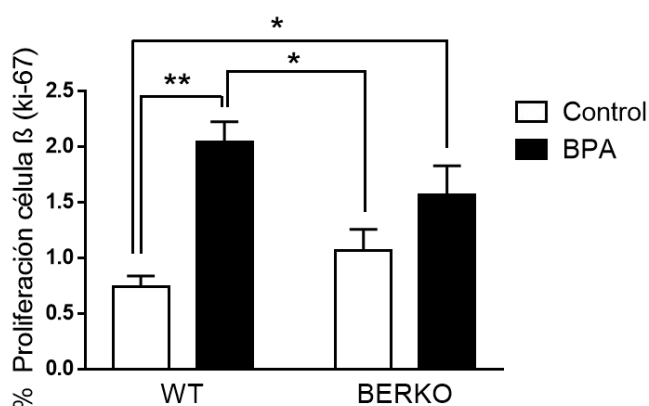
Figura 14. Efecto de la exposición a BPA durante el desarrollo en ratones macho F1 en día P30. (A) Peso corporal medio de los ratones al mes de vida. **(B)** Peso de los páncreas extraídos a día P30. **(C)** Análisis del área de la célula β (%), calculada como la razón del área insulino-positiva respecto al área total del páncreas. **(D)** Análisis de la masa de la célula β pancreática (mg) calculada como la relación del área insulino-positiva sobre el área total del páncreas, multiplicado por el peso del páncreas. **(E)** Imágenes representativas de cortes histológicos con marcaje positivo para insulina mediante histoquímica. Barra de escala 50 μ m. Los datos se expresan como la media $\pm$

error estándar y la significancia estadística es determinada por ANOVA de dos vías seguido del test post hoc Tukey's. En A: Control WT n = 5; BPA WT n = 5; Control BERKO n = 4; BPA BERKO n = 4. En B-D: Control WT n = 5; BPA WT n = 5; Control BERKO n = 5; BPA BERKO n = 5. * p < 0.05, ** p < 0.01.

Estos resultados nos indican que las exposiciones a una dosis medioambientalmente relevante de BPA durante la gestación conducen a una alteración del desarrollo del páncreas que se caracteriza por un aumento de la masa de célula β pancreática. Dicho aumento empieza a ser visible en el momento del nacimiento y es mediado por la activación del receptor ER β .

Tal como hemos descrito, la proliferación y la apoptosis celular marcarán el correcto crecimiento celular en la vida adulta. Estudiamos, por tanto, posibles cambios en la tasa de proliferación de la célula β . Para ello, analizamos las secciones del páncreas de las crías en el día P30 mediante técnicas de inmunohistoquímica. Se realizó un doble marcaje frente a la proteína nuclear, Ki-67, que actúa como marcador de proliferación celular, y a la insulina para identificar las células β pancreáticas, y se cuantificaron las células doble positivas. Encontramos un aumento significativo en la tasa de proliferación, siendo el doble en las células β procedentes de animales BPA WT en comparación con los valores del grupo Control WT, lo cual puso de manifiesto el efecto proliferativo de la exposición a BPA intraútero. Asimismo, se observaron diferencias significativas entre los grupos Control WT vs BPA BERKO, y BPA WT vs Control BERKO (figura 15A y B). Observamos que cuando el receptor ER β no está presente no se produce el citado incremento de proliferación, al igual que ocurre con el aumento de masa de célula β , por lo que podemos asumir que los efectos sobre la división celular y la masa de la célula β del BPA están mediados por la activación de ER β .

A



B

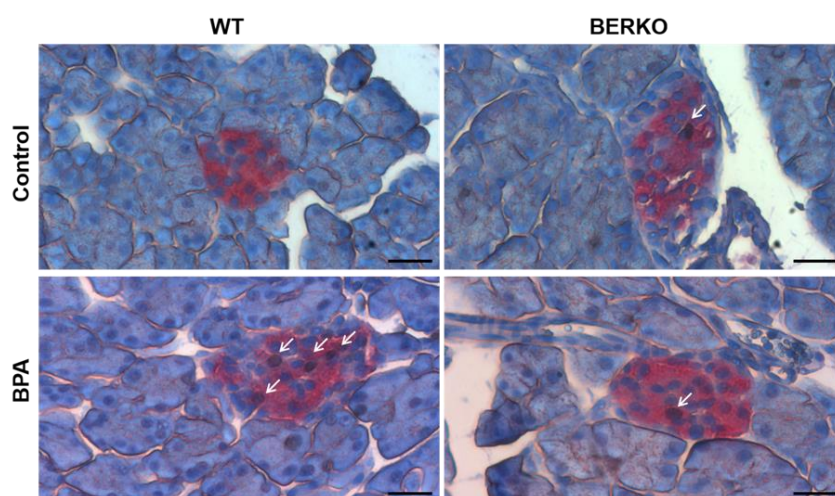


Figura 15. Determinación de la tasa de proliferación de la célula β pancreática en animales P30. (A) Análisis de la proliferación de la célula β , calculada como el porcentaje de células β positivas para Ki-67 con respecto al número de células β pancreáticas totales. **(B)** Imágenes representativas de cortes histológicos con marcaje nuclear positivo para Ki-67 (núcleo marrón, indicado con flechas) y marcaje citoplasmático para insulina (rosa) mediante inmunohistoquímica. Barra de escala 50 μ m. Los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar y la significancia estadística es determinada por ANOVA de dos vías seguido del test post hoc Tukey's. Control WT n = 5; BPA WT n = 5; Control BERKO n = 5; BPA BERKO n = 5. * p < 0.05, ** p < 0.01.

Asimismo, se llevó a cabo la cuantificación de la tasa de apoptosis en los cortes histológicos de las crías WT y BERKO al mes de vida. Para ello, se realizó un doble marcaje; el marcaje de células apoptóticas mediante la utilización de la técnica TUNEL y el marcaje de insulina. Al analizar estas secciones en el microscopio de fluorescencia nos encontramos con una tasa de apoptosis extremadamente baja en los controles, observando una razón aproximada de 1 célula β apoptótica en relación a un número total de 1500 células β pancreáticas. Esta baja tasa de apoptosis en los controles nos impidió realizar un correcto análisis estadístico y, por tanto, este estudio no pudo aportar ningún dato fiable

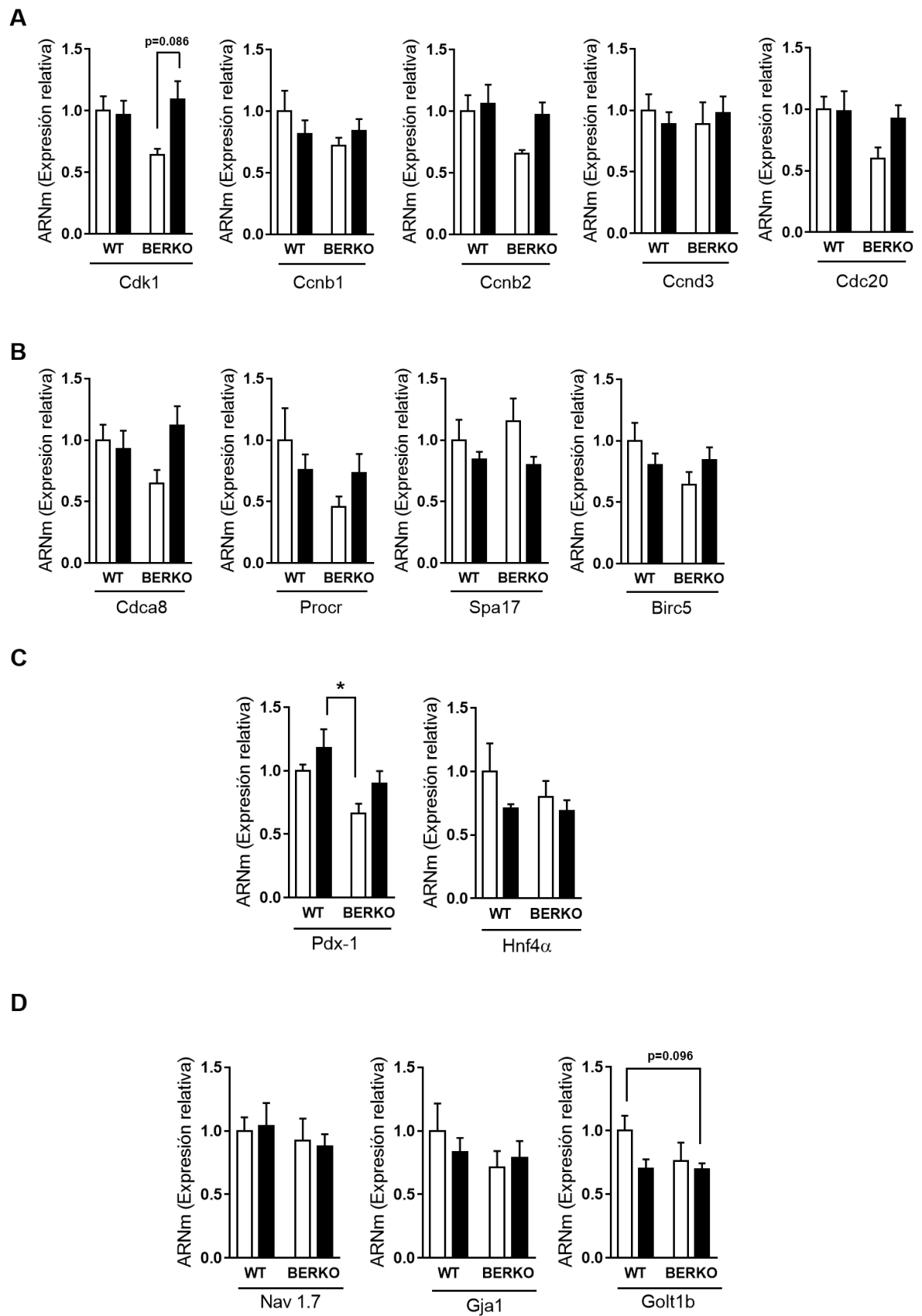
a la presente tesis. Esta limitación de la baja tasa apoptótica también ocurre en ratas adultas (Scaglia et al., 1997) y en ratones (Mandrup-Poulsen, 2001).

3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES EN CÉLULAS β PROCEDENTES DE ANIMALES WT y BERKO EXPUESTOS A BPA *IN UTERO*.

Nuestro siguiente objetivo se centró en averiguar si la exposición materna (F0) a BPA (10 $\mu\text{g/kg/día}$) durante la gestación podría modificar el patrón de expresión de genes relacionados con el control del ciclo celular en los machos F1. Como se mencionó anteriormente, la capacidad de regeneración de la célula β se ve incrementada por la exposición a BPA a través del receptor ER β . Quisimos estudiar si dicho aumento se debía a una sobreexpresión de genes que intervienen en la regulación del ciclo celular y en la maduración y función de la célula β . Para abordar esta cuestión, cuantificamos mediante qRT-PCR los niveles de expresión de genes tales como la quinasa dependiente de ciclina 1 (Cdk1), la ciclina B1 (Ccnb1), la ciclina B2 (Ccnb2), la ciclina D3 (Ccnd3), la proteína del ciclo de división celular 20 (Cdc20), la proteína 8 asociada al ciclo de división celular 8 (Cdca8), el receptor de la proteína C (Procr), la proteína de la superficie del espermatozoide 17 (Spa17) y el inhibidor baculovírico de la apoptosis que contiene la repetición 5 (Birc5). Asimismo, analizamos posibles cambios de expresión en genes implicados en la maduración y función de la célula β , como el homeobox pancreático y duodenal o también llamado factor promotor de insulina 1 (Pdx-1) y el factor nuclear 4 alfa de hepatocito (Hnf4 α); y en otros genes, como el transportador de Golgi 1B (Golt1b), la proteína alfa de uniones Gap (Gja1) y la subunidad alfa del canal de sodio NaV1.7 (Scna9). La selección de estos genes se realizó en base a datos previos obtenidos mediante la realización de un microarray en animales OF1 expuestos a BPA durante la gestación (García-Arevalo et al., 2016). Además, analizamos posibles cambios en la expresión de los genes que codifican para los receptores de estrógenos ER α y GPER. En nuestro estudio el análisis de la expresión génica de los citados genes se realizó a partir de muestras de ARNm extraído de islotes de Langerhans procedentes de animales P30 que habían sido expuestos a BPA durante la etapa gestacional. Se analizaron muestras de cuatro grupos experimentales: Controles (Control WT y Control BERKO) y BPA (BPA WT y BPA BERKO).

El análisis de la expresión génica relativa puso de manifiesto que la exposición a BPA no modificaba de manera significativa la expresión de genes implicados en el control del ciclo celular (figura 16A y B). No obstante, encontramos que en el grupo Control BERKO había una disminución (aunque no estadísticamente significativa) en la expresión relativa de casi todos los genes del ciclo celular estudiados, indicando que el genotipo *knockout* per se, puede conllevar una

menor expresión de genes relacionados con el proceso de división celular. Con respecto a los niveles relativos de expresión del gen Cdk-1, se observó una marcada tendencia de aumento en el grupo BPA BERKO frente al Control BERKO (figura 16A). Con respecto a los genes relacionados en la maduración y función de la célula β (figura 16C) se observó un aumento de la expresión del gen Pdx-1 en el grupo BPA WT frente al Control BERKO. El gen Pdx-1 es fundamental para el correcto desarrollo embrionario pancreático y, además, en los adultos, tiene un papel importante en la función de la célula β , regulando la expresión del gen de la insulina. También se analizó la expresión de otros genes relacionados con procesos importantes de la función de la célula β pancreática, como el canal de sodio dependiente de voltaje, Nav 1.7 (Scna9); y el transportador de Golgi, Golgi1b, gen que codifica una proteína implicada en el transporte de la insulina desde su biosíntesis en el aparato de Golgi. Asimismo, se cuantificó la expresión del gen Gja1 que codifica una proteína estructural que forma las uniones gap, uniones que permiten la comunicación intercelular para regular procesos como apoptosis, proliferación o diferenciación. Para ninguno de estos 3 genes, se encontraron cambios significativos en los niveles de expresión del ARNm en animales BPA frente a animales controles (figura 16D). En cuanto a los niveles relativos de expresión de los genes que codifican para los receptores de estrógenos se observó que la expresión del gen ER α presentaba una disminución en el grupo BPA WT frente al Control WT ($p < 0.01$). Esta misma tendencia se observó en la expresión del gen GPER entre los grupos BPA WT y Control WT, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (figura 16E).



E

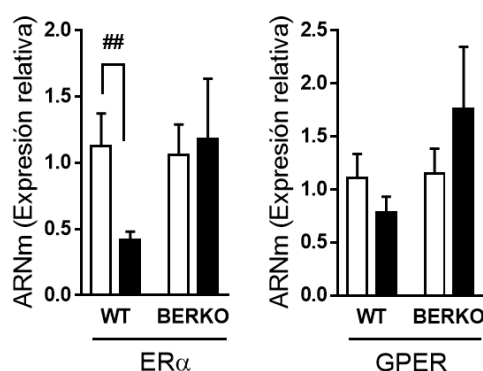


Figura 16. Expresión génica en islotes de Langerhans de los machos F1 que han sido expuestos al BPA *in utero* entre los días 9-16 de gestación. En blanco (Control) y en negro (BPA). (A-B) Expresión de ARNm (relativa al control) de los genes relacionados con el ciclo celular: Cdk1, Ccnb1, Ccnb2, Ccnd3 y Cdc20 en A; Cdc8, Procr, Spa17 y Birc5 en B. **(C)** Expresión de ARNm (relativa al control) de genes que intervienen en el proceso de maduración y función de la célula β : Pdx-1 y Hnf4 α . **(D)** Expresión de ARNm (relativa al control) de otros genes como: Nav 1.7, Gja1 y Golt1b. **(E)** Expresión de ARNm (relativa al control) de los genes de receptores de estrógenos: ER α y GPER. Los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar y la significancia estadística calculada mediante ANOVA de dos vías seguido del test post hoc Tukey's. Control WT n = 6, BPA WT n = 6, Control BERKO n = 5 y BPA BERKO n = 8. * p < 0.05; o t-test Student ## p < 0.01.

4. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A BPA DURANTE EL DESARROLLO EN LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA Y LA SENSIBILIDAD A LA INSULINA EN RATONES WT Y BERKO.

Evaluamos si los cambios observados en la masa de células β pancreáticas debido a la exposición a BPA durante la etapa gestacional podrían implicar cambios en la homeostasis de la glucosa en la descendencia masculina WT y BERKO al mes de vida. Para ello, se llevó a cabo un test de tolerancia intraperitoneal a la glucosa en el día P30 en los ratones macho WT y BERKO que habían sido expuestos a una dosis diaria de vehículo o BPA (10 μ g/kg/día) entre los días 9 a 16 de gestación.

Para llevar a cabo el test de tolerancia a la glucosa se dejó en ayuno a los ratones durante un periodo de 6 horas. Posteriormente, se tomó una medida de la glucemia a tiempo 0 y tras ello, se les inyectó una dosis de glucosa de 2g/kg intraperitoneal. Se midieron los niveles de glucosa en sangre a los tiempos 10, 20, 30, 60 y 120 minutos. Como se puede observar en la figura 17A no se

encontraron diferencias en los niveles de glucemia en respuesta a la carga de glucosa entre grupos experimentales. No obstante, observamos que el grupo BPA BERKO presentaba una ligera tendencia a un aumento en los niveles de glucemia en respuesta a glucosa en relación al grupo Control BERKO, diferencia que alcanzó la significatividad estadística en el minuto 20 (figura 17A). En cuanto al análisis del área bajo la curva del test de tolerancia a la glucosa, no se observaron diferencias significativas en ninguno de los cuatro grupos experimentales estudiados (figura 17B).

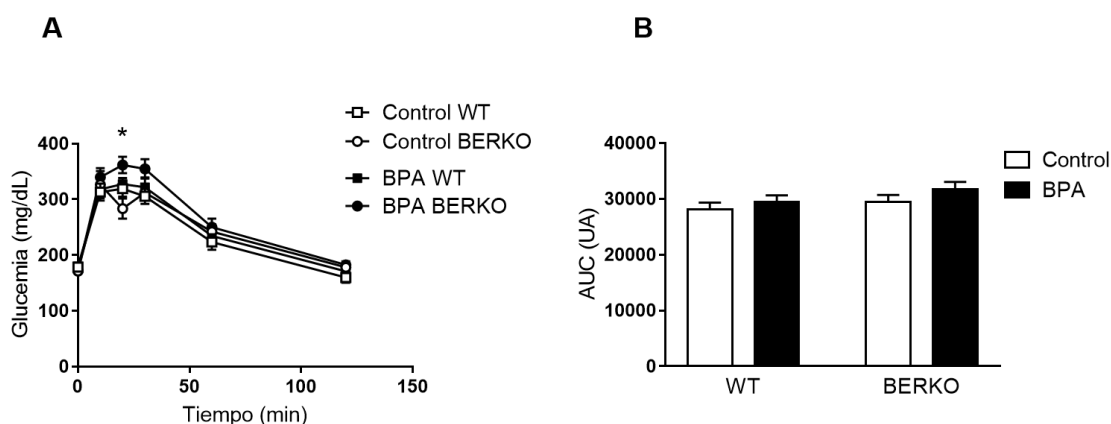


Figura 17. Análisis de la tolerancia a la glucosa en los machos F1 al mes de vida.

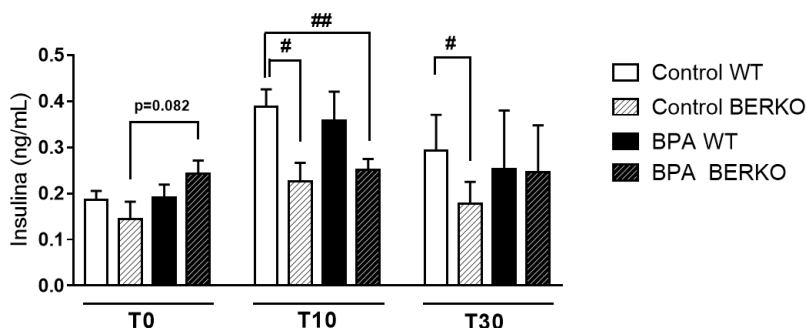
(A) Curva de glucemia en respuesta a una inyección intraperitoneal de glucosa correspondiente a los cuatro grupos experimentales analizados: Control WT (cuadrado blanco), Control BERKO (círculo blanco), BPA WT (cuadrado negro) y BPA BERKO (círculo negro). **(B)** Área bajo la curva, AUC (UA) del test de tolerancia a la glucosa. Los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar y la significancia estadística por ANOVA de dos vías seguido del test post hoc Tukey's. En A y B: Control WT $n = 13$, BPA WT $n = 15$, Control BERKO $n = 5$ y BPA BERKO $n = 9$. * $p < 0.05$ a los 20 minutos entre el grupo Control BERKO vs BPA BERKO.

Asimismo, se evaluaron los niveles de insulina basal en plasma, así como la liberación de insulina en diferentes puntos temporales tras la inyección de glucosa (GSIS) (0, 10 y 30 minutos). Se observó que la cantidad de insulina liberada en respuesta a glucosa a los diferentes tiempos analizados era similar en los animales Control y BPA WT (figura 18). Estos resultados nos indican que la exposición a BPA intraútero no conlleva cambios en la tolerancia a la glucosa ni en la secreción de insulina *in vivo* al mes de vida. Sin embargo, en los animales BERKO se observó una disminución de la secreción de insulina en respuesta a la carga de glucosa con respecto a los animales WT Control. Dicha diferencia fue máxima transcurridos 10 minutos de la inyección de glucosa. Las diferencias fueron visibles entre el grupo Control WT y los grupos Control BERKO y BPA

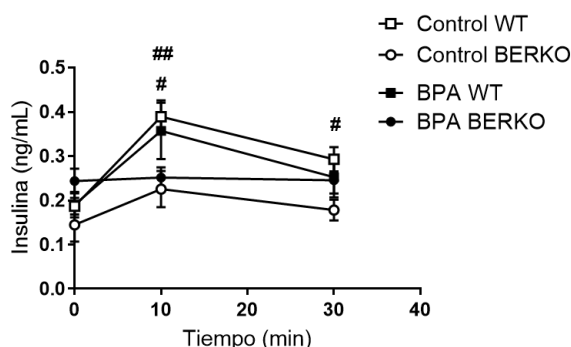
BERKO. La disminución se mantiene además en los animales Control BERKO a los 30 minutos de la administración de glucosa (figura 18A y B).

Los datos sugieren una reducción de la primera fase de la secreción de insulina en ratones carentes de ER β en relación a los animales Control (figura 18A). Con respecto al área bajo la curva (AUC) de la GSIS, se observa que los grupos BERKO tienen una menor área, siendo la diferencia entre Control WT y Control BERKO estadísticamente significativa y rozando la significancia el grupo BPA BERKO frente al Control (figura 18C). En conjunto, los resultados obtenidos ponen de manifiesto la importancia de ER β en la regulación de la liberación de insulina y, por lo tanto, en la homeostasis de la glucosa.

A



B



C

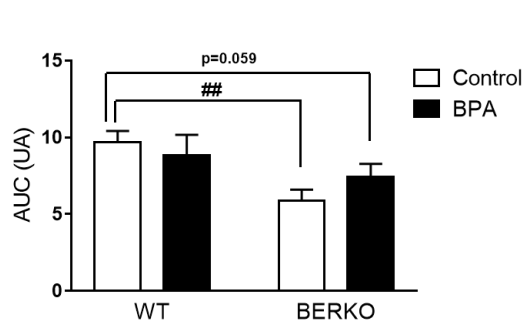


Figura 18. GSIS en animales F1 al mes de vida expuestos *in utero* a BPA. (A) Cuantificación de la secreción de insulina basal (tiempo 0) y a los 10 y 30 minutos tras la inyección de una dosis de glucosa de 2 g/kg en los cuatro grupos experimentales de estudio: Control WT (blanco), Control BERKO (blanco rallado), BPA WT (negro) y BPA BERKO (negro rallado). **(B)** Curva de la GSIS a los diferentes tiempos analizados 0 (T0), 10 (T10) y 30 (T30) minutos en los cuatro grupos experimentales: Control WT (cuadrado blanco), Control BERKO (círculo blanco), BPA WT (cuadrado negro) y BPA BERKO (círculo negro). **(C)** Área bajo la curva, AUC (UA) de la GSIS. Los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar y la significancia estadística por ANOVA de dos vías

seguido del test post hoc Tukey's y t-test Student para comparación entre dos grupos. En A, B y C: Control WT n = 8, BPA WT n = 12, Control BERKO n = 4 y BPA BERKO n = 7. # p < 0.05, ## p < 0.01. En B: ##, entre el grupo Control BERKO vs BPA BERKO y # entre el grupo Control WT vs Control BERKO.

Posteriormente analizamos posibles efectos de la administración del BPA durante la gestación en la secreción de insulina en respuesta a concentraciones estimuladoras de glucosa ex vivo. Para ello, se aislaron islotes de Langerhans de los ratones macho F1 en día P30 y se llevó a cabo la medición de insulina en respuesta a tres concentraciones crecientes de glucosa (3, 8 y 16 mM glucosa). Como se puede ver en la figura 19 observamos que el incremento de la concentración de glucosa extracelular provocó, como era esperable, un aumento de la secreción de insulina en los islotes control siendo la respuesta máxima a la concentración 16 mM de glucosa. En cuanto a los grupos tratados con BPA no se observaron cambios significativos con respecto a los grupos control a ninguna concentración de glucosa. Sin embargo, a la concentración no estimuladora de glucosa (3 mM) observamos una diferencia significativa entre el grupo Control BERKO vs BPA WT.

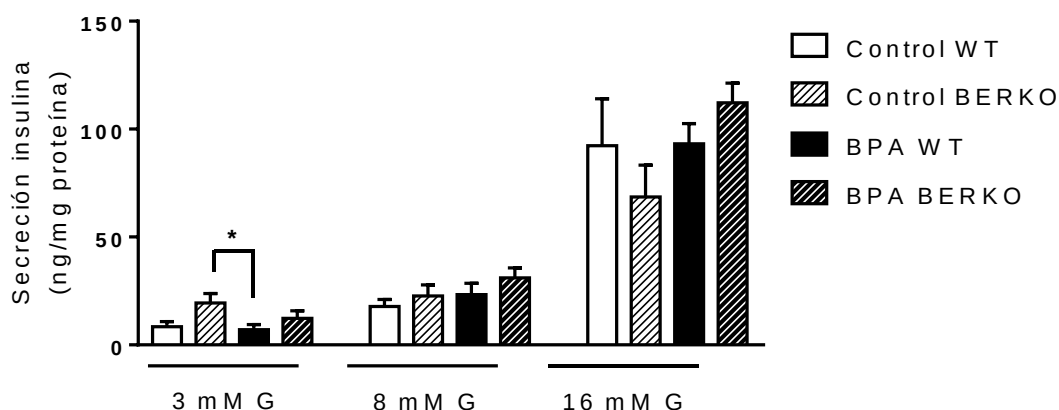


Figura 19. Secreción de insulina de islotes pancreáticos en respuesta a concentraciones crecientes de glucosa (3, 8 y 16 mM). Los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar y la significancia estadística por ANOVA de dos vías seguido del test post hoc Tukey's. Control WT n = 5, Control BERKO n = 4, BPA WT n = 7, y BPA BERKO n = 5, Control BERKO vs BPA WT. * p < 0.05.

Para completar el estudio de la homeostasis de la glucosa se cuantificaron los niveles plasmáticos de insulina y leptina. Además, también cuantificamos metabolitos circulantes en plasma como los ácidos grasos no esterificados, procedentes de la lipólisis de triglicéridos. Cuando se analizaron los niveles de insulina en estado de saciedad no encontramos diferencias significativas entre

los cuatro grupos experimentales estudiados (Tabla 5). No obstante, en el grupo BPA BERKO observamos niveles más bajos de esta hormona. Con respecto a la leptina y a los ácidos grasos no esterificados (Tabla 5) no hubo cambios significativos.

Tabla 5. Valores plasmáticos de hormonas y metabolitos en animales F1 al mes de vida tras la exposición *in utero* a BPA. Todos los parámetros han sido medidos en estado de saciedad. Los datos son expresados como la media $\pm$ error estándar y analizados por ANOVA de dos vías seguido del test post hoc Tukey's. Control WT n = 17, BPA WT n = 23, Control BERKO n = 9 y BPA BERKO n = 15.

	Control WT	Control BERKO	BPA WT	BPA BERKO
Insulina (ng/mL)	0.56 $\pm$ 0.05	0.55 $\pm$ 0.05	0.53 $\pm$ 0.04	0.47 $\pm$ 0.04
Leptina (ng/mL)	2.01 $\pm$ 0.20	1.57 $\pm$ 0.20	1.75 $\pm$ 0.18	1.69 $\pm$ 0.15
Ácidos grasos no esterificados (mg/dL)	1.96 $\pm$ 0.13	1.82 $\pm$ 0.21	1.98 $\pm$ 0.14	2.00 $\pm$ 0.14

5. EFECTO DEL BPA SOBRE LA CAPACIDAD DE REPLICACIÓN DE LA CÉLULA β PANCREÁTICA.

Teniendo en cuenta el aumento observado de la masa y de la tasa de replicación de célula β pancreática en animales expuesto *in utero* a BPA se decidió investigar si el BPA podría tener una acción directa sobre la proliferación de las células β pancreáticas. Para ello, se llevaron a cabo cultivos primarios de células aisladas de islotes de Langerhans procedentes de animales en diferentes etapas de la vida: animales neonatos de 4 a 5 días de edad (P4 y P5) y animales adultos (2-3 meses de edad) tanto WT como BERKO. Las células fueron tratadas con BPA a diferentes dosis (1, 10 o 100 nM) y con el marcador de proliferación BrdU (10 μ M) durante 48 horas. El BrdU actúa como un análogo del nucleótido timidina y esta analogía permite su incorporación en la fase de síntesis del ciclo celular. Posteriormente, se identificaron las células positivas para insulina y BrdU mediante inmunocitoquímica.

Observamos que las células β pancreáticas procedentes de ratones neonatos cultivadas en presencia de 1 nM BPA presentaban un aumento en la tasa de incorporación de BrdU frente a las células del grupo Control, lo que se traduce en un incremento de la tasa de proliferación de la célula β en las células de los neonatos BPA WT respecto al Control WT, $p < 0.01$ (figura 20A y figura 21). No se observaron cambios en la tasa de división de células β pancreáticas a

concentraciones más elevadas de BPA, 10 y 100 nM, lo que pone de manifiesto que el efecto del BPA sobre la capacidad de replicación de la célula β sigue un patrón de respuesta en forma de curva no monotónica, característica de los disruptores endocrinos. En las células procedentes de ratones neonatos BERKO expuestas a BPA no se encontraron diferencias significativas respecto al Control (figura 20B), si bien se aprecia una tendencia a la disminución del porcentaje de proliferación. Estos datos nos muestran que el efecto proliferativo del BPA en células β pancreáticas neonatales es mediado por la activación de ER β .

Los experimentos *in vitro* realizados a partir de células procedentes de animales adultos mostraron resultados similares. Se observó un incremento estadísticamente significativo del porcentaje de proliferación en células β en respuesta a BPA del orden de tres veces con respecto a las células Control en animales WT (figura 20C y figura 22). En el caso de las células procedentes de machos BERKO no se observaron diferencias en la tasa de división celular en los diferentes grupos experimentales frente a las células Control (figura 20D). Resultados muy similares se encontraron en los cultivos primarios derivados de las hembras WT, donde las tres dosis de BPA ensayadas condujeron a un aumento estadísticamente significativo del número de células β pancreáticas, aproximadamente del doble con respecto al Control (figura 20E). Cabe mencionar que el aumento observado en el caso de las células procedentes de machos fue de mayor magnitud que en el de las hembras. De modo similar a lo obtenido en machos, en las células aisladas de islotes de Langerhans procedentes de hembras carentes del receptor ER β no se observaron efectos del BPA sobre la capacidad de proliferación de las células β (figura 20F). Por último, podemos observar que los niveles basales de proliferación en los adultos descienden de manera llamativa con respecto a los neonatos (figura 20A, C y E). En base a estos datos, podemos concluir que el BPA actuaría de forma directa sobre la división celular de la célula β a través del receptor ER β incrementando la proliferación a la dosis de 1 nM en los neonatos y a las dosis de 1 nM, 10 nM y 100 nM en los adultos tanto en machos como en hembras.

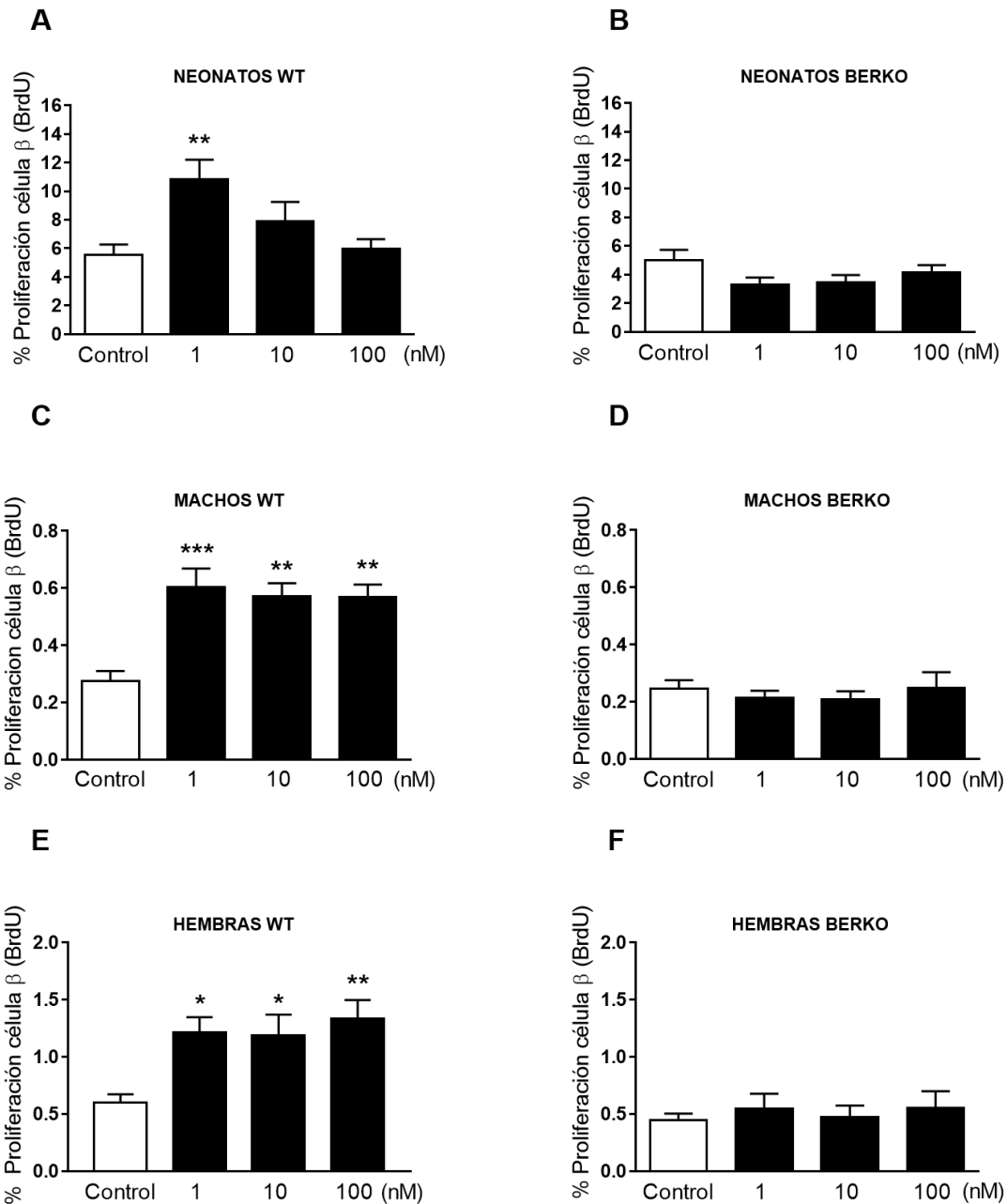


Figura 20. Porcentaje de proliferación de las células β pancreáticas en cultivos celulares expuestos a diferentes dosis de BPA (1, 10 y 100 nM). Se cultivaron células aisladas de los islotes de Langerhans de ratones neonatos WT o BERKO en presencia del vehículo o BPA y BrdU. La proliferación de células pancreáticas se midió como el porcentaje de incorporación de BrdU en células positivas para insulina con respecto al número total de células β pancreáticas. Tasa de proliferación en **(A)** células WT de neonatos **(B)** células BERKO de neonatos **(C)** células WT de machos adultos **(D)** células BERKO de machos adultos **(E)** células WT de hembras adultas **(F)** células BERKO de hembras adultas. Los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar y la significancia estadística es determinada por ANOVA de una vía seguido del post hoc Dunnett's. En A: n = 800-1000 células β cuantificadas por cubre, 5-7 cubres por

condición procedentes de 6 neonatos WT; en B: n = 900-1100 células β cuantificadas por cubre, 5 cubres por condición de 5 neonatos BERKO; en C: n = 1800-2800 células β cuantificadas por cubre, 5 cubres por condición de 3 machos adultos WT; en D: n = 2500-2800 células β cuantificadas por cubre, 5 cubres por condición de 3 machos adultos BERKO; en E: n = 2200-3800 células β cuantificadas por cubre, 5 cubres por condición de 3 hembras adultas WT; en F: n = 3000-4300 células β cuantificadas por cubre, 6 cubres por condición de 5 hembras adultas BERKO. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

A continuación se muestran imágenes representativas de la proliferación de células β pancreáticas en cultivos celulares procedentes de los neonatos WT expuestos a la dosis de BPA 1 nM (figura 21).

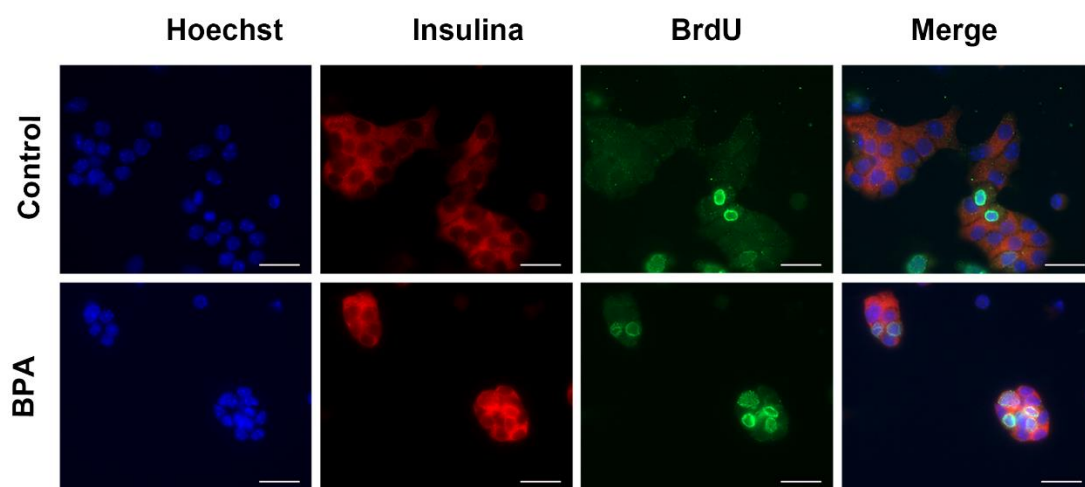


Figura 21. Imágenes representativas de células pancreáticas procedentes de neonatos WT. En rojo se muestra el marcaje positivo para insulina, en verde el marcaje nuclear de proliferación BrdU y en azul el marcaje nuclear con Hoechst en los grupos Control y BPA 1 nM. Barra de escala 20 μm .

En la figura 22 se muestran imágenes representativas de la proliferación de células β pancreáticas en cultivos celulares procedentes de los machos adultos WT expuestos a la dosis de BPA 1 nM.

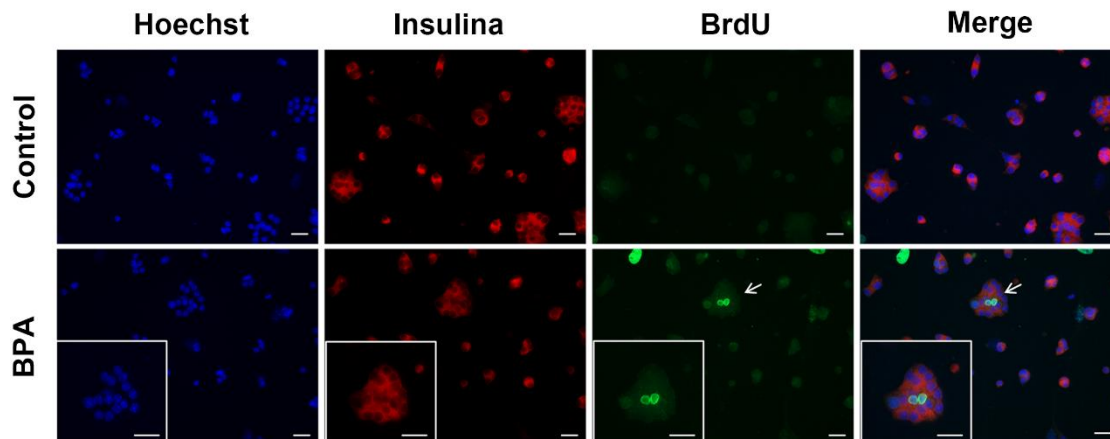


Figura 22. Imágenes representativas de células pancreáticas procedentes de machos adultos WT. En rojo se muestra el marcaje positivo para insulina, en verde el marcador nuclear de proliferación BrdU y en azul el marcaje nuclear con Hoechst en los grupos Control y BPA 1 nM. Barra de escala 20 μ m.

6. EFECTO DEL AGONISTA WAY200070 SOBRE LA CAPACIDAD DE REPLICACIÓN DE LA CÉLULA β DE RATONES NEONATOS Y ADULTOS.

Mediante la utilización de animales WT y KO para ER β demostramos que el efecto directo de BPA sobre la división de la célula β pancreática requería de la activación del receptor ER β . Para confirmar la participación de ER β en este fenómeno estudiamos el efecto de un agonista específico del receptor ER β , el compuesto WAY200070. Para ello, llevamos a cabo cultivos primarios de células procedentes de islotes de Langerhans de neonatos y ratones adultos. Dichas células se cultivaron en presencia del agonista WAY200070 y de BrdU durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se llevó a cabo el marcaje de células positivas para insulina y BrdU mediante inmunocitoquímica y a su posterior cuantificación.

En células procedentes de animales neonatos WT tratadas con el agonista de ER β , se observó un incremento de proliferación a la dosis más alta ensayada de WAY200070, 100 nM (figura 23A). En las células de los neonatos BERKO expuestas a WAY200070 no se encontraron diferencias en comparación con el Control (figura 23B). Con respecto al estudio del efecto de WAY200070 sobre la tasa de proliferación en los machos adultos WT, vemos un aumento significativo en respuesta a la dosis del agonista de 10 nM y 100 nM en comparación con el Control (figura 23C). En las células de los machos adultos BERKO expuestas a WAY200070 no se encontraron diferencias respecto al Control (figura 23D). La incubación con el agonista específico de ER β en las hembras WT produce, al igual que en los machos, un incremento en la tasa de proliferación a la dosis de

10 nM (figura 23E). Asimismo, este efecto desaparece en células procedentes de ratones hembras cuando el receptor $ER\beta$ está ausente (figura 23F). En vista de los resultados obtenidos, concluimos que el agonista específico de $ER\beta$ produce un efecto proliferativo en la población de células β pancreáticas que es máximo a la dosis de 10 y 100 nM. Además, el efecto es más significativo en células procedentes de ratones adultos que en células procedentes de neonatos como ocurría en los experimentos con BPA.

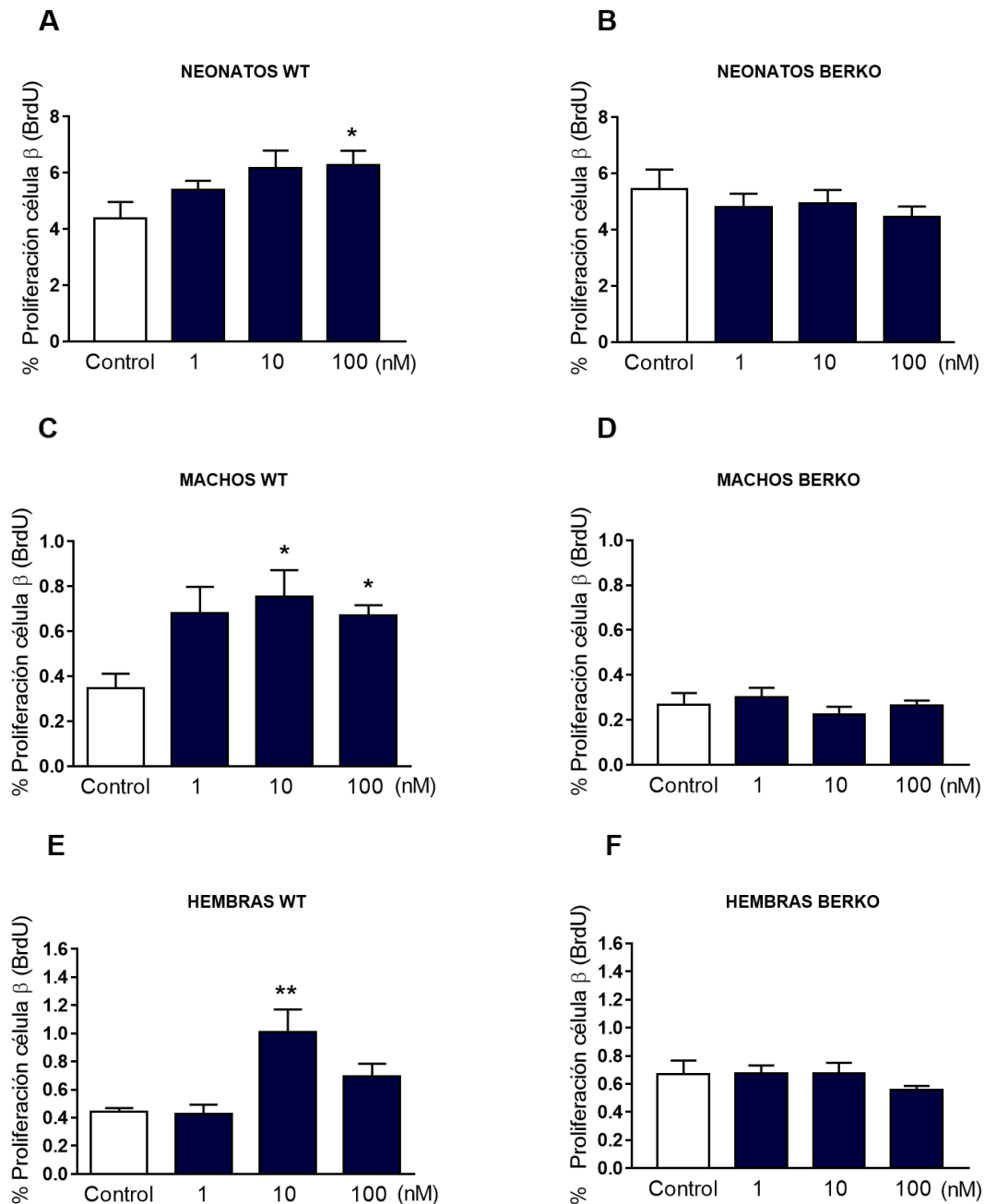


Figura 23. Porcentaje de proliferación de células β pancreáticas en cultivos celulares expuestos a diferentes dosis de WAY200070 (1, 10 y 100 nM). Tasa de proliferación en **(A)** células WT de neonatos **(B)** células BERKO de neonatos **(C)** células WT de machos adultos **(D)** células BERKO de machos adultos **(E)** células WT de hembras adultas **(F)** células BERKO de hembras adultas. Los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar y la significancia estadística es determinada por ANOVA de una vía seguido del método Dunnett's, o el test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido del método Dunn's según corresponda. En A: n = 900-1200 células β cuantificadas por cubre, 5-7 cubres por condición de 5 neonatos WT; en B: n = 700-1000 células β cuantificadas por cubre, 4-5 cubres por condición de 5 neonatos BERKO; en C: n = 3000-3700 células β cuantificadas por cubre, 5 cubres por condición de 3 machos adultos WT; en D: n = 1800-3200 células β cuantificadas por cubre, 5 cubres por condición de 3 machos adultos BERKO; en E: n = 2000-2700 células β cuantificadas por cubre, 5-7 cubres por condición de 3 hembras adultas WT; en F: n = 1300-1600 células β cuantificadas por cubre, 5 cubres por condición de 3 hembras adultas BERKO.* p < 0.05, ** p < 0.01.

Cabe destacar que existen diferencias en la tasa de proliferación basal en el grupo Control tanto en animales WT como BERKO en función del sexo (figura 24A y B). Como se puede observar en la figura 24A los valores de proliferación en células β cultivadas en presencia del vehículo durante 48 h (grupo Control) son más elevados en células procedentes de ratones hembra WT que en el caso de los machos WT. En el caso de ratones BERKO se observan resultados similares (figura 24B).

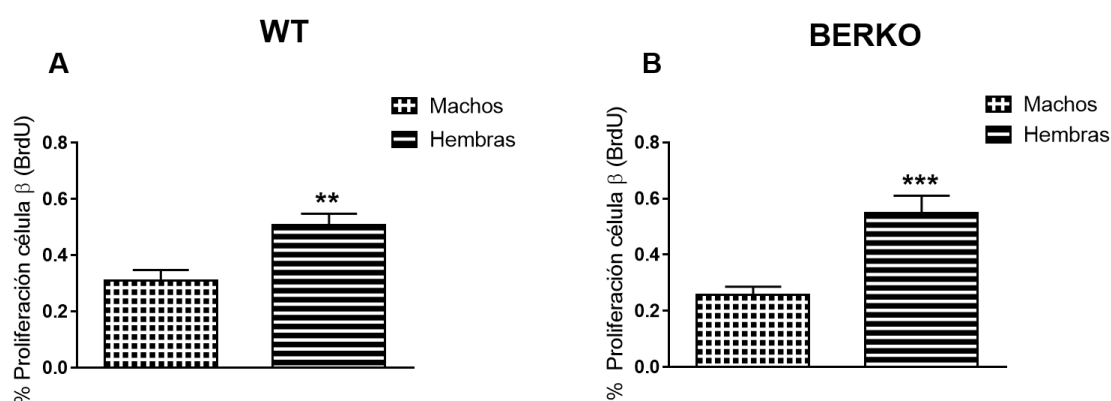


Figura 24. Tasa de proliferación control de células β pancreáticas en machos y hembras (A) Tasa de proliferación de células β procedentes de animales adultos WT. **(B)** Tasa de proliferación de células β procedentes de animales adultos BERKO. Los datos se expresan como la media $\pm$ error estándar. En A: n = 2900-3200 células β cuantificadas por cubre, 10-12 cubres por condición; en B: n = 2200-2900 células β pancreáticas cuantificadas por cubre, 10-11 cubres por condición; t-test Student; ** p < 0.01, *** p < 0.001.

7. EFECTOS DEL AGONISTA ESPECÍFICO DE ER α , PPT, Y LA HORMONA 17 β -ESTRADIOL SOBRE LA TASA DE DIVISIÓN CELULAR EN LA CÉLULA β DE RATONES ADULTOS.

Para estudiar si otros receptores de estrógenos como el ER α podrían estar implicados en la modulación de la capacidad proliferativa de las células β pancreáticas utilizamos un agonista específico de este receptor, el PPT. Además, se quiso analizar el efecto de la hormona natural, el 17 β -estradiol sobre la proliferación de la célula β . Para ello, llevamos a cabo cultivos primarios de células procedentes de islotes de Langerhans de ratones WT adultos, tanto en machos como en hembras. Dichas células fueron cultivadas en presencia del agonista PPT, o bien, de 17 β -estradiol, así como del marcador de proliferación, BrdU, durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se llevó a cabo el marcaje de células positivas para insulina y BrdU mediante inmunocitoquímica y a su posterior cuantificación.

En las células procedentes de los machos y hembras WT adultos tratadas con el agonista de ER α , se observó un aumento de proliferación en las células β a las dosis más altas ensayadas de PPT, 10 nM y 100 nM frente al grupo Control (figura 25A y B). Por tanto, en base a estos resultados, encontramos que el agonista específico de ER α produce un efecto proliferativo en la población de células β pancreáticas que es máximo a la dosis de 10 y 100 nM lo que sugiere que el efecto proliferativo del BPA descrito anteriormente también podría requerir la participación del receptor ER α . Con respecto al estudio del efecto del 17 β -estradiol sobre la tasa de proliferación en los machos y hembras WT, no se encontraron diferencias a ninguna dosis testada en comparación con los controles (figura 25C y D). Estos resultados indican que la hormona natural no mimetiza el efecto proliferativo del BPA en la célula β pancreática.

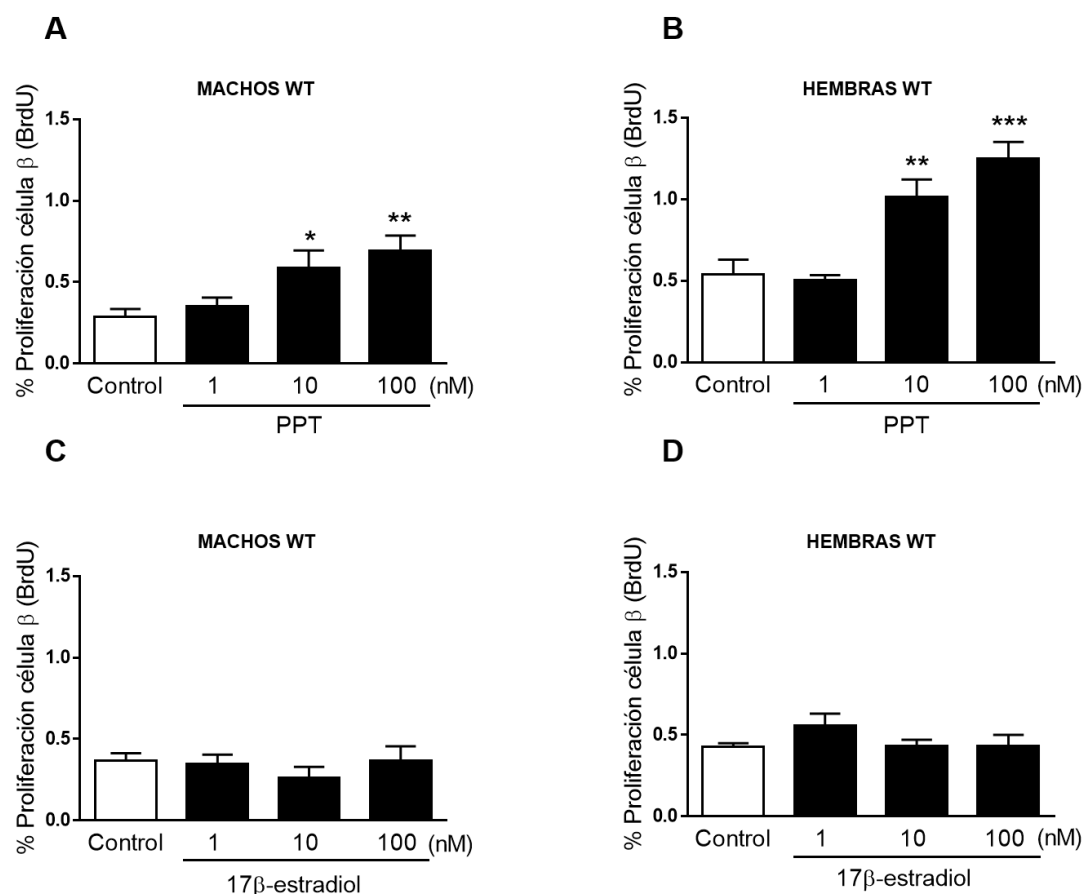


Figura 25. Porcentaje de proliferación de células β pancreáticas en cultivos celulares expuestos a diferentes dosis (1, 10 y 100 nM) de PPT y 17β-estradiol.

Tasa de proliferación tras el tratamiento con PPT en (A) células β procedentes de ratones WT machos y en (B) células β procedentes de ratones WT hembras. Tasa de proliferación tras la incubación con 17β-estradiol en (C) células β procedentes de ratones WT machos y en (D) células β procedentes de ratones WT hembras. Los datos se expresan como la media ± error estándar y la significancia estadística es determinada por ANOVA de una vía seguido del método Dunnett's, o el test no paramétrico Kruskal-Wallis seguido del método Dunn's según corresponda. En A: n = 2000-2700 células β cuantificadas por cubre, 5 cubres por condición de 3 machos WT; en B: n = 2000-3800 células β cuantificadas por cubre, 5-8 cubres por condición de 3 hembras WT; en C: n = 3400-4500 células β cuantificadas por cubre, 5 cubres por condición de 3 machos WT; en D: n = 2700-3700 células β cuantificadas por cubre, 5 cubres por condición de 3 hembras WT. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

DISCUSIÓN

Los EDCs son sustancias químicas exógenas, o mezcla de ellas, capaces de interferir con algún aspecto de la acción hormonal (Zoeller et al., 2012). Estos compuestos pueden alterar los efectos de hormonas naturales como el estradiol, la testosterona o las hormonas tiroideas; bien actuando como agonistas, antagonistas, alterando el patrón de síntesis y metabolismo hormonal y/o modificando los niveles de receptores hormonales.

Aunque inicialmente se relacionaron con la aparición de defectos en la función reproductora, numerosos trabajos publicados en los últimos quince años, han puesto de manifiesto que estas sustancias exógenas pueden estar ligadas a la aparición de desórdenes metabólicos. La hipótesis de la disrupción endocrina como nuevo factor de riesgo implicado en la etiología de la diabetes y la obesidad ha ido adquiriendo una importancia creciente (Alonso-Magdalena et al., 2010; Alonso-Magdalena et al., 2011, Nadal et al., 2017, Heindel et al., 2017). En este sentido se ha acuñado el término de agente químico disruptor metabólico (MDC, *metabolism-disrupting chemical*) para referirse a aquellos EDCs capaces de aumentar la susceptibilidad a desarrollar desórdenes metabólicos. Bajo ese término se engloban compuestos disruptores con capacidad obesogénica (obesógenos), diabetogénica (diabetógenos) o ambas (diabesógenos) (Heindel et al., 2017).

Como agente químico disruptor metabólico destaca de manera relevante el BPA, nuestro modelo de EDC. La ubicuidad de este compuesto ha hecho que este disruptor endocrino tenga una alta presencia medioambiental y que la exposición en humanos sea prácticamente constante (Welshons et al., 2006, Vandenberg et al., 2007).

Los EDCs son particularmente activos a dosis bajas durante determinados periodos en el desarrollo del organismo, particularmente durante el desarrollo fetal y la infancia, cuando se producen la diferenciación celular y la organogénesis. Se tiene constancia de que la exposición a BPA durante esta etapa de la vida puede originar alteraciones estructurales y/o funcionales con consecuencias permanentes en el individuo en desarrollo (Alonso-Magdalena et al., 2010, Alonso-Magdalena et al., 2011, García-Arévalo et al., 2016, Gore et al., 2015, Heindel et al., 2017).

En base a estas consideraciones, el trabajo de la presente Tesis Doctoral se ha centrado en analizar las consecuencias metabólicas de la exposición gestacional a dosis medioambientalmente relevantes de BPA en la descendencia haciendo especial hincapié en a) posibles alteraciones en el desarrollo del páncreas endocrino, b) efectos sobre la homeostasis de la glucemia a edad temprana c) estudio de los mecanismos subyacentes con especial atención al papel de los receptores de estrógenos.

1. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A BPA *IN UTERO* SOBRE LA MASA Y LA FUNCIÓN DE LA CÉLULA β PANCREÁTICA DE LA DESCENDENCIA.

Desde hace más de cuatro décadas se conoce que las condiciones previas y cercanas al nacimiento pueden determinar el estado de salud en la vida adulta. Esta premisa tiene su origen en la "hipótesis del origen fetal de las enfermedades en la edad adulta" planteada en los años 60, según la cual la exposición a estímulos adversos, durante períodos críticos de la vida fetal, puede ocasionar cambios fisiológicos y/o estructurales que condicionan un mayor riesgo de padecer ciertas patologías en etapas posteriores de la vida (Barker et al., 1989, Barker et al., 1989, Hales and Barker, 2001). Los estudios publicados por Hales y colaboradores mostraron una fuerte correlación entre ciertas anomalías intrauterinas como la desnutrición y un mayor riesgo de padecer enfermedades metabólicas en la vida adulta, incluyendo la intolerancia a la glucosa, la DM2 y la obesidad (Hales and Barker, 1992).

Un fenómeno similar ocurre en el caso de la exposición temprana a ciertos EDCs como BPA. En este sentido, cabe señalar que si bien los efectos a largo plazo de la exposición gestacional a BPA en la regulación de la homeostasis de la glucosa y de la función de la célula β pancreática han sido ampliamente estudiados (Alonso-Magdalena et al., 2010, Wei et al., 2011, Angle et al., 2013, Garcia-Arevalo et al., 2014), existe un mayor desconocimiento sobre cuáles son las alteraciones estructurales y/o funcionales que tienen lugar en las fases tempranas del desarrollo. Por ello, el presente trabajo se centra en el estudio de las consecuencias de la exposición *in utero* a BPA en la masa y la función de la célula β pancreática en las primeras etapas de la vida. Con este fin, tratamos a las madres gestantes OF1 entre los días 9 a 16 de gestación con BPA a las dosis de 10 y 100 $\mu\text{g/kg/día}$. Se decidió estudiar solo los efectos en la descendencia de ratones machos ya que estudios previos de nuestro grupo no encontraron ningún tipo de cambio fenotípico en las hembras adultas (Alonso-Magdalena et al., 2010).

En nuestro estudio analizamos, en primer lugar, la evolución del peso corporal de las crías desde el día de nacimiento (P0) hasta el día postnatal 30 (P30). Los cambios en el peso corporal al nacer son un reflejo de una situación adversa en el ambiente uterino y se consideran un factor importante en la etiología de la diabetes (Hales and Barker, 1992, Berends and Ozanne, 2012). En humanos, existen numerosas evidencias científicas que asocian un bajo peso al nacer con una mayor predisposición al desarrollo de enfermedades metabólicas en estadios posteriores (Hales and Barker, 2001). Nuestros resultados en ratones de la cepa OF1 muestran que las crías que habían sido expuestas a BPA durante la gestación, presentaban un menor peso al nacer en comparación con las crías Control, coincidiendo con diferentes estudios epidemiológicos (Miao et al., 2011,

Huo et al., 2015). Asimismo, observamos que los animales BPA10 muestran un crecimiento recuperador de tal modo que, al mes de vida, presentan valores del peso corporal similares a los observados en el grupo Control. Por el contrario, los animales BPA100 mantienen un peso menor que los Controles, desde el nacimiento hasta el destete, momento en el que comienzan a ganar peso mostrando un incremento del mismo con respecto a los animales Control en el estadio P30. Por tanto, observamos que diferentes dosis de BPA producen diferentes cambios en la evolución del peso y en el valor de este mismo al mes de vida. Estas diferencias del peso corporal con respecto a las diferentes dosis testadas de BPA concuerdan con otras investigaciones realizadas en ratones en las que los efectos del peso corporal, debido a la exposición perinatal del BPA, son dosis dependientes (Rubin and Soto, 2009). Otros estudios en ratones, muestran que la exposición gestacional a dosis más altas de BPA, 0.26 y 2.7 mg/kg/día, conducen a un aumento en el peso corporal en los descendientes en P30 (Miyawaki et al., 2007). En cuanto a los ratones expuestos a la dosis de 10 µg/kg/día BPA de la colonia *knockout* para ERβ no encontramos diferencias en el peso al nacer ni tampoco al mes de vida. Observamos que los animales de la colonia BERKO presentan menor peso tanto en P0 como en P30 con respecto a la cepa OF1. Estas diferencias de peso en las distintas cepas utilizadas podrían explicar el diferente comportamiento del BPA. Ryan y colaboradores demostraron que la exposición temprana a dosis bajas de BPA (0.25 µg/kg/día) tampoco producía cambios en el peso corporal de los ratones CD1 descendientes en P30 (Ryan et al., 2010). Sin embargo, existen otros estudios en la literatura que sí que muestran diferentes cambios en el peso corporal de las crías por la exposición a BPA (Rubin et al., 2001, Wei et al., 2011, Liu et al., 2013). Wei y colaboradores observaron que la exposición a BPA en ratas aumentaba el peso de las crías en P30 a la dosis de 50 µg/kg/día, pero no a dosis más altas (250 y 1250 µg/kg/día) (Wei et al., 2011). Liu y colaboradores también observaron en ratones que la exposición prenatal a BPA conducía a un incremento del peso corporal de los descendientes en P30 a la dosis de 100 µg/kg/día (Liu et al., 2013). Estas discrepancias podrían deberse al uso de diferentes especies, dosis, rutas de administración y del tiempo de exposición.

El mantenimiento de la masa de la célula β pancreática es crítico en la regulación de la homeostasis de glucosa y en la prevención de la DMT2 (Ackermann and Gannon, 2007). Nuestros resultados muestran un incremento de la masa de la célula β en los animales OF1 que han sido expuestos a las dosis de BPA 10 y 100 µg/kg/día con respecto a los controles. Este aumento es visible en el momento del nacimiento siendo, aún más significativo, al mes de vida. Estudios previos en ratas, ya demostraron un aumento de masa en los machos descendientes a las 27 semanas de edad, en respuesta al tratamiento intraútero (desde el día G0 hasta el día 21 de vida postnatal) con dosis bajas de BPA (50 µg/kg/día) (Wei et al., 2011). Cabe destacar que, otras perturbaciones

ambientales durante la vida fetal, como la exposición materna a una dieta rica en grasa, también pueden conducir a un aumento de la masa de la célula β en la descendencia. Se ha visto en modelos animales que la exposición materna a una dieta rica en grasa durante 8 semanas antes de la concepción, así como durante el periodo de gestación y de lactancia, conduce a un aumento de la masa de la célula β en la descendencia en el día P10 y a los 3 meses de edad, en comparación con los individuos control (Brighenti et al., 2013). Otro estudio demostró que la exposición a una dieta rica en grasa, solo durante la gestación, conducía a un incremento de la masa de la célula β en los descendientes a los 3 meses de edad (Gregorio et al., 2013). Acorde al incremento de masa, observamos *in vivo* un aumento de la proliferación de la célula β pancreática en los animales BPA al mes de vida. La formación de nuevas células β obedece a los procesos de división celular y neogénesis. La neogénesis es el mecanismo de generación de nuevas células β pancreáticas a partir de células progenitoras, y tiene lugar, fundamentalmente, durante las primeras etapas de la embriogénesis. Sin embargo, a partir de la última etapa de gestación, y durante las primeras semanas de vida postnatal, la expansión de la población de células β se produce, principalmente, gracias al proceso de proliferación celular (Georgia and Bhushan, 2004, Dhawan et al., 2007). La proliferación de células β es un fenómeno que sigue vigente en la edad adulta, si bien, la tasa de replicación es significativamente baja en esta etapa (Teta et al., 2005). Asimismo, en el correcto mantenimiento de la masa de célula β , se sabe que también participan eventos de apoptosis o muerte celular. En la literatura se ha descrito que, en el marco del desarrollo del páncreas, hay un incremento de la tasa de apoptosis en los días próximos al destete (Scaglia et al., 1997, Kassem et al., 2000). En nuestro estudio, encontramos que los animales P30 presentan una disminución en la tasa de apoptosis de célula β cuando son tratados *in utero* a BPA, por lo que concluimos que el aumento de la masa de la célula β no solo es debido a un incremento de la proliferación celular, sino también a una disminución de la tasa de apoptosis. En conjunto, demostramos que la exposición a BPA durante la gestación provoca en los animales al mes de vida un aumento de la masa de la célula β a través de la regulación al alza del proceso de proliferación celular y a la baja del proceso de apoptosis.

El BPA es un xenoestrógeno que actúa a través de los receptores ER α y ER β en la célula β pancreática (Alonso-Magdalena et al., 2008, Soriano et al., 2012). En 2013, estudios realizados por nuestro laboratorio demostraron que el receptor ER β era capaz de estimular la división en células β pancreáticas, tanto en condiciones *in vivo* como *ex vivo* (Alonso-Magdalena et al., 2013). En la presente Tesis llevamos a cabo una serie de experimentos utilizando ratones de la colonia *knockout* para ER β . Trabajamos con dos grupos de animales: el grupo Control, que son los ratones descendientes de las madres a las que se les inyectó el vehículo y el grupo BPA, los ratones descendientes de las madres a las que se

les administró BPA. A su vez, estos dos grupos incluyen animales *wild-type* (WT) o *knockout* para ER β (BERKO). Debido a la dificultad para obtener un número suficiente de animales para cada genotipo y condición, empleamos una única dosis de BPA (10 $\mu\text{g/kg/día}$). La selección fue basada en los resultados previos obtenidos en animales OF1 que mostraron efectos más significativos en el desarrollo del páncreas endocrino de la generación F1 a la dosis de 10 $\mu\text{g/kg/día}$, en comparación con los efectos a una dosis alta de 100 $\mu\text{g/kg/día}$. En concordancia con nuestros datos, otros estudios en ratas, mostraron que las alteraciones en el desarrollo de la célula β pancreática de los descendientes como consecuencia de la exposición a BPA durante la etapa gestacional, acontecían a concentraciones bajas de BPA (50 $\mu\text{g/kg/día}$) y no a concentraciones más elevadas (250 o 1250) $\mu\text{g/kg/día}$ (Wei et al., 2011). Un estudio más reciente en ratas, también demostró que la exposición a BPA durante la gestación producía un aumento en la densidad de los adipocitos a la dosis más baja testada de 0,5 $\mu\text{g/kg/día}$, pero no a la dosis más alta testada de 50 $\mu\text{g/kg/día}$ (Lejonklou et al., 2017). Investigaciones en ratones han puesto de manifiesto que la exposición a concentraciones más bajas del NOAEL (nivel sin efecto adverso observable) de BPA, que es de 5000 $\mu\text{g/kg/día}$, producía diferentes alteraciones en la homeostasis de glucosa en los descendientes que habían estado expuestos durante la etapa de la gestación. Sin embargo, concentraciones 10 veces superiores al NOAEL, 50000 $\mu\text{g/kg/día}$, no producían alteraciones en estos parámetros (Angle et al., 2013, Gioiosa et al., 2015). Convencionalmente, la toxicología tradicional ha seguido el dogma “la dosis hace el veneno”, es decir, cuanto mayor es la dosis, mayor es la respuesta. Sin embargo, como observamos con el BPA y con muchos otros disruptores endocrinos, estos presentan efectos a dosis bajas que no son visibles a dosis altas, siguiendo curvas de respuesta no monotónicas. Las curvas de respuesta no monotónicas son aquellas en las que el valor de su pendiente fluctúa de negativo a positivo, o viceversa, al menos una vez en el rango de dosis examinado (Vandenberg et al., 2012).

En los animales WT de la colonia *knockout* para ER β tratados con BPA durante el desarrollo, observamos un incremento de masa y área de célula β , en comparación con los animales Control WT, tanto a día P0 como P30, lo que confirma nuestros resultados previos descritos en ratones OF1. Por el contrario, los animales BPA carentes de ER β , no muestran ningún cambio significativo en el área ni en la masa de célula β con respecto al grupo Control. Asimismo, observamos un aumento de la proliferación de la célula β en los animales WT BPA que no es visible en los animales BERKO. Estos datos indican que los cambios inducidos por la exposición temprana a BPA sobre el desarrollo pancreático requieren de la participación de ER β .

En línea con nuestros resultados se ha visto que la exposición prenatal de BPA conduce a cambios en la tasa de proliferación celular en otros órganos diferentes al páncreas. Así, en roedores, se observó un aumento de la división celular a nivel hepático en la etapa fetal tras la exposición oral a BPA (5 mg/kg/día), entre los días G7.5 a G18.5 (DeBenedictis et al., 2016). Estudios en la glándula pituitaria de ratón mostraron que la exposición a BPA *in utero* a dosis medioambientalmente relevantes (0.5 y 50 µg/kg/día), desde el día G10.5 hasta el final de la gestación, alteraba el desarrollo de dicha glándula en las hembras descendientes al nacer (P0). Esta alteración se debía a un aumento de la tasa de proliferación celular en respuesta a BPA y, de acuerdo a los autores del estudio, podría requerir la activación de receptores ERs (Brannick et al., 2012). También se han descrito evidencias del efecto proliferativo del BPA durante el desarrollo en órganos del sistema reproductor femenino como el útero, el ovario o la glándula mamaria de diferentes especies (Newbold et al., 2007, Vandenberg et al., 2007, Tharp et al., 2012, Acevedo et al., 2013) y masculino (Ramos et al., 2003, Nanjappa et al., 2012). Murray y colaboradores observaron que la exposición fetal a BPA provocaba una hiperplasia en la glándula mamaria, así como una sobreexpresión del receptor ER α (Murray et al., 2007). En cuanto a la próstata, un estudio en ratas mostró que la exposición de BPA a dosis de 25 µg/kg/día o 250 µg/kg/día, desde el día G8 hasta el final de la gestación, producía un aumento de la proliferación celular en la próstata de los descendientes en el día 15 postnatal (Ramos et al., 2003). En las células de Leydig localizadas en los testículos, también se observó un aumento de la división celular por la exposición a dosis de BPA 2.5 µg/kg/día o 25 µg/kg/día durante la etapa gestacional en ratas (Nanjappa et al., 2012). Estudios de exposición neonatal a estrógenos, tanto en la próstata como en las células de Leydig, demostraron que el receptor ER α estaba implicado (Prins and Birch, 1997, Oliveira et al., 2004), por lo que se postula que el mecanismo de actuación del BPA podría ser el mismo. Además, un estudio revela que concentraciones nanomolares de BPA estimulan la proliferación de las células de Sertoli, las cuales comparten características morfológicas y funcionales muy similares a las células de Leydig, mediante la activación de la vía ERK1/2 a través del receptor ER α y GPER (Chen et al., 2016). De esta manera observamos que los receptores ERs, y más concretamente el receptor ER α , participan en el efecto proliferativo del BPA en la mayor parte de órganos estudiados, sin que se pueda descartar la participación de otros receptores. En la presente tesis demostramos por primera vez que el efecto proliferativo del BPA requiere de la participación de ER β .

Como podemos observar el BPA tiene la capacidad de modular la proliferación celular en distintos tipos celulares. En lo que se refiere a la célula β pancreática, es importante tener en cuenta que el aumento de proliferación en la célula β pancreática junto con el aumento de la masa de este tipo celular puede producir alteraciones en la homeostasis de glucosa a largo plazo como se observa en

otros estudios en roedores de exposición prenatal al BPA (Alonso-Magdalena et al., 2010; Heindel et al., 2017; Tuduri et al., 2018). Además, observamos que este efecto proliferativo del BPA requiere de la participación de ER β que también juega un papel fundamental en la regulación de la homeostasis de glucosa.

Estudios previos de nuestro grupo demostraron que el tratamiento gestacional con BPA en ratones OF1, conducía a cambios en el perfil de expresión génica en los islotes de Langerhans. Entre los cambios más relevantes se observó una sobreexpresión de genes implicados en el control del ciclo de división celular, así como de genes que actúan como potenciadores de la proliferación celular y de la tumorigénesis (García-Arevalo et al., 2016). Por ello, decidimos analizar si en los animales BPA WT de la colonia *knockout* para ER β se reproducía este fenómeno y, de ser así, si era necesaria la participación de ER β .

En el estudio de expresión de genes observamos que el gen Pdx-1, factor de transcripción relacionado con la formación embrionaria del páncreas, mostraba una tendencia al aumento en los animales BPA WT en comparación con los animales Control y carentes de ER β . Durante el desarrollo, este factor de transcripción es esencial en el proceso de diferenciación de los linajes celulares endocrinos y de la expansión de la masa de la célula β pancreática (Bernardo et al., 2008). Estudios previos demostraron que el aumento de la expresión de Pdx-1 se asocia con la etapa del desarrollo pancreático ya que todos los progenitores pancreáticos lo expresan entre los días G8.5 y G9.5. Más tardíamente, su expresión se restringe a las células β pancreáticas, por lo que, además de tener un papel crucial en el desarrollo precoz del páncreas, es esencial para la fisiología de las células β . Cabe destacar, que en otros modelos experimentales en los que se analiza la importancia de la nutrición materna en el desarrollo funcional del páncreas endocrino, como los modelos de restricción proteica materna, se observó una disminución en la expresión del gen Pdx-1 en la descendencia (Arantes et al., 2002). Asimismo, la exposición materna a una dieta rica en grasa, conduce a disminuciones en los niveles observados por inmunohistoquímica del factor de transcripción Pdx-1, necesario para el desarrollo pancreático y la maduración de la célula β pancreática en la descendencia (Cerf et al., 2009). Nuestros resultados muestran, por primera vez, el posible efecto del BPA sobre la expresión de Pdx-1 a través del receptor ER β en la célula β pancreática. Sorprendentemente, no encontramos cambios significativos en los genes relacionados con el ciclo celular, por lo que el aumento de proliferación por la exposición de BPA no se puede explicar a priori mediante cambios en la expresión génica. Podría ser que las alteraciones genéticas debidas a la exposición de BPA no aparezcan en la etapa de transcripción, durante la cual se sintetizan los transcritos de ARNm, sino que los efectos de este disruptor endocrino se pongan de manifiesto en otras etapas como, por ejemplo, la posttranscripcional, si bien se requieren nuevos estudios para resolver

esta cuestión. Las diferencias observadas entre la presente Tesis y el estudio llevado a cabo por García-Árevalo y colaboradores también podría deberse al uso de diferentes cepas de ratón.

Por otro lado, investigamos si los cambios observados en la masa y proliferación de las células β a través de ER β debidos a la exposición a BPA durante la etapa gestacional, podrían implicar cambios en la homeostasis de la glucosa en los animales de la colonia *knockout* para ER β al mes de vida. No observamos cambios en los niveles de glucemia en respuesta a la administración de una carga de glucosa en animales BPA en comparación con los animales Control. Tampoco encontramos alteraciones en el análisis de la sensibilidad a la insulina en ninguno de los cuatro grupos estudiados. Estos hallazgos concuerdan con los experimentos que se realizaron en animales de la cepa OF1, en los cuales no observamos cambios en la tolerancia a la glucosa ni en la sensibilidad a la insulina en la descendencia al mes de vida (Garcia-Arevalo et al., 2016). Sin embargo, cabe destacar que la exposición *in utero* a BPA conduce al desarrollo de importantes alteraciones en la homeostasis de glucosa a más largo plazo. El inicio de aparición de dichas anomalías se sitúa entre los 3 y los 8 meses de vida dependiendo de la cepa del animal y las dosis de BPA empleadas; e incluyen en todos los casos, una marcada intolerancia a la glucosa y resistencia a la insulina (Alonso-Magdalena et al., 2010, Wei et al., 2011, Angle et al., 2013, Garcia-Arevalo et al. 2014).

En concordancia con estos datos es interesante señalar que en algunos estudios en los que se evalúa el efecto de la malnutrición materna en la descendencia, no se aprecian cambios en la tolerancia a la glucosa en animales jóvenes de entre 6 semanas y 3 meses de edad, sin embargo, a los 15 meses comienzan a manifestar una disminución de la tolerancia a la glucosa; situación que se agrava en los animales de 17 meses de edad los cuales desarrollan la DMT2 y resistencia a la insulina (Petry et al., 2001). Hales y colaboradores también observaron que el efecto de la restricción de la dieta materna durante la preñez no conducía a cambios en la tolerancia a la glucosa en los descendientes jóvenes de 3 meses de edad, pero sí, cuando estos alcanzaban los 15 meses de edad (Hales et al., 1996). De esta manera, se demuestra una correlación entre la exposición a estímulos desfavorables durante la gestación y el deterioro de la tolerancia a la glucosa en los descendientes a medida que avanzan en edad (Desai and Hales, 1997, Ozanne and Hales, 1999).

Estudios previos en la cepa OF1 muestran una hiperinsulinemia en los animales expuestos *in utero* a bajas dosis de BPA (Garcia-Arevalo et al., 2016) que parecen mantenerse hasta los 6 meses de vida (Garcia-Arevalo et al., 2014). Este efecto hiperinsulinémico también ha sido observado en animales adultos en estado no ayunado, expuestos a BPA durante 4 días a dosis de 100 $\mu\text{g/kg/día}$

(Alonso-Magdalena et al., 2006). Por el contrario, en los animales BPA WT no se observaron cambios en los niveles de insulina al mes de vida. Estos resultados concuerdan con los datos arrojados por los experimentos realizados *ex vivo*, en los que no se apreciaron diferencias significativas en la cantidad de insulina liberada en respuesta a concentraciones estimuladoras de glucosa, lo que parece indicar que la capacidad secretora de la célula β en animales BPA no se encuentra alterada al mes de vida en esta cepa de animales.

La posible ausencia de hiperinsulinemia en los animales BPA WT de la cepa cepa C57BL/6J frente a lo observado en ratones BPA OF1, podría estar relacionada con la diferente magnitud de los cambios en la masa de célula β observados. Así, en los animales BPA WT se observa un aumento de masa de célula β en torno a una razón de 1.25 veces superior a los animales Control, mientras que los animales BPA OF1 muestran un incremento más elevado de alrededor del 1.47.

Diferentes trabajos han documentado de forma consistente que, bajo ciertas circunstancias fisiológicas como la gestación, o, patológicas como la obesidad, el páncreas endocrino es capaz de adaptarse a una mayor demanda de insulina y lo hace gracias a un aumento de la masa y de la secreción de insulina por parte de las células β pancreáticas (Nadal et al., 2009, Gonzalez et al., 2013). Los estudios en roedores muestran que durante la gestación se produce en la madre un aumento de masa de célula β del orden de 2 y 5 veces (Parsons et al., 1995, Scaglia et al., 1995). De forma similar en humanos, se ha demostrado un aumento de masa de en torno a 2.4 veces en mujeres embarazadas (Van Assche et al., 1978, Parsons et al., 1995, Scaglia et al., 1995). Por otro lado, en situaciones de obesidad, tanto en humanos como en modelos animales de obesidad inducidos por una dieta rica en grasa, se observa que la expansión de masa de la célula β es de aproximadamente 1.41-1.5 veces (Gonzalez et al., 2013, Linnemann et al., 2014). A este incremento de masa, le acompaña una elevación de los niveles de insulina en plasma en estados de saciedad (incremento de 1.5 hasta 3) (Saudek et al., 1975, Nolan and Proietto, 1996, Gonzalez et al., 2013, Musial et al., 2016). Nuestros resultados muestran cambios en la masa de célula β en ratones OF1, similares a las adaptaciones descritas en los modelos de preñez y obesidad; cambios que van acompañados de un aumento en los niveles de insulina plasmática como se observa también en los animales BPA. Sin embargo, encontramos un incremento más discreto en la masa de la célula β en los animales WT tratados con BPA en comparación con los valores citados anteriormente. Este aumento más discreto podría ser insuficiente para llegar a provocar cambios en la concentración plasmática de insulina. Además, cabe mencionar que el diferente fondo genético de los animales podría explicar también las discrepancias observadas; desconocemos la diferencia en el grado de susceptibilidad a la diabetes entre las dos cepas

utilizadas en la presente tesis, OF1 y la cepa de los animales de la colonia BERKO con fondo genético C57BL/6J.

En nuestro estudio analizamos posibles diferencias en la homeostasis de glucosa en los animales carentes de ER β . Curiosamente, no observamos diferencias significativas en la tolerancia a la glucosa ni en la sensibilidad a la insulina en animales BERKO frente al grupo Control, sin embargo, nuestros estudios ponen de manifiesto una menor capacidad secretora de las células β pancreáticas en los animales carentes de ER β al mes de vida. Así, cuando cuantificamos la cantidad de insulina liberada *in vivo* en respuesta a una carga de glucosa determinamos que la secreción de insulina es menor en ratones BERKO; dicha disminución es significativa a los 10 minutos tras la administración de glucosa, si bien la tendencia a una menor respuesta secretora se mantiene a los 30 minutos de la administración de glucosa. Estos datos parecen indicar que los animales carentes de ER β presentan al mes de vida una disminución de la primera fase de la secreción de insulina. Estos resultados se hallan en concordancia con el retraso en la secreción de insulina observado en ratones BERKO de 8 meses de edad (Barros et al., 2009). A esta edad, se observa, además, un descenso de los niveles de glucosa en ayunas, así como una menor tolerancia a la glucosa a los 30 minutos postcarga (Barros et al., 2009); lo que parece indicar un deterioro progresivo del control de la glucemia en ratones BERKO a medida que envejecen y confirman la importancia de este receptor en la regulación de la homeostasis glucémica.

En base a estos hallazgos concluimos que la exposición *in utero* del BPA promueve cambios tempranos en la morfología del páncreas endocrino que requieren de la participación del receptor de estrógenos ER β . Dichos cambios se relacionan con alteraciones metabólicas severas tales como intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina y disfunción de la célula β pancreática; alteraciones que se ponen de manifiesto en la vida adulta del animal. En este sentido, nuestros resultados indican que el receptor ER β podría jugar un papel fundamental en la exposición temprana a BPA sobre el desarrollo de la célula β pancreática. Por otro lado, los estudios de farmacocinética han puesto de manifiesto que el BPA es capaz de atravesar la barrera placentaria (Vandenberg et al., 2007), lo que podría indicar que este EDC podría alcanzar de forma directa el páncreas en desarrollo. Con el fin de investigar si el BPA podría tener un efecto directo sobre la célula β pancreática llevamos a cabo una serie de experimentos *in vitro* que a continuación se discuten.

2. ESTUDIO *IN VITRO* DEL EFECTO DEL BPA EN LA CÉLULA β PANCREÁTICA A TRAVÉS DE ER β .

Los experimentos *in vitro* realizados en la presente tesis nos muestran que el BPA es capaz de modular de forma directa la capacidad proliferativa de la célula β pancreática y que, además, este efecto requiere de la participación de ER β . Los resultados obtenidos muestran un aumento de la proliferación en células β pancreáticas procedentes de ratones machos y hembras adultos WT. También se observa un aumento en la tasa de proliferación en las células β pancreáticas procedentes de los animales neonatos, sugiriendo que el BPA podría tener un efecto directo en la replicación de la célula β pancreática en los primeros estadios de vida, así como en edades adultas, independientemente del sexo del animal. Estos resultados se asemejan a los encontrados en el estudio de proliferación celular *in vivo* en animales de la colonia *knockout* para ER β expuestos intraútero a BPA.

Otro aspecto a destacar es el hecho de que las dosis de BPA seleccionadas son comparables a los niveles de exposición en el hombre. Así, por ejemplo, la concentración intermedia testada de 10 nM equivale a 2.28 ng/mL, concentración que se encuentra dentro de los niveles de BPA previamente reportados en el plasma (0.5–22.3 ng/ml) (Padmanabhan et al., 2008) y en la orina (0.16–43.42 ng/ml) (Giesbrecht et al., 2016) de las mujeres embarazadas de EEUU. Además, se conoce que el BPA puede cruzar la barrera placentaria, lo que sugiere que este xenoestrógeno podría alcanzar y actuar de forma directa sobre la célula β pancreática fetal (Vandenberg et al., 2007, Balakrishnan et al., 2010).

Estos hallazgos se encuentran en consonancia con el efecto proliferativo del BPA a bajas dosis observado en otros tejidos y tipos celulares. Por ejemplo, estudios realizados en la línea celular fetal humana H295A de células corticales suprarrenales demostraron un incremento de la tasa proliferativa tras la exposición a BPA a las dosis crecientes de 10, 100 y 1000 nM (Medwid et al., 2018). En células espermáticas de ratón, también se ha demostrado que las concentraciones bajas de BPA (0.1 nM, 1 nM y 10 nM) producían un aumento de la división celular sin cambios en el rango micromolar, lo que ponía de manifiesto un patrón de respuesta no monotónico (Sheng and Zhu, 2011). En línea con estos resultados, se ha demostrado como el BPA promueve un aumento en la tasa de división celular en la línea celular de cáncer de mama MCF7, siguiendo una respuesta en forma no monotónica; con cambios máximos a dosis entre 10 nM y 1 μ M (Samuelsen et al., 2001). Además, Gao y colaboradores también describieron en líneas de células vasculares del músculo liso, tanto de rata como de humanos, que el BPA inducía un incremento de la tasa de proliferación a concentraciones de 1, 10 y 100 nM, pero no a concentraciones superiores en el rango micromolar (1 y 10 μ M) (Gao et al., 2019).

Se han descrito diferentes mecanismos subyacentes a la actividad proliferativa del BPA. Estos incluyen principalmente la participación de vías de señalización mediadas por la activación del receptor de estrógenos ER α (Lee et al., 2012, Sengupta et al., 2013), el receptor de estrógenos acoplado a proteína G (GPER) (Lapensee et al., 2009, Pupo et al., 2012, Xu et al., 2017), el receptor *relacionado de estrógenos* γ (ERR γ) (Lapensee et al., 2009, Song et al., 2015) o el receptor para el factor de crecimiento epidermal (EGFR) (Sauer et al., 2017). En el presente trabajo los resultados sugieren que la capacidad proliferativa de BPA dependería de la activación de ER β . Nuestros resultados muestran como el aumento en la tasa de replicación inducido por este disruptor está ausente en células procedentes de animales BERKO, lo que confirma la participación de este receptor. Asimismo, los datos obtenidos tras el tratamiento de las células β con el agonista específico de ER β , WAY200070, demuestran que este agonista, al igual que el BPA, tiene un efecto potenciador del crecimiento celular en células β procedentes de animales WT, no así, en animales carentes de ER β . En cuanto a las dosis empleadas se observa un aumento significativo en la tasa de replicación de la célula β en respuesta a las tres dosis de BPA analizadas 1, 10 y 100 nM, si bien, en el caso del agonista WAY200070, el efecto solo fue visible a la dosis intermedia de 10 nM y con una tendencia al aumento a la dosis de 100 nM. Como agonista selectivo de ER β , el compuesto WAY200070 muestra una selectividad 68 veces mayor frente a este receptor que la mostrada por ER α (EC₅₀ 2 y 155nM, respectivamente). No obstante, no podemos descartar que concentraciones más altas de WAY200070 puedan activar el receptor ER α .

Como se ha descrito anteriormente, no solamente observamos que el BPA es capaz de modificar la tasa de replicación de células β en adultos, sino también en neonatos, si bien, cabe destacar que los efectos del BPA en las células β pancreáticas procedentes de animales neonatos, sólo fueron visibles a la dosis de BPA 1 nM, sin cambios a concentraciones más altas a diferencia de lo que ocurría en las células procedentes de ratones adultos. La respuesta del BPA sigue en este caso un patrón de respuesta no monotónica, característica de los disruptores endocrinos como se ha mencionado anteriormente. En este sentido, se ha descrito que las células inmaduras de Sertoli ubicadas en los túbulos seminíferos de los testículos, en respuesta a concentraciones de BPA en el rango nanomolar, mostraban un aumento en la tasa de proliferación celular, mientras que, a concentraciones más elevadas, del rango micromolar, presentaban una disminución en dicha tasa (Ge et al., 2014). Estos hallazgos son consistentes con nuestros resultados en las células β pancreáticas procedentes de neonatos, sugiriendo que el efecto del BPA sigue un patrón no monotónico de respuesta en el caso de la exposición en etapas más tempranas.

Como se ha descrito anteriormente, los datos en la presente tesis muestran por primera vez que el BPA puede tener un efecto proliferativo en la célula β

pancreática que requiere de la participación de ER β . Un estudio reciente en las células corticales suprarrenales también demuestra que el BPA produce un aumento de la división celular, aparentemente, a través del receptor ER β . En el citado estudio observan que, tras el tratamiento con BPA, los niveles citosólicos de ER β disminuyen y los niveles nucleares aumentan, sugiriendo que puede estar ocurriendo una translocación de este receptor desde el citosol hacia el núcleo, la cual es esencial para la activación transcripcional de los ERE. Para estudiar esta hipótesis utilizan un agonista específico de ER β , el diarilpropiolnitrilo (DPN), que produce un aumento en los niveles de proliferación en las células corticales suprarrenales, así como un incremento en la expresión de ciclinas. Asimismo, emplean un antagonista específico de ER β , el PHTPP, el cual suprime el efecto proliferativo del BPA lo que confirma que este receptor parece estar involucrado en el proceso de división celular debido al tratamiento con BPA. Estos autores también proponen que el BPA actuaría sobre ER β activando la vía de señalización Sonic hedgehog (Shh), vía esencial que controla el desarrollo embrionario, así como la proliferación de células adultas (Medwid et al., 2018).

Nuestros resultados demuestran la participación de ER β en el efecto del BPA sobre la tasa de división celular, no obstante, no podemos descartar la implicación de otros receptores. A favor de esta hipótesis nos encontramos con dos hechos destacables. En primer lugar, observamos que los efectos del BPA sobre la tasa de replicación de células β es más potente que el provocado por el agonista selectivo WAY200070, al menos en el caso de neonatos y hembras. Además, es importante destacar que el tratamiento de células β con el agonista específico de ER α , PPT, conduce a un incremento en la tasa de incorporación de BrdU en la célula β en respuesta a las dosis más altas testadas, 10 y 100 nM. Estos hallazgos plantean la posibilidad de que el efecto del BPA en la replicación de la célula β , podría acontecer debido a la sinergia de diferentes vías de transducción de señales mediadas por la activación de ambos receptores, ER α y ER β . En cualquier caso, se requieren estudios adicionales que puedan confirmar, si el efecto proliferativo del BPA sobre las células β requiere de la activación de ER α . Los estudios recogidos en la literatura proponen que, tanto ER α como GPER, podrían estar involucrados en la activación de los mecanismos que controlan el crecimiento de la célula β pancreática, si bien, se ha descrito que este papel modulador se restringe a determinadas situaciones en las que se requiere un aumento compensatorio de la masa de célula β . Se ha propuesto que ER α puede actuar como factor regulador en el control de la replicación de la célula β durante procesos de embriogénesis y en procesos de daño celular en el páncreas adulto (Yuchi et al., 2015). Por otro lado, se ha relacionado la activación de GPER con un incremento en el número de células β en estados de resistencia a la insulina, bien sea fisiológica como en el caso del embarazo, o patológica como en el caso de la obesidad (Jacovetti et al., 2012). Asimismo, no se puede

descartar la participación de otros receptores como ERR γ , el cual puede actuar como regulador de la maduración de células pancreáticas y es, además, una diana para BPA (Yoshihara et al., 2016).

Cabe destacar que no se observaron cambios en respuesta al tratamiento con la hormona 17 β -estradiol, a diferencia de lo observado en presencia, tanto del agonista selectivo de ER α , PPT, como de ER β , WAY200070. Un fenómeno similar lo encontramos en la línea celular epitelial mamaria murina HC11, en la que, tanto el agonista selectivo de ER α , PPT, como el agonista selectivo de ER β , DPN, promovieron un aumento del metabolismo celular, si bien, no se observó ningún efecto en respuesta al 17 β -estradiol. Los autores del estudio sugirieron que este fenómeno podría explicarse en base al mecanismo molecular de acción de los moduladores selectivos de los receptores de estrógeno (SERM); diferentes ligandos pueden reclutar diferentes conjuntos de proteínas coactivadoras/corepresoras, lo que da lugar a una activación transcripcional diferente y, por lo tanto, a respuestas distintas (Helguero et al., 2005).

Además de actuar como un regulador del crecimiento celular, trabajos previos de nuestro grupo han puesto de manifiesto que el receptor ER β tiene un papel clave en la señalización del BPA. A través de la activación de ER β , el BPA puede modular de forma directa la expresión y función de canales iónicos, claves en la estimulación de la actividad eléctrica de las células β y la secreción de insulina (Soriano et al., 2012, Villar-Pazos et al., 2017, Martínez-Pinna et al., 2019).

En el presente trabajo demostramos que la exposición a BPA no sólo aumenta la proliferación de la célula β pancreática, sino que también disminuye la tasa de apoptosis. En los experimentos *in vivo* realizados en la cepa OF1 observamos una disminución de la tasa de apoptosis en células β en animales BPA frente al grupo Control al mes de vida. En resumen, en la presente tesis se describe un efecto nuevo del BPA en las células β pancreáticas, en el que el receptor de estrógenos ER β es clave. Nuestros datos sugieren que el BPA, en dosis dentro del rango de exposición humana, modula la división de las células pancreáticas, lo que lleva a un incremento de la masa de células β pancreáticas durante el desarrollo. Este hallazgo contribuye a ampliar nuestro conocimiento sobre los mecanismos subyacentes a la acción del BPA en la homeostasis de la glucosa, así como a predecir la acción de sustancias químicas aún desconocidas que actúan a través de ER β .

CONCLUSIONES

1. La exposición a BPA *in utero* provoca en los animales OF1 al mes de vida un aumento de la masa de la célula β pancreática a través de la regulación al alza del proceso de proliferación celular y a la baja del proceso de apoptosis. Resultados similares se observan en los animales WT de la colonia BERKO.
2. El aumento en la masa de célula β al mes de vida, no se asocia con alteraciones en la homeostasis de la glucosa ni en la secreción de insulina en respuesta a la exposición a BPA durante la etapa gestacional.
3. El aumento de la masa y la tasa de proliferación de las células β en las primeras etapas de la vida inducido por la exposición prenatal a BPA, requiere la participación del receptor ER β .
4. El BPA, a dosis medioambientalmente relevantes, es capaz de modular de forma directa la capacidad proliferativa de la célula β pancreática a través de un mecanismo dependiente de ER β si bien, no podemos descartar la posible participación de otros receptores como ER α .

REFERENCIAS

Acevedo, N., B. Davis, C. M. Schaeberle, C. Sonnenschein, and A. M. Soto. 2013. Perinatally administered bisphenol a as a potential mammary gland carcinogen in rats. *Environ Health Perspect* 121 (9):1040-6.

Ackermann, A. M., and M. Gannon. 2007. Molecular regulation of pancreatic beta-cell mass development, maintenance, and expansion. *J Mol Endocrinol* 38 (1-2):193-206.

Alonso-Magdalena, P., M. Garcia-Arevalo, I. Quesada, and A. Nadal. 2015. Bisphenol-A treatment during pregnancy in mice: a new window of susceptibility for the development of diabetes in mothers later in life. *Endocrinology* 156 (5):1659-70.

Alonso-Magdalena, P., O. Laribi, A. B. Ropero, E. Fuentes, C. Ripoll, B. Soria, and A. Nadal. 2005. Low doses of bisphenol A and diethylstilbestrol impair Ca²⁺ signals in pancreatic alpha-cells through a nonclassical membrane estrogen receptor within intact islets of Langerhans. *Environ Health Perspect* 113 (8):969-77.

Alonso-Magdalena, P., S. Morimoto, C. Ripoll, E. Fuentes, and A. Nadal. 2006. The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environ Health Perspect* 114 (1):106-12.

Alonso-Magdalena, P., I. Quesada, and A. Nadal. 2011. Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol* 7 (6):346-53.

Alonso-Magdalena, P., A. B. Ropero, M. P. Carrera, C. R. Cederroth, M. Baquie, B. R. Gauthier, S. Nef, E. Stefani, and A. Nadal. 2008. Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha. *PLoS One* 3 (4):e2069.

Alonso-Magdalena, P., A. B. Ropero, S. Soriano, I. Quesada, and A. Nadal. 2010. Bisphenol-A: a new diabetogenic factor? *Hormones (Athens)* 9 (2):118-26.

Alonso-Magdalena, P., A. B. Ropero, M. Garcia-Arevalo, S. Soriano, I. Quesada, S. J. Muhammed, A. Salehi, J. A. Gustafsson, and A. Nadal. 2013. Antidiabetic actions of an estrogen receptor beta selective agonist. *Diabetes* 62 (6):2015-25.

Alonso-Magdalena, P., E. Vieira, S. Soriano, L. Menes, D. Burks, I. Quesada, and A. Nadal. 2010. Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. *Environ Health Perspect* 118 (9):1243-50.

Angle, B. M., R. P. Do, D. Ponzzi, R. W. Stahlhut, B. E. Drury, S. C. Nagel, W. V. Welshons, C. L. Besch-Williford, P. Palanza, S. Parmigiani, F. S. vom Saal, and J. A. Taylor. 2013. Metabolic disruption in male mice due to fetal exposure to low but not high doses of bisphenol A (BPA): evidence for effects on body weight, food intake, adipocytes, leptin, adiponectin, insulin and glucose regulation. *Reprod Toxicol* 42:256-68.

Araki, E., M. A. Lipes, M. E. Patti, J. C. Brüning, B. Haag, R. S. Johnson, and C. R. Kahn. 1994. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 372 (6502):186-90.

Arantes, V. C., V. P. Teixeira, M. A. Reis, M. Q. Latorraca, A. R. Leite, E. M. Carneiro, A. T. Yamada, and A. C. Boschero. 2002. Expression of PDX-1 is reduced in pancreatic islets from pups of rat dams fed a low protein diet during gestation and lactation. *J Nutr* 132 (10):3030-5.

Arrojo e Drigo, R., Y. Ali, J. Diez, D. K. Srinivasan, P. O. Berggren, and B. O. Boehm. 2015. New insights into the architecture of the islet of Langerhans: a focused cross-species assessment. *Diabetologia* 58 (10):2218-28.

Artavanis-Tsakonas, S., M. D. Rand, and R. J. Lake. 1999. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284 (5415):770-6.

Ashcroft, F. M., and P. Rorsman. 2013. K(ATP) channels and islet hormone secretion: new insights and controversies. *Nat Rev Endocrinol* 9 (11):660-9.

Association, American Diabetes. 2010. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 33 Suppl 1:S62-9.

Balakrishnan, B., K. Henare, E. B. Thorstensen, A. P. Ponnampalam, and M. D. Mitchell. 2010. Transfer of bisphenol A across the human placenta. *Am J Obstet Gynecol* 202 (4):393.e1-7.

Balhuizen, A., R. Kumar, S. Amisten, I. Lundquist, and A. Salehi. 2010. Activation of G protein-coupled receptor 30 modulates hormone secretion and counteracts cytokine-induced apoptosis in pancreatic islets of female mice. *Mol Cell Endocrinol* 320 (1-2):16-24.

Bansal, A., C. Li, F. Xin, A. Duemler, W. Li, C. Rashid, M. S. Bartolomei, and R. A. Simmons. 2019. Transgenerational effects of maternal bisphenol: a exposure on offspring metabolic health. *J Dev Orig Health Dis* 10 (2):164-175.

Bansal, A., C. Rashid, F. Xin, C. Li, E. Polyak, A. Duemler, T. van der Meer, M. Stefaniak, S. Wajid, N. Doliba, M. S. Bartolomei, and R. A. Simmons. 2017. Sex- and Dose-Specific Effects of Maternal Bisphenol A Exposure on Pancreatic Islets of First- and Second-Generation Adult Mice Offspring. *Environ Health Perspect* 125 (9):097022.

Barker, D. J., C. N. Hales, C. H. Fall, C. Osmond, K. Phipps, and P. M. Clark. 1993. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 36 (1):62-7.

Barker, D. J., and C. Osmond. 1986. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1 (8489):1077-81.

Barker, D. J., C. Osmond, J. Golding, D. Kuh, and M. E. Wadsworth. 1989. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ* 298 (6673):564-7.

Barker, D. J., P. D. Winter, C. Osmond, B. Margetts, and S. J. Simmonds. 1989. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 2 (8663):577-80

Barnett, D. W., D. M. Pressel, and S. Misler. 1995. Voltage-dependent Na⁺ and Ca²⁺ currents in human pancreatic islet beta-cells: evidence for roles in the generation of action potentials and insulin secretion. *Pflugers Arch* 431 (2):272-82.

Barros, R. P., C. Gabbi, A. Morani, M. Warner, and J. A. Gustafsson. 2009. Participation of ERalpha and ERbeta in glucose homeostasis in skeletal muscle and white adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297 (1):E124-33.

Barros, R. P., U. F. Machado, M. Warner, and J. A. Gustafsson. 2006. Muscle GLUT4 regulation by estrogen receptors ERbeta and ERalpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (5):1605-8.

Bell, G. I., R. L. Pictet, W. J. Rutter, B. Cordell, E. Tischer, and H. M. Goodman. 1980. Sequence of the human insulin gene. *Nature* 284 (5751):26-32.

Berends, L. M., and S. E. Ozanne. 2012. Early determinants of type-2 diabetes. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 26 (5):569-80.

Bernardo, A. S., C. W. Hay, and K. Docherty. 2008. Pancreatic transcription factors and their role in the birth, life and survival of the pancreatic beta cell. *Mol Cell Endocrinol* 294 (1-2):1-9.

Beydoun, H. A., S. Khanal, A. B. Zonderman, and M. A. Beydoun. 2014. Sex differences in the association of urinary bisphenol-A concentration with selected indices of glucose homeostasis among U.S. adults. *Ann Epidemiol* 24 (2):90-7.

Bonefeld-Jørgensen, E. C., H. R. Andersen, T. H. Rasmussen, and A. M. Vinggaard. 2001. Effect of highly bioaccumulated polychlorinated biphenyl congeners on estrogen and androgen receptor activity. *Toxicology* 158 (3):141-53.

Bonner-Weir, S. 2000a. Islet growth and development in the adult. *J Mol Endocrinol* 24 (3):297-302.

Bonner-Weir, S. 2000b. Life and death of the pancreatic beta cells. *Trends Endocrinol Metab* 11 (9):375-8.

Bouwens, L., and I. Rooman. 2005. Regulation of pancreatic beta-cell mass. *Physiol Rev* 85 (4):1255-70.

Brannick, K. E., Z. R. Craig, A. D. Himes, J. R. Peretz, W. Wang, J. A. Flaws, and L. T. Raetzman. 2012. Prenatal exposure to low doses of bisphenol A increases pituitary proliferation and gonadotroph number in female mice offspring at birth. *Biol Reprod* 87 (4):82.

Braun, M., R. Ramracheya, M. Bengtsson, Q. Zhang, J. Karanauskaite, C. Partridge, P. R. Johnson, and P. Rorsman. 2008. Voltage-gated ion channels in human pancreatic beta-cells: electrophysiological characterization and role in insulin secretion. *Diabetes* 57 (6):1618-28.

Bringhenti, I., J. A. Moraes-Teixeira, M. R. Cunha, F. Ornellas, C. A. Mandarim-de-Lacerda, and M. B. Aguila. 2013. Maternal obesity during the

preconception and early life periods alters pancreatic development in early and adult life in male mouse offspring. *PLoS One* 8 (1):e55711.

Brissova, M., M. J. Fowler, W. E. Nicholson, A. Chu, B. Hirshberg, D. M. Harlan, and A. C. Powers. 2005. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *J Histochem Cytochem* 53 (9):1087-97.

Bulayeva, N. N., B. Gametchu, and C. S. Watson. 2004. Quantitative measurement of estrogen-induced ERK 1 and 2 activation via multiple membrane-initiated signaling pathways. *Steroids* 69 (3):181-92.

Bulayeva, N. N., and C. S. Watson. 2004. Xenoestrogen-induced ERK-1 and ERK-2 activation via multiple membrane-initiated signaling pathways. *Environ Health Perspect* 112 (15):1481-7.

Butt, C. M., J. Congleton, K. Hoffman, M. Fang, and H. M. Stapleton. 2014. Metabolites of organophosphate flame retardants and 2-ethylhexyl tetrabromobenzoate in urine from paired mothers and toddlers. *Environ Sci Technol* 48 (17):10432-8.

Cabrera, O., D. M. Berman, N. S. Kenyon, C. Ricordi, P. O. Berggren, and A. Caicedo. 2006. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (7):2334-9.

Calafat, A. M., Z. Kuklenyik, J. A. Reidy, S. P. Caudill, J. Ekong, and L. L. Needham. 2005. Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect* 113 (4):391-5.

Cano, D. A., B. Soria, F. Martin, and A. Rojas. 2014. Transcriptional control of mammalian pancreas organogenesis. *Cell Mol Life Sci* 71 (13):2383-402.

Casals-Casas, C., and B. Desvergne. 2011. Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annu Rev Physiol* 73:135-62.

Cerf, M. E., C. S. Chapman, C. J. Muller, and J. Louw. 2009. Gestational high-fat programming impairs insulin release and reduces Pdx-1 and glucokinase immunoreactivity in neonatal Wistar rats. *Metabolism* 58 (12):1787-92.

Chen, L., D. J. Magliano, and P. Z. Zimmet. 2012. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus--present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol* 8 (4):228-36.

Chen, Z. J., K. S. Zhang, L. C. Ge, H. Liu, L. K. Chen, J. Du, and H. S. Wang. 2016. Signals involved in the effects of bisphenol A (BPA) on proliferation and motility of Leydig cells: a comparative proteomic analysis. *Toxicol Res (Camb)* 5 (6):1573-1584.

Coperchini, F., O. Awwad, M. Rotondi, F. Santini, M. Imbriani, and L. Chiovato. 2017. Thyroid disruption by perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoate (PFOA). *J Endocrinol Invest* 40 (2):105-121.

De Coster, S., and N. van Larebeke. 2012. Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action. *J Environ Public Health* 2012:713696.

De Vos, A., H. Heimberg, E. Quartier, P. Huypens, L. Bouwens, D. Pipeleers, and F. Schuit. 1995. Human and rat beta cells differ in glucose transporter but not in glucokinase gene expression. *J Clin Invest* 96 (5):2489-95.

DeBenedictis, B., H. Guan, and K. Yang. 2016. Prenatal Exposure to Bisphenol A Disrupts Mouse Fetal Liver Maturation in a Sex-Specific Manner. *J Cell Biochem* 117 (2):344-50.

Desai, M., and C. N. Hales. 1997. Role of fetal and infant growth in programming metabolism in later life. *Biol Rev Camb Philos Soc* 72 (2):329-48.

Dhawan, S., S. Georgia, and A. Bhushan. 2007. Formation and regeneration of the endocrine pancreas. *Curr Opin Cell Biol* 19 (6):634-45.

Diamanti-Kandarakis, E., J. P. Bourguignon, L. C. Giudice, R. Hauser, G. S. Prins, A. M. Soto, R. T. Zoeller, and A. C. Gore. 2009. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev* 30 (4):293-342.

Ding, S., Y. Fan, N. Zhao, H. Yang, X. Ye, D. He, X. Jin, J. Liu, C. Tian, H. Li, S. Xu, and C. Ying. 2014. High-fat diet aggravates glucose homeostasis disorder caused by chronic exposure to bisphenol A. *J Endocrinol* 221 (1):167-79.

Dodds EC and Lawson W. 1936. Synthetic oestrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature* 137(3476):996.

Dor, Y., J. Brown, O. I. Martinez, and D. A. Melton. 2004. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429 (6987):41-6.

Dunaif, A., J. Xia, C. B. Book, E. Schenker, and Z. Tang. 1995. Excessive insulin receptor serine phosphorylation in cultured fibroblasts and in skeletal muscle. A potential mechanism for insulin resistance in the polycystic ovary syndrome. *J Clin Invest* 96 (2):801-10.

Eizirik, D. L., M. L. Colli, and F. Ortis. 2009. The role of inflammation in insulinitis and beta-cell loss in type 1 diabetes. *Nat Rev Endocrinol* 5 (4):219-26.

Eliasson, L., F. Abdulkader, M. Braun, J. Galvanovskis, M. B. Hoppa, and P. Rorsman. 2008. Novel aspects of the molecular mechanisms controlling insulin secretion. *J Physiol* 586 (14):3313-24.

Farach-Carson, M. C., and P. J. Davis. 2003. Steroid hormone interactions with target cells: cross talk between membrane and nuclear pathways. *J Pharmacol Exp Ther* 307 (3):839-45.

Fernandez, M. F., J. P. Arrebola, J. Taoufik, A. Navalón, O. Ballesteros, R. Pulgar, J. L. Vilchez, and N. Olea. 2007. Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reprod Toxicol* 24 (2):259-64.

Fernández-González, R., I. Yebra-Pimentel, E. Martínez-Carballo, and J. Simal-Gándara. 2015. A Critical Review about Human Exposure to Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins (PCDDs), Polychlorinated Dibenzofurans (PCDFs) and Polychlorinated Biphenyls (PCBs) through Foods. *Crit Rev Food Sci Nutr* 55 (11):1590-617.

Filardo, E. J., J. A. Quinn, A. R. Frackelton, and K. I. Bland. 2002. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol* 16 (1):70-84.

Filardo, E., J. Quinn, Y. Pang, C. Graeber, S. Shaw, J. Dong, and P. Thomas. 2007. Activation of the novel estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 (GPR30) at the plasma membrane. *Endocrinology* 148 (7):3236-45.

Gao, F., Y. Huang, L. Zhang, and W. Liu. 2019. Involvement of estrogen receptor and GPER in bisphenol A induced proliferation of vascular smooth muscle cells. *Toxicol In Vitro* 56:156-162.

Gao, N., J. LeLay, M. Z. Vatamaniuk, S. Rieck, J. R. Friedman, and K. H. Kaestner. 2008. Dynamic regulation of Pdx1 enhancers by Foxa1 and Foxa2 is essential for pancreas development. *Genes Dev* 22 (24):3435-48.

Garcia-Arevalo, M., P. Alonso-Magdalena, J. Rebelo Dos Santos, I. Quesada, E. M. Carneiro, and A. Nadal. 2014. Exposure to bisphenol-A during pregnancy partially mimics the effects of a high-fat diet altering glucose homeostasis and gene expression in adult male mice. *PLoS One* 9 (6):e100214.

García-Arévalo, M., P. Alonso-Magdalena, J. M. Servitja, T. Boronat-Belda, B. Merino, S. Villar-Pazos, G. Medina-Gómez, A. Novials, I. Quesada, and A. Nadal. 2016. Maternal Exposure to Bisphenol-A During Pregnancy Increases Pancreatic β -Cell Growth During Early Life in Male Mice Offspring. *Endocrinology* 157 (11):4158-4171.

Garofano, A., P. Czernichow, and B. Bréant. 1997. In utero undernutrition impairs rat beta-cell development. *Diabetologia* 40 (10):1231-4.

Ge, L. C., Z. J. Chen, H. Liu, K. S. Zhang, Q. Su, X. Y. Ma, H. B. Huang, Z. D. Zhao, Y. Y. Wang, J. P. Giesy, J. Du, and H. S. Wang. 2014. Signaling related with biphasic effects of bisphenol A (BPA) on Sertoli cell proliferation: a comparative proteomic analysis. *Biochim Biophys Acta* 1840 (9):2663-73.

Georgia, S., and A. Bhushan. 2004. Beta cell replication is the primary mechanism for maintaining postnatal beta cell mass. *J Clin Invest* 114 (7):963-8.

Giesbrecht, G. F., J. Liu, M. Ejaredar, D. Dewey, N. Letourneau, T. Campbell, J. W. Martin, and APrON Study Team. 2016. Urinary bisphenol A is associated with dysregulation of HPA-axis function in pregnant women: Findings from the APrON cohort study. *Environ Res* 151:689-697.

Gioiosa, L., P. Palanza, S. Parmigiani, and F. S. Vom Saal. 2015. Risk Evaluation of Endocrine-Disrupting Chemicals: Effects of Developmental Exposure to Low Doses of Bisphenol A on Behavior and Physiology in Mice (*Mus musculus*). *Dose Response* 13 (4):1559325815610760.

Gonzalez, A., B. Merino, L. Marroqui, P. Neco, P. Alonso-Magdalena, E. Caballero-Garrido, E. Vieira, S. Soriano, R. Gomis, A. Nadal, and I. Quesada. 2013. Insulin hypersecretion in islets from diet-induced hyperinsulinemic obese female mice is associated with several functional adaptations in individual beta-cells. *Endocrinology* 154 (10):3515-24.

Gore, A. C., V. A. Chappell, S. E. Fenton, J. A. Flaws, A. Nadal, G. S. Prins, J. Toppari, and R. T. Zoeller. 2015. Executive Summary to EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocr Rev* 36 (6):593-602.

Gregorio, B. M., V. Souza-Mello, C. A. Mandarim-de-Lacerda, and M. B. Aguilu. 2013. Maternal high-fat diet is associated with altered pancreatic remodelling in mice offspring. *Eur J Nutr* 52 (2):759-69.

Hales, C. N., and D. J. Barker. 1992. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia* 35 (7):595-601.

Hales, C. N., and D. J. Barker. 2001. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull* 60:5-20.

Hales, C. N., M. Desai, S. E. Ozanne, and N. J. Crowther. 1996. Fishing in the stream of diabetes: from measuring insulin to the control of fetal organogenesis. *Biochem Soc Trans* 24 (2):341-50.

Hamers, T., J. H. Kamstra, E. Sonneveld, A. J. Murk, M. H. Kester, P. L. Andersson, J. Legler, and A. Brouwer. 2006. In vitro profiling of the endocrine-disrupting potency of brominated flame retardants. *Toxicol Sci* 92 (1):157-73.

Hammes, S. R., and E. R. Levin. 2011. Minireview: Recent advances in extranuclear steroid receptor actions. *Endocrinology* 152 (12):4489-95.

Hehn, R. S. 2016. NHANES Data Support Link between Handling of Thermal Paper Receipts and Increased Urinary Bisphenol A Excretion. *Environ Sci Technol* 50 (1):397-404.

Heindel, J. J., J. Balbus, L. Birnbaum, M. N. Brune-Drisse, P. Grandjean, K. Gray, P. J. Landrigan, P. D. Sly, W. Suk, D. Cory Slechts, C. Thompson, and M. Hanson. 2015. Developmental Origins of Health and Disease: Integrating Environmental Influences. *Endocrinology* 156 (10):3416-21.

Heindel, J. J., B. Blumberg, M. Cave, R. Machtinger, A. Mantovani, M. A. Mendez, A. Nadal, P. Palanza, G. Panzica, R. Sargis, L. N. Vandenberg, and F. Vom Saal. 2017. Metabolism disrupting chemicals and metabolic disorders. *Reprod Toxicol* 68:3-33.

Heindel, J. J., F. S. Vom Saal, B. Blumberg, P. Bovolín, G. Calamandrei, G. Ceresini, B. A. Cohn, E. Fabbri, L. Gioiosa, C. Kassotis, J. Legler, M. La

Merrill, L. Rizzi, R. Machtinger, A. Mantovani, M. A. Mendez, L. Montanini, L. Molteni, S. C. Nagel, S. Parmigiani, G. Panzica, S. Paterlini, V. Pomatto, J. Ruzzin, G. Sartor, T. T. Schug, M. E. Street, A. Suvorov, R. Volpi, R. T. Zoeller, and P. Palanza. 2017. Correction to: Parma consensus statement on metabolic disruptors. *Environ Health* 16 (1):130.

Helguero, L. A., M. H. Faulds, J. A. Gustafsson, and L. A. Haldosén. 2005. Estrogen receptors alfa (ERalpha) and beta (ERbeta) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11. *Oncogene* 24 (44):6605-16.

Hem, A., A. J. Smith, and P. Solberg. 1998. Saphenous vein puncture for blood sampling of the mouse, rat, hamster, gerbil, guinea pig, ferret and mink. *Lab Anim* 32 (4):364-8.

Henquin, J. C. 2000. Triggering and amplifying pathways of regulation of insulin secretion by glucose. *Diabetes* 49 (11):1751-60.

Henquin, J. C. 2009. Regulation of insulin secretion: a matter of phase control and amplitude modulation. *Diabetologia* 52 (5):739-51.

Hofmann, P. J., L. Schomburg, and J. Köhrle. 2009. Interference of endocrine disruptors with thyroid hormone receptor-dependent transactivation. *Toxicol Sci* 110 (1):125-37.

Howdeshell, K. L., A. K. Hotchkiss, K. A. Thayer, J. G. Vandenberg, and F. S. vom Saal. 1999. Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* 401 (6755):763-4.

Hu, W., H. Liu, H. Sun, O. Shen, X. Wang, M. H. Lam, J. P. Giesy, X. Zhang, and H. Yu. 2011. Endocrine effects of methoxylated brominated diphenyl ethers in three in vitro models. *Mar Pollut Bull* 62 (11):2356-61.

Huo, W., W. Xia, Y. Wan, B. Zhang, A. Zhou, Y. Zhang, K. Huang, Y. Zhu, C. Wu, Y. Peng, M. Jiang, J. Hu, H. Chang, B. Xu, Y. Li, and S. Xu. 2015. Maternal urinary bisphenol A levels and infant low birth weight: A nested case-control study of the Health Baby Cohort in China. *Environ Int* 85:96-103.

Ingelfinger, J. R., and J. A. Jarcho. 2017. Increase in the Incidence of Diabetes and Its Implications. *N Engl J Med* 376 (15):1473-1474.

Jacovetti, C., A. Abderrahmani, G. Parnaud, J. C. Jonas, M. L. Peyot, M. Cornu, R. Laybutt, E. Meugnier, S. Rome, B. Thorens, M. Prentki, D. Bosco,

and R. Regazzi. 2012. MicroRNAs contribute to compensatory beta cell expansion during pregnancy and obesity. *J Clin Invest* 122 (10):3541-51.

Jennings, R. E., A. A. Berry, J. P. Strutt, D. T. Gerrard, and N. A. Hanley. 2015. Human pancreas development. *Development* 142 (18):3126-37.

Jeon, J., M. Correa-Medina, C. Ricordi, H. Edlund, and J. A. Diez. 2009. Endocrine cell clustering during human pancreas development. *J Histochem Cytochem* 57 (9):811-24.

Jirtle, R. L., and M. K. Skinner. 2007. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet* 8 (4):253-62.

Jørgensen, M. C., J. Ahnfelt-Rønne, J. Hald, O. D. Madsen, P. Serup, and J. Hecksher-Sørensen. 2007. An illustrated review of early pancreas development in the mouse. *Endocr Rev* 28 (6):685-705.

Kahn, S. E., R. L. Hull, and K. M. Utzschneider. 2006. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444 (7121):840-6.

Kang, J. H., D. Asai, D. Aasi, and Y. Katayama. 2007. Bisphenol A in the aquatic environment and its endocrine-disruptive effects on aquatic organisms. *Crit Rev Toxicol* 37 (7):607-25.

Kassem, S. A., I. Ariel, P. S. Thornton, I. Scheimberg, and B. Glaser. 2000. Beta-cell proliferation and apoptosis in the developing normal human pancreas and in hyperinsulinism of infancy. *Diabetes* 49 (8):1325-33.

Kelly, M. J., and E. R. Levin. 2001. Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab* 12 (4):152-6.

Ketola, I., T. Otonkoski, M. A. Pulkkinen, H. Niemi, J. Palgi, C. M. Jacobsen, D. B. Wilson, and M. Heikinheimo. 2004. Transcription factor GATA-6 is expressed in the endocrine and GATA-4 in the exocrine pancreas. *Mol Cell Endocrinol* 226 (1-2):51-7.

Klinge, C. M. 2000. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* 65 (5):227-51.

Krege, J. H., J. B. Hodgin, J. F. Couse, E. Enmark, M. Warner, J. F. Mahler, M. Sar, K. S. Korach, J. A. Gustafsson, and O. Smithies. 1998. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (26):15677-82.

Kuiper, G. G., B. Carlsson, K. Grandien, E. Enmark, J. Häggblad, S. Nilsson, and J. A. Gustafsson. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138 (3):863-70.

Kuiper, G. G., J. G. Lemmen, B. Carlsson, J. C. Corton, S. H. Safe, P. T. van der Saag, B. van der Burg, and J. A. Gustafsson. 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139 (10):4252-63.

Kurebayashi, H., H. Betsui, and Y. Ohno. 2003. Disposition of a low dose of ¹⁴C-bisphenol A in male rats and its main biliary excretion as BPA glucuronide. *Toxicol Sci* 73 (1):17-25.

Lang, I. A., T. S. Galloway, A. Scarlett, W. E. Henley, M. Depledge, R. B. Wallace, and D. Melzer. 2008. Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA* 300 (11):1303-10.

Lapensee, E. W., T. R. Tuttle, S. R. Fox, and N. Ben-Jonathan. 2009. Bisphenol A at low nanomolar doses confers chemoresistance in estrogen receptor-alpha-positive and -negative breast cancer cells. *Environ Health Perspect* 117 (2):175-80.

Laustsen, P. G., M. D. Michael, B. E. Crute, S. E. Cohen, K. Ueki, R. N. Kulkarni, S. R. Keller, G. E. Lienhard, and C. R. Kahn. 2002. Lipoatrophic diabetes in *Irs1*(-/-)/*Irs3*(-/-) double knockout mice. *Genes Dev* 16 (24):3213-22.

Lee, H. R., K. A. Hwang, M. A. Park, B. R. Yi, E. B. Jeung, and K. C. Choi. 2012. Treatment with bisphenol A and methoxychlor results in the growth of human breast cancer cells and alteration of the expression of cell cycle-related genes, cyclin D1 and p21, via an estrogen receptor-dependent signaling pathway. *Int J Mol Med* 29 (5):883-90.

Leino, O., H. Kiviranta, A. K. Karjalainen, C. Kronberg-Kippilä, H. Sinkko, E. H. Larsen, S. Virtanen, and J. T. Tuomisto. 2013. Pollutant concentrations in placenta. *Food Chem Toxicol* 54:59-69.

Lejonklou, M. H., L. Dunder, E. Bladin, V. Pettersson, M. Rönn, L. Lind, T. B. Waldén, and P. M. Lind. 2017. Effects of Low-Dose Developmental Bisphenol

A Exposure on Metabolic Parameters and Gene Expression in Male and Female Fischer 344 Rat Offspring. *Environ Health Perspect* 125 (6):067018.

Li, L., T. Wu, and Z. Liu. 2010. [Integration of extra-nuclear and nuclear estrogen receptor actions]. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 27 (4):958-following 60.

Linnemann, A. K., M. Baan, and D. B. Davis. 2014. Pancreatic beta-cell proliferation in obesity. *Adv Nutr* 5 (3):278-88.

Liu, J., P. Yu, W. Qian, Y. Li, J. Zhao, F. Huan, J. Wang, and H. Xiao. 2013. Perinatal bisphenol A exposure and adult glucose homeostasis: identifying critical windows of exposure. *PLoS One* 8 (5):e64143.

Livak, K. J., and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25 (4):402-8.

López-Cervantes, J., and P. Paseiro-Losada. 2003. Determination of bisphenol A in, and its migration from, PVC stretch film used for food packaging. *Food Addit Contam* 20 (6):596-606.

Mandrup-Poulsen, T. 2001. beta-cell apoptosis: stimuli and signaling. *Diabetes* 50 Suppl 1:S58-63.

Mao, Z., W. Xia, H. Chang, W. Huo, Y. Li, and S. Xu. 2015. Paternal BPA exposure in early life alters Igf2 epigenetic status in sperm and induces pancreatic impairment in rat offspring. *Toxicol Lett* 238 (3):30-8.

Martinez-Pinna, J., L. Marroqui, A. Hmadcha, J. Lopez-Beas, S. Soriano, S. Villar-Pazos, P. Alonso-Magdalena, R. S. Dos Santos, I. Quesada, F. Martin, B. Soria, J. Gustafsson, and A. Nadal. 2019. Oestrogen receptor β mediates the actions of bisphenol-A on ion channel expression in mouse pancreatic beta cells. *Diabetologia* 62 (9):1667-1680.

Matthews, J. B., K. Twomey, and T. R. Zacharewski. 2001. In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem Res Toxicol* 14 (2):149-57.

Medwid, S., H. Guan, and K. Yang. 2018. Bisphenol A stimulates adrenal cortical cell proliferation via ER β -mediated activation of the sonic hedgehog signalling pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol* 178:254-262.

Melnick, R., G. Lucier, M. Wolfe, R. Hall, G. Stancel, G. Prins, M. Gallo, K. Reuhl, S. M. Ho, T. Brown, J. Moore, J. Leakey, J. Haseman, and M. Kohn. 2002. Summary of the National Toxicology Program's report of the endocrine disruptors low-dose peer review. *Environ Health Perspect* 110 (4):427-31.

Miao, M., W. Yuan, G. Zhu, X. He, and D. K. Li. 2011. In utero exposure to bisphenol-A and its effect on birth weight of offspring. *Reprod Toxicol* 32 (1):64-8.

Miyawaki, J., K. Sakayama, H. Kato, H. Yamamoto, and H. Masuno. 2007. Perinatal and postnatal exposure to bisphenol a increases adipose tissue mass and serum cholesterol level in mice. *J Atheroscler Thromb* 14 (5):245-52.

Moor, V., and M. Davies. 2001. Early life influences on later health: the role of nutrition. *Asia Pac J Clin Nutr* 10 (2):113-7.

Murray, T. J., M. V. Maffini, A. A. Ucci, C. Sonnenschein, and A. M. Soto. 2007. Induction of mammary gland ductal hyperplasias and carcinoma in situ following fetal bisphenol A exposure. *Reprod Toxicol* 23 (3):383-90.

Musial, B., D. S. Fernandez-Twinn, O. R. Vaughan, S. E. Ozanne, P. Voshol, A. N. Sferruzzi-Perri, and A. L. Fowden. 2016. Proximity to Delivery Alters Insulin Sensitivity and Glucose Metabolism in Pregnant Mice. *Diabetes* 65 (4):851-60.

Mårtensson, U. E., S. A. Salehi, S. Windahl, M. F. Gomez, K. Swärd, J. Daszkiewicz-Nilsson, A. Wendt, N. Andersson, P. Hellstrand, P. O. Grände, C. Owman, C. J. Rosen, M. L. Adamo, I. Lundquist, P. Rorsman, B. O. Nilsson, C. Ohlsson, B. Olde, and L. M. Leeb-Lundberg. 2009. Deletion of the G protein-coupled receptor 30 impairs glucose tolerance, reduces bone growth, increases blood pressure, and eliminates estradiol-stimulated insulin release in female mice. *Endocrinology* 150 (2):687-98.

Nadal, A., P. Alonso-Magdalena, C. Ripoll, and E. Fuentes. 2005. Disentangling the molecular mechanisms of action of endogenous and environmental estrogens. *Pflugers Arch* 449 (4):335-43.

Nadal, A., P. Alonso-Magdalena, S. Soriano, I. Quesada, and A. B. Ropero. 2009. The pancreatic beta-cell as a target of estrogens and xenoestrogens: Implications for blood glucose homeostasis and diabetes. *Mol Cell Endocrinol* 304 (1-2):63-8.

Nadal, A., P. Alonso-Magdalena, S. Soriano, A. B. Ropero, and I. Quesada. 2009. The role of oestrogens in the adaptation of islets to insulin resistance. *J Physiol* 587 (Pt 21):5031-7.

Nadal, A., M. Díaz, and M. A. Valverde. 2001. The estrogen trinity: membrane, cytosolic, and nuclear effects. *News Physiol Sci* 16:251-5.

Nadal, A., I. Quesada, and B. Soria. 1999. Homologous and heterologous asynchronicity between identified alpha-, beta- and delta-cells within intact islets of Langerhans in the mouse. *J Physiol* 517 (Pt 1):85-93.

Nadal, A., I. Quesada, E. Tuduri, R. Nogueiras, and P. Alonso-Magdalena. 2017. Endocrine-disrupting chemicals and the regulation of energy balance. *Nat Rev Endocrinol* 13 (9):536-546.

Nadal, A., A. B. Ropero, O. Laribi, M. Maillet, E. Fuentes, and B. Soria. 2000. Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (21):11603-8.

Nanjappa, M. K., L. Simon, and B. T. Akingbemi. 2012. The industrial chemical bisphenol A (BPA) interferes with proliferative activity and development of steroidogenic capacity in rat Leydig cells. *Biol Reprod* 86 (5):135, 1-12.

Newbold, R. R., W. N. Jefferson, and E. Padilla-Banks. 2007. Long-term adverse effects of neonatal exposure to bisphenol A on the murine female reproductive tract. *Reprod Toxicol* 24 (2):253-8.

Nolan, C. J., and J. Proietto. 1996. The set point for maternal glucose homeostasis is lowered during late pregnancy in the rat: the role of the islet beta-cell and liver. *Diabetologia* 39 (7):785-92.

Nowak, K., W. Ratajczak-Wrona, M. Górská, and E. Jabłońska. 2018. Parabens and their effects on the endocrine system. *Mol Cell Endocrinol* 474:238-251.

Oh, S. M., B. T. Ryu, S. K. Lee, and K. H. Chung. 2007. Antiestrogenic potentials of ortho-PCB congeners by single or complex exposure. *Arch Pharm Res* 30 (2):199-209.

Oliveira, C. A., G. A. Mahecha, K. Carnes, G. S. Prins, P. T. Saunders, L. R. França, and R. A. Hess. 2004. Differential hormonal regulation of estrogen

receptors ERalpha and ERbeta and androgen receptor expression in rat efferent ductules. *Reproduction* 128 (1):73-86.

Orton, F., E. Rosivatz, M. Scholze, and A. Kortenkamp. 2011. Widely used pesticides with previously unknown endocrine activity revealed as in vitro antiandrogens. *Environ Health Perspect* 119 (6):794-800.

Osmond, C., and D. J. Barker. 2000. Fetal, infant, and childhood growth are predictors of coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women. *Environ Health Perspect* 108 Suppl 3:545-53.

Ozanne, S. E., and C. N. Hales. 1999. The long-term consequences of intra-uterine protein malnutrition for glucose metabolism. *Proc Nutr Soc* 58 (3):615-9.

Padmanabhan, V., K. Siefert, S. Ransom, T. Johnson, J. Pinkerton, L. Anderson, L. Tao, and K. Kannan. 2008. Maternal bisphenol-A levels at delivery: a looming problem? *J Perinatol* 28 (4):258-63.

Parsons, J. A., A. Bartke, and R. L. Sorenson. 1995. Number and size of islets of Langerhans in pregnant, human growth hormone-expressing transgenic, and pituitary dwarf mice: effect of lactogenic hormones. *Endocrinology* 136 (5):2013-21.

Pessin, J. E., and A. R. Saltiel. 2000. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* 106 (2):165-9.

Petry, C. J., M. W. Dorling, D. B. Pawlak, S. E. Ozanne, and C. N. Hales. 2001. Diabetes in old male offspring of rat dams fed a reduced protein diet. *Int J Exp Diabetes Res* 2 (2):139-43.

Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29 (9):e45.

Piper, K., S. Brickwood, L. W. Turnpenny, I. T. Cameron, S. G. Ball, D. I. Wilson, and N. A. Hanley. 2004. Beta cell differentiation during early human pancreas development. *J Endocrinol* 181 (1):11-23.

Pjanic, M. 2017. The role of polycarbonate monomer bisphenol-A in insulin resistance. *PeerJ* 5:e3809.

Poitout, V., and R. P. Robertson. 2002. Minireview: Secondary beta-cell failure in type 2 diabetes--a convergence of glucotoxicity and lipotoxicity. *Endocrinology* 143 (2):339-42.

Prentki, M., E. Joly, W. El-Assaad, and R. Roduit. 2002. Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes* 51 Suppl 3:S405-13.

Prentki, M., M. L. Peyot, P. Masiello, and S. R. M. Madiraju. 2020. Nutrient-Induced Metabolic Stress, Adaptation, Detoxification, and Toxicity in the Pancreatic β -Cell. *Diabetes* 69 (3):279-290.

Puga, A., C. Ma, and J. L. Marlowe. 2009. The aryl hydrocarbon receptor cross-talks with multiple signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol* 77 (4):713-22.

Prins, G. S., and L. Birch. 1997. Neonatal estrogen exposure up-regulates estrogen receptor expression in the developing and adult rat prostate lobes. *Endocrinology* 138 (5):1801-9.

Pupo, M., A. Pisano, R. Lappano, M. F. Santolla, E. M. De Francesco, S. Abonante, C. Rosano, and M. Maggiolini. 2012. Bisphenol A induces gene expression changes and proliferative effects through GPER in breast cancer cells and cancer-associated fibroblasts. *Environ Health Perspect* 120 (8):1177-82.

Quesada, I., E. Fuentes, M. C. Viso-León, B. Soria, C. Ripoll, and A. Nadal. 2002. Low doses of the endocrine disruptor bisphenol-A and the native hormone 17beta-estradiol rapidly activate transcription factor CREB. *FASEB J* 16 (12):1671-3.

Ramos, J. G., J. Varayoud, L. Kass, H. Rodríguez, L. Costabel, M. Muñoz-De-Toro, and E. H. Luque. 2003. Bisphenol a induces both transient and permanent histofunctional alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in prenatally exposed male rats. *Endocrinology* 144 (7):3206-15.

Revankar, C. M., D. F. Cimino, L. A. Sklar, J. B. Arterburn, and E. R. Prossnitz. 2005. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 307 (5715):1625-30.

Richter, C. A., L. S. Birnbaum, F. Farabolini, R. R. Newbold, B. S. Rubin, C. E. Talsness, J. G. Vandenberg, D. R. Walser-Kuntz, and F. S. vom Saal.

2007. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol* 24 (2):199-224.

Riu, A., M. Grimaldi, A. le Maire, G. Bey, K. Phillips, A. Boulahtouf, E. Perdu, D. Zalko, W. Bourguet, and P. Balaguer. 2011. Peroxisome proliferator-activated receptor γ is a target for halogenated analogs of bisphenol A. *Environ Health Perspect* 119 (9):1227-32.

Robertson, R., H. Zhou, T. Zhang, and J. S. Harmon. 2007. Chronic oxidative stress as a mechanism for glucose toxicity of the beta cell in type 2 diabetes. *Cell Biochem Biophys* 48 (2-3):139-46.

Rojas, A., A. Khoo, J. R. Tejedo, F. J. Bedoya, B. Soria, and F. Martin. 2010. Islet cell development. *Adv Exp Med Biol* 654:59-75.

Rorsman, P., and M. Braun. 2013. Regulation of insulin secretion in human pancreatic islets. *Annu Rev Physiol* 75:155-79.

Routledge, E. J., R. White, M. G. Parker, and J. P. Sumpter. 2000. Differential effects of xenoestrogens on coactivator recruitment by estrogen receptor (ER) alpha and ERbeta. *J Biol Chem* 275 (46):35986-93.

Rubin, B. S., M. K. Murray, D. A. Damassa, J. C. King, and A. M. Soto. 2001. Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ Health Perspect* 109 (7):675-80.

Rubin, B. S., and A. M. Soto. 2009. Bisphenol A: Perinatal exposure and body weight. *Mol Cell Endocrinol* 304 (1-2):55-62.

Ruehlmann, D. O., J. R. Steinert, M. A. Valverde, R. Jacob, and G. E. Mann. 1998. Environmental estrogenic pollutants induce acute vascular relaxation by inhibiting L-type Ca^{2+} channels in smooth muscle cells. *FASEB J* 12 (7):613-9.

Ryan, K. K., A. M. Haller, J. E. Sorrell, S. C. Woods, R. J. Jandacek, and R. J. Seeley. 2010. Perinatal exposure to bisphenol-a and the development of metabolic syndrome in CD-1 mice. *Endocrinology* 151 (6):2603-12.

Ryder, J. W., M. Gilbert, and J. R. Zierath. 2001. Skeletal muscle and insulin sensitivity: pathophysiological alterations. *Front Biosci* 6:D154-63.

Sajiki, J., K. Takahashi, and J. Yonekubo. 1999. Sensitive method for the determination of bisphenol-A in serum using two systems of high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 736 (1-2):255-61.

Samuelsen, M., C. Olsen, J. A. Holme, E. Meussen-Elholm, A. Bergmann, and J. K. Hongslo. 2001. Estrogen-like properties of brominated analogs of bisphenol A in the MCF-7 human breast cancer cell line. *Cell Biol Toxicol* 17 (3):139-51.

Santos, R. M., L. M. Rosario, A. Nadal, J. Garcia-Sancho, B. Soria, and M. Valdeolmillos. 1991. Widespread synchronous $[Ca^{2+}]_i$ oscillations due to bursting electrical activity in single pancreatic islets. *Pflugers Arch* 418 (4):417-22.

Saudek, C. D., M. Finkowski, and R. H. Knopp. 1975. Plasma glucagon and insulin in rat pregnancy. Roles in glucose homeostasis. *J Clin Invest* 55 (1):180-7.

Sauer, S. J., M. Tarpley, I. Shah, A. V. Save, H. K. Lysterly, S. R. Patierno, K. P. Williams, and G. R. Devi. 2017. Bisphenol A activates EGFR and ERK promoting proliferation, tumor spheroid formation and resistance to EGFR pathway inhibition in estrogen receptor-negative inflammatory breast cancer cells. *Carcinogenesis* 38 (3):252-260.

Scaglia, L., C. J. Cahill, D. T. Finegood, and S. Bonner-Weir. 1997. Apoptosis participates in the remodeling of the endocrine pancreas in the neonatal rat. *Endocrinology* 138 (4):1736-41.

Scaglia, L., F. E. Smith, and S. Bonner-Weir. 1995. Apoptosis contributes to the involution of beta cell mass in the post partum rat pancreas. *Endocrinology* 136 (12):5461-8.

Schechter, A., L. C. Dai, L. T. Thuy, H. T. Quynh, D. Q. Minh, H. D. Cau, P. H. Phiet, N. T. Nguyen, J. D. Constable, and R. Baughman. 1995. Agent Orange and the Vietnamese: the persistence of elevated dioxin levels in human tissues. *Am J Public Health* 85 (4):516-22.

Schechter, A., N. Malik, D. Haffner, S. Smith, T. R. Harris, O. Paepke, and L. Birnbaum. 2010. Bisphenol A (BPA) in U.S. food. *Environ Sci Technol* 44 (24):9425-30.

Schneider, S., C. Bock, M. Wetzel, H. Maul, and A. Loerbroks. 2012. The prevalence of gestational diabetes in advanced economies. *J Perinat Med* 40 (5):511-20.

Sengupta, S., I. Obiorah, P. Y. Maximov, R. Curpan, and V. C. Jordan. 2013. Molecular mechanism of action of bisphenol and bisphenol A mediated by oestrogen receptor alpha in growth and apoptosis of breast cancer cells. *Br J Pharmacol* 169 (1):167-78.

Sheng, Z. G., and B. Z. Zhu. 2011. Low concentrations of bisphenol A induce mouse spermatogonial cell proliferation by G protein-coupled receptor 30 and estrogen receptor- α . *Environ Health Perspect* 119 (12):1775-80.

Silva, E., A. Kabil, and A. Kortenkamp. 2010. Cross-talk between non-genomic and genomic signalling pathways-distinct effect profiles of environmental estrogens. *Toxicol Appl Pharmacol* 245 (2):160-70.

Silver, M. K., M. S. O'Neill, M. R. Sowers, and S. K. Park. 2011. Urinary bisphenol A and type-2 diabetes in U.S. adults: data from NHANES 2003-2008. *PLoS One* 6 (10):e26868.

Skinner, M. K. 2008. What is an epigenetic transgenerational phenotype? F3 or F2. *Reprod Toxicol* 25 (1):2-6.

Skinner, M. K., M. Manikkam, and C. Guerrero-Bosagna. 2010. Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. *Trends Endocrinol Metab* 21 (4):214-22.

Soares, A., B. Guieysse, B. Jefferson, E. Cartmell, and J. N. Lester. 2008. Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environ Int* 34 (7):1033-49.

Somm, E., V. M. Schwitzgebel, A. Toulotte, C. R. Cederroth, C. Combescure, S. Nef, M. L. Aubert, and P. S. Hüppi. 2009. Perinatal exposure to bisphenol A alters early adipogenesis in the rat. *Environ Health Perspect* 117 (10):1549-55.

Song, H., T. Zhang, P. Yang, M. Li, Y. Yang, Y. Wang, J. Du, K. Pan, and K. Zhang. 2015. Low doses of bisphenol A stimulate the proliferation of breast cancer cells via ERK1/2/ERKgamma signals. *Toxicol In Vitro* 30 (1 Pt B):521-8.

- Sopasakis, V. R., P. Liu, R. Suzuki, T. Kondo, J. Winnay, T. T. Tran, T. Asano, G. Smyth, M. P. Sajan, R. V. Farese, C. R. Kahn, and J. J. Zhao. 2010. Specific roles of the p110alpha isoform of phosphatidylinositol 3-kinase in hepatic insulin signaling and metabolic regulation. *Cell Metab* 11 (3):220-30.
- Soriano, S., P. Alonso-Magdalena, M. García-Arévalo, A. Novials, S. J. Muhammed, A. Salehi, J. A. Gustafsson, I. Quesada, and A. Nadal. 2012. Rapid insulinotropic action of low doses of bisphenol-A on mouse and human islets of Langerhans: role of estrogen receptor β . *PLoS One* 7 (2):e31109.
- Soriano, S., C. Ripoll, P. Alonso-Magdalena, E. Fuentes, I. Quesada, A. Nadal, and J. Martinez-Pinna. 2016. Effects of Bisphenol A on ion channels: Experimental evidence and molecular mechanisms. *Steroids* 111:12-20.
- Soriano, S., A. B. Ropero, P. Alonso-Magdalena, C. Ripoll, I. Quesada, B. Gassner, M. Kuhn, J. A. Gustafsson, and A. Nadal. 2009. Rapid regulation of K(ATP) channel activity by 17 β -estradiol in pancreatic β -cells involves the estrogen receptor β and the atrial natriuretic peptide receptor. *Mol Endocrinol* 23 (12):1973-82.
- Stoffers, D. A., J. Ferrer, W. L. Clarke, and J. F. Habener. 1997. Early-onset type-II diabetes mellitus (MODY4) linked to IPF1. *Nat Genet* 17 (2):138-9.
- Sui, Y., N. Ai, S. H. Park, J. Rios-Pilier, J. T. Perkins, W. J. Welsh, and C. Zhou. 2012. Bisphenol A and its analogues activate human pregnane X receptor. *Environ Health Perspect* 120 (3):399-405.
- Sun, K., C. M. Kusminski, and P. E. Scherer. 2011. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest* 121 (6):2094-101.
- Susiarjo, M., F. Xin, A. Bansal, M. Stefaniak, C. Li, R. A. Simmons, and M. S. Bartolomei. 2015. Bisphenol a exposure disrupts metabolic health across multiple generations in the mouse. *Endocrinology* 156 (6):2049-58.
- Takeuchi, S., F. Shiraishi, S. Kitamura, H. Kuroki, K. Jin, and H. Kojima. 2011. Characterization of steroid hormone receptor activities in 100 hydroxylated polychlorinated biphenyls, including congeners identified in humans. *Toxicology* 289 (2-3):112-21.
- Takeuchi, T., and O. Tsutsumi. 2002. Serum bisphenol a concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels. *Biochem Biophys Res Commun* 291 (1):76-8.

- Tanti, J. F., T. Grémeaux, E. van Obberghen, and Y. Le Marchand-Brustel. 1994. Serine/threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 modulates insulin receptor signaling. *J Biol Chem* 269 (8):6051-7.
- Teta, M., S. Y. Long, L. M. Wartschow, M. M. Rankin, and J. A. Kushner. 2005. Very slow turnover of beta-cells in aged adult mice. *Diabetes* 54 (9):2557-67.
- Tharp, A. P., M. V. Maffini, P. A. Hunt, C. A. VandeVoort, C. Sonnenschein, and A. M. Soto. 2012. Bisphenol A alters the development of the rhesus monkey mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (21):8190-5.
- Thomas, P., and J. Dong. 2006. Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102 (1-5):175-9.
- Thomas, P., Y. Pang, E. J. Filardo, and J. Dong. 2005. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 146 (2):624-32.
- Trasande, L., T. M. Attina, and J. Blustein. 2012. Association between urinary bisphenol A concentration and obesity prevalence in children and adolescents. *JAMA* 308 (11):1113-21.
- Tudurí, E., L. Marroqui, R. S. Dos Santos, I. Quesada, E. Fuentes, and P. Alonso-Magdalena. 2018. Timing of Exposure and Bisphenol-A: Implications for Diabetes Development. *Front Endocrinol (Lausanne)* 9:648.
- Valdeolmillos, M., A. Nadal, B. Soria, and J. García-Sancho. 1993. Fluorescence digital image analysis of glucose-induced $[Ca^{2+}]_i$ oscillations in mouse pancreatic islets of Langerhans. *Diabetes* 42 (8):1210-4.
- Van Assche, F. A., L. Aerts, and F. De Prins. 1978. A morphological study of the endocrine pancreas in human pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol* 85 (11):818-20.
- Vandenberg, L. N., T. Colborn, T. B. Hayes, J. J. Heindel, D. R. Jacobs, D. H. Lee, T. Shioda, A. M. Soto, F. S. vom Saal, W. V. Welshons, R. T. Zoeller, and J. P. Myers. 2012. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev* 33 (3):378-455.

- Vandenberg, L. N., R. Hauser, M. Marcus, N. Olea, and W. V. Welshons. 2007. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol* 24 (2):139-77.
- Vandenberg, L. N., M. V. Maffini, C. Sonnenschein, B. S. Rubin, and A. M. Soto. 2009. Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr Rev* 30 (1):75-95.
- Vandenberg, L. N., M. V. Maffini, P. R. Wadia, C. Sonnenschein, B. S. Rubin, and A. M. Soto. 2007. Exposure to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol-A alters development of the fetal mouse mammary gland. *Endocrinology* 148 (1):116-27.
- Veiga-Lopez, A., J. Moeller, R. Sreedharan, K. Singer, C. Lumeng, W. Ye, A. Pease, and V. Padmanabhan. 2016. Developmental programming: interaction between prenatal BPA exposure and postnatal adiposity on metabolic variables in female sheep. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 310 (3):E238-47.
- Villar-Pazos, S., J. Martinez-Pinna, M. Castellano-Muñoz, P. Alonso-Magdalena, L. Marroqui, I. Quesada, J. A. Gustafsson, and A. Nadal. 2017. Molecular mechanisms involved in the non-monotonic effect of bisphenol-a on Ca^{2+} entry in mouse pancreatic β -cells. *Sci Rep* 7 (1):11770.
- Vizcaino, E., J. O. Grimalt, A. Fernández-Somoano, and A. Tardon. 2014. Transport of persistent organic pollutants across the human placenta. *Environ Int* 65:107-15.
- Vom Saal, F. S., S. C. Nagel, B. L. Coe, B. M. Angle, and J. A. Taylor. 2012. The estrogenic endocrine disrupting chemical bisphenol A (BPA) and obesity. *Mol Cell Endocrinol* 354 (1-2):74-84.
- Völkel, W., T. Colnot, G. A. Csanády, J. G. Filser, and W. Dekant. 2002. Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol* 15 (10):1281-7.
- Wang, H. X., Y. Zhou, C. X. Tang, J. G. Wu, Y. Chen, and Q. W. Jiang. 2012. Association between bisphenol A exposure and body mass index in Chinese school children: a cross-sectional study. *Environ Health* 11:79.
- Wang, T., M. Li, B. Chen, M. Xu, Y. Xu, Y. Huang, J. Lu, Y. Chen, W. Wang, X. Li, Y. Liu, Y. Bi, S. Lai, and G. Ning. 2012. Urinary bisphenol A (BPA) concentration associates with obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab* 97 (2):E223-7.

Wang, Y., H. Zhu, and K. Kannan. 2019. A Review of Biomonitoring of Phthalate Exposures. *Toxics* 7 (2).

Wei, J., D. Ding, T. Wang, Q. Liu, and Y. Lin. 2017. MiR-338 controls BPA-triggered pancreatic islet insulin secretory dysfunction from compensation to decompensation by targeting Pdx-1. *FASEB J* 31 (12):5184-5195.

Wei, J., Y. Lin, Y. Li, C. Ying, J. Chen, L. Song, Z. Zhou, Z. Lv, W. Xia, X. Chen, and S. Xu. 2011. Perinatal exposure to bisphenol A at reference dose predisposes offspring to metabolic syndrome in adult rats on a high-fat diet. *Endocrinology* 152 (8):3049-61.

Welshons, W. V., S. C. Nagel, and F. S. vom Saal. 2006. Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology* 147 (6 Suppl):S56-69.

West, I. C. 2000. Radicals and oxidative stress in diabetes. *Diabet Med* 17 (3):171-80.

Withers, D. J., J. S. Gutierrez, H. Towery, D. J. Burks, J. M. Ren, S. Previs, Y. Zhang, D. Bernal, S. Pons, G. I. Shulman, S. Bonner-Weir, and M. F. White. 1998. Disruption of IRS-2 causes type 2 diabetes in mice. *Nature* 391 (6670):900-4.

Wong, W. P., J. P. Tiano, S. Liu, S. C. Hewitt, C. Le May, S. Dalle, J. A. Katzenellenbogen, B. S. Katzenellenbogen, K. S. Korach, and F. Mauvais-Jarvis. 2010. Extranuclear estrogen receptor-alpha stimulates NeuroD1 binding to the insulin promoter and favors insulin synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (29):13057-62.

Wozniak, A. L., N. N. Bulayeva, and C. S. Watson. 2005. Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor-alpha-mediated Ca²⁺ fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells. *Environ Health Perspect* 113 (4):431-9.

Xu, F., X. Wang, N. Wu, S. He, W. Yi, S. Xiang, P. Zhang, X. Xie, and C. Ying. 2017. Bisphenol A induces proliferative effects on both breast cancer cells and vascular endothelial cells through a shared GPER-dependent pathway in hypoxia. *Environ Pollut* 231 (Pt 2):1609-1620.

Yoshihara, E., Z. Wei, C. S. Lin, S. Fang, M. Ahmadian, Y. Kida, T. Tseng, Y. Dai, R. T. Yu, C. Liddle, A. R. Atkins, M. Downes, and R. M. Evans. 2016.

ERRgamma Is Required for the Metabolic Maturation of Therapeutically Functional Glucose-Responsive beta Cells. *Cell Metab* 23 (4):622-34.

Yuchi, Y., Y. Cai, B. Legein, S. De Groef, G. Leuckx, V. Coppens, E. Van Overmeire, W. Staels, N. De Leu, G. Martens, J. A. Van Ginderachter, H. Heimberg, and M. Van de Castele. 2015. Estrogen Receptor alpha Regulates beta-Cell Formation During Pancreas Development and Following Injury. *Diabetes* 64 (9):3218-28.

Zhou, Q., P. L. Dolan, and G. L. Dohm. 1999. Dephosphorylation increases insulin-stimulated receptor kinase activity in skeletal muscle of obese Zucker rats. *Mol Cell Biochem* 194 (1-2):209-16.

Zoeller, R. T., T. R. Brown, L. L. Doan, A. C. Gore, N. E. Skakkebaek, A. M. Soto, T. J. Woodruff, and F. S. Vom Saal. 2012. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society. *Endocrinology* 153 (9):4097-110.

Zsarnovszky, A., H. H. Le, H. S. Wang, and S. M. Belcher. 2005. Ontogeny of rapid estrogen-mediated extracellular signal-regulated kinase signaling in the rat cerebellar cortex: potent nongenomic agonist and endocrine disrupting activity of the xenoestrogen bisphenol A. *Endocrinology* 146 (12):5388-96.

ANEXO I

Short communication

**BISPHENOL-A EXPOSURE DURING PREGNANCY ALTERS
PANCREATIC β -CELL DIVISION AND MASS IN MALE MICE
OFFSPRING: A ROLE FOR ER β**

Talía Boronat-Belda¹, Hilda Ferrero^{1,2}, Ruba Al-Abdulla¹, Iván Quesada^{1,2}, Jan-Ake

Gustafsson^{3,4}, Ángel Nadal^{1,2}, Paloma Alonso-Magdalena^{1,2*}

1.Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), Universidad Miguel Hernández, Elche, Spain; 2. Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Spain; 3. Department of Cell Biology and Biochemistry, Center for Nuclear Receptors and Cell Signaling, University of Houston, Houston, TX, USA; 4. Department of Biosciences and Nutrition, Karolinska Institutet, Huddinge, Sweden.

* Correspondence should be addressed to:

Paloma Alonso-Magdalena. Email: palonso@umh.es

Bisphenol-A (BPA) is a widespread endocrine disrupting chemical that constitutes a risk factor for type 2 diabetes mellitus (T2DM). Data from animal and human studies have demonstrated that early exposure to BPA results in adverse metabolic outcomes in adult life.

In the present work, we exposed pregnant heterozygous estrogen receptor β (ER β) knock out (BERKO) mice to 10 μ g/kg/day BPA, during days 9 to 16 of pregnancy, and measured β -cell mass and proliferation in wildtype (WT) and BERKO male offspring at postnatal day 30. We observed increased pancreatic β -cell proliferation and mass in WT, yet no effect was produced in BERKO mice. Dispersed islet cells in primary culture treated with 1nM BPA showed an enhanced pancreatic β -cell replication rate, which was blunted in pancreatic β -cells from BERKO mice and mimicked by the selective ER β agonist WAY200070. This increased β -cell proliferation was found in male adult as well as in neonate pancreatic β -cells, suggesting that BPA directly impacts β -cell division at earliest stages of life. These findings strongly indicate that BPA during pregnancy upregulates pancreatic β -cell division and mass in an ER β -dependent manner. Thus, other natural or artificial chemicals may use this ER β -mediated pathway to promote similar effects.

Keywords: bisphenol A, diabetes, estrogen receptor ER β , pancreatic β -cell division, pancreatic β -cell mass.

1. INTRODUCTION

Endocrine disrupting chemicals (EDCs) are defined by The Endocrine Society as “an exogenous chemical, or mixtures of chemicals, that interfere with any aspect of hormone action” (Zoeller et al., 2012). Experimental research in animals, as well as human epidemiological studies, converge to conclude that a subset of EDCs increases the susceptibility to a number of non-communicable diseases such as T2DM and obesity (Alonso-Magdalena et al., 2011; Heindel et al., 2017; Nadal et al., 2017; Sargis and Simmons, 2019).

Nowadays, BPA is a paradigmatic EDC, which is still present in a wide variety of consumer products including food and beverage containers, children toys, medical devices, electronic equipment's and thermal paper among others. Human exposure to BPA occurs on a virtually constant basis (Calafat et al., 2005; Vandenberg et al., 2007) and, consequently, it has been detected at levels of biological relevance in a variety of biological samples such as urine, plasma, placenta, breast milk, neonatal blood or amniotic fluid (Vandenberg et al., 2010).

BPA acts as a weak estrogen when it binds to nuclear estrogen receptors, ER α and ER β , which act as ligand-inducible transcription factors and specifically regulate the expression of target genes by binding to estrogen response elements (EREs) (Hewitt and Korach, 2018). In addition, ERs activate non-classical genomic pathways via interacting with other transcription factors such as AP-1 or SP-1 (Safe and Kim, 2008). They also elicit extranuclear-initiated actions which trigger signalling cascades involving ERK1/2 or PI3Kinase that may regulate gene expression (Marino et al., 2006; Nadal et al., 2005). When BPA acts via these extranuclear-initiated signalling pathways, its biological activity is as high as that of estradiol, ranging within the pico- and nano-molar

concentrations (Wetherill et al., 2007). In pancreatic β -cells, BPA promotes estrogen-like activities through ER α and ER β at concentrations between 100 pM and 10 nM (Alonso-Magdalena et al., 2012). Thus, BPA upregulates insulin gene expression and increases insulin content via ER α /cSrc/ERK1/2 (Alonso-Magdalena et al., 2008). Furthermore, through ER β , it promotes the rapid closure of ATP-sensitive K⁺ channels in β -cells from mice and humans (Soriano et al., 2012), as well as regulates the expression of Ca²⁺, Na⁺ and K⁺ channel subunits in mouse β -cells (Martinez-Pinna et al., 2019; Villar-Pazos et al., 2017).

Early development is particularly sensitive to EDCs-induced perturbations that may have adverse consequences for health later in life, including the onset of metabolic diseases (Heindel and Vandenberg, 2015). In line with this, gestational exposure to low doses of BPA promoted insulin resistance, altered insulin secretion and decreased β -cell mass in first (Alonso-Magdalena et al., 2010; Angle et al., 2013; Bansal et al., 2017; Garcia-Arevalo et al., 2014; Susiarjo et al., 2015; Wei et al., 2011) as well as second (Bansal et al., 2017; Susiarjo et al., 2015) and third generation adult offspring (Bansal et al., 2019).

To determine how developmental BPA exposure affected glucose homeostasis as well as β -cell function and mass, at early life stages, we previously studied offspring at postnatal days 0 (P0), 21 (P21) and 30 (P30). We found a marked increase in pancreatic β -cell mass, an effect that was already visible at the moment of birth, and remained for the first month of life (Garcia-Arevalo et al., 2016). Because activation of ER β regulates pancreatic β -cell growth in normal and diabetic mice (Alonso-Magdalena et al., 2013), we decided to study a possible role of ER β in the β -cell mass increase caused by BPA in mice offspring after pregnancy exposure.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Animals and treatment

All experimental protocols were approved by the Animal Ethics Committee of Miguel Hernández University according to national regulations (Reference number: UMH.IB.AN.01.14 and UMH.IB.AN.02.14). All the methods were carried out in accordance with EU Directive 2010/63/EU for animal experiments. Experiments were performed using WT and BERKO mice supplied by Dr. Gustafsson's laboratory. Mice from the colony of BERKO mice were generated as described in Krege et al. (Krege et al., 1998). All genetically modified and WT animals were obtained from the same supplier and the same colony. The loss of ER β expression in the pancreas of the homozygous BERKO mice was confirmed by immunostaining (Supplemental Fig.1 and supplemental Fig.2) as it has been previously demonstrated in ovary (Krege et al., 1998). Male and female heterozygous BERKO mice were mated to obtain offspring. Mice were housed in polypropylene cages in a temperature and humidity controlled facility on a 12L:12D cycle at the Miguel Hernández University (light on occurred at 8:00 am), and maintained on 2014 Teklad Global 14% Protein Rodent Maintenance Diet (Harlan Laboratories, Barcelona, Spain), which does not contain alfalfa or soybean meal. The composition of the diet is as follows: calories from protein, 18%; calories from fat, 11%; and calories from carbohydrate, 71%, with energy of 2.9 kcal/g. BPA (MPBiomedicals, cat. No.155 118, Illkirch, France) was dissolved in tocopherol-stripped corn oil (MP Biomedicals, cat. No. 901 415, Illkirch, France) and administered subcutaneously on days 9 to 16 of gestation. The daily dose used was 10 μ g/kg in a constant volume of 100 μ L. WT and homozygous BERKO male offspring mice were used in this study. We selected litters with a number of pups between 7-8, to avoid pups/litter number as a variable.

Experiments were performed when animals were on postnatal days P0 and P30. For *ex vivo* experiments adult male and female WT and homozygous BERKO mice (2-3 aged months) as well as neonates were used.

2.2 Islet cell isolation and culture

Pancreatic islets of Langerhans from WT or BERKO male and female mice and neonates were dispersed using collagenase (Sigma, Madrid, Spain) digestion (modified from (Li et al., 2009)) The solution used for the isolation of the islets of Langerhans contained (in mmol/L): 115 NaCl, 10 NaHCO₃, 5 KCl, 1.1 MgCl₂, 1.2 NaH₂PO₄, 2.5 CaCl₂, 25 HEPES, and 5 D-glucose, pH 7.4, as well as 0.25% BSA. Islets were then dispersed into single cells with trypsin. Cells were centrifuged and resuspended in RPMI 1640 without phenol-red (Cambrex, Belgium) and with 10 % charcoal dextran treated serum (Hyclone, USA), 2 mM glutamine, 200 U/ml penicillin and 0.2 mg/ml streptomycin. They were then planted on glass covers and cultured at 37 °C in a humidified atmosphere of 95 % O₂ and 5% CO₂ for 48 hours in the presence of 10 µM BrdU along with vehicle, BPA, WAY200070 (Tocris Cookson Ltd, Bristol, U.K.), PPT (Tocris Cookson Ltd, Bristol, U.K.), PHTPP (Tocris Cookson Ltd, Bristol, U.K.) or 17β-estradiol (E2) (Sigma, Spain).

2.3 Immunofluorescence and pancreatic β-cell proliferation

Islet-derived primary cells were plated and treated as described before and fixed with 4% PFA for 10 min at RT and washed with PBS. Permeabilization was achieved with 3 min treatment with 0.5% Triton X-100. Non-specific interactions were blocked with 3% BSA in PBS for 2 h at RT. Cells were then incubated with a rabbit anti-insulin antibody (1:200; Cell Signaling Technology, Leiden, The Netherlands), overnight at 4°C. After washing, sections were incubated with the secondary antibody goat anti-rabbit Alexa Fluor 546 at 1/500 for 2h at RT. Then cells were fixed with 4% PFA for 5 min, washed with PBS, and

treated with 70% ethanol for 30 min at 4°C. After washing with PBS, cells were treated with HCL 2N for 20 min at RT, and neutralized with 0.1 M Na₂B₄O₇ (pH= 9.36) for 15 min at RT. After washing, nonspecific interactions were blocked by incubation with 3% BSA for 2 h at RT. Then, cells were incubated with anti BrdU (1:100, mono-clonal; DAKO, Barcelona, Spain) overnight at 4°C. As secondary antibody, goat anti-mouse Alexa Fluor 488 was used at 1/500 for 1h at RT. The nuclei were stained with 10 µg/mL Hoechst 33342 for 15 min at RT (Alexa Fluor, Molecular Probes, Barcelona, Spain) and then, samples were mounted using ProLong Gold Antifade Reagent (Invitrogen, Barcelona, Spain). BrdU-positive nuclei were scored only in cells that were also positive for insulin.

2.4 Immunohistochemistry, pancreatic β-cell mass and proliferation analysis

Pancreas samples were removed, weighed and fixed in 4% PFA overnight. Then tissue was embedded in paraffin and sections were prepared. Tissue sections (5 µm thick) were affixed onto glass slides designed to enhance tissue adhesion and processed for immunohistochemistry using a previously described protocol (Alonso-Magdalena et al., 2013). Slides were incubated with a rabbit anti-insulin antibody (1:400; Cell Signaling Technology, Leiden, The Netherlands), overnight at 4°C, and the secondary antibody biotinylated antirabbit IgG (H_L) (Vector laboratories, CA) for 1 hour at RT. The Vectastain ABCkit (Vector Laboratories, CA) was used for the avidin-biotin complex (ABC) method according to the manufacturer's instructions. Peroxidase activity was visualized with 3, 3-diaminobenzidine (DAKO, CA). The slides were counterstained with hematoxylin, dehydrated through an ethanol series to xylene, and mounted. For morphometric analysis, 4-8 slides of each pancreas per animal, separated by 200 µm were analysed. Each slide was completely scanned by capturing images from no overlapping fields with a digital camera (Image Development Systems camera). In each slide the β-

cell area and the total pancreatic area were measured using the analysis program Metamorph Software. The percentage of the β -cell area was determined by dividing the total area of insulin-positive cells by the total pancreas area. Beta cell mass (mg per pancreas) was calculated by multiplying the percentage of the β -cell area by pancreas weight (Montanya and Tellez, 2009).

To study β -cell proliferation the kit EnVision G/2 Doublestain System (DAB+/Permanent Red) was used following commercial instructions (DAKO K5361, Agilent Technologies). Slides were simultaneously incubated with the proliferating cell nuclear antigen Ki67 (rabbit anti-Ki67, D3B5, #12202 Cell Signaling; 1:400) and with an anti-insulin antibody (mouse anti-insulin I2018, Sigma, 1:100) at 4°C overnight. Samples were counterstained with haematoxylin for nuclei counting and mounted with Faramount aqueous mounting medium (DAKO S3025, Agilent Technologies). Proliferation rate was expressed as the percentage of β -cells with Ki67-positive nuclei with respect to the total β -cells.

2.5 Statistical analysis

GraphPad Software v6 was used for all statistical analyses. To assess differences between treatment groups for each exposure treatment, we used the one analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnet's post hoc test, or two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. We used a post hoc test only when ANOVA showed a statistically significant difference. We used Student's t-test when comparing two groups. Results were considered significant at $p < 0.05$. Data are shown as mean $\pm$ SEM. We specified statistical tests used in each experiment in figure legends.

3. RESULTS

3.1 BPA exposure during pregnancy increases offspring pancreatic β -cell mass in an ER β -dependent manner

Female heterozygous BERKO mice were treated with either vehicle or BPA at a dose of 10 μ g/kg/day from gestational day 9 (GD9) to 16 (GD16). Male offspring was examined at P0 and P30. We had four different experimental groups: wild type vehicle-treated animals (WT Control), wild type BPA-treated animals (WT BPA), homozygous BERKO vehicle-treated animals (BERKO Control) and homozygous BERKO BPA-treated animals (BERKO BPA). At P0, we observed a tendency to an increased β -cell area in the group WT BPA compared to WT Control, although the difference was not statistically significant. Additionally, pancreatic β -cell area was decreased in BERKO BPA mice compared to WT BPA (Fig. 1A, 1B). At P30, BPA treatment resulted in augmented pancreatic β -cell area as well as mass in WT BPA animals compared to WT Control (Fig. 1C-E). This effect was related to a marked increment of pancreatic β -cell proliferation in WT BPA animals (Fig. 1F). On the contrary, no significant differences were observed when comparing Control and BPA BERKO mice (Fig. 1C-F).

These results confirm that *in utero* exposure to BPA promoted an augmented pancreatic β -cell mass at one month of age. The lack of effect in knockout animals, strongly support a role for ER β in the described BPA effects.

3.2 BPA increased β -cell replication in primary pancreatic β -cells

To explore if changes observed in offspring pancreatic β -cell mass could be related to a direct action of BPA on the regulation of pancreatic β -cell replication, we performed a series of *ex vivo* experiments. Dispersed pancreatic islet cells from adult male mice were

cultured in the presence of vehicle or BPA, and BrdU for 48 h. Three different concentrations of BPA were assayed (1 nM, 10 nM or 100 nM). Then coimmunostaining for BrdU and insulin was performed. BPA treatment increased proliferation of male WT mouse β -cells at all doses tested (Fig. 2A). The effect was imitated by the selective ER β agonist, WAY200070 (Fig. 2C) and was abolished in cells from BERKO mice (Fig. 2B, 2D). We performed the same series of experiments in female mice, and we also observed an increment in β -cell proliferation in response to BPA (Fig. 2E). In a similar manner, WAY200070 potentiated pancreatic β -cell replication although the effect was only significant at the dose of 10 nM with a tendency towards increase at 100 nM (Fig. 2G). No change was observed when cells from BERKO female mice were treated with either BPA (Fig. 2F) or WAY200070 (Fig. 2H). A statistically significant decrease in pancreatic β -cell proliferation was observed when comparing BPA-treated cells derived from BERKO with BPA-treated cells derived from WT mice, both in males and females, while no differences between WT and BERKO controls were observed (Supplemental Fig. 3). When pancreatic β -cells from WT male mice were treated with the antagonist of ER β , PHTPP (1 μ M), we observed that it promoted per se a marked increment of pancreatic β -cell proliferation which was similar to that produced by BPA. This was an unexpected result which made us seriously question about the specificity and the feasibility of using this compound as a selective ER β antagonist, at least for the case of pancreatic β -cells and the dose assayed (Supplemental Fig. 4).

In order to evaluate a possible involvement of ER α in the BPA-induced proliferative effect in pancreatic β -cells, male and female β -cells from WT mice were treated with the selective ER α agonist PPT. In both cases, we observed that β -cell replication was increased in response to PPT at the doses of 10 and 100 nM (Fig. 3A, 3B). On the contrary,

the treatment with the natural hormone E2, in the same range of doses (1nM-100 nM), did not promote any change on β -cell proliferation neither in males (Fig. 3C) nor in females WT (Fig. 3D).

It is of note that pancreatic *ex vivo* β -cell proliferation in adult female was higher than in male mice both in WT and BERKO mice (Supplemental Fig. 5).

We next examined the effects of BPA in pancreatic β -cells from WT neonates and found that proliferation was increased when cells were treated with 1nM BPA, yet no effect was observed at higher doses (Fig. 4A, 4E). Similar effect was observed when neonate cells were treated with the specific ER β agonist WAY200070 at the dose of 100 nM (Fig. 4B, 4E). The effects on β -cell replication were abolished in cells from BERKO neonate mice treated either with BPA (Fig. 4C) or WAY200070 (Fig. 4D).

Of note, differences on the effective dose of BPA and WAY200070 in WT neonates compared to WT adults were observed. Thus, in neonates only BPA 1 nM had an impact on the rate of β -cell proliferation (Fig. 4A, 4E) unlike in adults where all BPA-doses promoted an increment in β -cell division (Fig. 2A, 2E). In a similar manner, WAY200070 increased pancreatic β -cell proliferation in neonates only at the dose of 100 nM (Fig. 4B, 4E) while in male adults the effect was also observed in response to a lower dose (10 nM) (Fig. 2C); the effect in female adult mice was only significant at 10 nM (Fig. 2G).

4. DISCUSSION AND CONCLUSIONS

The rapid increase in the incidence of T2DM is often linked to environmental factors such as inadequate nutritional habits, lack of exercise and overweight. Evidence indicates that exposure to EDCs is also a contributing factor to the diabetes epidemic (Alonso-Magdalena et al., 2011; Gore et al., 2015; Mimoto et al., 2017). BPA is one of the most studied EDCs and constitutes a clear example of a widespread environmental pollutant causally linked to metabolic diseases (Alonso-Magdalena et al., 2011; Gore et al., 2015; Heindel et al., 2017). In the present study, we have treated pregnant mice from GD9 to GD16 with BPA at a dose of 10 µg/kg/d, a dose which is below the current lowest observed effect level (LOAEL) (50 µg/kg/d) established by the Environmental Protection Agency (EPA), and approximately double the tolerable daily intake (TDI) (4 µg/kg/d) established by the European Food Safety Authority (EFSA). Time of exposure has been limited to days 9 to 16 of gestation since this is the period of major organogenesis as well as the time in which endocrine pancreas develops (Cano et al., 2014; Rojas et al., 2010).

Route of exposure is important to determine BPA hazard. It has been considered for years that human exposure to BPA primarily comes from dietary sources. This assumption led to some agencies to consider that only animal studies using oral routes of administration were relevant. However, more recent evaluations have highlighted the fact that non-dietary sources are also important and not should be underestimated (Bernier and Vandenberg, 2017). In particular, dermal exposure, which can occur when handling thermal paper, has been demonstrated as a major source of BPA (Bernier and Vandenberg, 2017). In line with this, the more recent EFSA document has revealed that thermal paper was the second most important source of BPA exposure in individuals over 3 years' old (<https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/consultation/130725.pdf>).

Furthermore, it is known that after oral administration, BPA is efficiently metabolized and eliminated through the urine in less than 6 h (Thayer et al., 2015). However, a study based on NHANES 2003-2004 data showed that BPA concentration in urine did not decline quickly with fasting time, which comes to reinforce the importance of the non-food exposure pathways (Stahlhut et al., 2009).

The selection of the BPA route of administration which best reflects source and current total daily exposure in humans, is still an unresolved question when addressing animal studies. Of note, pharmacokinetics studies have demonstrated that mice and humans show comparable serum-conjugated BPA levels when analysing the 24 hour-period after BPA administration (Taylor et al., 2011). Here we administered BPA subcutaneously as some animal studies have shown that subcutaneous exposure may be a better delivery manner than oral administration leading to a ratio of serum conjugated vs unconjugated BPA within the range observed in human studies (Vom Saal et al., 2014). In any case, we cannot discard certain limitations derived from the exposure route utilized in our experimental animal model.

Previous studies indicate that, developmental exposure to BPA promotes early changes in pancreatic β -cell development including augmented pancreatic β -cell proliferation and increased pancreatic β -cell mass (Garcia-Arevalo et al., 2016). One important open question was the possibility that BPA acting through ERs caused this effect. Clarifying the participation of ERs in the effects of first-generation *in utero* exposure to BPA should help to predict diabetes risk in response to other xenoestrogens. Thus, we decided to study the possible involvement of ER β since this receptor is known to stimulate pancreatic β -cell division, both *in vivo* and *ex vivo* (Alonso-Magdalena et al., 2013), and because BPA-induced β -cell mass increase was mainly due to augmented β -cell proliferation (Garcia-Arevalo et al., 2016).

Many rodent studies have shown alterations in blood glucose homeostasis and pancreatic β -cell mass and function in BPA-exposed offspring (Alonso-Magdalena et al., 2010; Heindel et al., 2017; Tuduri et al., 2018). However, mechanisms and pathways by which BPA triggers these metabolic disturbances in multigenerational studies are still unknown. The present finding, comparing WT and BERKO mice *in utero*-exposed to BPA, indicate that, for the endpoints measured here, BPA actions require ER β activation. Because BPA crosses the placental barrier (Balakrishnan et al., 2010; Nishikawa et al., 2010), it is plausible that it reaches fetal β -cells and activates ER β to enhance β -cell proliferation. This is consistent with the marked BPA-induced increment in the percentage of proliferative β -cells in primary culture, which was abolished in cells from BERKO mice and was mimicked by the selective ER β agonist WAY200070. Surprisingly, as described in the results, we observed that the antagonist of ER β , PHTPP, promote per se an increase in pancreatic β -cell proliferation. This is unlikely an antagonistic effect on unliganded ER β activation (Maggi, 2011) as there is no difference in pancreatic β -cell proliferation between WT and BERKO in control conditions (Supplemental Fig. 4). We hypothesize that this could be an unspecific effect since some inconsistent results when using PHTPP were already found in previous work from our lab. In particular, we observed that sodium (Nav) ramp current values in the presence of the antagonist PHTPP were considerably reduced compared to controls in mouse dorsal root ganglion neurons (Soriano et al., 2019). Overall, these data, led us to discard the use of this compound in our experimental design. The increment in β -cell proliferation was observed in neonatal cells as well as cells from adult male and female animals.

In the present study, *ex vivo* pancreatic β -cell replication was measured by using BrdU cell incorporation assay, since this has been a high-value tool successfully employed for high accuracy quantification of pancreatic β -cell proliferation in the field of diabetes

(Montanya and Tellez, 2009; Sharma et al., 2019). Although it is considered as an accurate and reliable method, one possible limitation is that BrdU can also be incorporated into cell DNA during DNA repair or cell degeneration and thus, it would be possible that some nuclei might be labelled for this marker in the absence of S-phase entry, diminishing the real value of cell replication. Nevertheless, it is important to clarify that for both mouse and human pancreatic β -cells, it has been demonstrated that DNA damage does not cause BrdU labelling. This comes to confirm the reliability of BrdU as a labelling marker for β -cells entering S-phase and to exclude a misconstrued estimation of the proliferation rate (Sharma et al., 2019). In whole-animal experiments the use of an alternative marker for cell division, Ki67, was preferred. The reason was that the use of BrdU under *in vivo* conditions requires injecting living animals and additional handling, which is not exempt from causing some stress in the animals, and that in particular cases, BrdU may behave as a mutagen and in consequence promote abnormalities in the developing tissues (Kolb et al., 1999). In addition to that, depending on the organ/tissue the diffusion of BrdU can be limited after an intraperitoneal injection and therefore the amount of the marker reaching cells could be a limiting factor (Cameron and McKay, 2001). In any case, both markers are accepted methods for the quantification of proliferation in pancreatic β -cells (Jimenez-Palomares et al., 2015; Montanya and Tellez, 2009; Rankin and Kushner, 2009).

BPA behaves as a modulator of cell growth not only in pancreatic β -cells but in a diversity of cells and tissues. Low doses of BPA induced accelerated cell proliferation in ER-positive (Lee et al., 2012; Ricupito et al., 2009; Song et al., 2015) and ER-negative breast cancer cell lines (Pfeifer et al., 2015; Pupo et al., 2012; Sauer et al., 2017; Xu et al., 2017) ovarian cancer cells (Shi et al., 2017), and ventral prostate epithelial cells (Huang et al., 2017), among other cell types. A variety of mechanisms behind the BPA proliferative

activity has been proposed including signalling pathways activated by ER α (Lee et al., 2012; Sengupta et al., 2013), G protein-coupled estrogen receptor (GPER) (Pupo et al., 2012; Xu et al., 2017), estrogen-related receptor γ (ERR γ) (Song et al., 2015) or epidermal growth factor receptor (EGFR) (Sauer et al., 2017). Here we added ER β as a new player.

Nevertheless, we cannot rule out that BPA-induced proliferative effect in β -cells could be mediated by other receptors in addition to ER β . In line with this, we observed that pancreatic β -cells treated with the selective ER α agonist, PPT, exhibited an augmented BrdU incorporation rate. One possible scenario is that BPA effects on pancreatic β -cell replication may take place by the synergy of different signal transduction pathways mediated by the activation of both ER α and ER β . In any case, whether or not BPA-induced proliferative effect on β -cells require ER α activation needs further experimental confirmation.

Of note, no changes on β -cell division in response to E2 treatment was observed confirming previously published data (Alonso-Magdalena et al., 2008). In contrast, another study reported that E2 increased the percentage of proliferative β -cells in cultured islet cells. However, the increment became apparent at pharmacological doses of E2 (Sorenson et al., 1993), so it is unclear what is the physiological relevance of this last observation.

While E2 treatment did not provoke any effect on β -cell replication, both selective ER α and ER β agonists, were able to promote an upregulation of pancreatic β -cell growth independently. A similar phenomenon was found in the murine mammary epithelial HC11 cell line where the selective ER α agonist PPT, as well as the selective ER β agonist DPN, increased cell metabolism but no effect was observed in response to E2. The authors suggested that this phenomenon could be explained on the basis of the selective estrogen

receptor modulators (SERMs) molecular mechanism of action, i.e. different ligands may recruit different sets of coactivator/corepressor proteins thus resulting in different transcriptional activation and, therefore, in distinct final outcomes (Helguero et al., 2005). This could be applied to the BPA mechanism of action in β -cells; nevertheless, it merits further investigation.

In summary, in the present study we describe a new mechanism of BPA action in pancreatic β -cells, in which ER β is key. Our data suggest that BPA, at doses within the range of human exposure, modulates pancreatic β -cell division leading to an increment of pancreatic β -cell mass during development. This finding should contribute to expanding our mechanistic understanding of BPA action on glucose homeostasis as well as to predict the action of yet unknown chemicals acting through ER β .

Acknowledgments

The authors thank M. L. Navarro and S. Ramon (IDiBE, Universidad Miguel Hernández) for their excellent technical assistance.

Funding This work was supported by BPU2017-86579-R (AN) and BFU2016-77125-R (IQ) financed by: FEDER/Ministerio de Ciencia e Innovación-Agencia Estatal de Investigación; Generalitat Valenciana PROMETEO II/2015/016 (AN). CIBERDEM is an initiative of the Instituto de Salud Carlos III. Jan-Ake Gustafsson is thankful to the Robert A. Welch Foundation for support (E 30007).

REFERENCES

- Alonso-Magdalena, P., Quesada, I., Nadal, A., 2011. Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. *Nature reviews. Endocrinology* 7, 346-353.
- Alonso-Magdalena, P., Ropero, A.B., Carrera, M.P., Cederroth, C.R., Baquie, M., Gauthier, B.R., Nef, S., Stefani, E., Nadal, A., 2008. Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha. *PloS one* 3, e2069.
- Alonso-Magdalena, P., Ropero, A.B., Garcia-Arevalo, M., Soriano, S., Quesada, I., Muhammed, S.J., Salehi, A., Gustafsson, J.A., Nadal, A., 2013. Antidiabetic actions of an estrogen receptor beta selective agonist. *Diabetes* 62, 2015-2025.
- Alonso-Magdalena, P., Ropero, A.B., Soriano, S., Garcia-Arevalo, M., Ripoll, C., Fuentes, E., Quesada, I., Nadal, A., 2012. Bisphenol-A acts as a potent estrogen via non-classical estrogen triggered pathways. *Molecular and cellular endocrinology* 355, 201-207.
- Alonso-Magdalena, P., Vieira, E., Soriano, S., Menes, L., Burks, D., Quesada, I., Nadal, A., 2010. Bisphenol A exposure during pregnancy disrupts glucose homeostasis in mothers and adult male offspring. *Environmental health perspectives* 118, 1243-1250.
- Angle, B.M., Do, R.P., Ponzi, D., Stahlhut, R.W., Drury, B.E., Nagel, S.C., Welshons, W.V., Besch-Williford, C.L., Palanza, P., Parmigiani, S., vom Saal, F.S., Taylor, J.A., 2013. Metabolic disruption in male mice due to fetal exposure to low but not high doses of bisphenol A (BPA): evidence for effects on body weight, food intake, adipocytes, leptin, adiponectin, insulin and glucose regulation. *Reproductive toxicology* 42, 256-268.

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, 393 e391-397.

Bansal, A., Li, C., Xin, F., Duemler, A., Li, W., Rashid, C., Bartolomei, M.S., Simmons, R.A., 2019. Transgenerational effects of maternal bisphenol A exposure on offspring metabolic health - Erratum. *Journal of developmental origins of health and disease* 10, 138.

Bansal, A., Rashid, C., Xin, F., Li, C., Polyak, E., Duemler, A., van der Meer, T., Stefaniak, M., Wajid, S., Doliba, N., Bartolomei, M.S., Simmons, R.A., 2017. Sex- and Dose-Specific Effects of Maternal Bisphenol A Exposure on Pancreatic Islets of First- and Second-Generation Adult Mice Offspring. *Environmental health perspectives* 125, 097022.

Bernier, M.R., Vandenberg, L.N., 2017. Handling of thermal paper: Implications for dermal exposure to bisphenol A and its alternatives. *PloS one* 12, e0178449.

Calafat, A.M., Kuklennyik, Z., Reidy, J.A., Caudill, S.P., Ekong, J., Needham, L.L., 2005. Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environmental health perspectives* 113, 391-395.

Cameron, H.A., McKay, R.D., 2001. Adult neurogenesis produces a large pool of new granule cells in the dentate gyrus. *The Journal of comparative neurology* 435, 406-417.

Cano, D.A., Soria, B., Martin, F., Rojas, A., 2014. Transcriptional control of mammalian pancreas organogenesis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71, 2383-2402.

Garcia-Arevalo, M., Alonso-Magdalena, P., Rebelo Dos Santos, J., Quesada, I., Carneiro, E.M., Nadal, A., 2014. Exposure to bisphenol-A during pregnancy partially mimics the effects of a high-fat diet altering glucose homeostasis and gene expression in adult male mice. *PloS one* 9, e100214.

Garcia-Arevalo, M., Alonso-Magdalena, P., Servitja, J.M., Boronat-Belda, T., Merino, B., Villar-Pazos, S., Medina-Gomez, G., Novials, A., Quesada, I., Nadal, A., 2016. Maternal Exposure to Bisphenol-A During Pregnancy Increases Pancreatic beta-Cell Growth During Early Life in Male Mice Offspring. *Endocrinology* 157, 4158-4171.

Gore, A.C., Chappell, V.A., Fenton, S.E., Flaws, J.A., Nadal, A., Prins, G.S., Toppari, J., Zoeller, R.T., 2015. EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocrine reviews* 36, E1-E150.

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* 68, 3-33.

Heindel, J.J., Vandenberg, L.N., 2015. Developmental origins of health and disease: a paradigm for understanding disease cause and prevention. *Current opinion in pediatrics* 27, 248-253.

Helguero, L.A., Faulds, M.H., Gustafsson, J.A., Haldosen, L.A., 2005. Estrogen receptors alfa (ERalpha) and beta (ERbeta) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11. *Oncogene* 24, 6605-6616.

Hewitt, S.C., Korach, K.S., 2018. Estrogen Receptors: New Directions in the New Millennium. *Endocrine reviews* 39, 664-675.

European Food Safety Authority (EFSA). Draft scientific opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs – Part: exposure assessment; <https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/consultation/130725.pdf>,

Huang, D., Wu, J., Su, X., Yan, H., Sun, Z., 2017. Effects of low dose of bisphenol A on the proliferation and mechanism of primary cultured prostate epithelial cells in rodents. *Oncology letters* 14, 2635-2642.

Jimenez-Palomares, M., Lopez-Acosta, J.F., Villa-Perez, P., Moreno-Amador, J.L., Munoz-Barrera, J., Fernandez-Luis, S., Heras-Pozas, B., Perdomo, G., Bernal-Mizrachi, E., Cozar-Castellano, I., 2015. Cyclin C stimulates beta-cell proliferation in rat and human pancreatic beta-cells. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 308, E450-459.

Kolb, B., Pedersen, B., Ballermann, M., Gibb, R., Whishaw, I.Q., 1999. Embryonic and postnatal injections of bromodeoxyuridine produce age-dependent morphological and behavioral abnormalities. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19, 2337-2346.

Krege, J.H., Hodgin, J.B., Couse, J.F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J.F., Sar, M., Korach, K.S., Gustafsson, J.A., Smithies, O., 1998. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 15677-15682.

Lee, H.R., Hwang, K.A., Park, M.A., Yi, B.R., Jeung, E.B., Choi, K.C., 2012. Treatment with bisphenol A and methoxychlor results in the growth of human breast cancer cells and alteration of the expression of cell cycle-related genes, cyclin D1 and p21, via an

estrogen receptor-dependent signaling pathway. *International journal of molecular medicine* 29, 883-890.

Li, D.S., Yuan, Y.H., Tu, H.J., Liang, Q.L., Dai, L.J., 2009. A protocol for islet isolation from mouse pancreas. *Nature protocols* 4, 1649-1652.

Maggi, A., 2011. Liganded and unliganded activation of estrogen receptor and hormone replacement therapies. *Biochimica et biophysica acta* 1812, 1054-1060.

Marino, M., Galluzzo, P., Ascenzi, P., 2006. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Current genomics* 7, 497-508.

Martinez-Pinna, J., Marroqui, L., Hmadcha, A., Lopez-Beas, J., Soriano, S., Villar-Pazos, S., Alonso-Magdalena, P., Dos Santos, R.S., Quesada, I., Martin, F., Soria, B., Gustafsson, J.A., Nadal, A., 2019. Oestrogen receptor beta mediates the actions of bisphenol-A on ion channel expression in mouse pancreatic beta cells. *Diabetologia* 62, 1667-1680.

Mimoto, M.S., Nadal, A., Sargis, R.M., 2017. Polluted Pathways: Mechanisms of Metabolic Disruption by Endocrine Disrupting Chemicals. *Current environmental health reports* 4, 208-222.

Montanya, E., Tellez, N., 2009. Pancreatic remodeling: beta-cell apoptosis, proliferation and neogenesis, and the measurement of beta-cell mass and of individual beta-cell size. *Methods in molecular biology* 560, 137-158.

Nadal, A., Alonso-Magdalena, P., Ripoll, C., Fuentes, E., 2005. Disentangling the molecular mechanisms of action of endogenous and environmental estrogens. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* 449, 335-343.

- Nadal, A., Quesada, I., Tuduri, E., Nogueiras, R., Alonso-Magdalena, P., 2017. Endocrine-disrupting chemicals and the regulation of energy balance. *Nature reviews. Endocrinology* 13, 536-546.
- Nishikawa, M., Iwano, H., Yanagisawa, R., Koike, N., Inoue, H., Yokota, H., 2010. Placental transfer of conjugated bisphenol A and subsequent reactivation in the rat fetus. *Environmental health perspectives* 118, 1196-1203.
- Pfeifer, D., Chung, Y.M., Hu, M.C., 2015. Effects of Low-Dose Bisphenol A on DNA Damage and Proliferation of Breast Cells: The Role of c-Myc. *Environmental health perspectives* 123, 1271-1279.
- Pupo, M., Pisano, A., Lappano, R., Santolla, M.F., De Francesco, E.M., Abonante, S., Rosano, C., Maggiolini, M., 2012. Bisphenol A induces gene expression changes and proliferative effects through GPER in breast cancer cells and cancer-associated fibroblasts. *Environmental health perspectives* 120, 1177-1182.
- Rankin, M.M., Kushner, J.A., 2009. Adaptive beta-cell proliferation is severely restricted with advanced age. *Diabetes* 58, 1365-1372.
- Ricupito, A., Del Pozzo, G., Diano, N., Grano, V., Portaccio, M., Marino, M., Bolli, A., Galluzzo, P., Bontempo, P., Mita, L., Altucci, L., Mita, D.G., 2009. Effect of bisphenol A with or without enzyme treatment on the proliferation and viability of MCF-7 cells. *Environment international* 35, 21-26.
- Rojas, A., Khoo, A., Tejedo, J.R., Bedoya, F.J., Soria, B., Martin, F., 2010. Islet cell development. *Advances in experimental medicine and biology* 654, 59-75.

Safe, S., Kim, K., 2008. Non-classical genomic estrogen receptor (ER)/specificity protein and ER/activating protein-1 signaling pathways. *Journal of molecular endocrinology* 41, 263-275.

Sargis, R.M., Simmons, R.A., 2019. Environmental neglect: endocrine disruptors as underappreciated but potentially modifiable diabetes risk factors. *Diabetologia* 62, 1811-1822.

Sauer, S.J., Tarpley, M., Shah, I., Save, A.V., Lyster, H.K., Patierno, S.R., Williams, K.P., Devi, G.R., 2017. Bisphenol A activates EGFR and ERK promoting proliferation, tumor spheroid formation and resistance to EGFR pathway inhibition in estrogen receptor-negative inflammatory breast cancer cells. *Carcinogenesis* 38, 252-260.

Sengupta, S., Obiorah, I., Maximov, P.Y., Curpan, R., Jordan, V.C., 2013. Molecular mechanism of action of bisphenol and bisphenol A mediated by oestrogen receptor alpha in growth and apoptosis of breast cancer cells. *British journal of pharmacology* 169, 167-178.

Sharma, R.B., Darko, C., Zheng, X., Gablaski, B., Alonso, L.C., 2019. DNA Damage Does Not Cause BrdU Labeling of Mouse or Human beta-Cells. *Diabetes* 68, 975-987.

Shi, X.Y., Wang, Z., Liu, L., Feng, L.M., Li, N., Liu, S., Gao, H., 2017. Low concentrations of bisphenol A promote human ovarian cancer cell proliferation and glycolysis-based metabolism through the estrogen receptor-alpha pathway. *Chemosphere* 185, 361-367.

Song, H., Zhang, T., Yang, P., Li, M., Yang, Y., Wang, Y., Du, J., Pan, K., Zhang, K., 2015. Low doses of bisphenol A stimulate the proliferation of breast cancer cells via

ERK1/2/ERRgamma signals. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 30, 521-528.

Sorenson, R.L., Brelje, T.C., Roth, C., 1993. Effects of steroid and lactogenic hormones on islets of Langerhans: a new hypothesis for the role of pregnancy steroids in the adaptation of islets to pregnancy. *Endocrinology* 133, 2227-2234.

Soriano, S., Alonso-Magdalena, P., Garcia-Arevalo, M., Novials, A., Muhammed, S.J., Salehi, A., Gustafsson, J.A., Quesada, I., Nadal, A., 2012. Rapid insulinotropic action of low doses of bisphenol-A on mouse and human islets of Langerhans: role of estrogen receptor beta. *PloS one* 7, e31109.

Soriano, S., Gil-Rivera, M., Marroqui, L., Alonso-Magdalena, P., Fuentes, E., Gustafsson, J.A., Nadal, A., Martinez-Pinna, J., 2019. Bisphenol A Regulates Sodium Ramp Currents in Mouse Dorsal Root Ganglion Neurons and Increases Nociception. *Scientific reports* 9, 10306.

Stahlhut, R.W., Welshons, W.V., Swan, S.H., 2009. Bisphenol A data in NHANES suggest longer than expected half-life, substantial nonfood exposure, or both. *Environmental health perspectives* 117, 784-789.

Susiarjo, M., Xin, F., Bansal, A., Stefaniak, M., Li, C., Simmons, R.A., Bartolomei, M.S., 2015. Bisphenol a exposure disrupts metabolic health across multiple generations in the mouse. *Endocrinology* 156, 2049-2058.

Taylor, J.A., Vom Saal, F.S., Welshons, W.V., Drury, B., Rottinghaus, G., Hunt, P.A., Toutain, P.L., Laffont, C.M., VandeVoort, C.A., 2011. Similarity of bisphenol A pharmacokinetics in rhesus monkeys and mice: relevance for human exposure. *Environmental health perspectives* 119, 422-430.

Thayer, K.A., Doerge, D.R., Hunt, D., Schurman, S.H., Twaddle, N.C., Churchwell, M.I., Garantziotis, S., Kissling, G.E., Easterling, M.R., Bucher, J.R., Birnbaum, L.S., 2015. Pharmacokinetics of bisphenol A in humans following a single oral administration. *Environment international* 83, 107-115.

Tuduri, E., Marroqui, L., Dos Santos, R.S., Quesada, I., Fuentes, E., Alonso-Magdalena, P., 2018. Timing of Exposure and Bisphenol-A: Implications for Diabetes Development. *Frontiers in endocrinology* 9, 648.

Vandenberg, L.N., Chahoud, I., Heindel, J.J., Padmanabhan, V., Paumgartten, F.J., Schoenfelder, G., 2010. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environmental health perspectives* 118, 1055-1070.

Vandenberg, L.N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., Welshons, W.V., 2007. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive toxicology* 24, 139-177.

Villar-Pazos, S., Martinez-Pinna, J., Castellano-Munoz, M., Alonso-Magdalena, P., Marroqui, L., Quesada, I., Gustafsson, J.A., Nadal, A., 2017. Molecular mechanisms involved in the non-monotonic effect of bisphenol-a on Ca^{2+} entry in mouse pancreatic beta-cells. *Scientific reports* 7, 11770.

Vom Saal, F.S., VandeVoort, C.A., Taylor, J.A., Welshons, W.V., Toutain, P.L., Hunt, P.A., 2014. Bisphenol A (BPA) pharmacokinetics with daily oral bolus or continuous exposure via silastic capsules in pregnant rhesus monkeys: Relevance for human exposures. *Reproductive toxicology* 45, 105-116.

Wei, J., Lin, Y., Li, Y., Ying, C., Chen, J., Song, L., Zhou, Z., Lv, Z., Xia, W., Chen, X., Xu, S., 2011. Perinatal exposure to bisphenol A at reference dose predisposes offspring to metabolic syndrome in adult rats on a high-fat diet. *Endocrinology* 152, 3049-3061.

Wetherill, Y.B., Akingbemi, B.T., Kanno, J., McLachlan, J.A., Nadal, A., Sonnenschein, C., Watson, C.S., Zoeller, R.T., Belcher, S.M., 2007. In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reproductive toxicology* 24, 178-198.

Xu, F., Wang, X., Wu, N., He, S., Yi, W., Xiang, S., Zhang, P., Xie, X., Ying, C., 2017. Bisphenol A induces proliferative effects on both breast cancer cells and vascular endothelial cells through a shared GPER-dependent pathway in hypoxia. *Environmental pollution* 231, 1609-1620.

Zoeller, R.T., Brown, T.R., Doan, L.L., Gore, A.C., Skakkebaek, N.E., Soto, A.M., Woodruff, T.J., Vom Saal, F.S., 2012. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society. *Endocrinology* 153, 4097-4110.

FIGURE LEGENDS

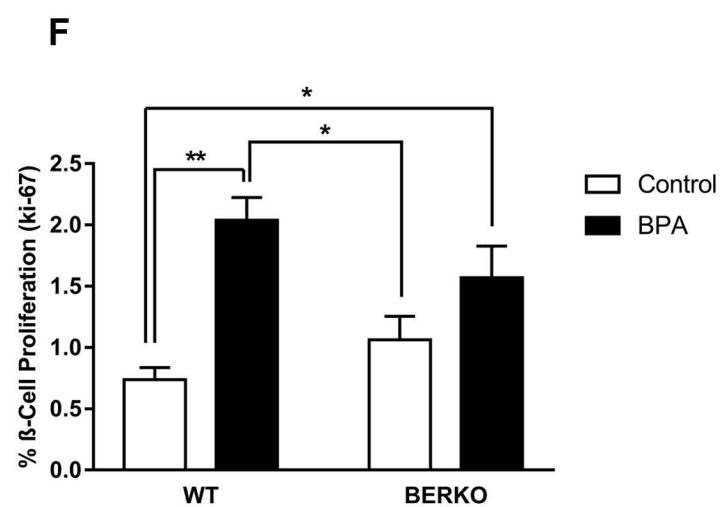
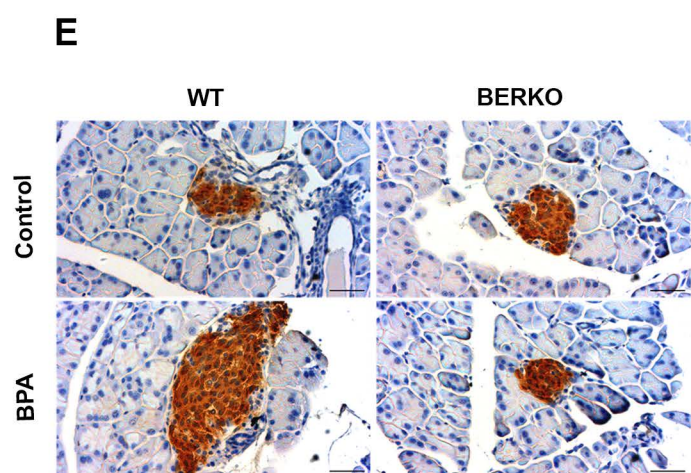
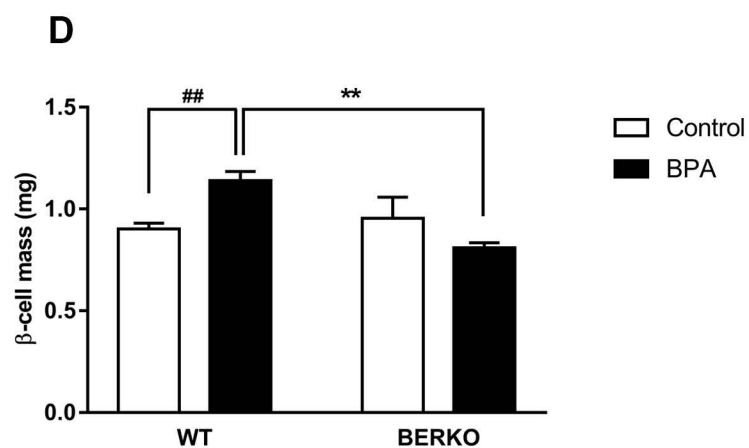
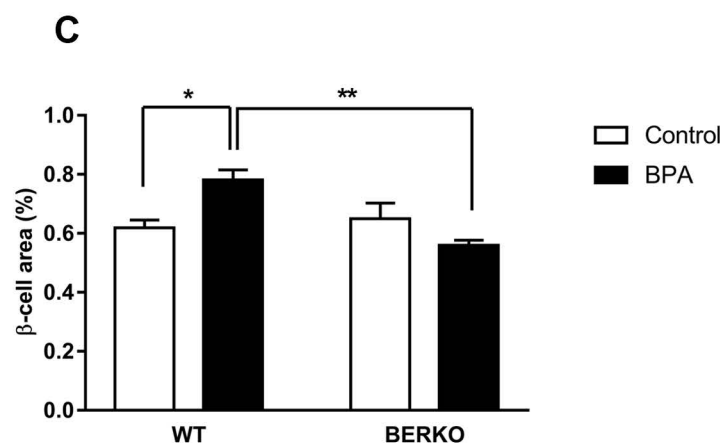
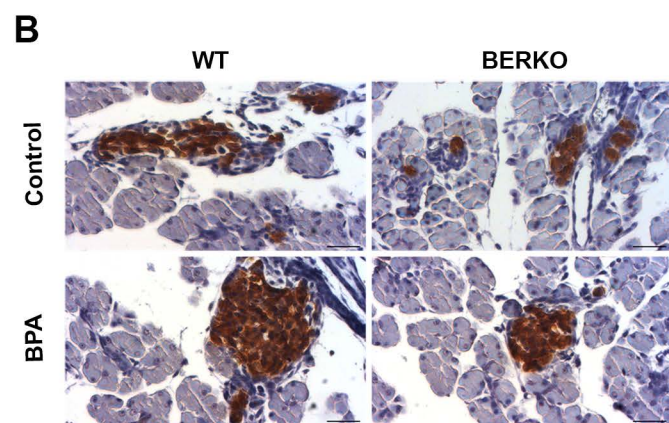
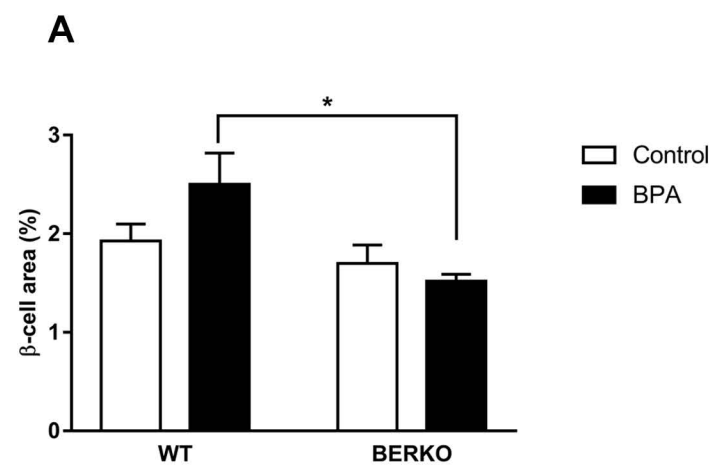
Figure 1. *In utero* exposure to low doses of BPA promotes an increment of pancreatic β -cell mass through the activation of ER β . (A) Relative β -cell area calculated as the percentage of the insulin-positive area over the total pancreas area in WT and BERKO male offspring at P0 treated with vehicle or BPA during gestation (n=5-6 mice/group from 8 litters). (B) Representative image of anti-insulin antibody-stained pancreatic sections from WT and BERKO male offspring at P0 (scale bar 50 μ m). (C) Quantification of the relative β -cell area at P30, calculated as the percentage of the insulin-positive area over the total pancreas area in WT and BERKO male offspring treated with vehicle or BPA during gestation (n=5 mice/group from 8 litters). (D) Pancreatic β -cell mass (milligrams per pancreas) calculated as the ratio of the insulin-positive area over the total pancreas area multiplied by the pancreas weight in WT and BERKO male offspring at P30 (n=5 mice/group from 8 litters). (E) Representative image of anti-insulin antibody-stained pancreatic sections from WT and BERKO male offspring at P30 (scale bar 50 μ m). (F) Percentage of Ki67 positive pancreatic β -cells in WT and BERKO male offspring at P30 (n=5 mice/group from 8 litters). Within each experimental group each mouse came from a different litter. Data are expressed as the mean $\pm$ SEM, and statistical significance was determined using Two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test; significance * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ or Student's t-test; significance ## $p < 0.01$.

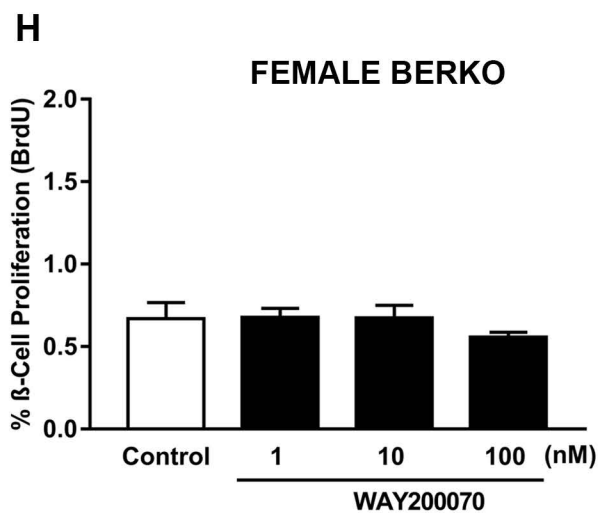
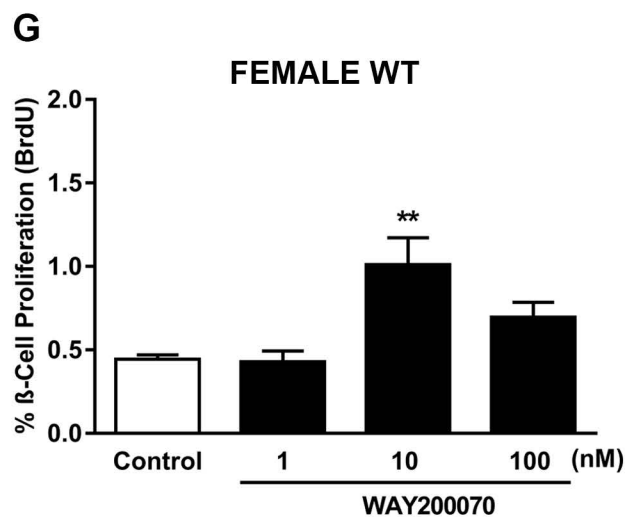
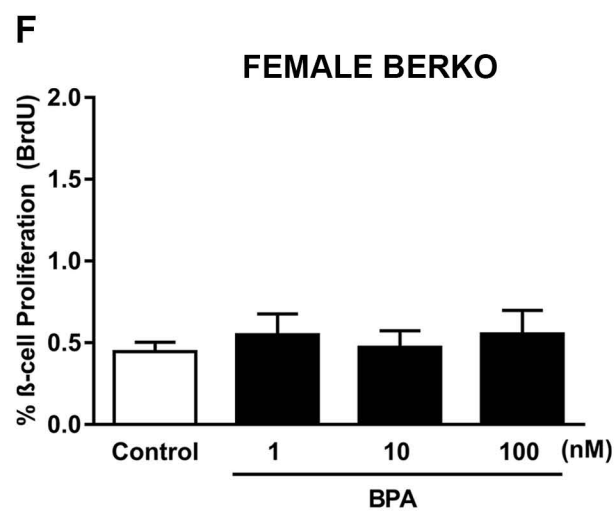
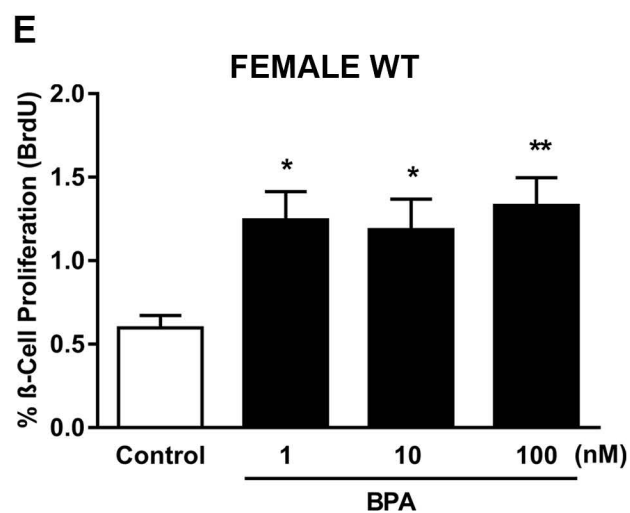
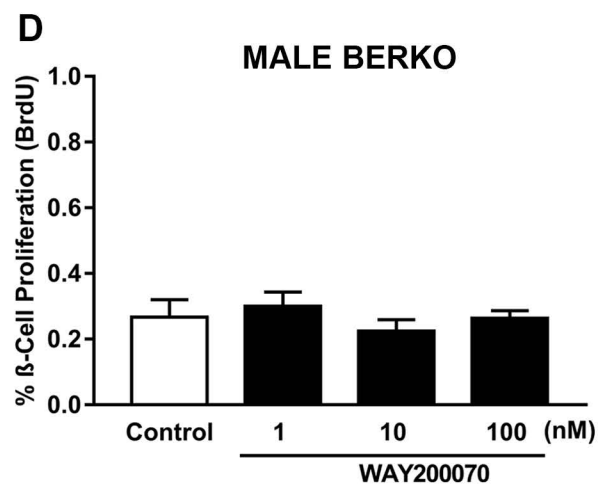
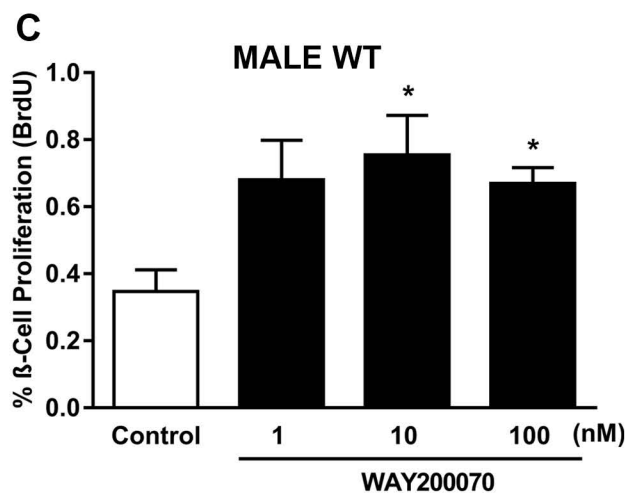
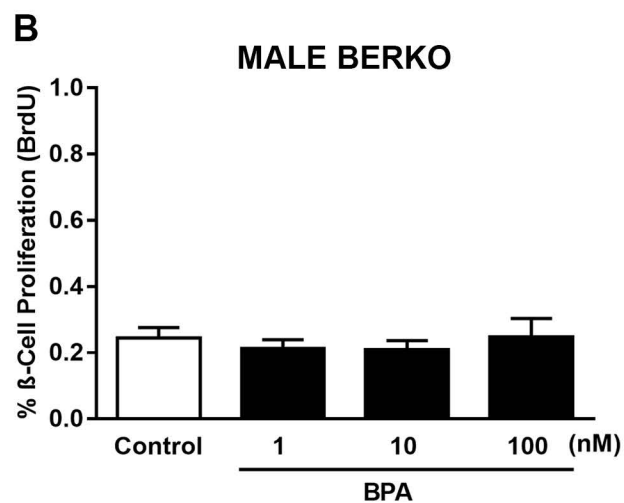
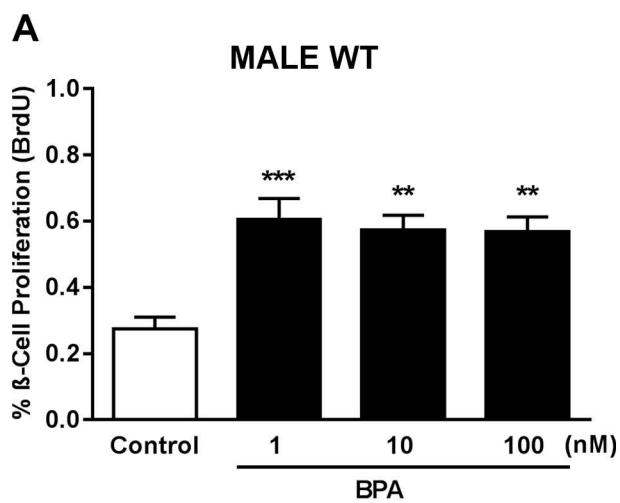
Figure 2. BPA increases pancreatic β -cell growth in WT adult mice but not in BERKO mice. *Ex vivo* analysis of pancreatic β -cell proliferation capacity. Quantification of proliferation rate in BPA-treated pancreatic β -cells isolated from (A) male adult WT mice (n=1800-2800 pancreatic β -cells per coverslip, 5 coverslips per condition from 3 mice) or (B) male adult BERKO mice (n=2500-2800 pancreatic β -cells per coverslip, 5

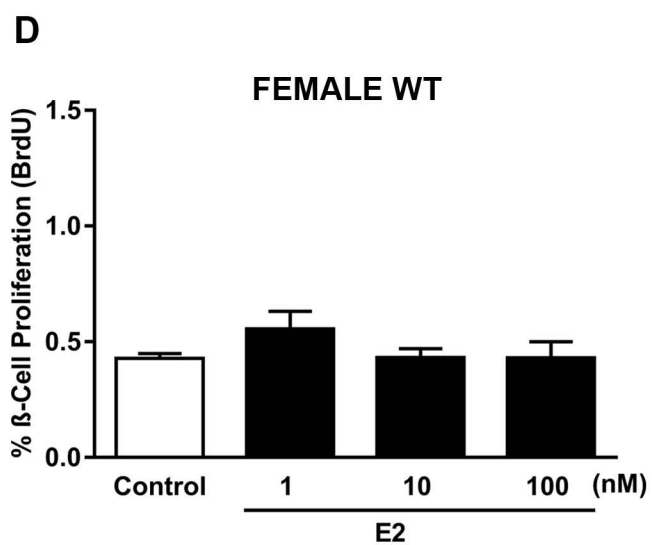
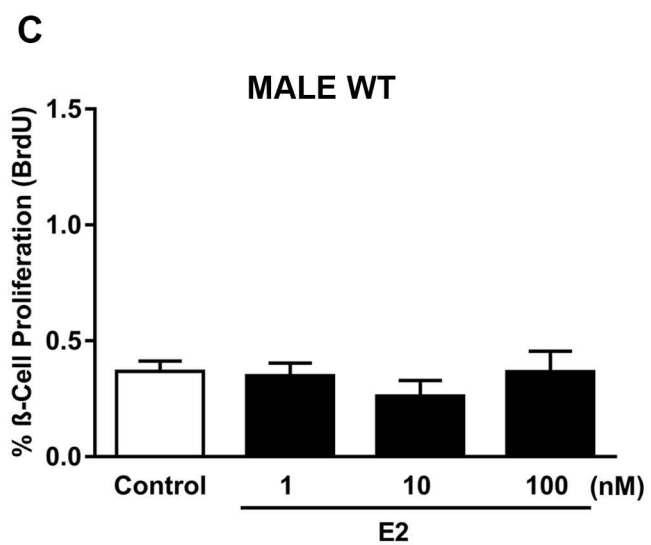
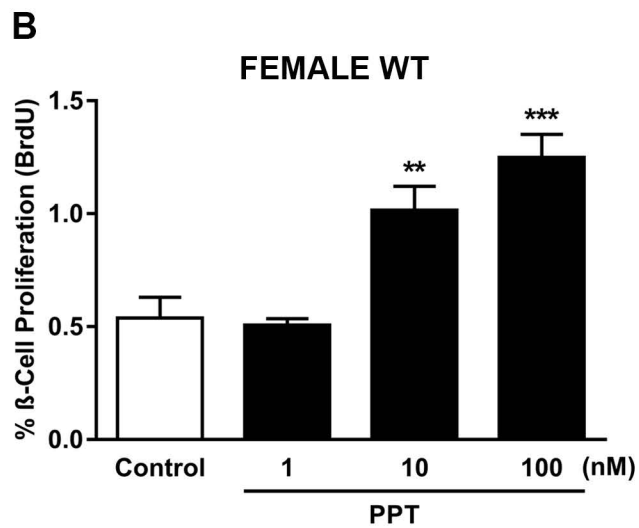
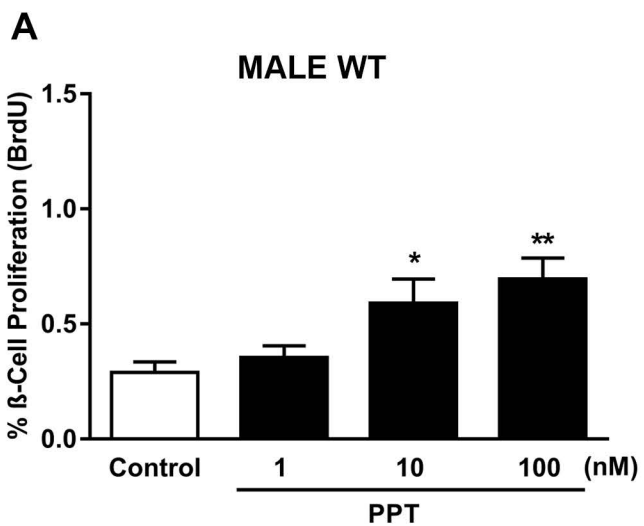
coverslips per condition from 3 mice). Pancreatic β -cell replication rates in WAY200070-treated cells from (C) male adult WT mice (n=3000-3700 pancreatic β -cells per coverslip, 5 coverslips per condition from 3 mice) or (D) BERKO male adult mice (n= 1800-3200 pancreatic β -cells per coverslip, 5 coverslips per condition from 3 mice). Pancreatic β -cell proliferation rate of BPA-treated cells from (E) female adult WT mice (n=2200-3800 pancreatic β -cells per coverslip, 5 coverslips per condition from 3 mice) or (F) female adult BERKO mice (n=3000-4300 pancreatic β -cells per coverslip, 6 coverslips per condition from 3 mice). β -cell proliferation in WAY200070-treated cells from (G) female adult WT mice (n=2000-2700 pancreatic β -cells per coverslip, 5-7 coverslips per condition from 3 mice) or (H) female adult BERKO mice (n= 1300-1600 pancreatic β -cells per coverslip, 5 coverslips per condition from 3 mice). Data are expressed as the mean $\pm$ SEM, and statistical significance was determined by One-way ANOVA followed by Dunnet's post hoc test; * vs. Control; Significance: * p<0.05, ** p< 0.01, *** p<0.001.

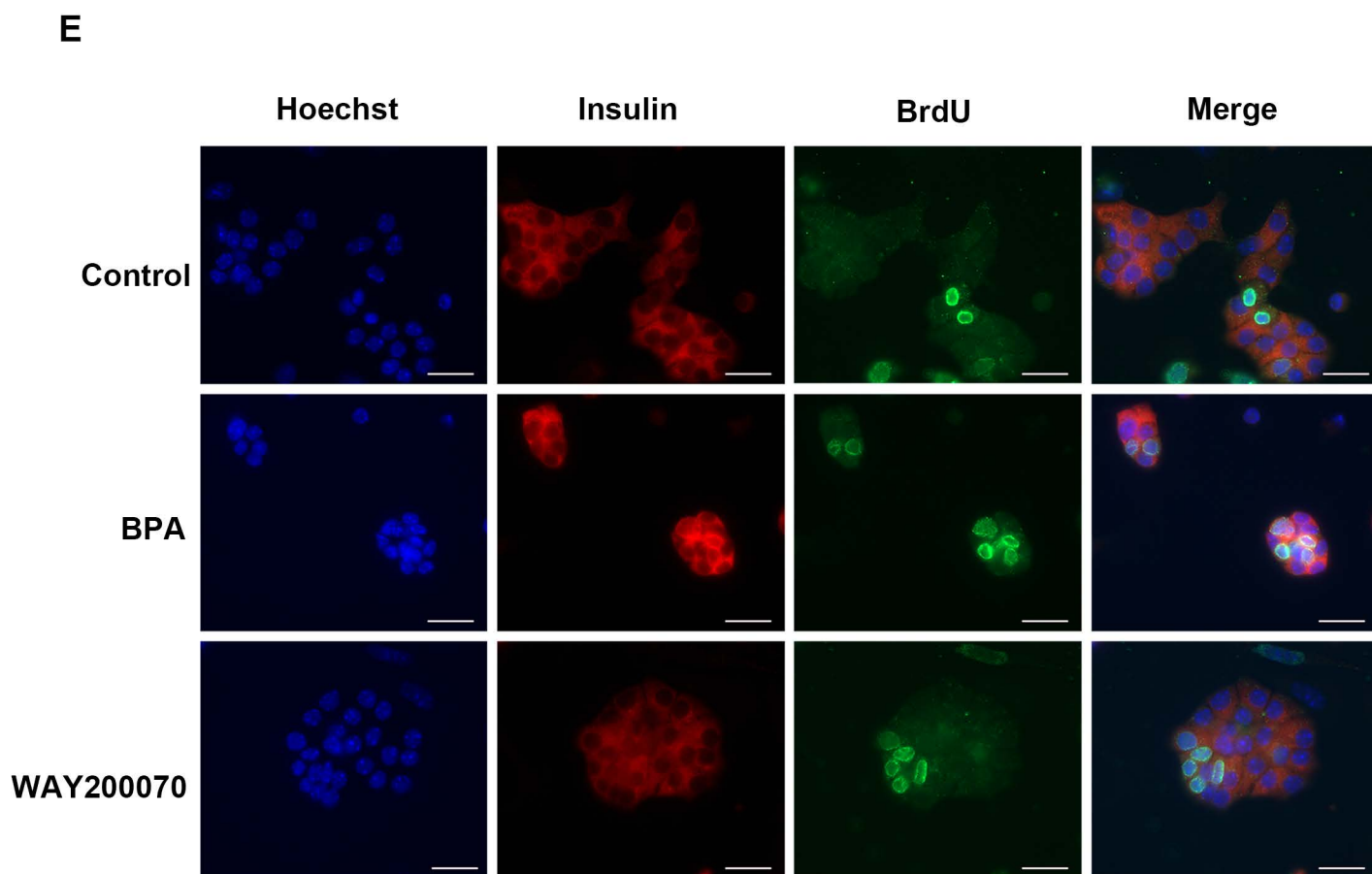
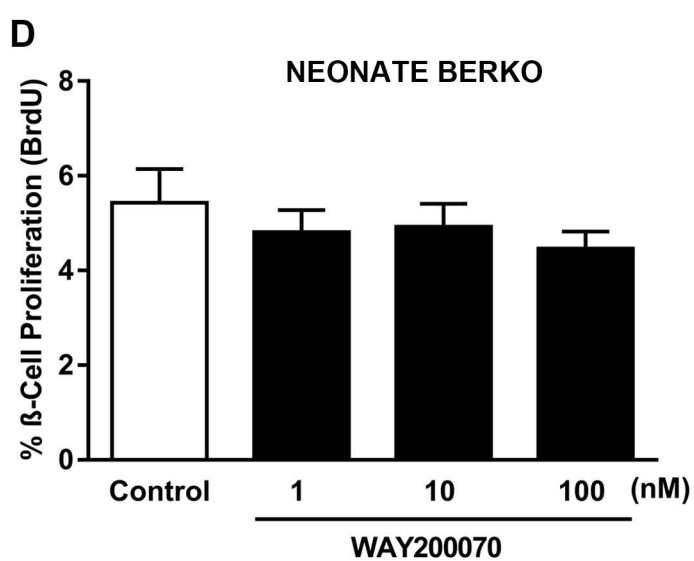
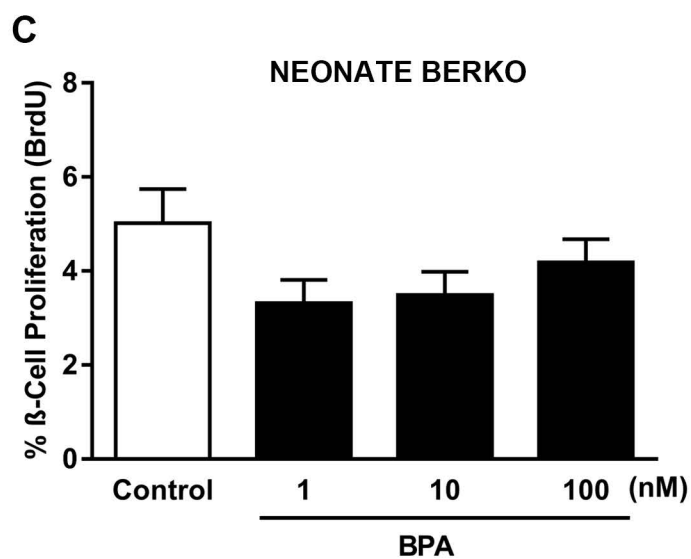
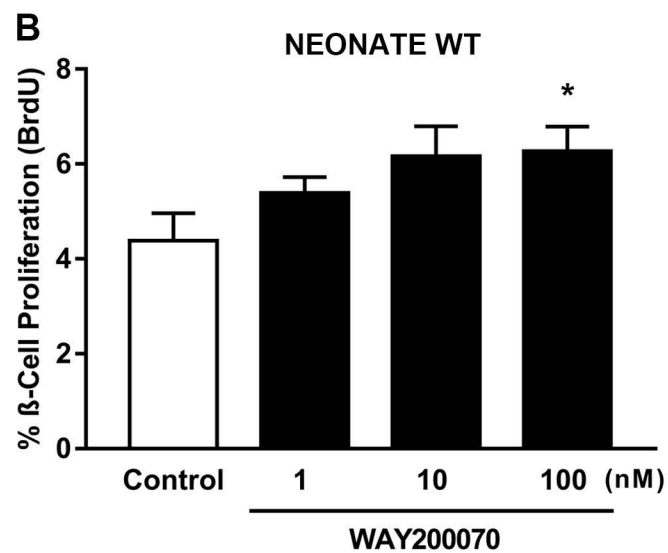
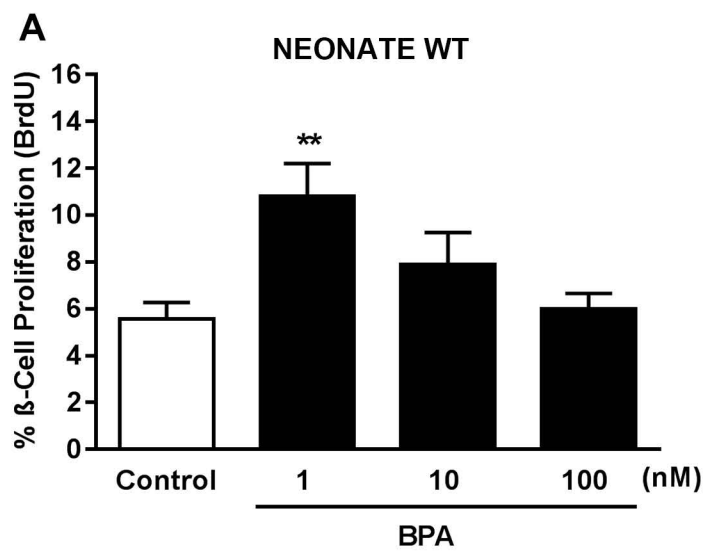
Figure 3. Pancreatic β -cell proliferation rate after 48-hour treatment with PPT or E2. Quantification of pancreatic β -cell proliferation rate in PPT-treated cells from (A) male WT mice (n=2000-2700 pancreatic β -cells per coverslip, 5 coverslips per condition from 3 mice) or (B) female WT mice (n= 2000-3800 pancreatic β -cells per coverslip, 5-8 coverslips per condition from 3 mice). Pancreatic β -cell proliferation rate in E2-treated cells from (C) male WT mice (n=3400-4500 pancreatic β -cells per coverslip, 5 coverslips per condition from 3 mice) or (D) female WT mice (n=2700-3700 pancreatic β -cells per coverslip, 5 coverslips per condition from 3 mice). Data are expressed as the mean $\pm$ SEM, and statistical significance was determined by Kruskal-Wallis followed by Dunn's post hoc test (Fig. 3A) or One-way ANOVA followed by Dunnet's post hoc test (Fig. 3B); * vs. Control; Significance: * p<0.05, ** p< 0.01, *** p<0.001.

Figure 4. BPA displays a direct effect on pancreatic β -cell replication in neonates in an ER β dependent manner. (A) Pancreatic β -cell proliferation rate in BPA-exposed cells (n=800-1000 pancreatic β -cells per coverslip, 5-7 coverslips per condition from 6 mice) or (B) WAY200070-exposed cells (n= 900-1200 pancreatic β -cells per coverslip, 5-7 coverslips per condition from 5 mice) from WT neonate mice. (C) Pancreatic β -cell proliferation analysis in BPA (n=900-1100 pancreatic β -cells per coverslip, 5 coverslips per condition from 5 mice) or (D) WAY200070-treated cells (n=700-1000 pancreatic β -cells per coverslip, 4-5 coverslips per condition from 5 mice) obtained from BERKO neonate mice. (E) Representative images of pancreatic β -cells from WT neonate mice stained with antibodies against BrdU (green) and insulin (red) and counterstained with Hoechst (blue) (scale bar=20 μ m) from different experiments. Data are expressed as the mean $\pm$ SEM, and statistical significance was determined by One-way ANOVA followed by Dunnet's post hoc test; * vs. Control; significance: * p< 0.05, ** p< 0.01.









SUPPLEMENTAL MATERIAL

BISPHENOL-A EXPOSURE DURING PREGNANCY ALTERS PANCREATIC β -CELL DIVISION AND MASS IN MALE MICE OFFSPRING: A ROLE FOR ER β

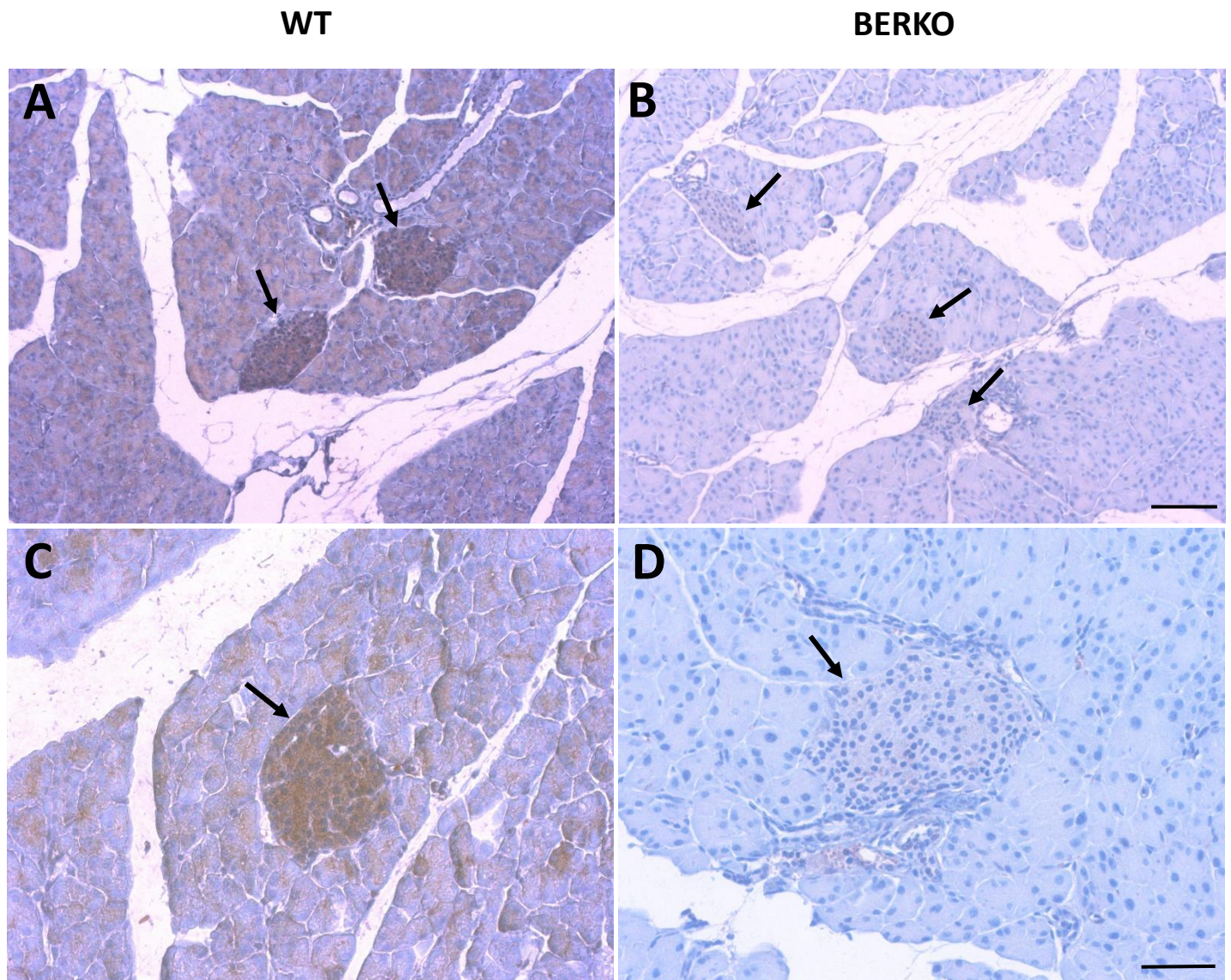
Talía Boronat-Belda¹, Hilda Ferrero^{1,2}, Ruba Al-Abdulla¹, Iván Quesada^{1,2}, Jan-Ake

Gustafsson^{3,4}, Ángel Nadal^{1,2}, Paloma Alonso-Magdalena^{1,2*}

1.Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), Universidad Miguel Hernández, Elche, Spain; 2. Centro de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), Spain; 3. Department of Cell Biology and Biochemistry, Center for Nuclear Receptors and Cell Signaling, University of Houston, Houston, TX, USA; 4. Department of Biosciences and Nutrition, Karolinska Institutet, Huddinge, Sweden.

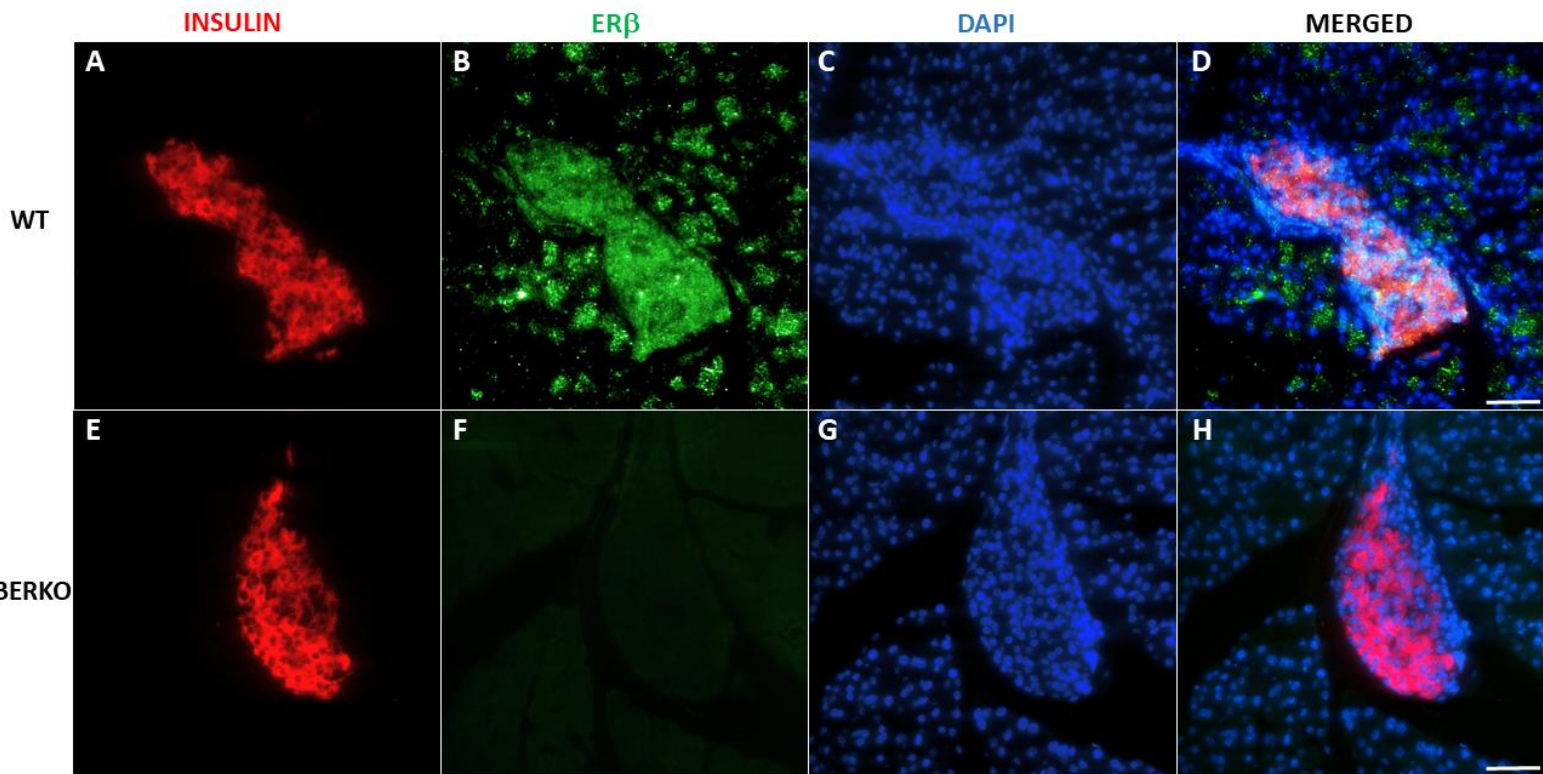
* Correspondence should be addressed to:

Paloma Alonso-Magdalena. Email: palonso@umh.es



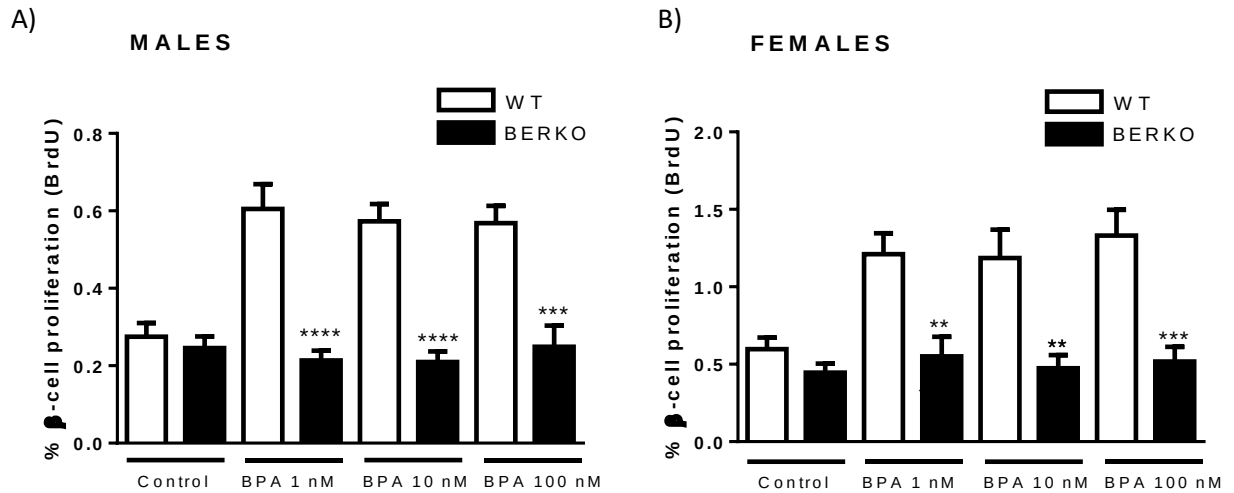
Supplemental Figure 1. Confirmation of loss of ER β expression in the pancreas of BERKO mice.

(A) Representative images of anti-ER β immunohistochemistry stained pancreatic sections at 10X magnification (scale bar 100 μ m) from (A) WT and (B) BERKO male offspring at P30. Representative images of anti-ER β immunohistochemistry stained pancreatic sections at 20X magnification (scale bar 50 μ m) from (C) WT and (D) BERKO male offspring at P30. Positive staining for ER β is shown in brown colour while negative staining for ER β is indicated by the absence of brown colour and instead light blue staining. Nuclei were counterstained with haematoxylin in all images. Islets of Langerhans are indicated by black arrows.



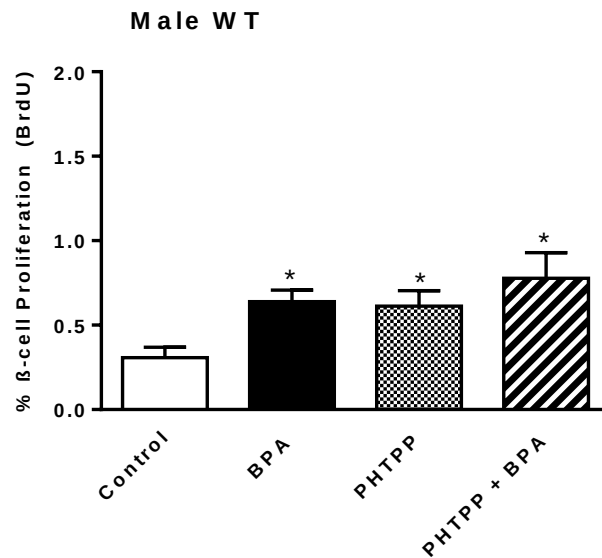
Supplemental Figure 2. Confirmation of loss of ER β expression in the pancreas of BERKO mice.

Immunofluorescence staining of (A) insulin (red colour), (B) ER β (green colour) and (C) DAPI nucleic acid staining (blue colour) in pancreatic sections from WT male offspring at P30. Immunofluorescence staining of (E) insulin (red colour), (F) ER β (green colour) and (G) DAPI nucleic acid staining (blue colour) in pancreas sections from BERKO male offspring at P30. Merged images are shown in D and H (40X magnification, scale bar 50 μ m). As it was already demonstrated and published before, ER β was found to be expressed inside and outside the nucleus in pancreatic β -cells (Alonso-Magdalena et al Plos One 2008).

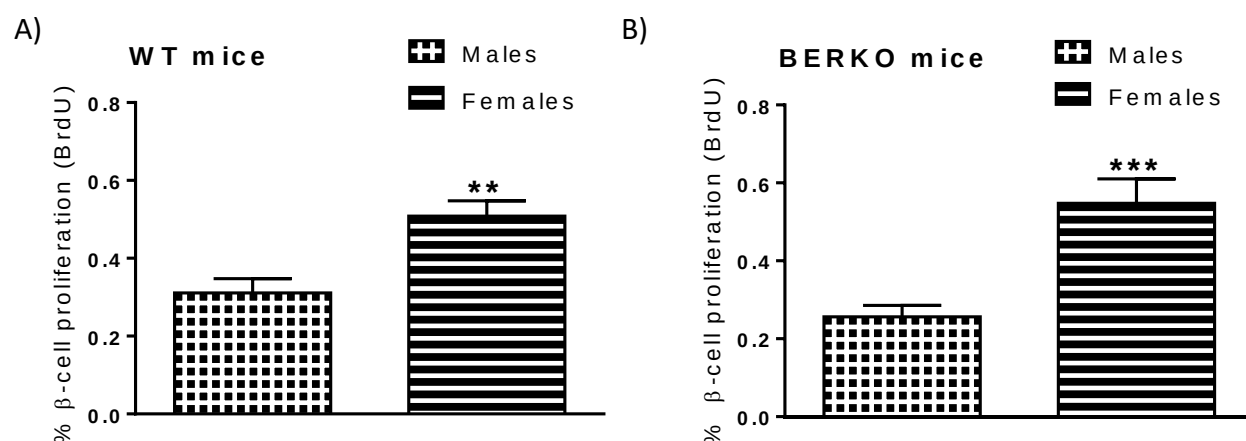


Supplemental Figure 3. Rate of pancreatic β -cell proliferation in (A) BPA-treated cells isolated from WT and BERKO male mice (n= 1800-3200 cells per coverslip, 5 coverslips) and (B) BPA-treated cells isolated from WT and BERKO female mice (n=2000-4300 cells per coverslip, 5 coverslips). Only direct comparisons within BPA dose and control groups are shown. Data are expressed as the mean $\pm$ SEM, and statistical significance was determined by Two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test; *Significance: ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001.

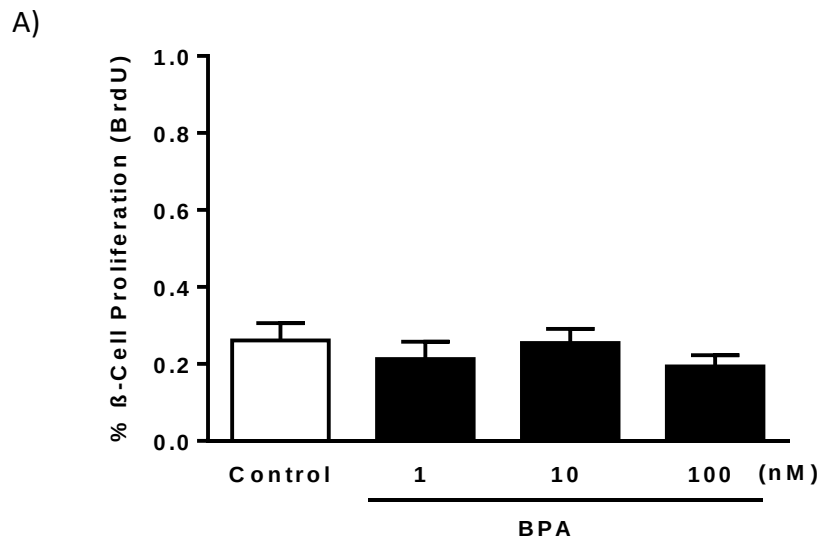
A)



Supplemental Figure 4. Pancreatic β -cell proliferation rate in cells treated with vehicle, BPA (1 nM), PHTPP (1 μ M) or BPA + PHTPP (n=2300-2700 cells per coverslip, 5-6 coverslips per condition). Data are expressed as the mean $\pm$ SEM, and statistical significance was determined by One-way ANOVA followed by Holm-Sidak's post hoc test; *Significance: * $p < 0.05$.



Supplemental Figure 5. Rate of pancreatic β -cell proliferation in (A) untreated cells from WT male and female mice (n= 2900-3200 cells per coverslip, 10-12 coverslips per condition) and (B) untreated cells from BERKO male and female mice (n= 2200-2900 cells per coverslip, 10-11 coverslips per condition). Data are expressed as the mean $\pm$ SEM, and statistical significance was determined by Student's t-test; * Significance: ** p<0.01, *** p<0.001.



Supplemental Figure 6. Rate of pancreatic β -cell proliferation in BPA-treated cells from BERKO female mice (n=2800-3500 cells per coverslip, 5 coverslips per condition). Data are expressed as the mean $\pm$ SEM.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quería agradecer la oportunidad que me han brindado mis directores de Tesis, el Dr. Ángel Nadal Navajas y la Dra. Paloma Alonso Magdalena, gracias a vosotros este trabajo es una realidad. Gracias Ángel por confiar en mí, por guiarme, por tu paciencia y tu tiempo. Gracias Paloma por darme la oportunidad de trabajar a tu lado, por tu amabilidad, por tu infinita ayuda y ser siempre un ejemplo a seguir. Un verdadero privilegio trabajar con vosotros. No encuentro la forma de expresar la admiración que siento por vosotros. Quería agradecer también al Dr. Iván Quesada, la Dra. Esther Fuentes y la Dra. Cristina Ripoll por ser imprescindibles en los éxitos de este laboratorio. A los electrofisiólogos, el Dr. Sergi Soriano y el Dr. Juan Pinna, gracias por vuestra simpatía, amabilidad y risas compartidas. Agradecer también a la Dra. Beatriz Merino, Dr. Reinaldo dos Santos y la Dra. Hilda Ferrero, sois grandes científicos. No puedo olvidarme de la Dra. Eva Tudurí y la Dra. Laura Marroquí, gracias por todos vuestros consejos y por los congresos compartidos. Gracias también al Profesor Jan-Åke Gustafsson del *Karolinska Institutet* por facilitarnos el modelo de experimentación animal.

Quiero dedicar unos agradecimientos especiales a dos pilares fundamentales del laboratorio, a Luisi y Salomé. Gracias por la ayuda infinita que me habéis ofrecido diariamente y por las largas mañanas cazando islotes con la música de fondo...También por las mañanas interminables en el animalario marcando a nuestros ratones. Luisi, la más trabajadora, gracias por todos los “raticos” tanto dentro como fuera del laboratorio, eres el alma de la fiesta y contagias alegría. Salo, la més valenta, la paraula gràcies es queda curta per agrair-te tots els consells i oportunitats que m’has brindat, admire molt la teua manera d’afrontar la vida.

No puedo olvidar a mis compañeras de tesis y bancada. Gracias a Toñi y Lucía, aunque hemos coincidido menos tiempo. A Jean, gracias por alegrar cada mañana el laboratorio y por divertirme tantísimo contigo, desprendes mucha luz. A Eva, gracias por todo lo aprendido contigo, por toda tu amabilidad siempre, eres una gran persona. A Sabrina y a Cris, sois grandes mujeres, una suerte haber coincidido con vosotras en esta etapa porque sin vuestra amistad no hubiera sido lo mismo, os voy a echar de menos.

A mis amigas de siempre, gracias por el apoyo que me habéis dado. El tiempo que paso con vosotras siempre es poco.

A mi familia, a mi hermana Tanit por estar siempre ahí y aconsejarme como buena hermana mayor. A mis padres, Vicent i Pepa, sin vosotros nunca podría

haber llegado hasta aquí. Gracias por vuestra dedicación y por no dudar nunca de mí. Esta tesis también es vuestra.

Por último, y no menos importante, a Jacobo, a ti no basta solo con darte las gracias, sin tu ayuda, sin tu apoyo, simplemente no lo hubiera conseguido, gracias por hacerme tan feliz.