



Universidad de Oviedo



CENTRO INTERNACIONAL
DE POSTGRADO

CAMPUS DE EXCELENCIA
INTERNACIONAL

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOLOGÍA Y TECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN

Efectos del bisfenol A en la reproducción

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
2015-2016

Autora: SHUYANA DEBA REMENTERIA

Tutora: PAULA NÚÑEZ MARTÍNEZ

FECHA: Junio 2016

AGRADECIMIENTOS

Primero de todo quiero agradecer a mi tutora Paula. Gracias por todas las pautas y sugerencias que me has dado a lo largo de estos meses. Agradecerte sinceramente todo el apoyo.

A Inés, Javi y Sara, compañeros de máster y amigos, por hacer de este curso académico una experiencia inolvidable, por contestar todas mis dudas, por aguantar todos mis mensajes. A Fátima, por hacer de Oviedo mi segundo hogar, y a Bea por su grandísima amistad. Gracias a los cinco por todo lo vivido.

A mis amigas y familiares por animarme a lo largo de estos meses y seguir estando a mi lado cuando estaba fuera de casa.

Pero sobre todo, a mi Aita, Ama y Markel, por confiar siempre en mí, por darme la oportunidad de seguir creciendo académica y personalmente.

Mile esker bihotz bihotzez danori

RESUMEN

Esta revisión sistemática tiene como objetivo analizar los efectos del bisfenol A en la reproducción, realizando una búsqueda y selección de estudios originales publicados en las bases de datos PubMed y Web Of Science. El bisfenol A es un producto químico que se utiliza como monómero o aditivo en la producción de polímeros sintéticos como el policarbonato y las resinas epoxi. Ambos se usan para la fabricación de envases de alimentos y bebidas como las botellas de agua, biberones y las latas de conserva. Los cambios de temperatura y pH de estos materiales provocan la hidrólisis de los polímeros, liberando bisfenol A que contamina el contenido de los recipientes. A partir de estudios *in vitro* e *in vivo*, se ha demostrado la actividad estrogénica de este compuesto; por ello, se analiza el impacto en la reproducción que puede llegar a tener como disruptor endocrino. Diversos experimentos con animales de laboratorio (roedores) demuestran que el bisfenol A altera y perjudica la fertilidad de machos y hembras durante el desarrollo fetal y la edad adulta.

Palabras claves: bisfenol A, policarbonato, resina epoxi, disruptor endocrino, fertilidad.

ABSTRACT

The aim of this systematic review is to analyze the negative effect of bisphenol A on reproduction, searching and selecting original studies published in PubMed databases and Web of Science. Bisphenol A is a chemical product which is used as monomer or additive in the production of synthetic polymers such as polycarbonate and epoxy resins. Both are used for the manufacture of food and beverage containers such as water bottles, baby bottles and cans. Changes in temperature and pH of these materials causes hydrolysis of polymers and bisphenol A migrates, contaminating the contents of the containers. In addition, *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated estrogenic activity of this compound; therefore, the impact that could have on reproduction as endocrine disruptor has been analyzed. Experiments with laboratory animals (rodents) show that bisphenol A induced alterations and damages on fertility. And either males or females get affected during fetal development and adulthood.

Keywords: bisphenol A, polycarbonate, epoxy resin, endocrine disruptor, fertility.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN = Ácido desoxirribonucleico

Akt= Proteína quinasa

ARNm = Ácido ribonucleico mensajero

BADGE = Bisfenol A diglicidil éter

BPA = Bisfenol A

CaBP-9K = Calbindin-9k gene

COMT = Catecol-o-metiltransferasa

CpG = Citosina fosfato guanina

CYP450 = Citocromo P450

DDT = Diclorodifeniltricloroetano

DEP = Dietil ftalato dietilo

DES = Dietilestilbestrol

Dnmts = ADN metiltransferasas

DSB = Roturas bicatenarias del ADN

ECC-1 = Línea celular de adenocarcinoma endometrial

EDC = Compuesto disruptor endocrino

EE = Etil-estradiol

EFSA = Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

Ej. = Ejemplo

EPA = Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos

ER = Receptor estrogénico

ER α = Receptor estrogénico alpha

ER β = Receptor estrogénico beta

ERE = Elementos de respuesta estrogénica

ERK = Quinasas reguladas por señales extracelulares

ESR 1= Gen codificante de ER α

ESR 2 = Gen codificante de ER β

FDA = Administración de alimentos y medicinas de Estados Unidos

FSH = Hormona folículo estimulante

GEN = Genisteína
GH = Hormona de crecimiento
GnRH = Hormona liberadora de gonadotropina
HHG = Eje hipotálamo-hipófisis-gonadal
HHO = Eje hipotálamo-hipófisis-ovario
HHT = Eje hipotálamo-hipófisis-testículo
HT = Proceso de calentamiento
ICI = Antagonista estrogénico
IGF = Factor de crecimiento de insulina
IGF-1R = Receptor del factor de crecimiento de insulina-1
IPI = Intervalos de los impulsos de GnRH
IRS = Sustrato del receptor de insulina
Kg = Kilogramo
Kiss1R = Receptor de kisspeptina
KNDy = Neuronas/kisspeptina/NKB/Dyn
L = Litro
LBD = Dominio de unión ligando
LH = Hormona luteinizante
M = Molar
MCF-7 = Línea celular de cáncer de mama
mER = Receptor estrogénico de membrana
mg = Miligramo
Min = Minuto
mL = Mililitro
MLH1 = Proteína asociada al entrecruzamiento meiótico
NCBI = Centro nacional de información biotecnológica
NHT = Ningún proceso de calor aplicado
NL = Ligando natural
NLM = Biblioteca nacional de la salud
NR = Receptor nuclear
OMS = Organización mundial de la salud

PBDE = Polibromodifeniléteres

PC = Policarbonato

PCB = Bifenilo policlorado

PCNA = Antígeno nuclear de proliferación celular

PET = Tereftalato de polietileno

PFOA = Perfluoro octanoato

PGC = Células germinales primordiales

ppb = Partes por billón

PR = Receptor de progesterona

PRL = Prolactina

RS = Revisión sistemática

RT-PCR = Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

SC = Complejo sináptico

SCF = Comité científico de alimentos

S-COMT = Isoforma soluble de COMT

SSC = Célula madre espermatogonia

StAR = Proteína reguladora androgénica

T = Temperatura

TBT = Tributilo

TCDD = 2, 3, 7, 8-tetraclorodibenzeno-p-dioxina

UE = Unión Europea

UV = Luz ultravioleta

WOS = Web Of Science

µg = Microgramo

µL = Microlitro

µM = Micromolar

°C = Grados centígrados

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 INFERTILIDAD.....	1
1.2 EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-GONADAL	2
1.2.1 Eje hipotálamo-hipófisis-ovario	4
1.2.2 Eje hipotálamo-hipófisis-testicular	6
1.3 ESTRÓGENOS	7
1.4 RECEPTORES DE ESTRÓGENOS.....	8
1.4.1 Receptores genómicos	9
1.4.2 Receptores no-genómicos.....	9
1.5 COMPUESTOS DISRUPTORES ENDOCRINOS	10
1.5.1 Mecanismo molecular.....	11
1.6 BISFENOL A	13
1.6.1 Acción estrogénica de bisfenol A.....	15
2. HIPÓTESIS.....	17
3. OBJETIVOS.....	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS	18
4.1 REVISIÓN SISTEMÁTICA	18
4.2 BASE DE DATOS	18
4.3 ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA.....	19
4.4 SELECCIÓN DE ESTUDIOS.....	20
4.4.1 Criterios de selección y exclusión	20
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
5.1 Concentraciones de bisfenol A a las que la población está expuesta	22
5.2 Identificación de la acción estrogénica del bisfenol A <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	29
5.3 Efectos del bisfenol A en la reproducción en modelos de experimentación animal (roedores).....	42
5.3.1 Efecto de BPA en la reproducción masculina.	42
5.3.2 Efecto del BPA en la reproducción femenina.....	51
6. CONCLUSIONES	65
7. REFERENCIAS	67

1. INTRODUCCIÓN

1.1 INFERTILIDAD

La infertilidad o la incapacidad para concebir es un problema de proporciones globales, millones de personas en todo el mundo sufren de infertilidad (Inhorn y Patrizio, 2015). Ha sido definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una enfermedad del sistema reproductivo que se caracteriza por la no consecución de un embarazo clínico tras 12 meses o más de relaciones sexuales habituales sin anticoncepción (WHO/UNEP, 2009).

La infertilidad se puede clasificar en primaria y secundaria. La primaria se define como la ausencia de un nacimiento vivo en parejas que llevan juntas más de cinco años, tiempo en el que ninguno de los dos ha usado anticonceptivos y la pareja expresa un deseo de descendencia. La infertilidad secundaria se define como la falta de un nacido vivo en parejas que llevan juntas más de cinco años desde el último nacimiento vivo de la pareja femenina, periodo en el que ninguno de los dos ha usado anticonceptivos y muestran un deseo de concebir otro hijo (Mascarenhas y cols., 2012).

Entre las parejas infértiles, se estima que la causa es predominantemente femenina en 38% y masculino en 20%, mientras que 27% de los casos muestran anomalías ambos y en el 15% restante no se identifica causa aparente de la infertilidad (Marques-Pinto y Carlvaho, 2013).

Podemos hablar de las causas anatómicas de la infertilidad femenina que incluyen anomalías tuboperitoneales, endometriosis, miomas que distorsionan la cavidad uterina, anomalías uterinas congénitas, y otras anomalías menos frecuentes del tracto reproductivo (Abrao y cols., 2013). Por otro lado, las causas hormonales de la infertilidad femenina implican no sólo trastornos del sistema reproductor (ej., trastornos del eje hipotálamo hipófisis gonadal), sino también las glándulas endocrinas no reproductivas (ej., la tiroides, las glándulas suprarrenales y el páncreas) y los órganos no endocrinos (ej., el hígado y los riñones) (Luciano y cols., 2013).

La etiología de la infertilidad masculina puede estar relacionada con diferentes factores congénitos o adquiridos que actúan a diferentes niveles: (a) nivel pre-testicular,

que a su vez incluye dos tipos de condiciones patológicas, hipogonadismo hipogonadotropo y trastornos coitales como la disfunción eréctil y la eyaculación retrógrada; (b) nivel post-testicular, que incluye obstrucción del tracto seminal, las infecciones, enfermedades inflamatorias de las glándulas accesorias y la infertilidad autoinmune; (c) nivel testicular, un gran número de patologías pueden conducir a insuficiencia testicular primaria entre ellos criptorquidia, orquitis, trauma testicular, torsiones, formas iatrogénicas, algunas enfermedades sistémicas y factores genéticos (Krausz, 2011).

En los últimos años se ha visto una incidencia creciente de enfermedades de la reproducción humana y la consiguiente disminución de descendencia en el mundo entero; las alteraciones genéticas no pueden ser la respuesta a este fenómeno dado el corto periodo en el que se ha registrado dicha disminución. Por lo tanto, las sustancias ambientales pueden ser responsables de las tendencias observadas (Woodruff y cols., 2008, Balabanic y cols., 2011, Marques-Pinto y Carlvaho, 2013).

Una de las conclusiones más significativas de la endocrinología durante el siglo pasado fue el reconocimiento de que algunos productos químicos son capaces de alterar el sistema endocrino de los organismos (Marques-Pinto y Carlvaho, 2013). Algunos de esos compuestos denominados disruptores endocrinos (EDCs), tales como bisfenol A (BPA), aditivo que se usa en la producción de plásticos, tienen propiedades estrogénicas, pueden impedir la acción adecuada del estradiol, un regulador clave de la función reproductiva (Klenke y cols., 2016).

En esta revisión sistemática se abordará el efecto que tiene el BPA en la reproducción basándose en los estudios realizados en animales de experimentación (roedores).

1.2 EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-GONADAL

Todas las funciones relacionadas con la reproducción están bajo el control de un mecanismo endocrino: el eje reproductivo o eje hipotalámico-hipofisario-gonadal (HHG) (Ilustración 1). Los órganos que integran el eje HHG son el hipotálamo y la glándula pituitaria (o hipófisis) en el cerebro y las gónadas, es decir, los ovarios y los testículos, en la periferia (Dagklis y cols., 2015).

No hay diferencias anatómicas o histológicas aparentes en el hipotálamo o la hipófisis entre ambos sexos; neuronas agrupadas forman núcleos que dan lugar a sistemas neurosecretores que producen, transportan y liberan péptidos (Dagklis y cols., 2015).

En ambos sexos, el hipotálamo está en la base del cerebro, y se considera el centro integrado del eje HHG, mediador de la estimulación neuronal, hormonal y ambiental en la reproducción. El eje HHG controla dos procedimientos principales en ambos sexos: (1) producción de gametos; (2) síntesis de hormonas en las gónadas. Estas dos funciones se interrelacionan ya que las hormonas son esenciales en la producción de espermatozoides y óvulos. Así mismo, la glándula pituitaria se encuentra por debajo del hipotálamo y se compone de la parte anterior (adenohipófisis) y posterior (neurohipófisis); la adenohipófisis forma parte del eje HHG (Dagklis y cols., 2015).

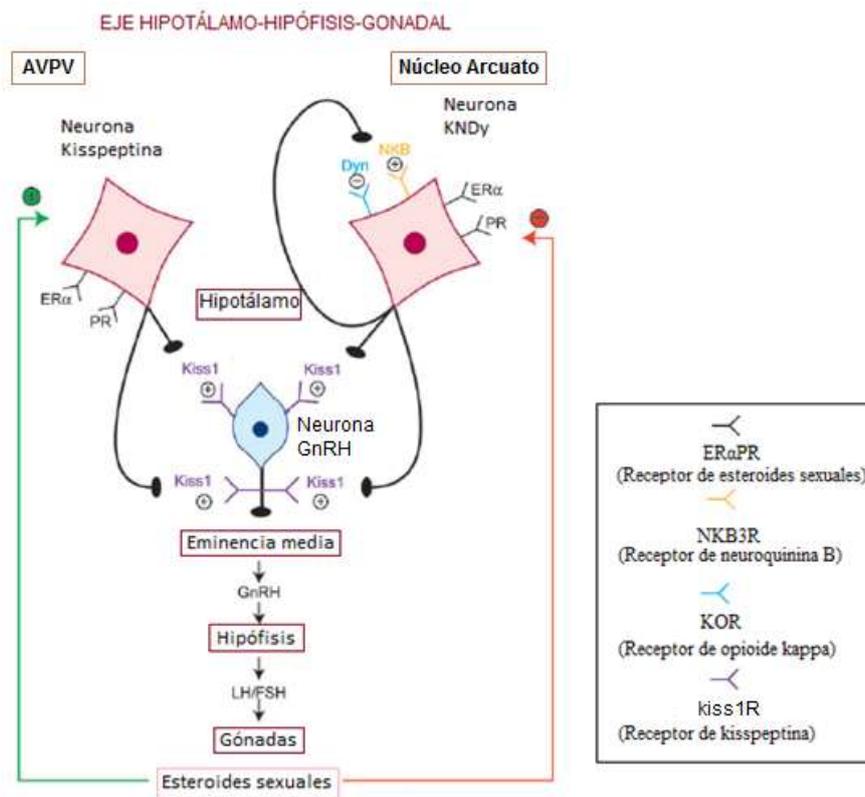


Ilustración 1: Diagrama esquemático del eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (HHG). Las neuronas kisspeptina y KNDy regulan la liberación de kisspeptina, dependiente del feedback positivo o negativo inducido por los esteroides sexuales liberados en las gónadas. A su vez, regulan la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) en las neuronas GnRH, poniendo en marcha el eje HHG. Ilustración modificada de Skorupskaitė y cols., 2014.

La hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), se produce en las neuronas GnRH ubicados en el núcleo arcuato en los roedores y área preóptica del hipotálamo. Se libera de forma pulsátil y es transportada a través del sistema porta hipofisario a la glándula pituitaria regulando la síntesis y la liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) (Dagklis y cols., 2015).

Los cambios en la frecuencia de pulso y la amplitud de la secreción de GnRH regulan la amplitud y frecuencia de FSH y LH. Estas hormonas son secretadas en el sistema sanguíneo y ejercen sus funciones en las gónadas, regulando la gametogénesis y la esteroidogénesis. El ovario y el testículo son ambos capaces de la producción de testosterona, estradiol y péptidos como la activina e inhibina (Dagklis y cols., 2015).

1.2.1 Eje hipotálamo-hipófisis-ovario

La actividad sexual de la mayor parte de las hembras de los mamíferos depende de la repetición de un ciclo reproductivo. Dicho ciclo se define como el conjunto de acontecimientos fisiológicos que se producen en el ovario a intervalos de tiempo cíclicos, debido a variaciones en los niveles hormonales (Ilustración 2), y que concluyen con la capacidad de reproducirse (Melmed y cols., 2011).

El ciclo reproductivo femenino está regulado por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (HHO), que está constituido por tres sistemas perfectamente integrados: hipotálamo, hipófisis o glándula pituitaria y ovario (Melmed y cols., 2011).

Las señales de inicio de un ciclo provienen del sistema nervioso central, cuya función endocrina la desempeñan el hipotálamo y la glándula pituitaria. Las neuronas GnRH hipotalámicas liberan de forma pulsátil GnRH en el sistema porta hipofisario, ésta se une al receptor específico en la adenohipófisis estimulando la secreción de FSH y LH (Beshay y Carr, 2013).

Las hormonas FSH y LH desencadenan el desarrollo de una serie de folículos dentro del ovario; éste comienza a secretar estradiol, que a su vez retroalimenta el eje mediante un feedback positivo, actuando sobre hipotálamo e hipófisis y dando lugar al pico-preovulatorio de LH. La LH desencadena la ovulación de los ovocitos maduros, la luteinización de las células de la teca y de la granulosa y la formación del cuerpo lúteo (Strauss y Barbieri, 2013). Posteriormente, las hormonas ováricas secretadas por el

cuerpo lúteo, estrógenos y progesterona, ejercen un efecto de retroalimentación negativo inhibiendo la secreción de GnRH a nivel hipotalámico y de FSH y LH a nivel hipofisario (Hall, 2010). Finalmente, si no hay gestación, el cuerpo lúteo degenera y las hormonas secretadas por el mismo disminuyen, dejando de ejercer esta acción inhibitoria y originando el inicio de un nuevo ciclo ovárico (Hall, 2010).

El ciclo del estro, característico de roedores, tiene una duración de 4-5 días. En él, se distinguen las fases de diestro, proestro, estro y metaestro (Muthukumar y cols., 2013). Las características principales de cada fase del ciclo se resumen en la Tabla 1.

ESTADÍOS	DURACIÓN	CARACTERÍSTICAS	TIPOS CELULARES EN EPITELIO VAGINAL
Diestro	6 horas	Folículo de varios tamaños. El cuerpo lúteo continúa creciendo.	Muy pocas células y sin una forma definida.
Proestro	60 horas	El folículo tiene un crecimiento rápido y el cuerpo lúteo se encuentra en fase de regeneración.	Células nucleadas, que en ocasiones aparecen formando ramificaciones.
Estro	20 horas	Las células germinales sufren su maduración. Copulación.	Células escamadas.
Metaestro	8 horas	Ovulación. Folículos muy pequeños.	Abundante presencia de leucocitos que invaden el epitelio vaginal, acompañados de células nucleadas y mucus.

Tabla 1: Tabla que resume las fases del ciclo del estro. Goldman y cols., 2007

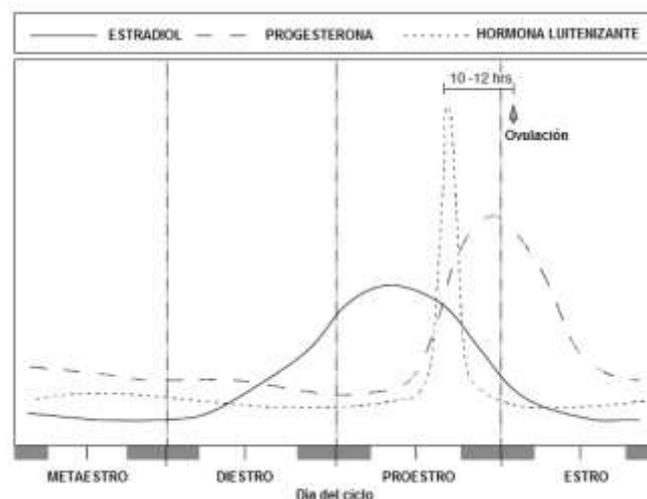


Ilustración 2: Diagrama de las fluctuaciones hormonales a lo largo del ciclo. Ilustración modificada de Goldman y cols., 2007.

1.2.2 Eje hipotálamo-hipófisis-testicular

La fisiología reproductiva masculina no se organiza en ciclos; la espermatogénesis está regulada por el eje hipotálamo-hipófisis-testículo (HHT). El hipotálamo libera a pulsos GnRH, señal para que la glándula pituitaria libere LH y FSH (Alves y cols., 2013).

La LH se une selectivamente a los receptores-LH de la superficie en las células de Leydig para promover la producción de testosterona. FSH actúa a través de los receptores de membrana de las células de Sertoli para estimular la producción de receptores de andrógenos intracelulares, la producción de inhibina y la señalización del calcio (Dagklis y cols., 2015).

La producción de inhibina por las células de Sertoli, así como la testosterona y estradiol por las células de Leydig, accionan la retroalimentación negativa que reduce la secreción de GnRH y LH (Ilustración 3) (Alves y cols., 2013).

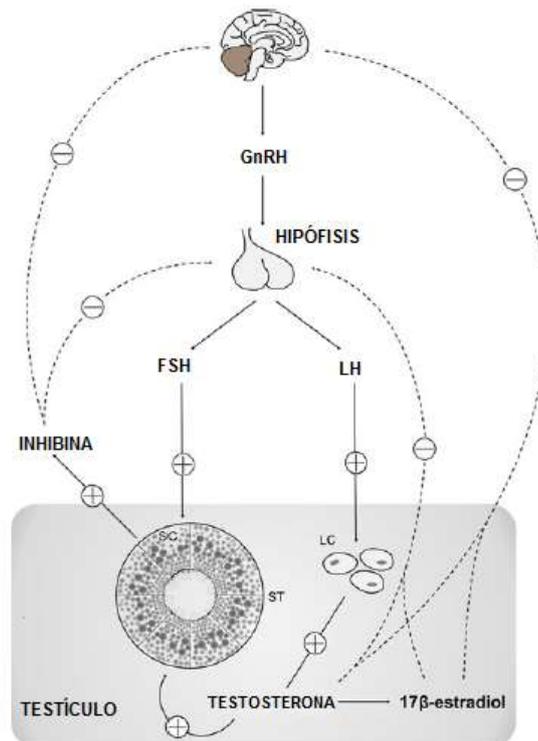


Ilustración 3: Esquema simplificado del eje hipotálamo-hipófisis-testicular. La inhibina producida en las células de Sertoli (ST) y la testosterona producida en las células de Leydig (LC) accionan la retroalimentación negativa (-). Ilustración modificada de Alves y cols., 2013.

Al igual que en el HHO, el estradiol tiene una implicación importante en la fisiología masculina. Un delicado equilibrio de andrógenos y estrógenos es fundamental para el desarrollo testicular normal y la fertilidad en animales y seres humanos. Este equilibrio puede ser interrumpido por la exposición a EDCs (Zhang y cols., 2016). Los estrógenos se producen en los testículos por la aromatización de la testosterona (Alves y cols., 2013); es metabolizada a través de la citocromo P450 (CYP450) aromatasasa (Jin y Yang, 2014).

Por último en cuanto al eje HHG, cabe destacar que, las neuronas de GnRH no expresan receptores de estradiol o testosterona en ninguno de los sexos. Por lo tanto, las acciones de retroalimentación de los esteroides sexuales son mediados por los sistemas neurosecretorios vecinos (Dagklis y cols., 2015). Las neuronas kisspeptina y KNDy (neuronas kisspeptin/NKB/Dyn), forman sinapsis con las neuronas GnRH (Tng, 2015). Regulan la liberación de kisspeptina, que a su vez regula la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas en las neuronas GnRH mediante los receptores kiss1R (Skorupskaite y cols., 2014) (Ilustración 1).

1.3 ESTRÓGENOS

Los estrógenos son reguladores esenciales de la fertilidad tanto en hombres como en mujeres, entre otras funciones, regulan la vascularización del endometrio y tiene un papel importante en el desarrollo y funcionamiento de la glándula prostática (Saunders, 2015). Los estrógenos naturales endógenos son esteroides C18 e incluyen estrona, estradiol y estriol. Tienen 4 anillos A, B, C, D, un grupo hidroxilo en C3, y, bien un grupo hidroxilo o un grupo cetona en C17 (Ilustración 4) (Smiley y Khalil, 2009).

Las hormonas esteroides son esenciales para el metabolismo de los hidratos de carbono, la gestión del estrés y la reproducción, y se sintetizan a partir del colesterol en las mitocondrias de las glándulas suprarrenales y gónadas. En estrés agudo o estimulación hormonal, la proteína reguladora androgénica (StAR) transporta el sustrato colesterol a las mitocondrias para la esteroidogénesis (Prasad y cols., 2015).

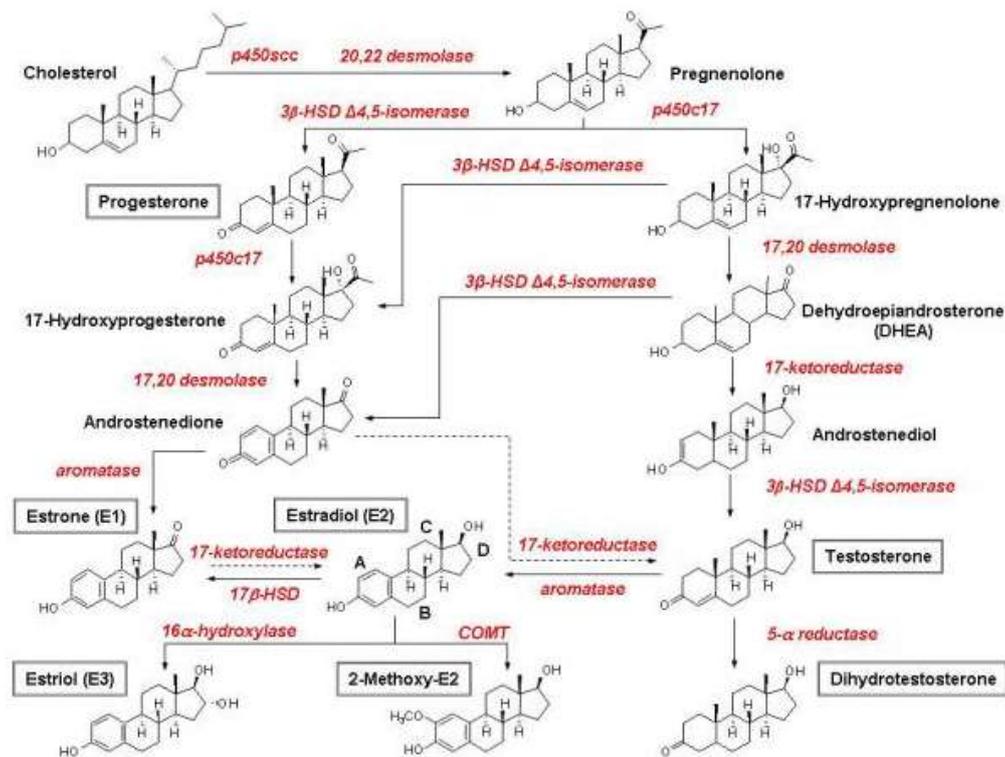


Ilustración 4: Síntesis de estrógenos a partir de colesterol. Ilustración modificada de Smiley y Khalil, 2009.

El colesterol es metabolizado por la enzima CYP11A1 de la cadena lateral del CYP450 (Issop y cols., 2013). CYP11A1 es una monooxigenasa mitocondrial que realiza la conversión de colesterol a pregnenolona, precursor de todas las hormonas esteroides (Pikuleva y Waterman, 2013) resumido esquemáticamente en la Ilustración 4.

1.4 RECEPTORES DE ESTRÓGENOS

El estradiol puede modular la actividad y el comportamiento neuronal a través de mecanismos genómicos y no genómicos. En general, los llamados mecanismos genómicos, mediados por receptores nucleares (NR), se consideran de latencia más larga y de inducir cambios a largo plazo en la función celular. Tras la unión ligando receptor, la expresión de la proteína biológicamente activa, normalmente, se produce varias horas más tarde. Sin embargo, el estradiol podría alterar la actividad neuronal en cuestión de segundos, que por lo general se considera una respuesta demasiado rápida para ser explicada por un mecanismo genómico. En 1983 Towle y Sze demostraron que

el estradiol podría tener acción no-genómica, es decir, que puede unirse a receptores sinápticos de membrana (Laredo y cols., 2014). Las vías de actuación estrogénicas se recogen en la Ilustración 5.

1.4.1 Receptores genómicos

Los receptores de estrógenos (ER) son miembros de la familia de receptores de hormonas esteroideas, que taxonómicamente están dentro de la superfamilia de NRs. Los ERs se dividen en dos subtipos, ER α y ER β , que poseen diferentes identidades; están codificados por diferentes genes, *ESR1* y *ESR2* respectivamente (Ng y cols., 2014).

Los principales ligandos de los ERs son el 17 β -estradiol, estrona y estriol (Ng y cols., 2014). Cuando el ligando se une a los receptores estrogénicos nucleares ER α o β , el complejo que se forma se dimeriza y se une a los elementos de respuesta estrogénica (EREs) que promueven la expresión de genes cascada abajo (Laredo y cols., 2014). Aparte de estos ligandos endógenos, los ERs, pueden unirse a una amplia variedad de sustancias exógenas. Por ello, se les considera receptores promiscuos. Las moléculas capaces de unirse abarcan desde subproductos industriales, plastificantes, plásticos, fitoestrógenos de origen natural, productos farmacéuticos y pesticidas. A pesar de la diversidad estructural de estos compuestos, estas moléculas parecen poseer al menos una estructura de anillo aromático, que se cree que es crucial para que se de la unión. Hoy en día, se hace referencia a estos compuestos como disruptores endocrinos y han sido implicados en numerosos efectos adversos para la salud (Ng y cols., 2014).

1.4.2 Receptores no-genómicos

ER α y ER β ambos se encuentran en las membranas de células (mER α y mER β), así como en los núcleos y en el citoplasma. Además de mER α y mER β , se han identificado varios receptores nuevos en las membranas de las células que tienen la capacidad de mediar una rápida señalización estrogénica: GPR30 y Gq-mER (Almey y cols., 2015). Activando la ruta de señalización MAPK-ERK y el factor de transcripción CREB (Laredo y col., 2014).

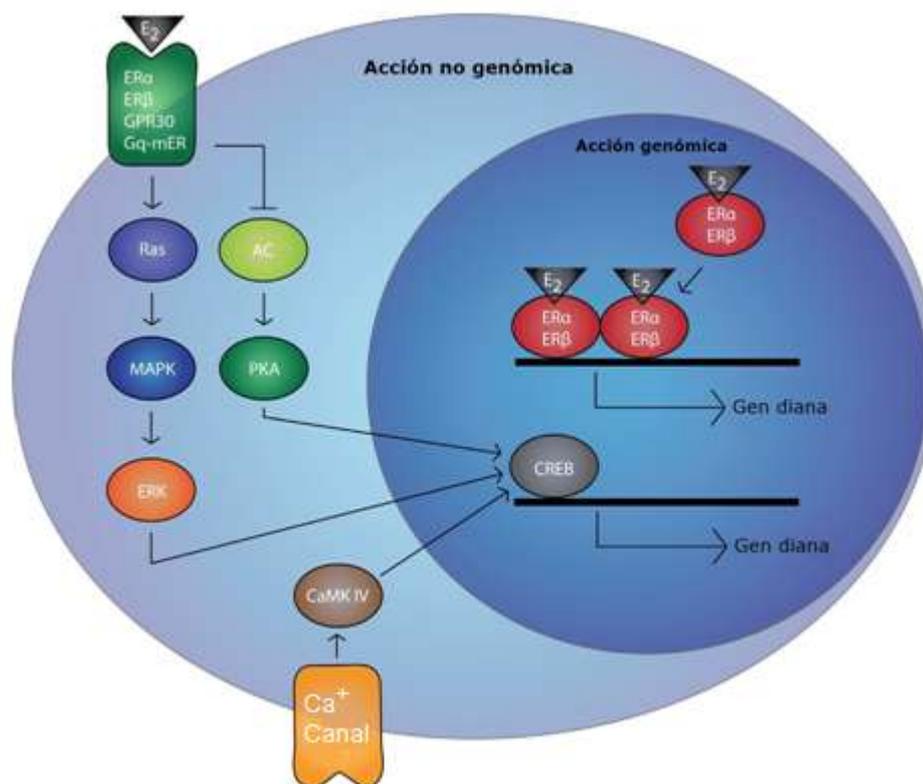


Ilustración 5: Los estrógenos pueden actuar a través de cascadas genómicas y no genómicas. Ilustración modificada de Laredo y cols., 2014.

1.5 COMPUESTOS DISRUPTORES ENDOCRINOS

El nombre de compuestos disruptores endocrinos (EDCs) fue acuñado por primera vez en el centro de conferencias Wisconsin en 1991 (Li y cols., 2015). Desde entonces existe una evidencia convincente de que hay una variedad de compuestos contaminantes, algunos de los cuales pueden perturbar el desarrollo endocrino de especies silvestres y animales de laboratorio; se encuentran en el agua de la lluvia, de pozos, lagos y océanos, así como en agua dulce, de mar y en productos alimenticios (Colbron y cols., 1993).

Vivimos en un mundo en el que los productos químicos artificiales son parte de la vida cotidiana. Algunos de estos contaminantes químicos, pueden afectar al sistema endocrino y por lo tanto, pueden interferir en los procesos controlados hormonalmente de los seres humanos y los animales salvajes (WHO/UNEP, 2012). Hoy en día, EDC se refiere a aquellas sustancias exógenas que pueden interferir en el sistema endocrino y da

lugar a un desarrollo anormal reproductivo, inmunológico, neurológico o enfermedad metabólica en humanos y animales (Li y cols., 2015).

Cientos de productos químicos se han definido como EDCs, pero la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) estima que falta por analizar el potencial endocrino de aproximadamente 87.000 productos de uso diario, por lo tanto a medida que avancen las investigaciones se irá ampliando la lista de los EDCs. Para ello, los resultados de los estudios deben ponerse en común en una sola base de datos unificada para la accesibilidad pública, compartiendo información, evitando las investigaciones redundantes y desperdicio de recursos (Fuhrman y cols., 2015).

1.5.1 Mecanismo molecular

La investigación científica básica muestra que los mecanismos de acción de los EDCs son más amplios de los que se pensaban inicialmente, actúan a través de NRs, receptores de hormonas esteroides no nucleares (ej. receptores estrogénicos de membrana), receptores no esteroideos (ej. receptores neurotransmisores), receptores huérfanos (ej. el receptor de aril hidrocarburo), vías enzimáticas implicadas en la biosíntesis y/o metabolismo de los esteroides, y numerosos otros mecanismo que convergen en el sistema endocrino y reproductor (Diamanti-Kandarakis y cols., 2009).

A través de estas interacciones actúan como agonista o antagonista, bloqueando la unión las hormonas naturales a sus correspondientes receptores o en algunos casos imitando la acción de la hormona endógena, aumentan la cantidad de percibida por el cuerpo alterando de ambas formas la respuesta de transcripción de genes (Ilustración 6) (Rogers y cols., 2013).

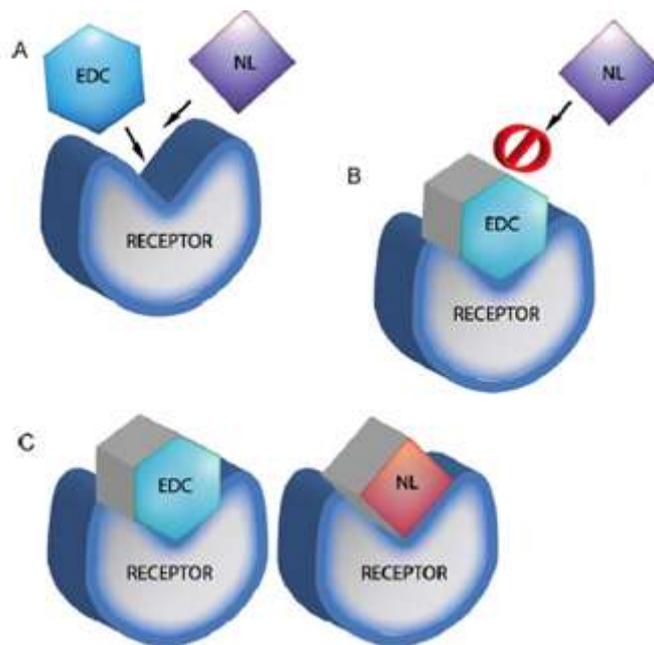


Ilustración 6: Representación gráfica de las interacciones de los EDCs con los receptores de ligandos naturales (NL). (A) Los EDCs pueden competir con los NLs por la unión al receptor. (B) La unión de los EDCs puede bloquear la unión de los NLs alterando la cascada de señales del receptor. (C) La unión de los EDCs puede darse al mismo tiempo que la unión con NLs lo que provocaría un efecto agonista o antagonista en la cascada de señales del receptor. Ilustración modificada de Rogers y cols., 2013.

Los EDCs pueden tener diversas formas de actuar con múltiples componentes que se manifiestan de forma única dentro de cada especie, es decir, el efecto de un EDC varía entre especies, lo que hace que sea difícil extrapolar la información de una especie a otra o incluso entre niveles de organización dentro de un mismo organismo (ej. célula, órgano). Los EDCs pueden afectar en muchos lugares diferentes del sistema endocrino y las perturbaciones pueden influir en una red entera de procesos responsables de la reproducción, como el desarrollo, la conducta y el mantenimiento de la homeostasis del individuo (Fuhrman y cols., 2015).

El grupo de moléculas identificadas como disruptores endocrinos es muy heterogéneo e incluye productos de síntesis química recogidos en la Tabla 2, y productos químicos naturales que se encuentran en la alimentación de humanos y animales (ej. los fitoestrógenos) que también pueden actuar como disruptores endocrinos (Diamanti-Kandarakis y cols., 2009).

EDCs	Tipo o fuente
Organoclorados (ej. DDT)	Pesticidas y plastificantes
Dioxinas (ej. PCB, TCDD)	Contaminantes ambientales en alimentos
Organotinas (ej. TBT)	Contaminantes ambientales en alimentos
PFCs (ej. PFOA)	Plastificantes
BFRs (ej. PBDE)	Retardantes de llamas
Alkilfenoles (ej. Octilfenol)	Surfactantes
BPA	Plásticos
Ftalatos (ej. DEP)	Plastificantes

Tabla 2: EDCs de síntesis química. Abreviaturas: BPA, bisfenol A; DDT, diclorodifeniltricloroetano; DEP, dietil ftalato dietil; PBDE, polibromodifeniléteres; PCB, bifenol policlorado; PFOA, perfluorooctanoato; TBT, tributilo; TCDD, 2, 3, 7, 8-tetraclorodibenzeno-p-dioxina. Tabla modificada de Casals-Casas y Desvergne, 2011.

Los EDC se encuentran en prácticamente todas las regiones del mundo pero, después de más de cinco décadas de debate y de investigación, la controversia aún rodea los riesgos que los plásticos pueden causar en los seres humanos, en particular con respecto a las propiedades de alteración endocrina (Casals-Casa y Desvergne , 2011).

1.6 BISFENOL A

Dentro de los aditivos que se utilizan en la industria del plástico cabe destacar el bisfenol A (BPA) (Galloway 2015), clasificado como un EDC en la Tabla 2 (Casals-Casa y Desvergne, 2011).

El BPA fue sintetizado por primera vez en 1891 por A.P. Dianin y fue investigado por su posible uso comercial en la década de 1930 durante la búsqueda de estrógenos sintéticos. Aunque se confirmó la actividad estrogénica, las pruebas de un compuesto sintético estructuralmente relacionado (Ilustración 7), dietilestilbestrol (DES), indicaron que DES era un estrógeno mucho más potente que el BPA como en un ensayo de

estrogenidad clásica de confirmación vaginal. Por tanto, el uso de BPA como estrógeno sintético fue abandonado en favor de DES. Se administró a mujeres embarazadas a partir de 1940 hasta 1971 para evitar varios problemas relacionados con el embarazo, incluyendo los nacimientos prematuros y abortos espontáneos. Este tratamiento se interrumpió cuando se descubrió que las hijas de las mujeres expuestas a este tratamiento desarrollaban cáncer vaginal y de cuello uterino (Rubin, 2011).

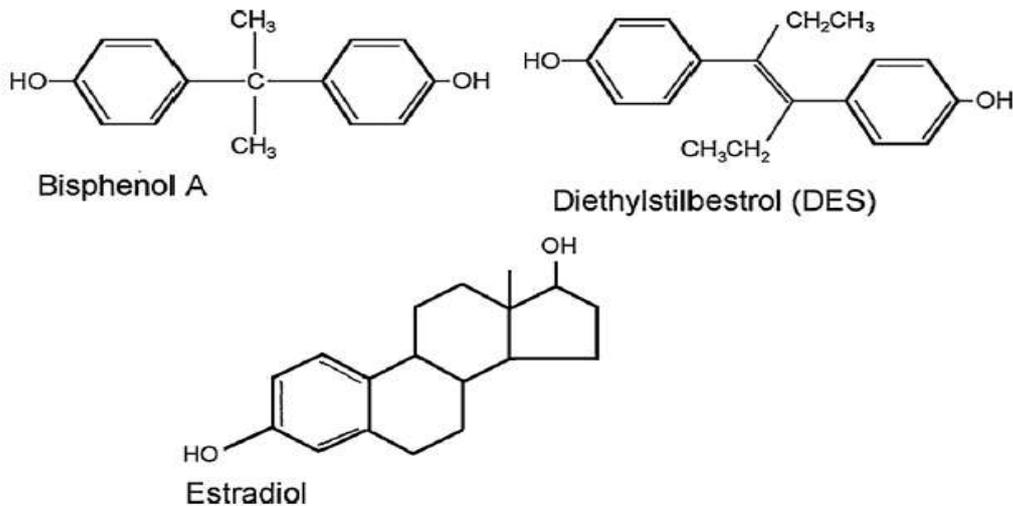


Ilustración 7: Estructura química del Bisfenol A, Diestilbestrol y el Estradiol. Ilustración modificada de Rubin, 2011.

En la década 1940 y 50, se identificó un uso del BPA en la industria del plástico (Rubin 2011). En las industrias químicas se utiliza BPA como un monómero en la fabricación de polímeros (ej. policarbonato y resinas epoxi), como antioxidante e inhibidor de la polimerización de cloruro de polivinilo, y como precursor de la síntesis de retardante de llama. A su vez, actualmente estos materiales se utilizan como componentes de muchos productos de consumo, incluyendo botellas reutilizables de plástico, envases de alimentación, recubrimiento de interior de las latas de conservantes y bebidas, papel térmico, dispositivos médicos, materiales dentales, etc. (Acconcia, 2015).

Desafortunadamente, al igual que otras sustancias químicas, la liberación de BPA depende de la temperatura y pH. Se han registrado cantidades alarmantes en los alimentos empaquetados con este producto, debido a los cambios de temperatura y pH que sufren estos empaquetados. En consecuencia, se estima que los alimentos contribuyen

en más de un 90% de la exposición total de BPA, mientras que a través de la ingesta de polvo, en una cirugía dental por ejemplo, la absorción permanece por debajo de un 5%. No obstante, la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos (FDA) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) han determinado que la exposición humana al BPA está por debajo de los niveles seguros de exposición (de 50 a 4 µg/Kg/día) (Acconcia y cols., 2015).

En la actualidad, muchas líneas de evidencia revelan que el BPA podría interactuar con muchos receptores de hormonas nucleares tales como los receptores de estrógenos (Ie Maire y cols., 2010, Desfosse y cols., 2012, Li y cols., 2010, Gaido y cols., 1997, Gould y cols., 1998, Okada y cols., 2008), receptor pregnano X o receptor de esteroides y xenobióticos (Sui y cols., 2012), receptor de andrógenos (Takayanagi y cols., 2006, Sohoni y Sumpter, 1998), receptor de la proliferación de peroxisomas activado (Riu y cols., 2011) y el receptor de la hormona tiroidea (Moriyama y cols., 2011, Zoeller y cols., 2005) (Li y cols., 2015).

1.6.1 Acción estrogénica de bisfenol A

La molécula de BPA tiene características estructurales que le confieren la capacidad de unirse a los dos ER, ER α y ER β . Aun así, el BPA muestra 1000-2000 veces menos afinidad a los ERs que el 17 β -estradiol, el estrógeno más activo. Estos NRs, son factores de transcripción activados por la unión del ligando, cambian de conformación y migran al núcleo donde mediante la unión a coactivadores y correpresores activan la cascada de señales del receptor. Sin embargo, el cambio en la conformación de ER difiere en función del ligando, lo que hace ER más o menos propenso a la coactivadores o correpresores. Los ligando exógenos producen un desplazamiento de unas hélices que conforman el dominio de unión a ligando (LBD) debido a que la estructura química difiere de la del ligando natural, lo que no permite un alojamiento adecuado en los confines del sitio de unión a hormonas, al contrario de lo que sucede cuando se une el estradiol a ER (Acconcia y cols., 2015).

El BPA actúa como agonista en la unión con el ER α , imitando la unión del estradiol y provocando el mismo cambio conformacional en LBD; sin embargo, cuando se une a ER β no se da el cambio conformacional correcto del LBD, es decir, en este

caso el BPA actúa como antagonista. Un desplazamiento del LBD adecuado es necesario para una conformación competente de la transcripción, por lo tanto el BPA, así como otros compuestos similares a los estrógenos, conducen al reclutamiento de coactivadores o correpresores en función de su acción agonista o antagonista (Acconcia y cols., 2015).

2. HIPÓTESIS

El bisfenol A es un compuesto orgánico utilizado en las industrias químicas que actúa como disruptor endocrino debido a su acción estrogénica, teniendo repercusión negativa en la reproducción.

3. OBJETIVOS

Con el fin de probar la hipótesis propuesta, se establecen los siguientes objetivos:

- Mostrar las fuentes de exposición y las concentraciones de bisfenol A a las que la población está expuesta.
- Identificar la acción estrogénica del bisfenol A *in vivo* e *in vitro*.
- Analizar el efecto que el bisfenol A tiene en la reproducción, caracterizando el impacto del compuesto sobre la fertilidad femenina y masculina en modelos de experimentación animal (roedores).

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 REVISIÓN SISTEMÁTICA

Las revisiones sistemáticas (RS) son investigaciones científicas en las que la unidad de análisis son los estudios originales primarios, a partir de los cuales se pretende contestar a una pregunta de investigación claramente formulada mediante un proceso sistemático y explícito. Por eso se las considera investigación secundaria («investigación sobre lo investigado»). Por el contrario, a las revisiones que no siguen un proceso sistemático, denominadas revisiones narrativas, no se las puede considerar un proceso formal de investigación, sino simplemente un formato de literatura científica basada sobre todo en opinión (Ferreira y cols., 2011).

Desde un punto de vista formal, las RS sintetizan los resultados de investigaciones primarias mediante estrategias que limitan el sesgo y el error aleatorio. Estas estrategias incluyen: (1) la búsqueda sistemática y exhaustiva de todos los artículos potencialmente relevantes; (2) la selección, mediante criterios explícitos y reproducibles, de los artículos que serán incluidos finalmente en la revisión; (3) la descripción del diseño y la ejecución de los estudios originales, la síntesis de los datos obtenidos y la interpretación de los resultados (Ferreira y cols., 2011)

Si en una revisión sistemática se obtiene un índice cuantitativo de la magnitud del efecto que cada estudio está investigando y se aplican técnicas de análisis estadístico para integrar dichos efectos, entonces la revisión sistemática se denomina meta-análisis (Sánchez-Meca, 2010).

En este trabajo se realizará una revisión sistemática cualitativa, donde a partir de estudios originales publicados en la base de datos PubMed y Web Of Science (WOS), se tratará de esclarecer si el BPA tiene repercusión negativa en la reproducción.

4.2 BASE DE DATOS

PubMed es una base de datos gratuita desarrollada y mantenida por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) de la Biblioteca Nacional de la Salud (NLM), disponible desde 1996. Proporciona libre acceso a MEDLINE, la base de datos

de citas y resúmenes en los campos de la medicina, enfermería, odontología, medicina veterinaria, los sistemas de atención de salud, y ciencias preclínicas de la NLM. PubMed es fácil de usar, basta con introducir temas de búsqueda - uno o más términos - y pulsar Buscar. Una característica única es la capacidad de encontrar al instante artículos relacionados para cualquier citación (ej. bisphenol a effects).

WOS es un servicio en línea de información científica, suministrado por Thomson Reuters, integrado en ISI Web of Knowledge. Facilita el acceso a un conjunto de bases de datos en las que aparecen citas de artículos de revistas científicas, libros y otros tipos de material impreso que abarca campos del conocimiento académico. Permite conectarse al texto completo de publicaciones primarias y acceder a ellos mediante un sistema de búsqueda basado en palabras claves (ej. bisphenol and reproduction).

4.3 ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA

Se realizará una búsqueda selectiva de artículos a partir de los objetivos fijados:

- Primer objetivo “mostrar las fuentes de exposición y las concentraciones de bisfenol A a las que la población está expuesta”, la búsqueda inicial en las bases de datos será: “environment bisphenol a concentration”.
- Segundo objetivo, “identificación de la acción estrogénica del bisfenol A *in vivo* e *in vitro*”, la búsqueda inicial en las bases de datos será: “*in vivo* estrogenicity bisphenol A” e “*in vitro* estrogenicity bisphenol A”.
- Tercer objetivo, “analizar el efecto que el bisfenol A tiene en la reproducción, caracterizando el impacto del compuesto sobre la fertilidad femenina y masculina en modelos de experimentación animal (roedores) la búsqueda inicial en las bases de datos será: “effect of bisphenol a on reproduction”.

4.4 SELECCIÓN DE ESTUDIOS

4.4.1 Criterios de selección y exclusión

En la siguiente Tabla 3 se exponen los criterios de selección y exclusión.

OBJETIVOS	CRITERIOS DE SELECCIÓN	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN
“Mostrar las fuentes de exposición y las concentraciones de bisfenol A a las que la población está expuesta.”	<ul style="list-style-type: none"> - Estudios que analizan fuentes de BPA <i>in vivo</i>, es decir, exposición de BPA en la población. Como por ejemplo la exposición de BPA de una botella de agua potable. 	<ul style="list-style-type: none"> - Estudios referidos a organismos marinos y plantas. - Estudios de disruptores endocrinos no referidos a BPA - Estudios <i>in vitro</i>, es decir, estudios que analizan el efecto del BPA en el laboratorio.
“Identificación de la acción estrogénica del bisfenol A <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .”	<ul style="list-style-type: none"> - Estudios que analizan la estrogénicidad del BPA tanto <i>in vitro</i> como <i>in vivo</i>, es decir, artículos que presenten un método reproducible y eficaz para demostrar la actividad estrogénica. - Estudios <i>in vitro</i> realizados en líneas células humanas con receptores de estrógeno. - Estudios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> en ratas y ratones. 	<ul style="list-style-type: none"> - Estudios referidos a organismos marinos y plantas. - Estudios referidos a la estrogénicidad en el agua o depósitos residuales. - Estudios de disruptores endocrinos no referidos a BPA. - Estudios referidos a materiales de ortodoncia. - Estudios referidos a metabolitos de BPA. - Estudios referidos a subproductos BPA de oxidación. - Estudios referidos la actividad estrogénica de los productos alimenticios. - Estudios que tengan BPA como compuesto estrogénico control.
“Analizar el efecto que el bisfenol A tiene en la reproducción, caracterizando el impacto del compuesto sobre la fertilidad de machos y hembras, en animales de experimentación (roedores).”	<ul style="list-style-type: none"> - Estudios que analizan el efecto de la exposición a BPA en animales de experimentación, centrándonos en los roedores. Analizando por separado el efecto en machos y en hembras. - Estudios <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> - Estudios referidos a organismos acuáticos, insectos, polluelos y ovejas. - Estudios referidos a compuestos que no sean BPA. - Estudios referidos a exposición a BPA y la obesidad / el desarrollo neuronal / la función pulmonar / la sensibilidad alérgica / daño hepático / la disrupción metabólica / alteraciones en la tiroides.

Tabla 3: Recoge los criterios de selección y exclusión de artículos hallados en la búsqueda.

Además, se excluyeron opiniones, editoriales, revisiones, informes de casos, cartas a los editores, publicaciones duplicadas y estudios publicados sólo como resúmenes.

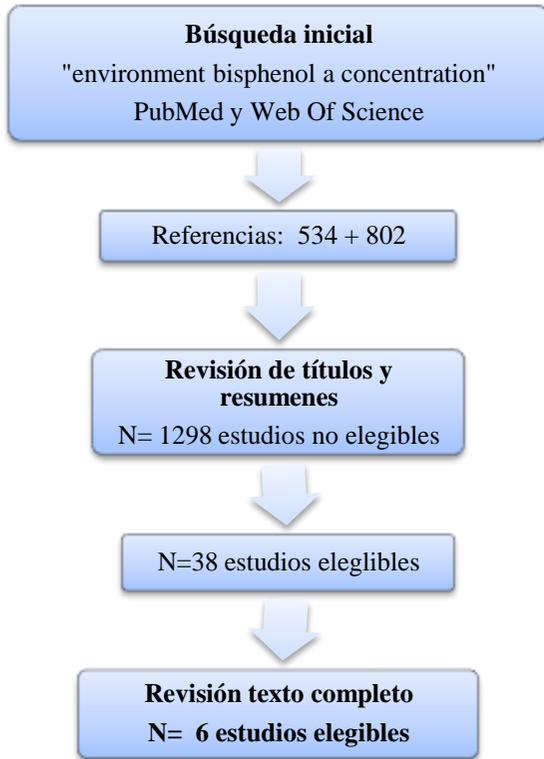


Diagrama 1: Resultado de la búsqueda para el primer objetivo.

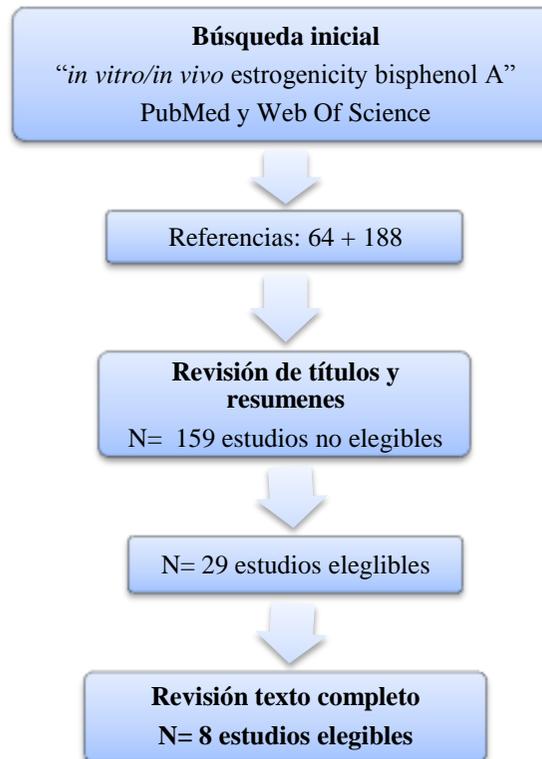


Diagrama 2: Resultado de la búsqueda para el segundo objetivo.

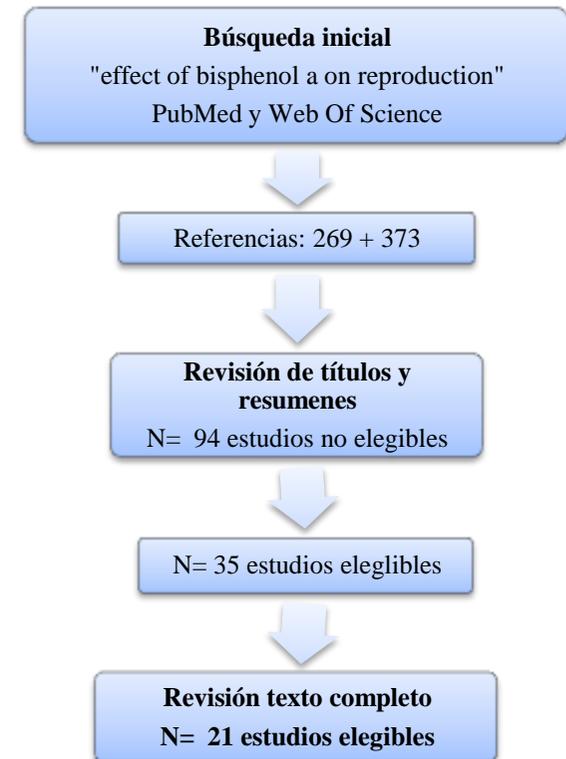


Diagrama 3: Resultado de la búsqueda para el tercer objetivo.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Concentraciones de bisfenol A a las que la población está expuesta

El primer objetivo definido en este trabajo es mostrar las fuentes de exposición y las concentraciones de bisfenol A a las que la población está expuesta. Con el fin de recopilar artículos a lo referido, se ha realizado una búsqueda en la base de datos PubMed y WOS dirigido a “environment bisphenol a concentration” (Diagrama 1). Se consiguieron 534 y 802 ítems, respectivamente y la selección se realizó como se explica en el apartado 4.4.1. Los artículos elegibles (N=6) se recogen en la Tabla 5.

En los últimos años, han surgido nuevas preocupaciones sobre el impacto que tienen en la salud humana los productos químicos denominados disruptores endocrinos. Uno de esos compuestos es el BPA, utilizado en la producción de policarbonato (PC) de plásticos y resinas epoxi. PC se usa en numerosos productos de consumo diario como las botellas o los biberones, al igual que las resinas epoxi, que se utilizan como revestimiento del interior de latas de alimentos o bebidas (Kubwabo y cols., 2009).

Como se mencionó anteriormente en la introducción de este trabajo, al igual que otras sustancias químicas, la liberación de BPA depende de la temperatura y pH. Se han registrado cantidades alarmantes en los alimentos envasados con este producto, debido a las condiciones adversas en las que se almacenan estos empaquetados. En consecuencia, se estima que los alimentos contribuyen en más de un 90% de la exposición total de BPA, mientras que a través de la ingesta de polvo, en una cirugía dental por ejemplo, la absorción permanece por debajo de un 5%. No obstante, la FDA y EFSA han determinado que la exposición humana al BPA está por debajo de los niveles seguros de exposición (de 50 a 4 µg/Kg/día) (Acconcia y cols., 2015).

El uso de aditivos como el BPA en la producción de biberones y botellas de PC y el hecho de que estén destinados a ser utilizados en repetidas ocasiones, junto con los posibles efectos adversos del BPA a dosis bajas, especialmente en relación con los niños, ha generado la necesidad de una investigación exhaustiva de la migración de BPA de este tipo de material en contacto con alimentos (Maragou y cols., 2008).

Se han realizado varios estudios sobre la migración de BPA a partir de botellas, simulando el uso cotidiano que se les da.

Maragou y cols., (2008) evalúan la migración del BPA de 31 nuevos biberones PC bajo condiciones que simulan un uso real, incluyendo repetidas operaciones de limpieza de las botellas en el lavavajillas o con un cepillo. Las botellas se rellenaron con agua para simular la migración similar en alimentos acuosos y ácidos, y una solución de 3% ácido acético para reproducir los alimentos grasos como los preparados para lactantes.

En este estudio las botellas fueron esterilizadas (agua hirviendo 10 min) antes de llenarlas e incubarlas a 70°C durante 2 horas. Tras realizar el procedimiento experimental no detectaron concentración de BPA alguna. Sin embargo, registraron migración medible de BPA (2,4-14,3 µg/kg) cuando se vierte agua hirviendo durante dos horas, indicando que la temperatura y el tiempo son factores críticos que favorecen la liberación.

Un año más tarde, Kubwabo y cols., (2009) publicaron un estudio similar al de Maragou y cols., (2008). En él, se utilizó agua para simular la migración a los alimentos acuosos y ácidos, y una solución de etanol/agua 50% para los alimentos grasos. Las botellas se incubaron durante 8, 24 o 240 horas (10 días) a 40°C para simular el uso a temperatura cotidiana. Se incluyeron los datos recogidos al de 10 días para estimar la migración de BPA tras el uso repetitivo y plantear el peor de los escenarios. El nivel de BPA residual varió de 0,11 µg/L en agua incubado durante 8 horas a 1,8 µg/L tras 240 horas.

Además, se observa una significativa subida del nivel de migración de BPA en las botellas PC debido a un aumento en la temperatura a la que se incuban durante 24 horas: 0,12 µg/L a 40°C frente a 1,77 µg/L a 60°C.

Así mismo, Nam y cols., (2010) registraron que el nivel de migración de BPA incrementa hasta 1,1 ppb (1,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) después de reutilizar el biberón 10 veces y a continuación, la exposición se mantiene hasta las 60 repeticiones. Después a medida que aumenta el uso el nivel de BPA sube rápidamente hasta alcanzar 3,08 ppb (3,08 $\mu\text{g}/\text{kg}$) en la repetición número 100. Además, el nivel de BPA que migra incrementó rápidamente cuando se incubó el biberón a temperaturas superiores a 80°C. El efecto se observa claramente en los siguientes gráficos publicados en este mismo estudio, Ilustración 8.

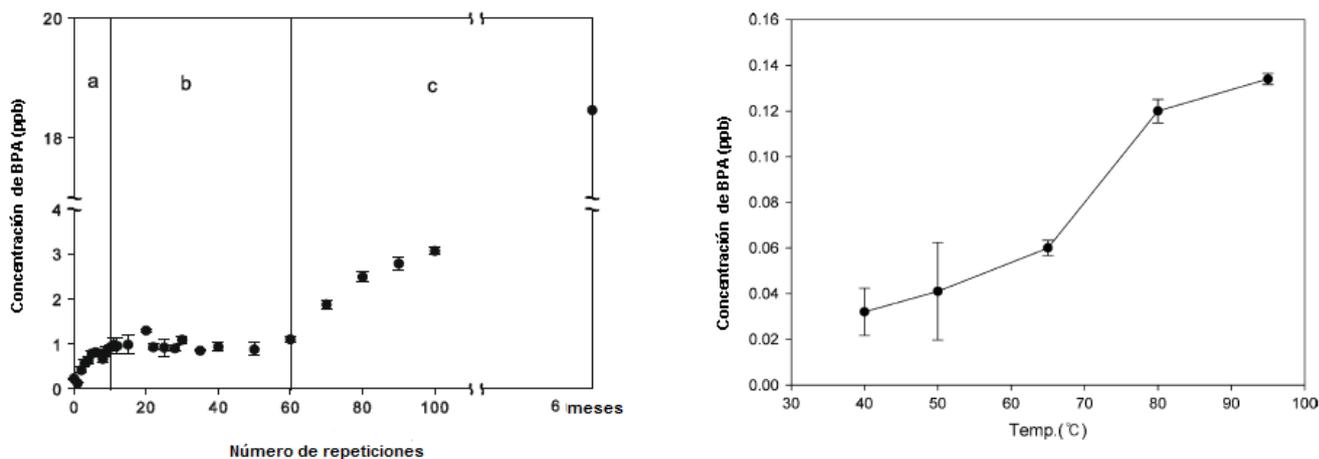


Ilustración 8: (Gráfico izquierda) Variación del nivel de BPA que migra con el uso repetido del biberón de PC. (Gráfico derecha) Efecto de la temperatura en el nivel de BPA que migra en un biberón de PC. Ilustración modificada de Nam y cols., 2010.

Teniendo en cuenta el nivel de migración de los biberones según los estudios (Maragou y cols., 2008; Kubwabo y cols., 2009, Nam y cols., 2010) y que un bebé de 0-4 meses de edad pesa 4,5 kg y consume 0,7 L cada día, de acuerdo el dictamen del Comité Científico de Alimentos (SCF, 2002), la ingesta estimada es de 0,4-2,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporal por día. De la misma manera, la ingesta estimada para un niño de 6-12 meses de edad, con un peso de 8,8 kg y el consumo de 0,7 L el rango es entre 0,2 y 1,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporal por día. Por lo tanto podríamos decir que, la exposición de BPA de biberones PC es ligeramente inferior a las estimaciones de la dieta. EFSA propone que la exposición dietética total a BPA para un bebe de tres meses, alimentados con una botella de PC, es de 11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal por día.

Hasta 2011 se utilizaron PC plástico en la fabricación de botellas de alimentación infantil. Sin embargo, fue retirada en la Unión Europea (UE) tras la introducción de la

Directiva 2011/8/UE de 28 de enero de 2011, que restringe el uso de BPA en estos artículos (EFSA, 2015).

Hoy en día, el consumo de agua embotellada es creciente por ello, es importante realizar estudios como el de Rowell y cols., (2016) que analiza la contaminación que esos envases suponen. Obtuvieron muestras de agua embotellada ($n = 122$) de los mercados locales de Doha, Qatar. Las muestras compuestas de 53 marcas exclusivas y siempre que fuese posible la misma marca fue adquirida en diferentes tipos de botellas (PET, vidrio y PC), en diferentes envases de color (azul claro, azul oscuro, claro, verde, luz verde, esmerilado y rosa) y en diferentes volúmenes de contenedores (que van a partir de 250 mL a 1,5 L).

En cuanto al resultado que nos concierne sobre la exposición de BPA, sólo se detectó en una muestra de agua potable de una botella de PC de 18,9 L, a un nivel de 1,7 $\mu\text{g/L}$, después de la exposición a UV. Debido a los posibles efectos sobre la salud del consumo de BPA prolongada, EFSA estableció que el valor de ingesta diaria de BPA no puede superar los 0,05 mg/kg de peso/cuerpo. Guart, Bono - Blay, Borrell, y Lacorte (2014) fijaron un valor de 24,2 $\mu\text{g/L}$ de BPA detectado en botellas de agua como valor máximo para que no tenga ningún riesgo en la salud, es decir, por encima de esos niveles está asociado con efectos adversos. Conclusión, BPA sólo se detectó en una muestra de un recipiente de PC a niveles muy por debajo del valor de ingesta diaria total fijado por EFSA.

No obstante, el PC no es la única exposición a BPA, las resinas epoxi representan el segundo mayor uso de BPA; se producen por la reacción de BPA con BPA diglicil éter (comúnmente abreviado como BADGE). Conforman polímeros termoestables que tienen buenas propiedades mecánicas así como una resistencia química y temperaturas altas. Como tal, estas resinas tienen una amplia gama de aplicaciones, incluyendo el uso como recubrimientos de latas de alimentos, aisladores eléctricos de alta tensión, empastes dentales, etc. (EFSA, 2015).

Las latas metálicas están protegidas contra la corrosión mediante la aplicación de resinas epoxi en los revestimientos interiores. Si los revestimientos se formulan de forma inadecuada, puede llegar a ocasionar contaminación debido a la migración de productos químicos (BPA y BADGE) a los alimentos (Mungui-López, 2001).

Mungui-Lopez y cols., (2001) demostraron el efecto del tratamiento térmico y el tiempo de almacenamiento sobre la migración de BPA y BADGE en latas de atún y pimiento de México. La Tabla 4 muestra la concentración de BPA que se encuentra las latas durante el experimento.

Como se esperaba, al igual que en las botellas de PC, el tiempo de almacenaje y el proceso de calentamiento (HT) tiene un efecto agravante en cuanto a la migración de ambos compuestos químicos.

Tiempo de almacenamiento (días a 25 °C)	[BPA] µg/kg				[BADGE] µg/kg			
	Lata de atún		Lata de pimiento		Lata de atún		Lata de pimiento	
	NHT	HT	NHT	HT	NHT	HT	NHT	HT
0	< 0,20	81,80	< 0,20	1,5	< 0,25	4,30	< 0,25	2,70
40	14,5	83,40	0,54	3,42	< 0,25	< 0,25	0,37	0,76
70	12,5	79,70	4,20	4,16	< 0,25	< 0,25	< 0,25	0,29

Tabla 4: Concentración BPA y BADGE para analizar el efecto del almacenamiento y proceso de calor. (NHT) Ningún proceso de calor aplicado. (HT) proceso térmico aplicado, latas de atún: 121°C durante 90 min, latas de pimiento, 100°C/9 min.

Misma conclusión obtuvieron en el estudio publicado por Errico y cols., (2014) sobre la migración de BPA desde el recubrimiento de las paredes internas de los tomates en conserva. En este estudio, se miden los niveles de BPA en los tomates enlatados a partir de seis marcas producidas en Nápoles, Italia.

En cuanto a los resultados confirman la migración de BPA de las latas en los productos de tomates. La variación de niveles de BPA (de 0,3 a 3,80 µg/kg) en diferentes tipos de latas almacenadas en buenas condiciones (sin daños y a T = 25°C), podría ser debido a las diferencias en los revestimientos de las latas (cantidad, grosor, etc.) y las condiciones de esterilización (temperatura y duración) utilizados en diferentes empresas. Por otro lado, la exposición accidental o por descuido de los productos de

tomate al calor (por ejemplo, la luz solar) durante el almacenamiento y el transporte son un factor agravante en el proceso de migración de BPA.

Aun así, los niveles de BPA en los productos de tomate en conserva investigados en este estudio son muchos más bajos que el límite legislado por la UE (600 µL/kg). Por lo tanto, la exposición al BPA a través el consumo de productos derivados del tomate en lata es baja.

Teniendo en cuenta los estudios podríamos decir que, el BPA es un producto químico industrial que se utiliza ampliamente como monómero o aditivo para la fabricación de PC y resinas epoxi principalmente. Las propiedades del PC, por ejemplo la rigidez, transparencia y resistencia, hacen que este plástico sea especialmente adecuado para muchas aplicaciones técnicas. Entre otras, las botellas de agua y los biberones que se encuentran en los supermercados. No obstante, el uso de este aditivo se prohibió en los materiales que entran en contacto con los niños en 2011. Por otro lado, las resinas epoxi basadas en BPA se usan como revestimiento en las latas de alimentos y bebidas y tanques de almacenamiento de agua potable (EFSA, 2015).

La migración de BPA residual, presente por la polimerización incompleta y la liberación del aditivo por la hidrólisis del polímero a partir de estos materiales utilizados en la industria alimenticia, son una fuente de exposición a BPA (EFSA, 2015). Las concentraciones encontradas en los alimentos incrementan a medida que se aumenta el tiempo de almacenamiento a temperaturas altas y el uso repetitivo de los productos.

Estudio	Objetivo	Método	Resultado
Mungui-López y cols., 2001	Demostrar el efecto del tratamiento térmico y el tiempo de almacenamiento sobre la migración de BPA y BADGE en latas de atún y pimiento.	La determinación de BPA se realiza mediante cromatografía líquida de alta definición (HPLC).	El tiempo de almacenaje y el proceso de calentamiento tiene un efecto agravante en cuanto a la migración de ambos compuestos químicos.
Maragou y cols., 2008	Analizar la migración del BPA de los biberones, en condiciones cotidianas.	El material de los biberones fue identificado por análisis espectroscopia infrarroja (FT-IR) y la determinación de BPA fue realizada con un método sensible basado en HPLC con detección de fluorescencia (HPLC-FLD).	Los resultados demuestran una migración medible de BPA (2,4-14,3 µg/kg) cuando se vierte agua hirviendo en los biberones de PC, indicando que la temperatura es el factor crítico que favorece la migración.
Kubwabo y cols., 2009	Analizar la migración del BPA de los biberones de PC, simulando el uso cotidiano de estos.	Todas las muestras se analizaron utilizando un método que combina la extracción en fase sólida y cromatografía de gas con una fuente de ionización de electrones (GC/EI) y espectrometría de masas (MS/MS).	El nivel de BPA residual varió de 0,11 µg/L en agua incubado durante 8 horas a 1,8 µg/L tras 240 horas. Además, se observa una significativa subida del nivel de migración de BPA en las botellas PC debido a un aumento en la temperatura a la que se incuban durante 24 horas: 0,12 µg/L a 40°C frente a 1,77µg/L a 60°C.
Nam y cols., 2010	Cuantificar la concentración de migración de BPA en un biberón de PC nueva y de biberones usados 100 veces (repeticiones), extrayendo agua en temperaturas que van de 40 °C a 100 °C.	La determinación de BPA se realiza mediante GC-MS y HPLC.	El nivel de migración de BPA se incrementó hasta 1,1 µg/kg después de 10 repeticiones y, a continuación, se mantuvo hasta 60 repeticiones. Después, a medida que aumentaban las repeticiones, el nivel de BPA creció rápidamente hasta alcanzar 3,08 µg/kg en la repetición número 100. Además, el nivel migrado de BPA se incrementó rápidamente a temperaturas por encima de 80°C.
Errico y cols., 2014	Obtener nuevos datos sobre la migración de BPA desde el recubrimiento de las paredes internas de los envases de los productos en conserva. En este estudio, se miden los niveles de BPA en los tomates enlatados.	El BPA se determina mediante cromatografía líquida de UV visible y espectrofotometría fluorescente.	La variación de niveles de BPA (de 0,3 a 3,80 µg/kg) en diferentes tipos de latas almacenadas en buenas condiciones (sin daños y a T=25 °C). Por otro lado, la exposición accidental o por descuido de los productos de tomate al calor (por ejemplo, la luz solar) durante el almacenamiento y el transporte son un factor agravante en el proceso de migración de BPA.
Rowell y cols., 2016	Determinar el contenido de BPA en agua embotellada de muestras obtenidas de los mercados.	Las muestras se determinan por dilución isotópica, y limpieza utilizando ultra HPLC (UHPLC) acoplada a espectrometría de ionización por pulverización electrónica (ESI) y espectrometría de masas en tándem (QTOF).	En cuanto al resultado que nos concierne sobre la exposición de BPA, sólo se detectó en una muestra de agua potable de una botella de PC de 18,9 L, a un nivel de 1,7 µg/l, después de la exposición a UV.

Tabla 5: Los artículos seleccionados para determinar las concentraciones de BPA y los resultados obtenidos tras el experimento.

5.2 Identificación de la acción estrogénica del bisfenol A *in vivo* e *in vitro*

El segundo objetivo definido en este trabajo es identificar la acción estrogénica del BPA tanto *in vivo* como *in vitro*. Para ello se ha realizado una búsqueda en la base de datos PubMed y WOS dirigido a: “*in vitro* estrogenicity bisphenol A” y “*in vivo* estrogenicity bisphenol A”, con el fin de conseguir la información más completa posible (Diagrama 2). El resultado es un total de 64 y 188 ítems respectivamente. Después de realizar la selección de artículos como se explica en el apartado 4.4.1 los elegibles (N=8) se recogen en la Tabla 6.

El estrógeno es un factor de importancia *in vivo* en el control de muchos procesos fisiológicos y en el desarrollo de varios órganos. Además, esta hormona sexual juega un papel esencial en el desarrollo de los órganos reproductivos, los huesos, el hígado y sistemas cardiovasculares. En los seres humanos, el estrógeno afecta la función reproductiva y regula el desarrollo de las características sexuales secundarias (Dang y cols., 2009).

Una variedad de sustancias químicas ambientales naturales y sintéticas conocidas como EDCs tienen actividades similares a los estrógenos y pueden causar respuestas estrogénicas fisiológicas. Estos compuestos se unen a ER e inducen o modulan una respuesta mediada por estos. Entre ellos BPA, que ha sido reportado con acción estrogénica tanto *in vivo* como *in vitro* (Dang y cols., 2009).

La actividad estrogénica de BPA se descubrió por casualidad. Los investigadores de la Universidad de Stanford identificaron una proteína de unión a estrógenos en la levadura (Feldman y cols., 1984). Después encontraron que la actividad estrogénica no provenía de la levadura sino del medio de cultivo que prepararon con agua, tratado en autoclave en matraz de PC. Mediante ensayos de unión a ER se purificó e identificó que el compuesto era BPA (Krishnan y cols., 1993, Ben-Jonathan and Steinmetz, 1998).

A partir de eso, se han publicado estudios que demuestran la estrogenidad de BPA. En 1999, Bergeron y cols., publicaron un estudio con el propósito de medir el potencial estrogénico del BPA *in vitro*. Para ello, cultivaron una línea celular del útero humano, carcinoma endometrial humano (ECC-1) con BPA, y lo compararon con un estrógeno prototípico, 17β-estradiol.

La línea celular ECC-1 se obtuvo originalmente por su capacidad para expresar ERs y además, respondió al estradiol provocando una mayor tasa de proliferación de las células y la inducción de receptores de progesterona (PR). Así, los efectos de BPA se examinaron mediante la medición de las uniones a ER y el nivel de expresión de ARNm PR, junto con la proliferación celular de ECC-1.

El presente estudio demostró que el BPA no sólo se une a ER en esta línea celular de una manera competitiva, sino que también activa el receptor para inducir la expresión de PR. La unión del ligando al ER produce cambios conformacionales en el receptor pero este sigue interactuando con cofactores de ADN y activando la expresión génica. El complejo BPA-ER induce patrones similares a cuando se une el estradiol en cuanto a la expresión de PR corresponde pero, no sucede así cuando se analiza sus respectivos efectos sobre la proliferación celular. El estradiol induce un aumento casi del doble de células uterinas cultivadas, mientras que el BPA no produjo ningún cambio. En resumen, los resultados demuestran que el BPA actúa tanto como un agonista de ER (inducción de ARNm PR) y antagonista (inhibición de la proliferación celular inducida por estrógenos) en las células uterinas humanas ECC-1.

En el mismo año, Schafer y cols., (1999) para confirmar o refutar la estrogenicidad putativa de BPA utilizaron MCF-7 como línea celular de estudio. Así confirmaron que BPA aumenta por encima de los niveles obtenidos en el control (con estradiol) la proliferación celular en las células MCF-7. La razón de esta disparidad proliferativa en respuesta al BPA entre MCF-7 y las células ECC -1 es probable que sea debido a las diferencias entre estas dos líneas celulares, que derivan de tejido mamario y endometrial, respectivamente. Hay diferencias específicas en la presencia y la disponibilidad de factores de transcripción que darían lugar a una respuesta diferente en estos dos tipos de células frente a BPA.

Por lo tanto, el BPA induce una conformación en el receptor dependiendo del tejido, lo que resulta en la inducción de algunas, pero no todas las respuestas estradiol-dependientes.

Cummings y Laws, (2000), afirmaron que la técnica de usar las células MCF-7 para evaluar la estrogenidad puede ser un ensayo más sensible que el planteado en su estudio, que evalúa la estrogenidad *in vivo*: basándose en la capacidad que el compuesto

químico tiene de iniciar la implantación. Para los fines experimentales utilizaron ratas Holtzman de 70 días de edad y el protocolo se resume gráficamente en la Ilustración 9.

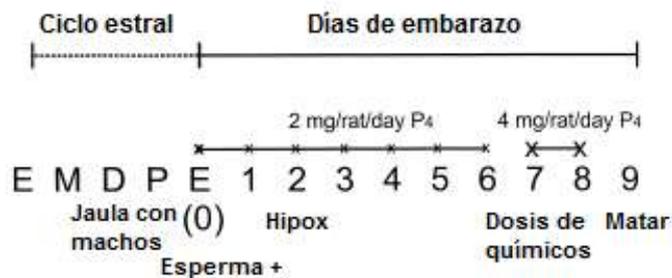


Ilustración 9: Protocolo para las ratas hipofisectomizadas de implantación retardada. E, M, D, P = Estro, Metaestro, Diestro y Proestro (días del ciclo estral de la rata); Hipox = hipofisectomizadas; P4 = inyección de progesterona. Ilustración modificada de Cummings y Laws, 2000.

Las ratas preñadas son hipofisectomizadas después de la fecundación, pero antes de la implantación. Hipofisectomía es la extirpación quirúrgica de la pituitaria y da como resultado la inhibición de la secreción de la hormona esteroide, que en última instancia evita la implantación. Los animales son entonces tratados con progesterona, que retrasa la implantación pero mantiene el blastocito en el útero. Se sabe que se requiere de estrógeno para la implantación; una dosis de estrógeno o un producto químico estrogénicamente activo inician la implantación en estos animales.

Entonces se da un aumento de permeabilidad vascular localizada en el sitio de la implantación, lo cual permite que el sitio sea fácilmente identificable por la penetración de un tinte macromolecular (penetración de colorante azul en el lugar de la implantación).

Como control se administro por inyección 1µg de estrona en ratas previamente hipofisectomizadas, induciendo así un control positivo, la hormona inicio la implantación en el 100% de los casos. Un patrón similar se observo en los animales inyectados con BPA, obteniendo una tasa de implantación del 100% con una dosis de 200 µg BPA/kg (Ilustración 10).

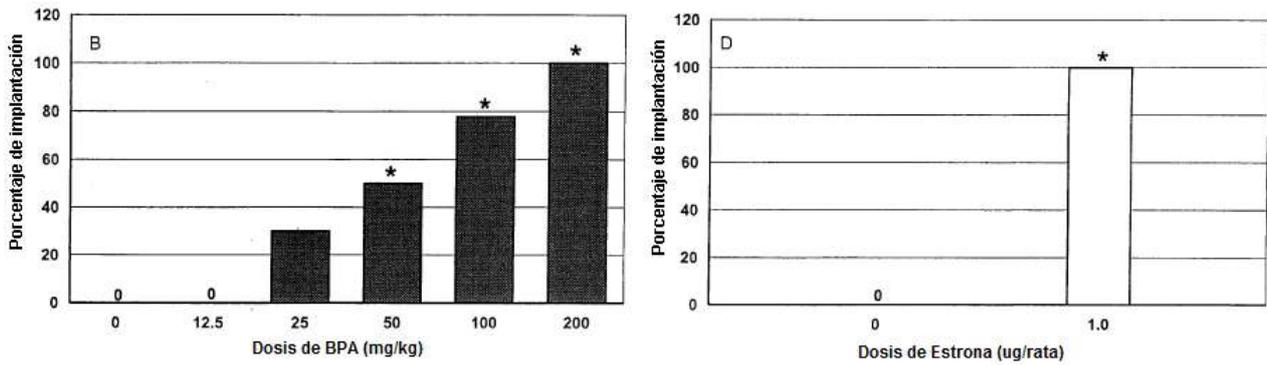


Ilustración 10: Evaluación de la dosis-respuesta de la capacidad de iniciar la implantación en ratas hipofisectomizadas. (a) Dosis ascendentes de BPA; (b) Dosis de estrona (ratas control). Ilustración modificada de Cummings y Laws, 2000.

Una cuestión importante en el uso de este modelo es el mecanismo por el cual los estrógenos inducen la iniciación de la implantación. Chatterjee y Johnson (1993) demostraron que un antagonista de estrógeno puro ICI- 182780 inhibe el efecto del de 17β -estradiol en la implantación en rata. Este descubrimiento sugiere que se requiere una etapa mediada por ER para la implantación.

La administración de progesterona durante el período de retraso de la implantación, es posible que interfieran en la regulación de mecanismos ER. Es decir, se ha observado una regulación a la baja de los ER en el citosol pero no se ha visto que afecte a los ER de la fracción nuclear, lo que deja suficientes ERs para que los productos estrogénicos a analizar o la estrona (control) se unan e inicien la implantación con éxito. Por lo tanto, los datos también implican que una sustancia química que inicia la implantación, de alguna manera, imita al estrógeno o estimula una vía mediada por el efecto del estrógeno para inducir la implantación.

El modelo es técnicamente más complejo y laborioso que los *in vitro* mencionados anteriormente, ya que implica inyecciones, cirugías y modelos vivos. Por esa razón, el modelo no es adecuado como una pantalla inicial, se utiliza mejor como un seguimiento con el fin de evaluar el nivel de estrogenidad. Aun así, se siguen planteando modelos *in vivo* para demostrar dicha actividad, como Markey y cols. 2001.

Markey y cols., publicaron un ensayo uterotrópico, un método establecido para determinar la estrogenicidad de BPA en roedores, que mide el aumento del peso húmedo del útero. En este trabajo se aborda el tema de la susceptibilidad a BPA usando ratones inmaduros CD-1 como modelo. Ratones consanguíneos y tamaño de camada

grande, que son útiles para los estudios sobre consecuencias de hormonas ambientales en el desarrollo y la reproducción.

Por lo tanto, en este experimento se plantea demostrar la estrogenidad de BPA *in vivo* mediante los cambios en el peso uterino y el desarrollo de métodos que reflejan la actividad estrogénica en el útero, la morfología de las células epiteliales, la inducción de la proteína lactoferrina (proteína estrógeno-inducible), y la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA).

En cuanto a los resultados obtenidos, se recogen en la Ilustración 11.

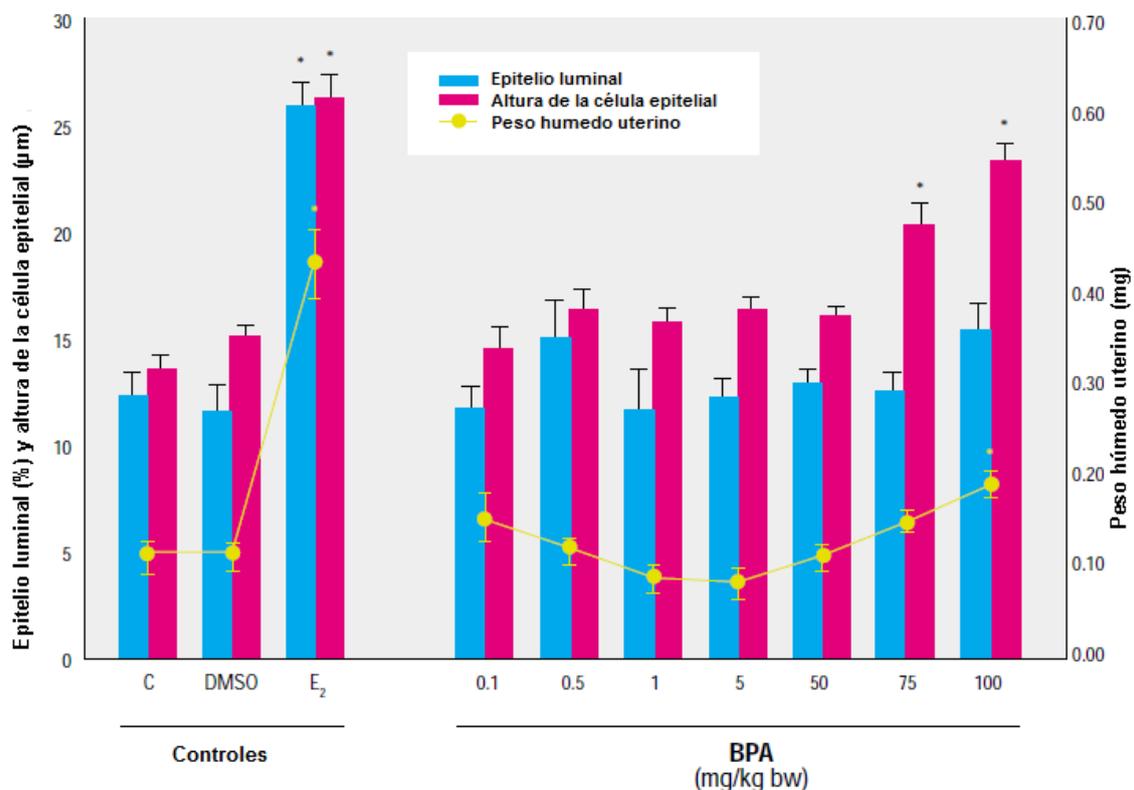


Ilustración 11: Las diferencias en el área del epitelio luminal (porcentaje del útero ocupado por el epitelio luminal), altura del epitelio luminal y el peso húmedo uterino de ratones inmaduros expuestos a concentraciones de BPA que van de 0,1 a 100 mg/kg/día. C: control ratones sin tratar; DMSO: dimetilsulfóxido; E₂: 17-βestradiol. Ilustración modificada de Markey y cols., 2001.

La administración de BPA en concentraciones de 0,1-75 mg/kg por peso corporal, no tuvo ningún efecto significativo en el peso húmedo del útero con respecto al grupo control (c). Hubo un aumento del 53 % en peso húmedo uterino en respuesta a 100 mg/kg por peso corporal de BPA, en relación al grupo de control.

El área del epitelio luminal dentro del útero no se vio afectado por BPA en ninguna concentración. Sin embargo, el tratamiento con estradiol indujo un aumento significativo en este parámetro, 115% con respecto al grupo control (c). No obstante, el útero exhibió un aumento de altura de las células epiteliales en respuesta al BPA en concentraciones de 5, 75, y 100 mg/kg, lo que representa incrementos de 14, 42 y 63%, respectivamente. El tratamiento con estradiol indujo un aumento del 83% respecto al grupo control (c).

Por otro lado, BPA indujo un significativo aumento en la expresión de la lactoferrina de un 373% a una concentración de 75 mg/kg y de un 438% a una concentración de 100 mg/kg en relación con el control grupo (c). Al contrario, bajas concentraciones de BPA no indujeron la expresión de lactoferrina; mientras que, la expresión de la lactoferrina aumentó en un 405% en el grupo del estradiol y el grupo control no mostró respuesta alguna.

Por último, no hubo diferencia significativa en la expresión de PCNA en el epitelio luminal entre los grupos de tratamiento.

Markey y cols., publicaron que el BPA actúa como un estrógeno *in vivo* mediante la inducción celular y los cambios bioquímicos en el útero de ratón que son compatibles con la actividad estrogénica. Además, BPA es capaz de inducir cambios en el peso húmedo uterino, altura de las células epiteliales, y la expresión de la lactoferrina en el ratón CD-1, que establece que esta cepa es adecuada para la investigación de la efectos de la exposición en el útero a BPA en el desarrollo y la reproducción. Aun así, este trabajo argumenta que es esencial ensayos *in vivo* más sensibles ya que los cambios a nivel celular se observaron en dosis más bajas que en las que ocurren cambios en el peso húmedo uterino.

En los últimos años se ha intentado desarrollar un método estandarizado para detectar la actividad estrogénica de los EDCs, como el BPA. Así, An y cols., 2002, plantearon el gen CaBP-9K como biomarcador para la respuesta estrogénica de estrógenos ambientales. En el útero, CaBP -9K se expresa principalmente en el estroma endometrial y miometrio de ratas no gestantes; mientras que en ratas preñadas, el gen también se expresa en el epitelio uterino. La expresión del gen esta bajo estricta regulación de los estrógenos.

El presente estudio, demuestra por primera vez que ARNm CaBP - 9k se induce rápida y fuertemente por compuestos estrogénicos ambientales, como el BPA, posiblemente a través de la regulación de la expresión del ARNm ER- α en el útero de la rata. Estos resultados sugieren que al igual que el esteroide endógeno, los estrógenos ambientales (BPA) pueden regular la expresión de ARNm CaBP-9k a través de la modulación de la actividad transcripcional de ER.

En el previo estudio se desarrollo una exposición *in vitro* para determinar la estrogenidad utilizando como biomarcador el gen CaBP-9k. Este modelo no solo proporciona información valida en lo que concierne a la actividad de los EDCs, también reduce el coste y el tiempo dedicado a testar los productos químicos. Por ello, Dangs y cols., 2009 utilizando células pituitarias de rata GH3 como modelo *in vitro* determinaron los efectos de EDCs entre los que cabe destacar BPA, midiendo la expresión de ARNm GH (factor de crecimiento) mediante RT-PCR semi-cuantitativa. Las células fueron tratadas con diferentes concentraciones y tiempos de exposición. Además, utilizaron una molécula anti-estrogénica ICI-182,780, para examinar el papel de ER en la inducción de la transcripción de GH en las células.

Por otro lado, con el fin de entender el posible efecto de los EDCs en las vías de segundo mensajeros, estudiaron los niveles de proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), proteínas quinasas B (Akt) y/o proteína G mediante análisis de inmunotransferencia. Como control interno utilizaron la inducción de la transcripción de un gen conocido, la prolactina (PRL): biomarcador como control interno para la actividad estrogénica.

A las 24 horas de exposición se observo aumento significativo en la expresión de ARNm GH inducido por altas y medianas concentraciones de EDCs (10^{-5} y 10^{-6} M) pero, no se ve cambio alguno en concentraciones bajas (10^{-7} M). Como control positivo se trataron las células con estradiol y vieron que las dosis administradas (de 10^{-10} a 10^{-8} M) también incrementaban la expresión de ARNm GH a las 24 horas (Ilustración 12a). Como se esperaba, la expresión de PRL también aumento a dosis altas de estradiol y EDCs (Ilustración 12b).

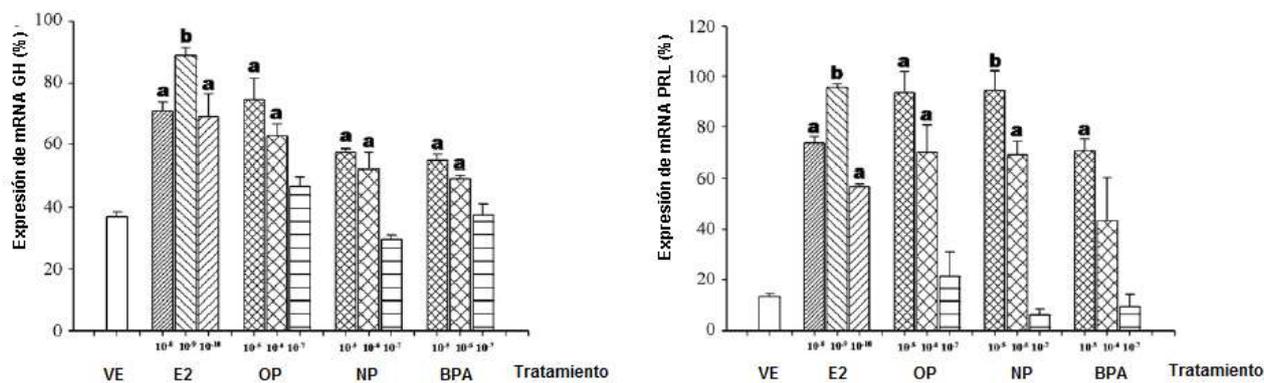


Ilustración 12: Efecto dependiente de la dosis de tratamiento en la inducción de la transcripción de mRNA GH y PRL. VE= vehículo; E2=estradiol; OP=Octilfenol; NP=Nonilfenol. Ilustración modificada de Dangs y cols., 2009.

Para determinar la ruta biológica implicada en la inducción de ARNm GH tras la exposición de las células GH3 a EDCs se empleó el anti-estrogeno ICI, 182,780. Las células se trataron con una alta concentración (10^{-5} M) de EDCs en ausencia y en presencia de ICI 182,780 (10^{-7} M) y se recogieron 24 horas más tarde. Los niveles de ARNm GH aumentaban tras el tratamiento, mientras que en aquellas que habían sido co-tratadas con ICI 182,780 mostraban una significativa atenuación en cuanto a los niveles de ARNm GH. Por lo tanto, los resultados sugieren que los efectos biológicos de los EDCs estudiados en la inducción de ARNm GH y secreción de GH responden a un mecanismo mediado por ERs.

Un experimento adicional se llevó a cabo para determinar el impacto de EDCs en la inducción de expresión de ERK, Akt y proteína G, involucradas en las vías de segundo mensajero, vía estrogénica no genómica. Las células se trataron con una alta concentración (10^{-5} M) de EDCs durante 24 h y los efectos y los niveles de proteína de ERK1/2, Akt1/2/3 o $G_{\alpha i-2}$ se analizaron por inmunoensayos. Se observó un aumento en los niveles de expresión de proteínas ERK1/2, Akt1/2/3 y/o $G_{\alpha i-2}$, demostrando así que los compuestos actúan por la vía no genómica también.

En un estudio más reciente, Ho y cols., 2013, describieron un ensayo *in vitro* para cuantificar efectos estrogénicos basados en la enzima Catecol-O-metiltransferasa (COMT). Esta enzima se expresa en diversos tejidos humanos para degradar los catecolestrógenos; intermediarios cancerígenos que se generan por el CYP450 a partir de la hidroxilación tanto de los estrógenos endógenos como los xenoestrógenos.

La expresión endógena de COMT no sólo está regulada por la vía estrogénica que reduce la expresión de la enzima a través de ERE, sino que también por compuestos de muy diferentes estructuras químicas pero que tienen la capacidad ya sea de imitar o antagonizar las acciones del estradiol. Por lo que, la expresión de COMT en respuesta a estos agentes estrogénicos puede ser un método útil para estimar la estrogenidad, entre otras sustancias la de BPA. Para ello describieron un sistema de ELISA competitivo que detecta la expresión de la isoforma soluble COMT (S-COMT) en la línea celular MCF-7 de adenocarcinoma de mama ER-positivo.

A continuación, la Ilustración 13 recoge la caracterización y aplicación de COMT ELISA y se explica los resultados obtenidos en el estudio.

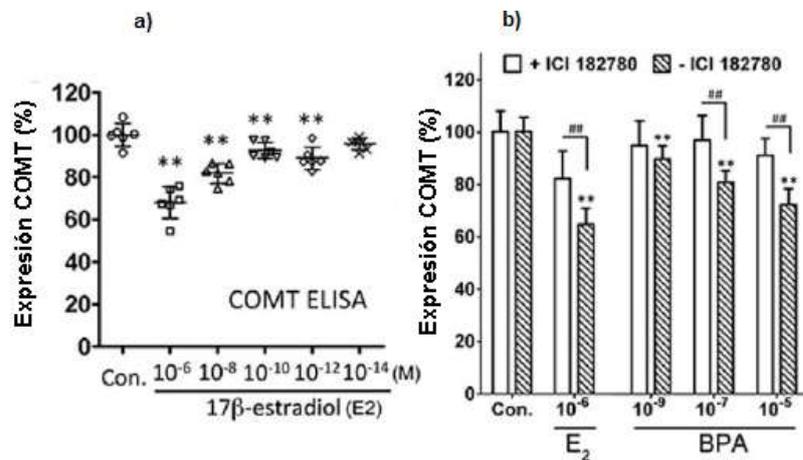


Ilustración 13: Caracterización y aplicación de COMT ELISA. (a) Efectos de dosis graduadas de 17β-estradiol (E2) sobre la expresión de COMT, en las células MCF-7 determinado por COMT ELISA después del tratamiento de 48 horas. (b) Efectos en la expresión de COMT tras el tratamiento con dosis graduadas de BPA sobre células MCF-7, en presencia o ausencia de ICI 182.780. Ilustración modificada de Ho y cols., 2013.

El tratamiento con 17β -estradiol (10⁻¹²-10⁻⁶ M) durante 48 horas causa una reducción en la expresión de la COMT en comparación con los resultados para las células de control no tratadas (Ilustración 13, a). Tal reducción puede ser bloqueado eficazmente por antagonista de ER, ICI 182.780, lo que confirma que la reducción de la COMT por 17β - estradiol está mediada por ER (Ilustración 13, b).

BPA reduce el nivel de expresión de S-COMT y la especificidad de acción estrogénica se demuestra por el hecho de que el ER antagonista, ICI 182.780, bloquea la acción de este plastificante en la supresión de la expresión de proteínas COMT.

Así el método planteado en este estudio, ELISA basado en células, puede ser un ensayo rápido y efectivo para evaluar la estrogenidad de compuestos químicos.

Se sabe que los estrógenos tienen riesgo de desarrollar y progresar la inducción de varios tipos de cánceres como el de mama, ovario o endometrio, y los carcinomas cervicales. Estos cánceres se denominan cánceres estrógeno-dependientes. En el estudio Hwang y cols., 2013, se evaluó el efecto xenoestrogénico de BPA y la actividad antiproliferativa de la genisteína (GEN) en de acuerdo con la influencia de estos compuestos en los cánceres estrógeno dependientes. La interacción entre ERs y el receptor del factor de crecimiento de insulina-1 (IGF-1R) juega un papel importante en la vía de señalización de proliferación y la resistencia en los cánceres estrógeno dependientes. El estrógeno regula a la alza la expresión de los componentes del sistema IGF-1 e induce la cascada de señalización mitogénica través de la fosforilación del sustrato del receptor de insulina 1 (IRS-1).

El experimento se centro en la comunicación cruzada en las vías de señalización entre ER y IGF-1R en las células BG-1 adenocarcinoma ovárico estrógeno dependiente. Se exploró el efecto que inducía el 17 β -estradiol (el estrógeno fisiológico más potente), y el BPA. Como otra nota clave del presente estudio, también se exploró la efecto antiproliferativo de la GEN para invertir la proliferación del cáncer promovido por el estradiol o BPA a través de la supresión de la diafonía entre las vías de señalización de ER y IGF-1R.

Tanto el estradiol y el BPA regulan a la alza la expresión de ARNm ER α y IGF-1R induciendo la fosforilación de IRS-1; por el contrario GEN, revierte la estrogenidad de BPA y estradiol (Ilustración 14).

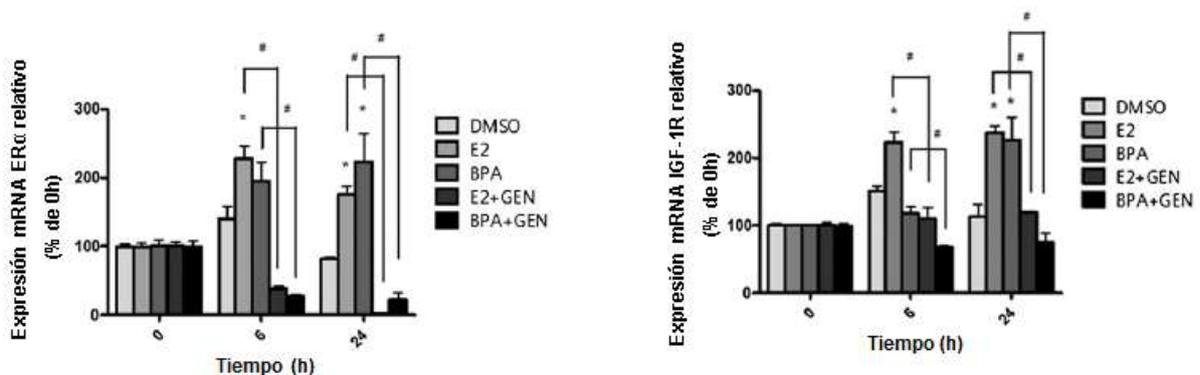


Ilustración 14: Los niveles alterados de expresión de mRNA ER α (izquierda) y IGF-1R (derecha) después de los tratamientos con estradiol (E2), BPA, E2 + GEN, o BPA + GEN. Se cultivaron células BG-1 en placas de 6 pocillos y se trataron con DMSO (vehículo), E2 (10⁻⁹ M), BPA (10⁻⁵ M), E2 (10⁻⁹ M) + GEN (10⁻⁴ M), o BPA (10⁻⁵ M) + GEN (10⁻⁴ M). El ARN total se extrajo después de los periodos de tratamiento (6 y 24 h). Ilustración modificada de Hwang y cols., 2013.

El efecto xenoestrogénico *in vitro* de BPA era confirmado en modelos animales *in vivo* en el que los ratones xenoinjertados de trasplante de células BG- 1 de cáncer de ovario y tratados con BPA o estradiol durante 8 semanas. En este estudio, BPA y estradiol aumentaron continuamente la carga tumoral de los ratones desde la etapa inicial del experimento; mientras que, GEN disminuyó significativamente el crecimiento del tumor (Ilustración 15). Quedando así patente como se ha demostrado en anteriores estudios que el BPA puede imitar las acciones del estradiol endógeno.

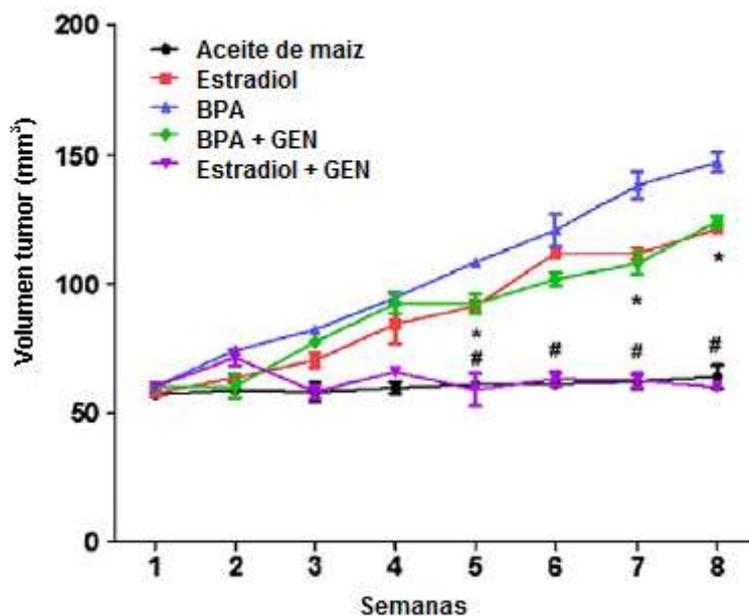


Ilustración 15: Medición del volumen tumoral. Con la administración de aceite de maíz (vehículo), Estradiol (E2) (20 µg/kg de peso corporal), BPA (100 mg/kg de peso corporal), E2 + GEN (20 µg/kg de peso corporal + 300 mg/kg de peso corporal), y el BPA + GEN (100 mg/kg de peso corporal + 300 mg/kg de peso corporal), los volúmenes tumorales (0,5 x longitud x altura x anchura) se midieron con una escala vernier cada semana durante 8 semanas. Ilustración modificada de Hwang y cols., 2013.

Los estudios demuestran la actividad estrogénica del BPA. Mediante líneas celulares estrógeno-dependientes se ha demostrado que el compuesto se une a los ERs y actúa como antagonista o agonista dependiendo del tejido. Además, no solo actúa por la vía directa, también puede activar segundos mensajeros como ERK/Akt y/o proteína G.

Estudio	Objetivo	Método	Resultado
Bergeron y cols., 1999	Medir el potencial estrogénico del BPA <i>in vitro</i> .	Cultivar células de la línea celular ECC-1 con BPA comparándola con el control, células cultivadas con estradiol, mediante ensayos de radiomarcado.	Demostraron que el BPA se une a ERs, activando la expresión de receptores de progesterona. Pero, no induce efecto sobre la proliferación de las células.
Schafer y cols., 1999	Confirmar la estrogenicidad del BPA.	MCF-7 línea celular del tejido mamario; citometría de flujo.	El BPA aumenta la proliferación de las células cultivadas, niveles superiores a los del control (tratamiento con estradiol).
Cummings y Laws, 2000	Evaluar la estrogenidad <i>in vivo</i> , basándose en la capacidad que el compuesto químico tiene de iniciar la implantación en ratas hipofisectomizadas	Utilizaron ratas Holtzman de 70 días de edad preñadas que son hipofisectomizadas después de la fecundación, pero antes de la implantación. Se tratan con progesterona para retrasar la implantación pero mantener el blastocisto en el útero. Se visualiza el sitio de implantación por un tinte macromolecular.	Como control se administro por inyección 1µg de estrona en ratas previamente hipofisectomizadas, induciendo así un control positivo, la hormona inicio la implantación en el 100% de los casos. Un patrón similar se observo en los animales inyectados con BPA, obteniendo una tasa de implantación del 100% con una dosis de 200µg BPA/kg.
Markey y cols., 2001	Establecer método <i>in vivo</i> para determinar estrogenidad del BPA.	Ensayo uterotrópico en ratones CD-1 inmaduros, tratados con estradiol y BPA frente a ratones sin tratamiento (control). Medición del peso húmedo uterino, altura de las células epiteliales, la inducción de la proteína lactoferrina y la expresión de PCNA.	Aumento del peso húmedo uterino con concentraciones superiores a 100 mg/kg peso corporal. Aumento del área epitelio luminal en los ratones tratados con estradiol. Tanto el estradiol como el BPA producen un incremento en la altura de las células epiteliales. BPA en concentraciones altas (>75mg/kg) y el estradiol indujeron un significativo aumento en la expresión de la lactoferrina. No hubo diferencia significativa en la expresión de PCNA
An y cols., 2002	Determinar Calbindina-D9k como biomarcador para la respuesta estrogénica de los estrógenos ambientales (entre ellos, BPA).	Cuantificación de ERα por RT-PCR.	ARNm CaBP-9k se induce rápida y fuertemente por compuestos estrogénicos ambientales, como el BPA, a través de la regulación de la expresión del ARNm ER-α en el útero de la rata.
Dang y cols., 2009	Determinar los efectos de EDCs entre los que cabe destacar BPA, midiendo la expresión de ARNm GH y entender el posible efecto de los EDCs en las vías de segundo mensajeros.	Cuantificación de GH mediante RT-PCR semi-cuantitativa, utilizando células pituitarias de rata GH3 como modelo <i>in vitro</i> . Para determinar la ruta biológica implicada en la inducción de ARNm GH tras la exposición de las células GH3 a EDCs se empleo el anti-estrogeno ICI, 182,780. También estudiaron los niveles de proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), proteínas quinasas B (Akt) y/o proteína G mediante análisis de inmunotransferencia.	Los niveles de ARNm GH aumentaban tras el tratamiento de EDCs y estradiol (control positivo), pero las co-tratadas con ICI 182,780 mostraban una significativa atenuación de los niveles de ARNm GH. Po lo tanto, los resultados sugieren que los efectos biológicos de los EDCs estudiados en la inducción de ARNm GH y secreción de GH responden a un mecanismo mediado por ERs. Además, se observó un aumento en los niveles de expresión de proteínas ERK1/2, Akt1/2/3 y/o G _{ai-2} , demostrando así que los compuestos actúan por la vía no genómica también.

Tabla 6: Artículos seleccionados para determinar la actividad estrogénica de BPA y los resultados obtenidos tras los experimentos.

Estudio	Objetivo	Método	Resultado
Ho y cols., 2013	Describir un ensayo in vitro para cuantificar efectos estrogénicos basado en la enzima COMT.	El método para cuantificar la expresión de COMT fue ELISA.	El tratamiento con 17β -estradiol (10^{-12} - 10^{-6} M) durante 48 horas causa una reducción en la expresión de la COMT. BPA reduce el nivel de expresión de S-COMT y la especificidad de acción estrogénica se demuestra por el hecho de que el ER antagonista, ICI-182.780, bloquea la acción de este plastificante en la supresión de la expresión de proteínas COMT.
Hwang y cols., 2013	Evaluar el efecto xenoestrogénico de BPA y la actividad antiproliferativa de GEN, de acuerdo con la influencia de estos compuestos en los cánceres estrogénico dependientes. Basándose en que el estrógeno regula a la alza la expresión de los componentes del sistema IGF-1 e induce la cascada de señalización mitógena a través de la fosforilación del IRS-1.	Ensayo de inmunohistoquímico y la bromodesoxiuridina (BrdU). Ensayo por túnel para analizar el tumor.	Tanto el estradiol y el BPA regulan a la alza la expresión de ARNm ERα y IGF-1R induciendo la fosforilación de IRS-1; por el contrario GEN, revierte la estrogénicidad de BPA y estradiol. BPA y estradiol aumentaron continuamente la carga tumoral de los ratones, mientras GEN disminuyó significativamente el crecimiento del tumor.

Continuación Tabla 6: Artículos seleccionados para determinar la actividad estrogénica de BPA y los resultados obtenidos tras los experimentos.

5.3 Efectos del bisfenol A en la reproducción en modelos de experimentación animal (roedores)

El tercer objetivo es analizar el efecto que el BPA tiene en la reproducción, caracterizando el impacto del compuesto sobre la fertilidad de machos y hembras, en animales de experimentación (roedores). Con el fin de recopilar artículos a lo referido, se ha realizado una búsqueda en la base de datos PubMed y WOS dirigido a “effect of bisphenol a on reproduction” (Diagrama 3). Se consiguieron 269 y 373 ítems, respectivamente y la selección de se realizó como se explica en el apartado **4.4.1**. Los artículos elegibles se clasificaron en dos grupos. Por un lado, los artículos referidos al efecto del BPA en la fertilidad masculina (n= 10) y por otro lado, los referidos a la fertilidad femenina (n= 11), los artículos se recogen en la Tabla 7 y 8, respectivamente.

La infertilidad o la incapacidad para concebir sigue siendo un problema de proporciones globales, millones de personas en todo el mundo sufren de infertilidad (Inhorn y Patrizio, 2014). Entre las parejas infértiles, se estima que la causa es predominantemente femenina en 38% y masculino en 20%, mientras que 27% de los casos muestran anomalías ambos y en el 15% restante no se identifica causa aparente de la infertilidad (Marques-Pinto y Carlvaho, 2013).

El BPA es un contaminante ambiental ubicuo, resultante de la fabricación, utilización o eliminación de los plásticos que contienen este compuesto químico como aditivo. El uso omnipresente y extensivo de productos que contienen BPA da como resultado una alta exposición al mismo, lo que podría derivar en efectos adversos en la salud, entre los que se estudiará el efecto en la reproducción (Li y cols., 2016).

5.3.1 Efecto de BPA en la reproducción masculina.

La infertilidad ha tenido una tendencia creciente y la calidad de esperma en los hombres ha disminuido durante las últimas décadas. Los factores fisiopatológicos están directamente vinculados a solo el 23% de todos los casos de mala calidad, y se cree que los factores ambientales son las principales causas de los casos restantes (Li y cols., 2016).

Los procesos y la regulación del desarrollo reproductivo masculino están bajo el control de los diversos mecanismos que comienzan a operar durante la vida fetal. Estos

mecanismos son sensibles a factores endógenos y exógenos como los EDCs, por lo tanto, la exposición a ellos durante la vida prenatal y postnatal temprana (durante la lactancia) pueden perturbar el desarrollo normal del eje HHG y la espermatogénesis (Gámez y cols., 2014).

La espermatogénesis es un proceso complejo que depende de señalización endocrina y paracrina, para llevar a cabo las múltiples divisiones celulares. Divisiones necesarias para renovar la población de células madres espermatogonias (spermatogonial stem cell [SSC]) y dar lugar a poblaciones de células que se diferencian en última instancia en espermatozoides, gametos masculinos. La meiosis es la división celular esencial para que se dé la reducción de las células germinales diploides a gametos haploides durante la gametogénesis (Vrooman y cols., 2015).

Evidencias crecientes muestran que el BPA tiene la capacidad de interrumpir eventos meióticos y, posteriormente, poner en peligro la función reproductiva. Por ello, Liu y cols. (2013) realizaron un estudio *in vivo* para evaluar los posibles efectos del BPA en la función reproductiva y el progreso de la meiosis en ratas machos adultos y explorar mecanismos relevantes involucrados.

En el estudio los resultados demostraron que el BPA induce anomalías meióticas en el sistema reproductivo masculino en ratas adultas. *In vivo*, la administración de 200 µg/kg peso corporal/día redujo significativamente el número de espermatozoides en ratas macho adultas. La reducción en el recuento espermático se asocio con una interrupción meiótica y la consiguiente apoptosis en las células testiculares

Liu y cols., propusieron que pudo ser causado por la persistencia de roturas bicatenarias del ADN (DSB=Double-Strand Breaks). Es decir, falta de reparación de roturas de la doble hebra del ADN en la fase de paquiteno y la activación de señales ATM/Chk2, “check-point” del ciclo celular, que cuya activación no solo retasa la división celular, también induce la apoptosis en caso de que los DSBs no sean reparados correctamente. La apoptosis fue iniciada por una cascada de caspasas; el tratamiento con sustancias con actividad estrogénica activa la expresión de caspasa-3, mientras que el pretratamiento con ICI bloquea dicha activación (Ilustración 16) (Liu y cols., 2013).

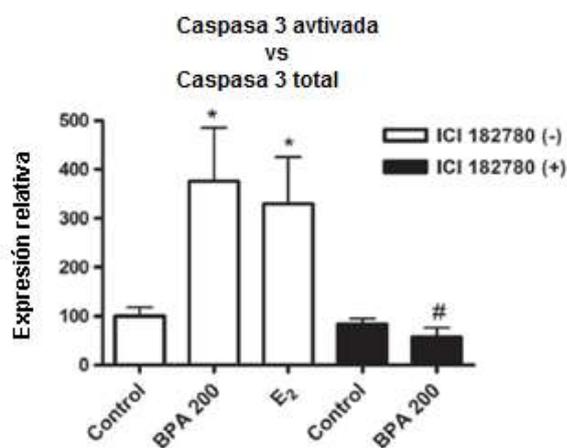


Ilustración 16: Cuantificación de proteína Caspasa 3 activa en relación al total. Las ratas control tratadas con vehículo se fijaron en el 100% (n=6 ratas por grupo). Ilustración modificada de Liu y cols. 2013.

Estos resultados están de acuerdo con el informe de Tiwari y Vanage (2013) que analizaron el efecto mutagénico de BPA en las células germinales masculinas de ratas adultas. Afirmaron que la acumulación de ADN dañado (Ilustración 17) en los espermatozoides puede ser causado por la acumulación de DSBs.

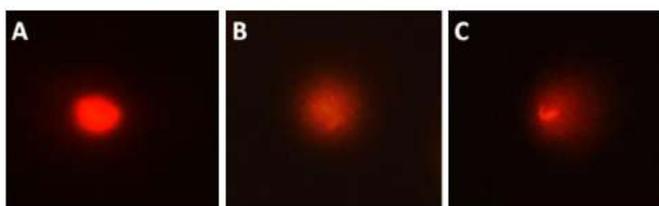


Ilustración 17: Grado de daño en el ADN evaluado mediante el ensayo cometa en el espermatozoides obtenido de ratas tratadas con diferentes concentraciones de BPA. (A) Control, tratamiento con vehículo; (B) Ratitas tratadas con 10 µg/kg; Ratitas tratadas con 5 mg/kg. Todas las imágenes están 63x magnificadas. Ilustración modificada de Tiwari y Vanage, 2013.

Vrooman y cols., (2015) demostraron que, en el ratón, la exposición a estrógenos exógenos (BPA y etinil-estradiol [EE]) durante el desarrollo testicular altera permanentemente la espermatogénesis en el adulto. Para probar la hipótesis de que la exposición estrogénica neonatal interrumpe la meiosis, los ratones machos recién nacidos (1-12 días después del parto) recibieron dosis orales diarias de BPA y EE o vehículo (placebo). En el protocolo experimental, analizaron los niveles de SYCP3 y MLH1: SYCP3 es un componente del complejo sinaptonémico (SC), y MLH1 es una

proteína que se localiza en los sitios de intercambio meiótico, proteína asociada al entrecruzamiento en el paquitenio.

Observaron una reducción en los niveles de MLH1 y un aumento correspondiente en la insuficiencia de recombinación aparente. Es decir, la exposición estrogénica aumenta la frecuencia de fallo de la recombinación. Además, para determinar si los defectos de recombinación inducidos por los estrógenos exógenos se deben a cambios en la línea germinal, transplantaron células germinales purificadas expuestas, a un ambiente somática no expuesto. El análisis llevado a cabo en las colonias regeneradoras por las células expuestas demostró niveles más bajos de MLH1, en comparación con aquellas tratadas con placebo. La persistencia de fenotipo de recombinación en el trasplante de las células germinales proporciona evidencia de que la exposición estrogénica altera las SSC.

Son preocupantes los niveles de BPA en fluidos biológicos, como el plasma materno, plasma fetal, tejido de la placenta, la sangre del cordón umbilical y de fluido amniótico, ya que indican que el BPA puede atravesar fácilmente la barrera placentaria. Los fetos en desarrollo son más susceptibles a la exposición al BPA ya que tienen una disminución de la eficiencia del metabolismo y una baja concentración de proteínas de unión a suero (Salian y cols., 2009).

El periodo perinatal se considera una “ventana” vulnerable y sensible del desarrollo de un individuo ya que abarca una importante fase de diferenciación sexual en el que la menor perturbación hormonal puede tener un impacto duradero sobre la fertilidad (Salian y cols., 2009).

En el estudio llevado a cabo por Salian y cols. (2009), la exposición perinatal de las ratas al BPA dio lugar a la reducción del número de espermatozoides y la motilidad en la descendencia masculina; se observó que estos machos eran subfértiles cuando se aparearon con hembras normales no expuestas al BPA. Es importante destacar que estos efectos persistieron en las posteriores generaciones F2 y F3 (Ilustración 18). Estas observaciones sugieren que la exposición perinatal de ratas al BPA provoca efectos negativos y duraderos sobre la fertilidad en edad adulta y que son transgeneracionales.

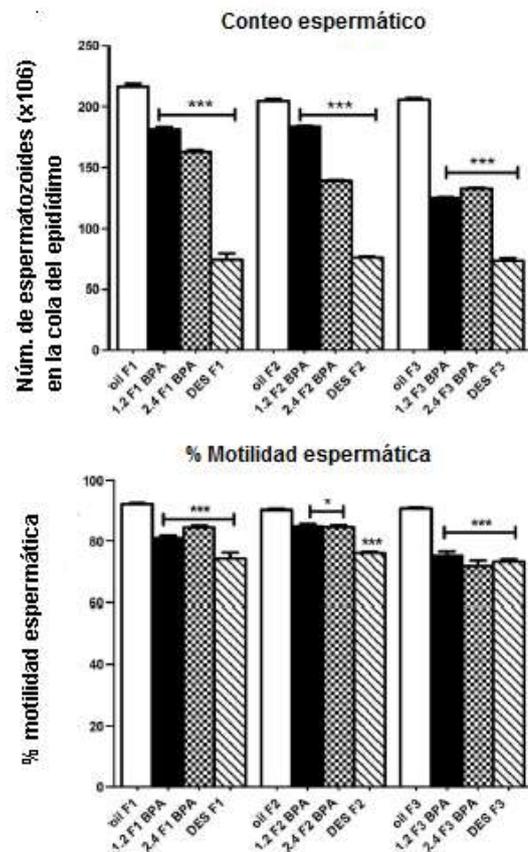


Ilustración 18: (Arriba) Disminución del recuento medio de espermatozoides por millones en la cola del epidídimo; (Abajo) % de motilidad espermática. En ratas machos adultas expuestas a 1,2µg y 2,4 µg de BPA y DES comparando con el control.

En un experimento de Gámez y cols., (2014), sometieron a ratas hembras a dosis de BPA bajas (3µg/kg/día) durante el periodo de preñez y estudiaron el efecto que ello tenía sobre los descendientes machos prepuberales. Así comprobaron que el peso testicular había disminuido en aquellos que habían sido expuestos, mientras que no se apreció diferencias significativas en cuanto a la vesícula seminal. Por otro lado, se analizaron los niveles séricos de LH y FSH, que aumentaron significativamente en los animales expuestos (Ilustración 19), al contrario que los niveles de testosterona que no variaron de un grupo a otro.

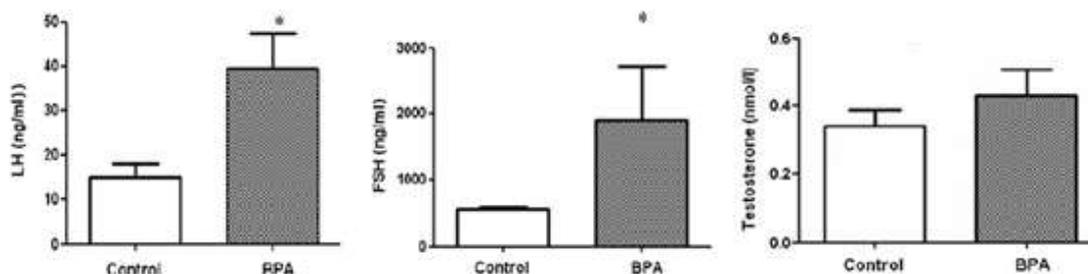


Ilustración 19: Niveles de LH, FH y testosterona en suero. (n = 6-11). Ilustración modificada de Gámez y cols., 2014.

Se sabe que la regulación de la función de la vesícula seminal es dependiente de andrógenos, por lo que sería de esperar que los cambios en los niveles de andrógenos modificaran el peso de la glándula sexual. Pero comprobaron que los niveles de testosterona no se vieron significativamente alterados tras la exposición a BPA, quedando justificado el hecho de que no se observara ningún cambio en el peso de la vesícula seminal.

Por otro lado, el peso de los testículos depende principalmente del número de Células de Sertoli. Estas células proliferan en un período preciso que comienza en la vida fetal y sigue en el período neonatal. Los datos demuestran que el peso testicular absoluto disminuye en los animales expuesto. Estos efectos podrían ser consecuencia de la unión de BPA a ER β presente en células de Sertoli. Estos receptores están ya presentes en las primeras etapas de desarrollo. BPA podría alterar la morfología de estas células mediante la unión a los receptores, y podría también disminuir el número de células, en consecuencia modificando el peso testicular.

El aumento de LH observado en animales expuestos al BPA puede explicarse por una posible reducción en el mecanismo de retroalimentación negativa de la testosterona, probablemente inducido por la acción antiandrogénica del BPA. Ya que se ha demostrado que, BPA afecta a múltiples etapas de la activación y la función de receptores androgénicos, lo cual inhibe la unión de los andrógenos nativos.

Por otra parte, el hecho de que la exposición a BPA aumente los niveles de FSH puede ser debido a su capacidad para interferir con la secreción de inhibina. Por lo que en futuros estudios sería de gran ayuda determinar los niveles de inhibina. Sin embargo, Gamez no descarta que BPA tenga un efecto directo a nivel hipotalámico mediante su unión a las neuronas a través del receptor de kisspeptina, receptor de proteína G acoplada.

Así mismo, Salian-Mehta y cols., (2014) demostraron que la exposición de ratas machos a una dosis baja de BPA durante el período neonatal es capaz de inducir alteraciones en la expresión de los receptores de esteroides testicular y sus co-reguladores durante el desarrollo. Tales perturbaciones afectan en la espermatogénesis de los recién nacidos y tienen impacto sobre la fertilidad durante la edad adulta.

La espermatogénesis es un proceso altamente coordinado fundamental para la fertilidad masculina que requiere una alta interacción de diferentes células, junto con la expresión de receptores esteroideos y los co-reguladores en una proporción definida. La diferencia en la sensibilidad hacia BPA y otros alteradores endocrinos pueden atribuirse mayormente a diferentes patrones de expresión. En el presente estudio las ratas expuestas en periodo neonatal a BPA mostraron menos ERs ($ER\beta$ y $ER\alpha$) y receptores androgénicos en las células de Sertoli a edad adulta, demostrando el efecto del BPA (Ilustración 20).

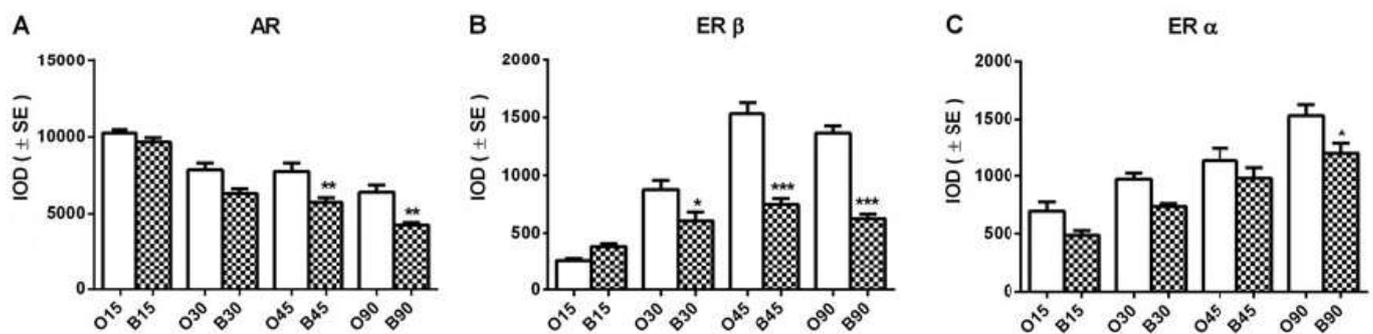


Ilustración 20: Efecto de la exposición neonatal a BPA en la intensidad de receptores esteroideos en el tejido testicular en los días postnatales 15, 30, 45 y 90: (A) Receptores androgénicos; (B) Receptor estrogénico beta; (C) Receptor estrogénico alfa. Análisis de imagen, IOD = densidad óptica integrada. B = grupo experimental; O = grupo control. Ilustración modificada de Salian-Mehta y cols., 2014.

Wisniewski y cols., (2015) investigaron la toxicidad reproductiva de BPA en ratas machos adultos. Las ratas fueron expuestas a 25 mg/kg de peso corporal/día a 5 mg/kg de peso corporal/día.

Los resultados mostraron que la exposición a BPA en la edad adulta reduce la producción de espermatozoides testiculares totales y diarios en aproximadamente un 50% en ratas de ambos grupos de BPA. Sin embargo, los resultados de experimentos llevados a cabo en animales de laboratorio adultos son contradictorios. Años antes, en el estudio Al-Hiyasat y cols., (2002) estimaron la fertilidad en ratones machos adultos (60 días) expuestos a 0, 5, 25 y 100 ng/kg BPA durante 30 días. Después del periodo de tratamiento cada macho se colocó en una jaula con dos hembras de la misma cepa vírgenes no tratadas. La fertilidad de los ratones se vio significativamente disminuida en aquellos machos que ingirieron 25 y 100 ng/kg por día durante 30 días, ya que se

observo que el número de hembras preñadas era menor. El peso de los testículos disminuía en todos los machos tratados con el compuesto al igual que el peso de la vesícula seminal. Un año más tarde, Chitra y cols. (2003) mostraron que ratas de 45 días de edad sometidas a tratamientos de BPA en dosis de 0,0002, 0,002 o 0,02 mg/kg presentaron una reducción dependiente de la dosis en la motilidad y el conteo de espermatozoides del epidídimo (Ilustración 21).

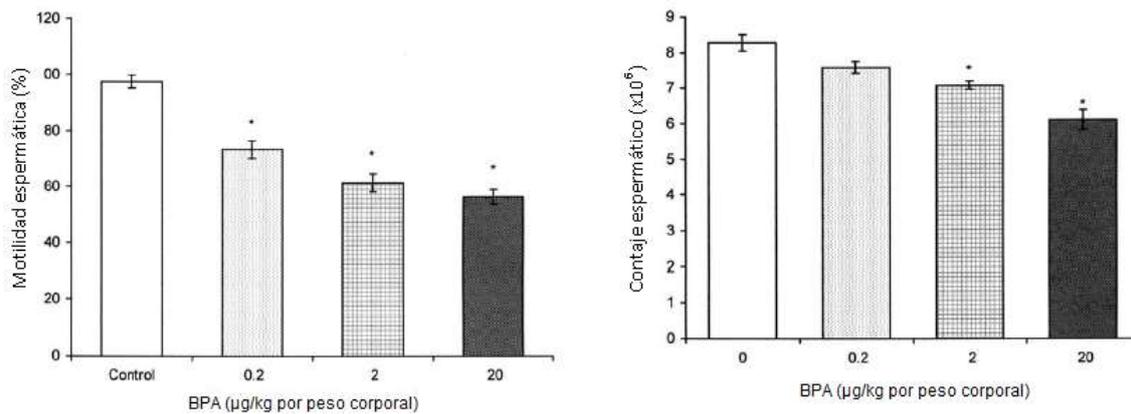


Ilustración 21: (Izquierda) Efecto del BPA en la motilidad de espermatozoides del epidídimo. (Derecha) Efecto del BPA en el conteo espermático en el epidídimo. Ilustración modificada de Chitra y cols., 2003.

Wisniewski y cols., además de una disminución de la producción, observaron que el movimiento de los espermatozoides a través del epidídimo fue rápido lo que puede comprometer al correcto desarrollo del espermatozoide. Durante la espermatogénesis, orgánulos citoplasmáticos se localizan en regiones específicas del espermatozoide para realizar funciones especializadas. Como resultado, las mitocondrias se encuentran en la región intermedia y generan energía para el flagelo, promoviendo así el movimiento. La integridad de la membrana de los espermatozoides también determina la capacidad de los espermatozoides para fertilizar el óvulo. Las sustancias tóxicas pueden alterar el metabolismo energético de la región intermedia y por consiguiente disminuir la fertilidad espermática. El estrés oxidativo inducido por sustancias tóxicas es la causa más común de daño al espermatozoide (Wisniewski y cols., 2015).

Más concretamente Chitra y cols., elaboraron un estudio en 2003 para evaluar el efecto de BPA en la inducción de estrés oxidativo en espermatozoides del epidídimo de ratas. En el presente estudio los animales tratados con BPA mostraron una disminución de las actividades de enzimas antioxidante superóxido dismutasa, catalasa,

glutación reductasa y glutación peroxidasa y un aumento de los niveles de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y la peroxidación lipídica en los espermatozoides del epidídimo de ratas en forma dependiente de la dosis. Si los espermatozoides no están provistos de sistemas de defensa antioxidante, las células no son capaces de eliminar los radicales libres lo que genera estrés oxidativo en ellas y por consiguiente daño en el ADN espermático.

También se han realizado estudios sobre BPA y los mecanismos epigenéticos que podría generar. El objetivo de Doshi y cols., (2011) es estudiar la metilación del ADN de la región del promotor del receptor estrogénico y también la maquinaria de metilación en los testículos de ratas adultas expuestas a BPA en su periodo neonatal.

La epigenética se define como el estudio de los procesos que inducen cambios heredables en la expresión génica pero sin cambios en la secuencia del ADN. Los cambios epigenéticos incluyen metilación del ADN, modificaciones en las histonas y ARN no codificantes, que regulan la expresión de genes sin afectar la secuencia del gen.

Las modificaciones epigenéticas a través de la metilación del ADN son cambios permanentes que se transmiten a las siguientes generaciones. La región del gen promotor citosina fosfato guanina (CpG) hipermetilada reprime la expresión de genes mientras que la hipometilación de dicha región incrementa la expresión. A su vez, la metilación del ADN es catalizado por ADN metiltransferasa (Dnmts), principalmente Dnmts 1, Dnmts3a y 3b.

El presente estudio demostró que la exposición neonatal de ratas machos a BPA indujeron la hipermetilación de la región promotora de ER α y β y causaron alteraciones en la expresión de Dnmts a nivel testicular durante la edad adulta. Lo que sugiere un efecto epigenético de BPA a través de la metilación aberrante del ADN.

Varios estudios muestran un aumento notable en enfermedades reproductivas, asociadas a la exposición de BPA. Dependiendo de la edad en la que se exponga el individuo el efecto será uno u otro, no obstante la fertilidad del varón se afecta a cualquier edad, teniendo repercusión en sus progenitores también.

5.3.2 Efecto del BPA en la reproducción femenina.

La exposición a EDCs diaria es uno de los principales factores que puede aumentar el riesgo de infertilidad de la mujer. El BPA es un EDC conocido que se utiliza ampliamente, por lo que los seres humanos están expuestos a este compuesto en su entorno. Estudios más recientes han demostrado que la exposición se asocia con la disfunción reproductiva en la mujer (Wang y cols., 2014).

En los mamíferos, la formación de los folículos primordiales en los ovarios es un proceso estrechamente regulado y crucial para la fertilidad femenina, y cualquier anomalía en dicho proceso puede resultar en la infertilidad. La formación empieza en la vida fetal, las células germinales primordiales (PGC) migran a la gónada y se dividen rápidamente ya que son los precursores de las oogonias que posteriormente se diferenciarán en ovocitos, gameto femenino. PGCs se dividen por mitosis pero no realizan citocinesis completa, las oogonias siguen conectadas por puentes intercelulares, formando nidos. Cuando se da la ruptura de los nidos, las oogonias entran en la meiosis I, hasta detenerse en diploteno de la profase I, dando lugar a ovocitos primarios. En este punto los ovocitos comienzan a separarse unos de otros y a rodearse por células de la granulosa, formando así los folículos primordiales (Zhang y cols., 2014).

En casi todas las hembras de los mamíferos, incluido el ser humano, la meiosis se inicia durante el desarrollo fetal en el útero y concluye cuando el ovocito es fecundado, en la edad adulta del individuo. La meiosis es un tipo especial de división celular que se caracteriza por la división reduccional del genoma, generando células haploides después de dos divisiones celulares tras la replicación del ADN. Durante la vida fetal se produce la primera profase meiótica, y los ovocitos primarios quedan detenidos en la fase diploteno hasta la pubertad (Briño-Enríquez y cols., 2012).

Durante la profase meiótica se dan algunos eventos importantes como los complejos sinápticos y la recombinación de cromosomas homólogos por el entrecruzamiento de las hebras. Estos procesos se dan a partir de la generación de DSBs a lo largo del genoma. Los DSBs deben ser reparados mediante recombinación homóloga ya sea mediante los cruces (COS, cuando las regiones que flanquean DSBs son intercambiados entre los homólogos) o como los no cruces (NCOS, cuando no ocurre intercambio entre los homólogos), para que el ciclo celular siga adelante. Cuando

el intercambio entre los cromosomas homólogos se realiza, aumenta la expresión de la proteína MLH1, proteína que se localiza en los sitios de intercambio meiótico, proteína asociada al entrecruzamiento (Briño-Enríquez y cols., 2012). Proceso semejante explicado anteriormente en los machos.

En el estudio de Wang y cols., (2014) para explorar el efecto *in utero* de BPA en las PGCs, realizaron evaluaciones histológicas y compararon los ovarios del grupo tratado con BPA y el grupo control, a día 4 postnacimiento de los ratones. Los datos muestran que todas las dosis de BPA administradas causan que mas células permanezcan en los nidos y se forme un menor número de folículos primordiales, comparando con los ovarios control (Ilustración 22)

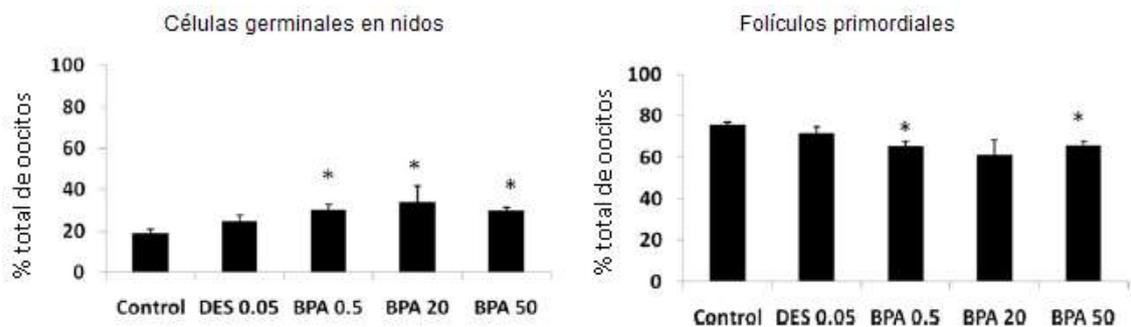


Ilustración 22: Efecto del BPA en la ruptura de los nidos de células germinales. Los ovarios se obtuvieron de una hembra por cada camada en día 4 postnacimiento y después se sometieron a evaluación histológica. El porcentaje de las células germinales que quedan en los nidos (panel izquierdo) y el porcentaje de folículos primordiales formados (panel derecho). Ilustración modificado de Wang y cols., 2014.

Mismo resultado se obtuvo en el estudio Zhang y cols., (2014). Para evaluar los efectos de la exposición al BPA en ovarios de ratones neonatales, los ovarios se cultivaron durante 3 días *in vitro*. La Ilustración 23 muestra que en el cultivo control el número de folículos primordiales es mayor que el porcentaje de células germinales en nidos; mientras que el cultivo tratado con BPA muestra mayor región de nidos y menor porcentaje de folículos primordiales.

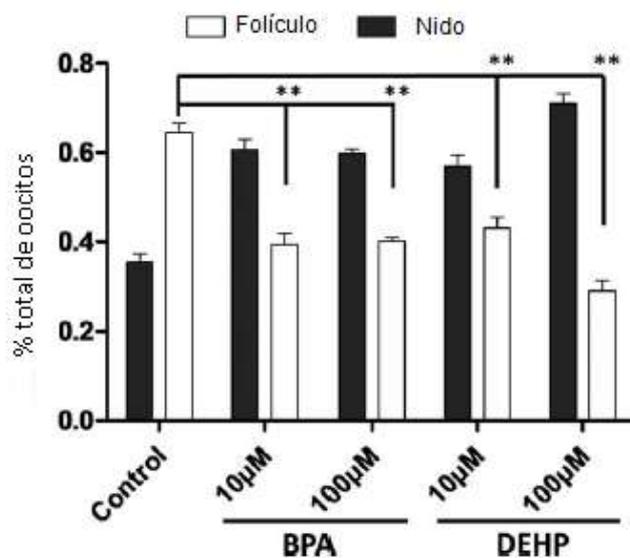


Ilustración 23: Porcentaje de células germinales en nidos y folículos en el cultivo control y expuestas a BPA y dietilhexil ftalato (DEHP). Ilustración modificado de Zhang y cols., 2014.

Ambos estudios (Wang y cols, 2014 y Zhang y cols., 2014) optaron por centrarse en el efecto del BPA en la ruptura del nido, definido como un proceso apoptótico. En los roedores dicha ruptura es provocada por la caída de los niveles de estrógenos alrededor del nacimiento. Dada la actividad estrogénica de BPA uno de los propósitos planteados es averiguar si el BPA interfiere en el proceso de apoptosis de las células germinales. Ambos estudios afirman que el BPA interrumpe el equilibrio entre los factores pro y anti-apoptóticos, alterando así la descomposición del nido.

Por otro lado, Susiarjo y cols., (2007) demostraron que la exposición *in utero* de BPA interrumpe la sinapsis y la recombinación en la profase meiótica en el ratón. Para analizar la profase meiótica, los ovarios fueron aislados de fetos femeninos en el día 18,5 de gestación. Realizaron análisis en ovocitos en paquiteno, etapa en la cual la sinapsis entre cromosomas homólogos es completa y los sitios de intercambio entre homólogos pueden ser detectables como focos MLH1 - positivos. Mediante el uso de anticuerpos SCP3 y MLH1 para visualizar el SC y detectar los intercambios, respectivamente, se analizaron las células de fetos femeninos tratados con placebo y expuestos a BPA. En cuanto a los resultados, encontraron un aumento significativo en anomalías sinápticas en ovocitos de hembras expuestas al BPA.

Lawson y cols., (2011) descubrieron un gran número de cambios sutiles en la expresión génica en el ovario fetal de ratón tras la exposición a BPA (20 ng/g)

(Ilustración 24). Los autores afirman que estos cambios podrían estar relacionados con los defectos en la recombinación y sinapsis de la meiosis.

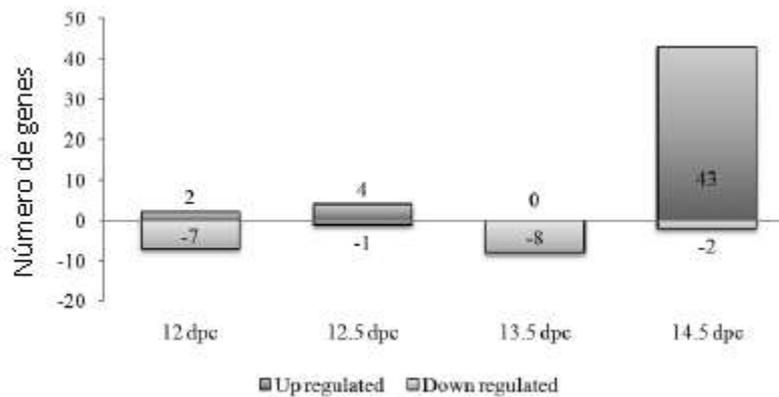


Ilustración 24: Genes meiosis específicos y candidatos a, afectados por BPA. De los 265 transcritos identificados, 67 de ellos se vieron regulados a la alza (up-regulated) o a la baja (down regulated) por BPA. Ilustración modificada de Lawson y cols., 2011.

Cabe destacar entre los genes estudiados la regulación a la alza de *Stra8*, un gen que se piensa que es la clave en relación con la entrada en la vía de la meiosis de las oogonias. La entrada meiótica es precedida por rondas sucesivas de proliferación mitóticas que amplía la población de las células germinales. Por lo tanto, si la exposición al BPA induce la entrada de la meiosis prematura, podría provocar la reducción del conjunto total de ovocitos. Esto tendría ramificaciones reproductivas importantes porque las hembras expuestas a BPA en el periodo perinatal no solo podrían tener un mayor riesgo de producir óvulos aneuploides (por los efectos en la meiosis) sino que también un mayor riesgo de senescencia reproductiva prematura.

En un estudio reciente, Ziv-Gal y cols., (2015) presentaron datos adicionales a los recogidos por Wang y cols., 2014. Wang y cols., examinaron los efectos de BPA en el útero sobre los resultados reproductivos de la generación F1 e informaron que el BPA provocaba un retraso en la edad de inicio del estro, diversos problemas en la fertilidad u aumento de crías muertas en comparación con los controles (Wang y cols., 2014).

Ziv-Gal y cols., analizaron además de la generación F1, las generaciones posteriores (F2 y F3). Los resultados indican que la edad de la abertura vaginal fue similar en todos los grupos en la generación F1 pero, se retrasó en los ratones F3 en los grupos expuestos a BPA (0,5µg/kg/día y 50µg/kg/día) (Ilustración 25).

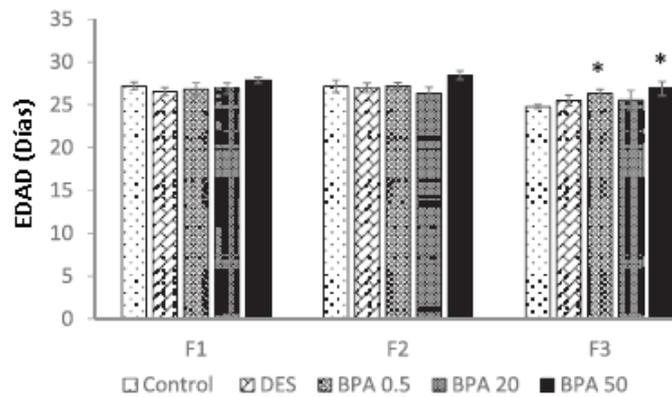


Ilustración 25: Los efectos de la exposición al BPA en el útero en el momento de la abertura vaginal en las generaciones F1-F3. n = 9 y 15 ratones por grupo de dosis. Los asteriscos representan una diferencia significativa con el grupo control. Ilustración modificada de Ziv-Gal y cols., 2015.

Sin embargo, estos datos difieren con los publicados en Honma y cols., (2002). Con el fin de aclarar el efecto *in vivo* de la exposición a dosis bajas de BPA durante el desarrollo prenatal, Honma y cols., examinaron la maduración sexual y la capacidad reproductiva en ratones hembras. Así, mostraron que la exposición a 20µg/kg/día en el útero BPA induce una abertura vaginal temprana comparando con el control (Ilustración 26). Sin embargo la función reproductiva no se vio afectada en las condiciones del presente estudio tras cruzar dichas hembras con machos sanos (Honma y cols., 2002).

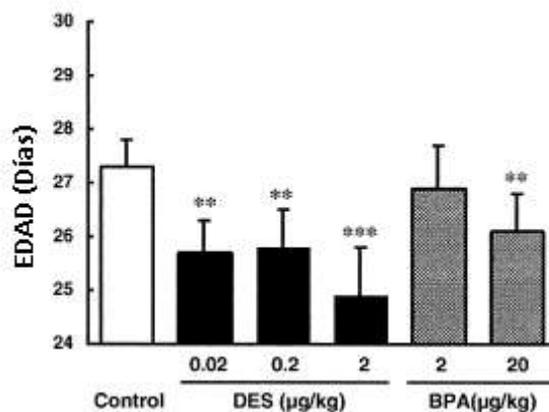


Ilustración 26: Edad de la abertura vaginal. n = 10 para cada grupo de dosis. Ilustración modificado de Honma y cols., 2002.

Ziv-Gal y cols., afirman que las diferencias en los datos recogidos no están claros pero que podría deberse a diferentes cepas de ratones utilizadas en los protocolos

experimentales, tiempo de exposición y diferentes dosis administradas en los estudios (Ziv-Gal y cols., 2015).

Por otro lado, Ziv-Gal y cols., observaron que el índice de apareamiento fue similar en todos los grupos estudiados y generaciones, lo que sugiere que la exposición al BPA en el útero no altera el comportamiento sexual de los animales. Por el contrario, disminuyó la capacidad de los ratones de mantener la gestación a medida que envejecían. Curiosamente, la disminución más pronunciada en el índice gestacional se observó con el tratamiento 0,5µg/kg/día en hembras a medida que la edad aumentaba (tanto en F1 y F2 a los 9 meses).

Es posible que esta dosis de BPA sea ovotóxica y que directamente dañe algunas células germinales durante el periodo perinatal y posteriormente dar lugar a ovocitos no saludables con modificaciones epigenéticas. Esto se basa en hallazgos anteriores de Susiarjo y cols., (2007) que demostraron que la exposición a BPA en el útero interfiere en la maduración y desarrollo de ovocitos de las hembras F1, lo que resulta en un mayor riesgo de producir aneuploidias.

Teniendo en cuenta los hallazgos anteriores, Gámez y cols., (2015) realizaron un trabajo de investigación para comprobar el efecto de la exposición prenatal y postnatal temprana (durante la lactancia) a dosis bajas de BPA en el eje HHG. La analítica hormonal mostró que los niveles séricos de LH y estradiol aumentaron significativamente en las ratas expuestas a BPA, mientras que los niveles de FSH no se modificaron (Ilustración 27). Estos cambios en las gonadotropinas pueden reflejar una función anómala del generador de impulsos GnRH. En este sentido, Fernández y cols., (2010) demostraron que la exposición al BPA aumenta la frecuencia del pulso GnRH, que lleva a un aumento en los niveles de LH.

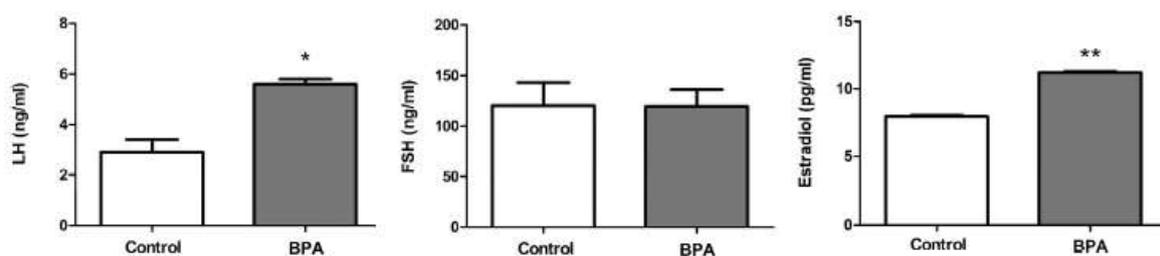


Ilustración 27: Niveles séricos de LH, FSH y estradiol respectivamente. (n = 6-11). Ilustración modificada de Gámez y cols., 2015.

Fernandez y cols., (2010) registraron en los resultados de su estudio que las ratas hembras expuestas a BPA en periodo neonatal presentan alteraciones en la secreción de GnRH, como demuestra la Ilustración 28, por una disminución en los intervalos de los impulsos de GnRH (IPI).

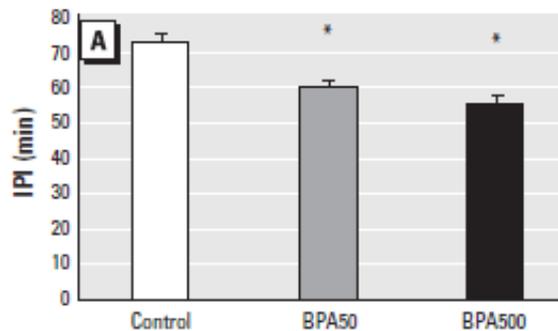


Ilustración 28: La exposición neonatal a BPA disminuye IPI en ratas hembras adultas, como se determina por la liberación de GnRH a través de explantes hipotalámicos in vitro. (n = 6 por tratamiento). Ilustración modificada de Fernández y cols., 2010.

Berger y cols., 2007 diseñaron un estudio para investigar el impacto de la exposición al BPA durante los primeros 5 días de gestación, periodo que coincide con la sincronización de la implantación en ratones. Abordaron dos vías de administración del compuesto, por inyección subcutánea y la ingesta de alimentos contaminados.

Las altas dosis de BPA por ingestión o inyección durante el período de implantación interrumpen las gestaciones en ratones inseminadas en el laboratorio. Las inyecciones subcutáneas dieron como resultado una disminución en el número medio de crías a partir de 3,375 mg/día de BPA. Además, a dosis de 10,125 mg/día hubo una reducción significativa en el número de las gestaciones, ya que se observó un menor número de crías nacidas en aquellas hembras que se les permitió dar a luz y un menor número de sitios de implantación en aquellas que se sacrificaron al de 6 días de la inseminación.

En ratones, el período de tiempo durante el cual el útero es receptivo para la implantación de un blastocisto es muy estrecho, y el tiempo de transporte de los óvulos fecundados por la trompa de Falopio es crítico. Los niveles elevados de estradiol en plasma alteran la velocidad a la que los óvulos fertilizados viajan a través de las trompas de Falopio. Exposición a altos niveles de BPA inducir un efecto similar y por lo tanto cuando el embrión alcanza el útero la ventana de implantación no estar abierta.

Además como muestra el estudio Takai y cols., (2000) las altas concentraciones de BPA pueden influir a nivel del embrión también. Takai y cols., examinaron el efecto de BPA *in vitro* en embriones en las primeras etapas de desarrollo, periodo preimplantacional. Cultivaron embriones de ratón de dos células a diferentes concentraciones de BPA para analizar la tasa de desarrollo. Así, demostraron que el compuesto químico en concentraciones bajas (1 a 3 nM) aumenta significativamente la tasa de desarrollo de embriones de ratón de dos células a blastocistos, mientras que una alta concentración (100µM) la disminuye (Ilustración 29).

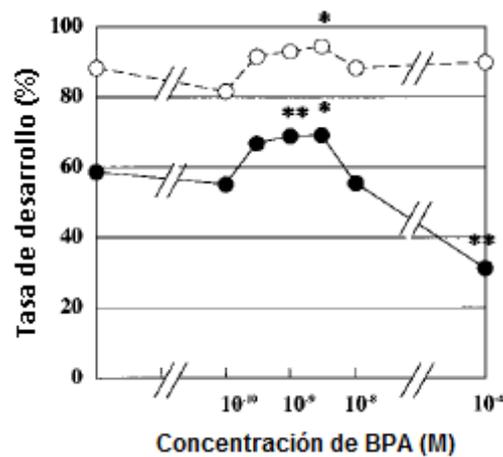


Ilustración 29: Efectos de BPA en el desarrollo de embriones de ratón de dos células cultivadas en presencia de las concentraciones indicadas y evaluado a intervalos de 24 h para el desarrollo de embriones de ocho células (○) y los blastocistos (●). Los símbolos * y ** indican $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente, en comparación con el desarrollo de embriones de control incubadas con vehículo (etanol 0,1%) solo. Los resultados son la suma de al menos tres análisis independientes; cada grupo consistía de 150 a 400 embriones. Ilustración modificado de Takai y cols., 2000.

Más adelante, Berger y cols., (2010) diseñaron un experimento para investigar la morfología uterina y la expresión de los receptores de esteroides estrógeno-dependientes, en respuesta a la exposición de BPA en la fase de implantación intrauterina del blastocisto (1-4 días después de la gestación en ratones).

Los datos demuestran que la exposición a dosis altas de BPA durante este periodo interrumpe la implantación intrauterina a la vez que altera drásticamente la morfología uterina. Después de las inyecciones diarias de BPA en los días 1-4 de la gestación, se observa una expansión considerable de la superficie luminal uterina y un aumento de la altura de las células del epitelio luminal (Ilustración 30).

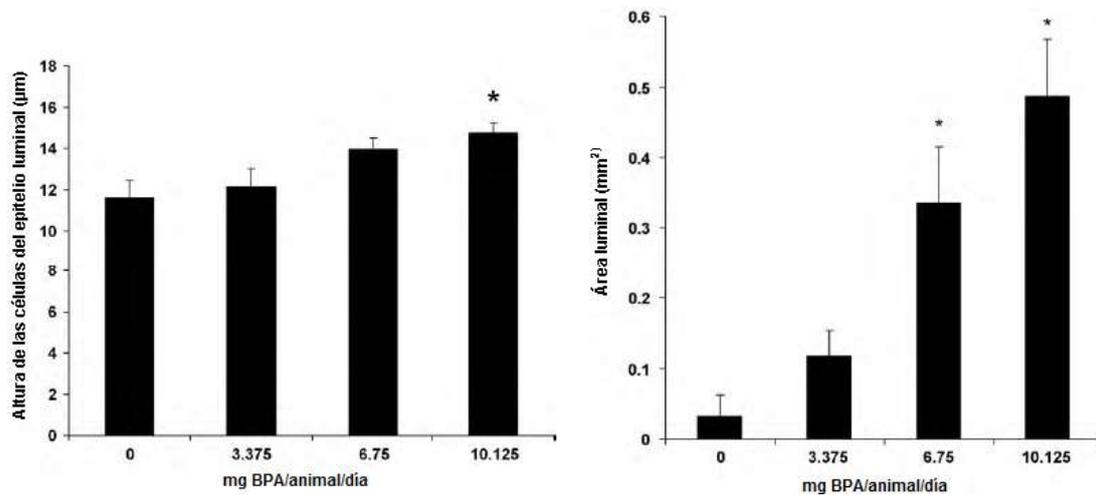


Ilustración 30: (Izquierda) Altura de las células del epitelio luminal uterino; (Derecha) Área luminal uterina. Hembras inseminadas en el laboratorio y muestras analizadas en el día 6 de gestación tras inyecciones subcutáneas de BPA en los días 1-4 de la gestación. Ilustración modificado de Berger y cols., 2010.

Tanto el desarrollo embrionario apropiado como un ambiente uterino adecuado son esenciales para una implantación exitosa. Las grandes alteraciones en la morfología uterina observados en el estudio sugiere que el BPA también puede ejercer su influencia a nivel uterino, lo que afecta su receptividad para la implantación del blastocisto. Así, el número de sitios de implantación desciende a medida que aumenta la concentración de BPA (Ilustración 31).

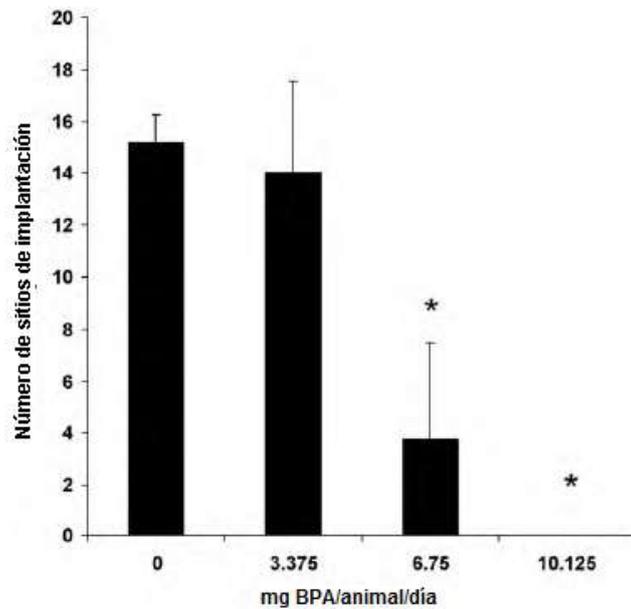


Ilustración 31: Número de sitios de implantación en el día 6 de la gestación tras inyecciones subcutáneas de BPA en los días 1-4 de la gestación. Ilustración modificada de Berger y cols., 2010.

Una de las mayores preocupaciones es que la exposición prenatal y postnatal temprana a BPA induce cambios multigeneracionales. Ejerce su efecto sobre el desarrollo de la gónada fetal a través de distintos mecanismos. Estudios han demostrado que afecta a la maduración meiótica del ovocito y limita el número de folículos primordiales disponibles mas tarde en la vida reproductiva de la hembra; además, conduce a alteraciones en el tracto reproductivo y en el inicio de la pubertad.

Estudio	Objetivo	Método	Resultado
Al-Hiyasat y cols., 2002	Analizar el efecto del BPA en la fertilidad de ratones machos.	Se administraron concentraciones diferentes de BPA por vía intragástrica a 40 ratones machos Swiss. La fertilidad masculina evaluó por apareamiento cada ratón con dos hembras no tratadas.	Los machos expuestos a BPA mostraron una reducción significativa en el número de espermatozoides, menor tasa de preñez y un número mayor de reabsorciones en de los embriones implantados.
Chitra y cols., 2003	Evaluar el efecto del BPA en la inducción de estrés oxidativo en espermatozoides del epidídimo de ratas.	A las ratas macho de raza Wistar (45 días) se les administro dosis graduadas de BPA y se midieron los niveles de expresión de enzimas antioxidantes con el método de Lowry.	Sometidas a tratamientos de BPA presentaron una reducción dependiente de la dosis en la motilidad y el conteo de espermatozoides del epidídimo. Además, una disminución de las actividades de enzimas antioxidante superóxido dismutasa , catalasa, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa y un aumento de los niveles de peróxido de hidrógeno (H2O2) y la peroxidación lipídica en los espermatozoides del epidídimo.
Doshi y cols., 2011	Estudiar la metilación del ADN de la región del promotor del receptor estrogénico y también la maquinaria de metilación en los testículos de ratas adultas expuestas a BPA en su período neonatal.	Ratas Holtzman preñadas. Los niveles de proteína testículos de Dnmt3a, Dnmt3b y actina fueron determinados por Western Blot. Cebadores específicos se utilizaron para determinar el nivel relativo de expresión de genes ER α , ER β y Dnmt3a mediante reacción en cadena de polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR).	La exposición neonatal de ratas machos a BPA indujeron la hipermetilación de la región promotora de ER α y β y causaron alteraciones en la expresión de Dnmts a nivel testicular durante la edad adulta. Lo que sugiere un efecto epigenético de BPA a través de la metilación aberrante del ADN
Gámez y cols., 2014	Analizar el efecto en machos prepuberales de dosis bajas de BPA durante la gestación.	Se detectaron los niveles séricos de las hormonas mediante radio inmunoensayo.	El peso testicular disminuye en aquellos que habían sido expuestos, mientras que no se apreció diferencias significativas en cuanto a la vesícula seminal. Los niveles séricos de LH y FSH, aumentan significativamente en los animales expuestos, pero no se vio alteración en la testosterona.
Liu y cols, 2013	Evaluar posibles efectos del BPA en la función reproductiva, el progreso de la meiosis en ratas machos adultas y explorar mecanismos relevantes involucrados.	Ratas Wistar de 8 semanas de edad. La morfología y motilidad se exploró de acuerdo a los parámetros de la OMS. La detección hormonal se realizó mediante inmunoensayo de quimioluminiscencia y radioinmunoensayo. El análisis de la meiosis se llevó a cabo mediante una técnica de inmunofluorescencia.	<i>In vivo</i> , la administración de 200 μ g/kg peso corporal/día redujo significativamente el número de espermatozoides en ratas macho adultas. La reducción en el recuento espermático se asoció con una interrupción meiótica y la consiguiente apoptosis en las células testiculares.

Tabla 7: Los artículos seleccionados para analizar el efecto que el bisfenol A tiene en la reproducción de los machos en animales de experimentación.

Estudio	Objetivo	Método	Resultado
Salian y cols., 2009	Analizar el efecto de BPA en la fertilidad masculina tras la exposición perinatal. Además examinaron el efecto en las siguientes dos generaciones.	Ratas Holtzman. Se estudia el efecto del compuesto en la fertilidad de machos expuestos observando las tasas de preñez.	La exposición perinatal de las ratas al BPA dio lugar a la reducción del número de espermatozoides y la motilidad en la descendencia masculina; se observó que estos machos eran subfértiles cuando se aparearon con hembras normales no expuestas al BPA. Estos efectos persistieron en las posteriores generaciones F2 y F3.
Salian-Mehta y cols., 2014	Demostrar que la exposición de ratas machos a una dosis baja de BPA durante el período neonatal es capaz de inducir alteraciones en la expresión de los receptores de esteroides testicular y sus co-reguladores durante el desarrollo.	Los niveles de expresión de los receptores se detectó mediante RT-PCR.	Las ratas expuestas en período neonatal a BPA mostraron menos ERs (ER β y ER α) y receptores androgénicos en las células de Sertoli a edad adulta.
Tiwari y Vanage y cols., 2013	Analizar el efecto mutagénico de BPA en las células germinales masculinas de ratas adultas.	El grado de daño en el ADN se evaluó mediante el ensayo cometa en el esperma epididimal obtenido de ratas tratadas con diferentes concentraciones de BPA.	Afirmaron que la acumulación de ADN dañado en los espermatozoides puede ser causado por la acumulación de DSBs.
Vrooman y cols., 2015	Demostrar que la exposición estrogénica neonatal interrumpe la meiosis de los ratones machos.	La detección se realizó mediante inmunotinción.	Observaron una reducción en los niveles de MLH1 y un aumento correspondiente en la insuficiencia de recombinación aparente. La exposición estrogénica altera las SSC.
Wisniewski y cols., 2015	Investigar la toxicidad reproductiva de BPA en ratas machos adultas.	Treinta ratas Wistar. Los espermatozoides se recogieron de la cola del epidídimo.	Los resultados mostraron que la exposición a BPA en la edad adulta reduce la producción de espermatozoides testiculares totales y diarios. Además, observaron que el movimiento de los espermatozoides a través del epidídimo fue rápido lo que puede comprometer al correcto desarrollo del espermatozoide.

Continuación Tabla 7: Los artículos seleccionados para analizar el efecto que el bisfenol A tiene en la reproducción de los machos en animales de experimentación.

Estudio	Objetivo	Método	Resultado
Berger y cols., 2007	Investigar el impacto de la exposición al BPA sobre la gestación durante los primeros 5 días.	Abordaron dos vías de administración del compuesto, por inyección subcutánea y la ingesta de alimentos contaminados. Ratones de la cepa CF- 1	Las altas dosis de BPA por ingestión o inyección durante el período de implantación interrumpen las gestaciones en ratones inseminadas en el laboratorio.
Berger y cols., 2010	Investigar la morfología uterina y la expresión de los receptores de esteroides estrógeno-dependientes, en respuesta a la exposición de BPA en la fase de implantación intrauterina del blastocisto.	Los ratones de la cepa CF- 1. En día seis de gestación se sacrifican los ratones y se analiza el sitio de implantación y la histomorfología del útero y los ovarios.	Los datos demuestran que la exposición a dosis altas de BPA durante este periodo interrumpe la implantación intrauterina a la vez que altera drásticamente la morfología uterina. Se observa una expansión considerable de la superficie luminal uterina y un aumento de la altura de las células del epitelio luminal.
Gámez y cols., 2015	Comprobar el efecto de la exposición prenatal y postnatal temprana (durante la lactancia) a dosis bajas de BPA en el eje HHG.	Para determinar la LH sérica y las concentraciones de FSH y estradiol se realizó quimio-luminiscencia y radioinmunoanálisis.	La analítica hormonal mostró que los niveles séricos de LH y estradiol aumentaron significativamente en las ratas expuestas a BPA, mientras que los niveles de FSH no se modificaron.
Fernandez y cols., 2010	Identificar el efecto de BPA en eje HHO.	Se identificaron los pulsos de la GnRH y los intervalos de interpulso (IPI) determinados por análisis Cluster8 (Veldhuis y Johnson 1986) utilizando software Pulse_XP.	Se registraron en los resultados de su estudio que las ratas hembras expuestas a BPA en periodo neonatal presentan alteraciones en la secreción de GnRH, por una disminución en los intervalos de los interpulsos de GnRH (IPI).
Honma y cols., 2002	Aclarar el efecto <i>in vivo</i> de la exposición a dosis bajas de BPA durante el desarrollo prenatal.	Ratones ICR/Jcl y se expusieron a BPA por vía subcutánea.	Examinaron la maduración sexual y la capacidad reproductiva en ratones hembras. Así, mostraron que la exposición a 20 µg/kg/día en el útero BPA induce una abertura vaginal temprana comparando con el control
Lawson y cols., 2011	Analizar la expresión génica relacionada con la meiosis en el ovario fetal de ratón tras la exposición a BPA.	Los fetos se eliminaron de los cuernos uterinos, y los ovarios fueron aislados de los fetos femeninos. Para el análisis genético, se determinó el ARN mediante "Affymetrix GeneChip Whole Transcript Sense Target Labeling Assay".	De los 265 transcritos identificados, 67 de ellos se vieron regulados a la alza (up-regulated) o a la baja (down-regulated).
Susiarjo y cols., 2007	Demostrar que la exposición <i>in utero</i> de BPA interrumpe la sinapsis y la recombinación en la profase meiótica en el ratón.	Ovarios fueron aislados de fetos femeninos en el día 18,5 de gestación. Realizaron inmunotinción con anticuerpos frente a SCP3 y MLH1 para analizar la sinapsis y recombinación, respectivamente.	Encontraron un aumento significativo en anomalías sinápticas en ovocitos de hembras expuestas al BPA.

Tabla 8: Los artículos seleccionados para analizar el efecto que el bisfenol A tiene en la reproducción de las hembras en animales de experimentación.

Estudio	Objetivo	Método	Resultado
Takai y cols., 2000	Examinar el efecto de BPA <i>in vitro</i> en embriones en las primeras etapas de desarrollo, periodo preimplantacional.	Ratones hembras B6C3F1 de cinco a 7 semanas de edad. El número de células de los blastocistos se determino añadiendo Hoechst 33258 y posterior observación bajo la luz ultravioleta mediante microscopía de fluorescencia.	Demostraron que el compuesto químico en concentraciones bajas aumenta significativamente la tasa de desarrollo de embriones de ratón de dos células a blastocistos, mientras que una alta concentración la disminuye.
Wang y cols., 2014	Explorar el efecto <i>in utero</i> de BPA en las PGCs realizaron evaluaciones histológicas y compararon los ovarios del grupo tratado con BPA y el grupo control, a día 4 postnacimiento de los ratones.	El análisis de la expresión de las células presentes en los ovarios se realizo mediante RT-PCR.	Los datos muestran que todas las dosis de BPA administradas causan que mas células permanezcan en los nidos y se forme un menor número de folículos primordiales, comparando con los ovarios control. Examinaron los efectos de BPA en el útero sobre los resultados reproductivos de la generación F1 e informaron que el BPA provocaba un retraso en la edad de inicio del estro, diversos problemas en la fertilidad u aumento de crías muertas en comparación con los controles.
Zhang y cols., 2014	Evaluar los efectos de la exposición al BPA en ovarios de ratones neonatales.	Los ovarios de ratones CD-1 se cultivaron durante 3 días <i>in vitro</i> . La inmunohistoquímica de fluorescencia para el conteo de ovocitos/folículos.	El cultivo control el número de folículos primordiales es mayor que el porcentaje de células germinales en nidos; mientras que el cultivo tratado con BPA muestra mayor región de nidos y menor porcentaje de folículos primordiales.
Ziv-Gal y cols., 2015	Analizar el efecto de la exposición fetal además de en la generación F1, en las generaciones posteriores (F2 y F3).	Ratones FVB. Las ratas fueron monitorizadas para detectarla abertura vaginal.	Los resultados indican que la edad de la abertura vaginal fue similar en todos los grupos en la generación F1 pero, se retraso en los ratones F3 en los grupos expuestos a BPA.

Continuación Tabla 8: Los artículos seleccionados para analizar el efecto que el bisfenol A tiene en la reproducción de las hembras en animales de experimentación.

6. CONCLUSIONES

- El BPA es un compuesto químico utilizado en la fabricación de policarbonato y resinas epoxi; Sus polímeros están presentes en los envases de comida y bebida, como botellas y latas.

- La esterilización (agua hirviendo hasta 10 minutos) de envases con BPA no provoca una mayor liberación del compuesto; pero, se han observado concentraciones del compuesto en los contenidos tras una exposición a temperaturas altas (> 25°C) en un tiempo más prolongado.

- Las exposiciones de BPA causadas por envases, están por debajo de los niveles marcados por EFSA (50µg/kg/día). Aun así, en 2011 se ha prohibido el uso de este aditivo en la UE, en productos que vayan a entrar en contacto directo con los niños.

- Experimentos *in vitro* (con tejidos o biomarcadores génicos estrógeno dependientes) e *in vivo* (ensayos uterotróficos por ejemplo) han demostrado la estrogenicidad del compuesto. El BPA se une a los ERs y actúa como agonista o antagonista dependiendo del tejido. También puede actuar por la vía de los segundos mensajeros, vía ERK/Akt y/o proteína G.

- Se han encontrado efectos del BPA en la reproducción masculina ya que produce una reducción en el número de espermatozoides y una peor motilidad de los mismos. Además se ha visto que afecta a las enzimas antioxidantes lo que hace que haya un aumento de estrés oxidativo que puede dañar al espermatozoide. También se ha visto un efecto epigenético a través de la metilación aberrante del DNA.

- Los estudios existentes muestran efectos del BPA en la reproducción femenina debidos a la exposición perinatal del mismo. El BPA interrumpe la sinapsis y la recombinación en la profase meiótica, lo que induce anomalías en los ovocitos. Por otro lado, las células realizan una meiosis prematura que podría provocar la reducción del conjunto total de ovocitos y un mayor riesgo de senescencia reproductiva prematura. La

exposición a BPA en la edad adulta en dosis altas provoca alteraciones morfológicas del útero reduciendo la receptividad de este llegando a interrumpir la gestación. Además se ha visto que un menor número de embriones llegan a blastocisto.

Conclusión final: La población está expuesta al BPA y estudios en animales de experimentación, roedores, demuestran que el compuesto tiene efectos negativos en la reproducción, confirmando así la hipótesis planteada.

7. REFERENCIAS

- Abrao, M. S., Muzii, L., y Marana, R. (2013). Anatomical causes of female infertility and their management. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 123, 18–24.
- Acconcia, F., Pallottini, V., y Marino, M. (2015). Molecular Mechanisms of Action of BPA. Dose-Response : A Publication of International Hormesis Society, 13.
- Al-Hiyasat, A. S., Darmani, H., y Elbetieha, A. M. (2002). Effects of bisphenol A on adult male mouse fertility. *European Journal of Oral Sciences*, 110(17), 163–167.
- Almey, A., Milner, T. A., y Brake, W. G. (2015). Estrogen receptors in the central nervous system and their implication for dopamine-dependent cognition in females. *Hormones and Behavior*, 74, 125–138.
- Alves, M. G., Rato, L., Carvalho, R. A., Moreira, P. I., Socorro, S., y Oliveira, P. F. (2013). Hormonal control of Sertoli cell metabolism regulates spermatogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70, 777–793.
- An, B. S., Kang, S. K., Shin, J. H., y Jeung, E. B. (2002). Stimulation of calbindin-D9k mRNA expression in the rat uterus by octyl-phenol, nonylphenol and bisphenol. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 191, 177–186.
- Ben-Jonathan, N., y Steinmetz, R. (1998). Xenoestrogens: The emerging story of bisphenol A. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 9(3), 124–128.
- Berger, R. G., Foster, W. G., y deCatanzaro, D. (2010). Bisphenol-A exposure during the period of blastocyst implantation alters uterine morphology and perturbs measures of estrogen and progesterone receptor expression in mice. *Reproductive Toxicology*, 30(3), 393–400.
- Berger, R. G., Hancock, T., y deCatanzaro, D. (2007). Influence of oral and subcutaneous bisphenol-A on intrauterine implantation of fertilized ova in inseminated female mice. *Reproductive Toxicology*, 23, 138–144.
- Bergeron, R. M., Thompson, T. B., Leonard, L. S., Pluta, L., y Gaido, K. W. (1999). Estrogenicity of bisphenol A in a human endometrial carcinoma cell line. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 150, 179–87.
- Beshay, V. E. y Carr, B. R. (2013) Hypothalamic-Pituitary-Ovarian Axis and Control of the Menstrual Cycle. En Falcone, T., y Hurd, W. W. (2013). *Clinical Reproductive Medicine and Surgery*, 31-42.
- Brieño-Enríquez, M. A., Reig-Viader, R., Cabero, L., Toran, N., Martínez, F., Roig, I., y Caldés, M. G. (2012). Gene expression is altered after bisphenol A exposure in human fetal oocytes in vitro. *Molecular Human Reproduction*, 18(4), 171–183.

- Casals-Casas, C., y Desvergne, B. (2011). Endocrine disruptors: from endocrine to metabolic disruption. *Annual Review of Physiology*, 73, 135–162.
- Chitra, K. C., Latchoumycandane, C., y Mathur, P. P. (2003). Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm of rats. *Toxicology*, 185, 119–127.
- Colborn, T., vom Saal, F. S., y Soto, A. M. (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives*, 101, 378–384.
- Cummings, A. M., y Laws, S. C. (2000). Assessment of estrogenicity by using the delayed implanting rat model and examples. *Reproductive Toxicology*, 14, 111–117.
- Dagklis, T., Ravanos, K., Makedou, K., Kourtis, A., y Rousso, D. (2015). Common features and differences of the hypothalamic–pituitary–gonadal axis in male and female. *Gynecological Endocrinology*, 31, 14–17.
- Dang, V. H., Nguyen, T. H., Lee, G. S., Choi, K. C., y Jeung, E. B. (2009). In vitro exposure to xenoestrogens induces growth hormone transcription and release via estrogen receptor-dependent pathways in rat pituitary GH3 cells. *Steroids*, 74, 707–714.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller, R. T., Gore, A. C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrinology Review*, 30, 293–342.
- Doshi, T., Mehta, S. S., Dighe, V., Balasinar, N., y Vanage, G. (2011). Hypermethylation of estrogen receptor promoter region in adult testis of rats exposed neonatally to bisphenol A. *Toxicology*, 289, 74–82.
- Efsa. (2015). Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of of bisphenol A (BPA) in foodstuffs: Part I – Exposure assessment. *EFSA Journal*, 13(1), 3978.
- Errico, S., Bianco, M., Mita, L., Migliaccio, M., Rossi, S., Nicolucci, C., Menale, C., Portaccio, M., Gallo, P., Mita, D. G. y Diano, N. (2014). Migration of bisphenol A into canned tomatoes produced in Italy: Dependence on temperature and storage conditions. *Food Chemistry*, 160, 157–164.
- Fernández, M., Bourguignon, N., Lux-Lantos, V., y Libertun, C. (2010). Neonatal exposure to bisphenol A and reproductive and endocrine alterations resembling the polycystic ovarian syndrome in adult rats. *Environmental Health Perspectives*, 118(9), 1217–1222.
- Ferreira, I., Urrutia, G., y Alonso-Coello, P. (2011). Revisión sistemática y metaanálisis: bases conceptuales e interpretación. *Revista Española de Cardiología*, 64, 688–696.

- Fuhrman, V. F., Tal, A., y Arnon, S. (2015). Why endocrine disrupting chemicals (EDCs) challenge traditional risk assessment and how to respond. *Journal of Hazardous Materials*, 286, 589–611.
- Galloway, T. S. (2015). Micro- and Nano-plastics and Human Health. En Bergmann, M., Gutow, L., Klages, M. (2015). *Marine Anthropogenic Litter* (pp.343-366).
- Gámez, J. M., Penalba, R., Cardoso, N., Bernasconi, P. S., Carbone, S., Ponzio, O., Pandolfi, M., Scacchi, P. y Reynoso, R. (2015). Exposure to a low dose of bisphenol A impairs pituitary-ovarian axis in prepubertal rats. Effects on early folliculogenesis. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 39(1), 9–15.
- Gámez, J. M., Penalba, R., Cardoso, N., Ponzio, O., Carbone, S., Pandolfi, M., Scacchi, P., Reynoso, R. (2014). Low dose of bisphenol A impairs the reproductive axis of prepuberal male rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 70, 239–246.
- Goldman, J. M., Murr, A. S., y Cooper, R. L. (2007). The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology*, 80(2), 84–97.
- Hall, J. E. (2010). *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. Elsevier Health Sciences.
- Ho, P. W. L., Tse, Z. H. M., Liu, H. F., Lu, S., Ho, J. W. M., Kung, M. H. W., Ramsden, D. B., y Ho, S. L. (2013). Assessment of Cellular Estrogenic Activity Based on Estrogen Receptor-Mediated Reduction of Soluble-Form Catechol-O-Methyltransferase (COMT) Expression in an ELISA-Based System. *PLoS ONE*, 8(9), 1–7.
- Honma, S., Suzuki, A., Buchanan, D. L., Katsu, Y., Watanabe, H., y Iguchi, T. (2002). Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reproductive Toxicology*, 16, 117–122.
- Hwang, K. A., Park, M. A., Kang, N. H., Yi, B. R., Hyun, S. H., Jeung, E. B., y Choi, K. C. (2013). Anticancer effect of genistein on BG-1 ovarian cancer growth induced by 17 β -estradiol or bisphenol A via the suppression of the crosstalk between estrogen receptor α and insulin-like growth factor-1 receptor signaling pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 272(3), 637–46.
- Inhorn, M. C., y Patrizio, P. (2014). Infertility around the globe: New thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Human Reproduction Update*, 21, 411–426.
- Issop, L., Rone, M. B., y Papadopoulos, V. (2013). Organelle plasticity and interactions in cholesterol transport and steroid biosynthesis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 371, 34–46.

- Jin, J. M., y Yang, W. X. (2014). Molecular regulation of hypothalamus-pituitary-gonads axis in males. *Gene*, 551, 15–25.
- Klenke, U., Constantin, S., y Wray, S. (2016). BPA directly decreases GnRH neuronal activity via non-canonical pathway. *Endocrinology*.
- Krausz, C. (2011). Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Clinical Endocrinology and Metabolism*, 25, 271–85.
- Kubwabo, C., Kosarac, I., Stewart, B., Gauthier, B. R., Lalonde, K., y Lalonde, P. J. (2009). Migration of bisphenol A from plastic baby bottles, baby bottle liners and reusable polycarbonate drinking bottles. *Food Additives and Contaminants. Part A, Chemistry Analysis Control Exposure and Risk Assessment*, 26, 928–937.
- Laredo, S. A., Landeros, R. V., y Trainor, B. C. (2014). Rapid effects of estrogens on behavior: Environmental modulation and molecular mechanisms. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 35, 447–458.
- Lawson, C., Gieske, M., Murdoch, B., Ye, P., Li, Y., Hassold, T., y Hunt, P. A. (2011). Gene expression in the fetal mouse ovary is altered by exposure to low doses of bisphenol A. *Biology of Reproduction*, 84, 79–86.
- Li, J., Mao, R., Zhou, Q., Ding, L., Tao, J., Ran, M. M., Gao, E. S., Yuan, W., Wang, J. T y Hou, L.F. (2016). Exposure to bisphenol A (BPA) in Wistar rats reduces sperm quality with disruption of ERK signal pathway. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 6516, 1–9.
- Li, L., Wang, Q., Zhang, Y., Niu, Y., Yao, X., y Liu, H. (2015). The molecular mechanism of bisphenol A (BPA) as an endocrine disruptor by interacting with nuclear receptors: Insights from molecular dynamics (MD) simulations. *PLoS ONE*, 10, 1–18.
- Liu, C., Duan, W., Li, R., Xu, S., Zhang, L., Chen, C., He, M., Lu, Y., Wu, H., Pi, H., Luo, X., Zhang, Y., Zhong, M., Yu, Z., y Zhou, Z. (2013). Exposure to bisphenol A disrupts meiotic progression during spermatogenesis in adult rats through estrogen-like activity. *Cell Death and Disease*, 4, e676.
- Luciano, A. A., Lanzone, A., y Goverde, A. J. (2013). Management of female infertility from hormonal causes. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, 123, 9–17.
- Maragou capitulo de un libro Cao, X. L., y Corriveau, J. (2008). Migration of bisphenol A from polycarbonate baby and water bottles into water under severe conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6378–6381.
- Markey, C. M., Michaelson, C. L., Veson, E. C., Sonnenschein, C., y Soto, A. M. (2001). The mouse uterotrophic assay: A reevaluation of its validity in assessing the estrogenicity of bisphenol A. *Environmental Health Perspectives*, 109(1), 55–60.

- Marques-Pinto, A., y Carvalho, D. (2013). Human infertility: are endocrine disruptors to blame? *Endocrine Connections*, 2, 15–29.
- Mascarenhas, M. N., Cheung, H., Mathers, C. D., y Stevens, G. A. (2012). Measuring infertility in populations: constructing a standard definition for use with demographic and reproductive health surveys. *Population Health Metrics*, 10, 17.
- Melmed, S., Polonsky, K. S., Larsen, P. R., y Kronenberg, H. M. (2011). *Williams textbook of endocrinology*. Elsevier Health Sciences.
- Munguia-Lopez, E. M., y Soto-Valdez, H. (2001). Effect of heat processing and storage time on migration of bisphenol A (BPA) and bisphenol A-diglycidyl ether (BADGE) to aqueous food simulant from Mexican can coatings. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3666–3671.
- Muthukumar, S., Rajesh, D., Saibaba, G., Alagesan, A., Rengarajan, R. L., y Archunan, G. (2013). Urinary Lipocalin Protein in a Female Rodent with Correlation to Phases in the Estrous Cycle: An Experimental Study Accompanied by In Silico Analysis. *PLoS ONE*, 8(8), 1–10.
- Nam, S. H., Seo, Y. M., y Kim, M. G. (2010). Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottle with repeated use. *Chemosphere*, 79(9), 949–952.
- Ng, H. W., Perkins, R., Tong, W., y Hong, H. (2014). Versatility or promiscuity: The estrogen receptors, control of ligand selectivity and an update on subtype selective ligands. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11, 8709–8742.
- Pikuleva, I. A. y Waterman, M. R. (2013). Cytochromes P450: Roles in diseases. *Journal of Biological Chemistry*, 288(24), 17091–17098.
- Prasad, M., Kaur, J., Pawlak, K. J., Bose, M., Whittal, R. M., y Bose, H. S. (2015). Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) regulates steroidogenic activity via steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2) interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 290, 2604–2616.
- Rogers, J. A., Metz, L., y Yong, V. W. (2013). Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: A focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Molecular Immunology*, 53, 421–430.
- Rowell, C., Kuiper, N., y Preud'Homme, H. (2016). Is container type the biggest predictor of trace element and BPA leaching from drinking water bottles? *Food Chemistry*, 202, 88–93.
- Rubin, B. S. (2011). Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127, 27–34.

- Salian, S., Doshi, T., y Vanage, G. (2009). Perinatal exposure of rats to Bisphenol A affects fertility of male offspring. *Life Sciences*, 85, 742-752.
- Salian-Mehta, S., Doshi, T., y Vanage, G. (2014). Exposure of neonatal rats to the endocrine disrupter Bisphenol A affects ontogenic expression pattern of testicular steroid receptors and their coregulators. *Journal of Applied Toxicology*, 34, 307-318.
- Sánchez-Meca, J. (2010). Cómo realizar una revisión sistemática y un meta-análisis. *Aula Abierta*, 38, 53-63.
- Saunders, P. T. K. (2005). Does estrogen receptor beta play a significant role in human reproduction? *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 16, 222-227.
- Schafer, T. E., Lapp, C. A., Hanes, C. M., Lewis, J. B., Wataha, J. C., y Schuster, G. S. (1999). Estrogenicity of bisphenol A and bisphenol A dimethacrylate in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research*, 45, 192-197.
- Skorupskaite, K., George, J. T., y Anderson, R. A. (2014). The kisspeptin-GnRH pathway in human reproductive health and disease. *Human Reproduction Update*, 20(4), 485-500.
- Smiley, D. A., y Khalil, R. A. (2009). Estrogenic compounds, estrogen receptors and vascular cell signaling in the aging blood vessels. *Current Medicinal Chemistry*, 16, 1863-87.
- Strauss III, J. F., y Barbieri, R. L. (2013). *Yen & Jaffe's reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology, and clinical management*. Elsevier Health Sciences.
- Susiarjo, M., Hassold, T. J., Freeman, E., y Hunt, P. A. (2007). Bisphenol A exposure in utero disrupts early oogenesis in the mouse. *PLoS Genetics*, 3(1), 63-70.
- Takai, Y., Tsutsumi, O., Ikezuki, Y., Hiroi, H., Osuga, Y., Momoeda, M., Yano, T. y Taketani, Y. (2000). Estrogen receptor-mediated effects of a xenoestrogen, bisphenol A, on preimplantation mouse embryos. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 270, 918-921.
- Tiwari, D., y Vanage, G. (2013). Mutagenic effect of Bisphenol A on adult rat male germ cells and their fertility. *Reproductive Toxicology*, 40, 60-68.
- Tng, E. (2015). Kisspeptin signalling and its roles in humans. *Singapore Medical Journal*, 56, 649-656.
- Vrooman, L. A., Oatley, J. M., Griswold, J. E., Hassold, T. J., y Hunt, P. A. (2015). Estrogenic Exposure Alters the Spermatogonial Stem Cells in the Developing Testis, Permanently Reducing Crossover Levels in the Adult. *PLoS Genetics*, 11, 1-20.
- Wang, W., Hafner, K. S., y Flaws, J. A. (2014). In utero bisphenol A exposure disrupts germ cell nest breakdown and reduces fertility with age in the mouse. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 276(2), 157-164.

- WHO (World Health Organization) (2009). World Health Statistics 2009.
- WHO/UNEP (World Health Organization/United Nations Environment Programme). State-of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals 2012; Bergman, A., Heindel, J.J., Jobling, S., Kidd, K. A., Zoeller, R.T., Eds.; WHO Press: Geneva, Switzerland, 2013.
- Wisniewski, P., Romano, R. M., Kizys, M. M. L., Oliveira, K. C., Kasamatsu, T., Giannocco, G., Chiamolera, M. I., Dias-da-Silva, M. R., y Romano, M. A. (2015). Adult exposure to bisphenol A (BPA) in Wistar rats reduces sperm quality with disruption of the hypothalamic-pituitary-testicular axis. *Toxicology*, 329, 1–9.
- Zhang, L., Ding, S., Qiao, P., Dong, L., Yu, M., Wang, C., Zhang, M., Zhang, L., Li, Y., Tang, N. y Chang, B. (2016). N-butylparaben induces male reproductive disorders via regulation of estradiol and estrogen receptors. *Journal of Applied Toxicology*, 29.
- Zhang, T., Li, L., Qin, X. S., Zhou, Y., Zhang, X. F., Wang, L. Q., De Felici, M., Chen, H., Qin, G. Q. y Shen, W. (2014). Di- (2-ethylhexyl) phthalate and bisphenol A exposure impairs mouse primordial follicle assembly in vitro. *Environmental and molecular mutagenesis*, 55(4), 343-353.
- Ziv-Gal, A., Wang, W., Zhou, C. y Flaws, J. A. (2015). The effects of in utero bisphenol A exposure on reproductive capacity in several generations of mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 284, 353-362.