



Universidad de Oviedo

EFFECTOS DEL BISFENOL A SOBRE LA RESPUESTA DÍPSICA EN RATAS OVARIECTOMIZADAS

Máster Universitario en Biología y Tecnología de la Reproducción

Autora: Laura García Sánchez

Tutoras: Carmen Perillán Méndez

Paula Núñez Martínez

JULIO 2016

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero dar las gracias a mis tutoras, la Dra. Carmen Perillán y la Dra. Paula Núñez, del área de Fisiología de la Universidad de Oviedo, por guiarme y enseñarme durante la realización de este trabajo y por estar siempre dispuestas a ayudarme en cada momento en el que lo necesité. Las dos habéis hecho que me apasione un tema del que poco sabía, sois motivadoras y esto ha hecho que este Máster haya sido duro pero a la vez estimulante.

Quiero dar las gracias también al Dr. Juan Argüelles, puesto que siempre que se le necesitó nos brindó su ayuda sin ni siquiera tener que pedírsela.

Asimismo, no puede faltar mi agradecimiento a mi gran compañero Alejandro. Ha sido para mí una fuente de inspiración por su dinamismo, buena predisposición y alegría.

Gracias al resto de mis compañeros/as por ser como sois, de todos/as he aprendido algo y siempre bueno. Este Máster no habría sido lo mismo sin estar todos y cada uno de ellos/as.

Estos meses han sido de mucho trabajo pero ha merecido la pena.

ABREVIATURAS

- **ADH:** hormona antidiurética
- **ADX:** adrenalectomizadas
- **Aldo:** aldosterona
- **Ang II:** angiotensina II
- **ANP:** péptido natriurético
- **AT1:** receptor de angiotensina II tipo I
- **BPA:** bisfenol-A
- **C:** control
- **CaMKII:** Ca-calmodulina cinasa II
- **DE:** disruptor endocrino
- **ECA:** enzima convertidora de angiotensina
- **EEM:** error estándar de la media
- **EPA:** Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
- **ER:** receptor estrogénico
- **E2:** estradiol
- **LEC:** líquido extracelular
- **LIC:** líquido intracelular
- **MR:** receptor de mineralocorticoides
- **Na⁺:** sodio
- **NO:** óxido nítrico
- **p.c.:** peso corporal
- **OCVs:** órganos circunventriculares
- **OS:** estrés oxidativo
- **OT:** oxitocina
- **OVLT:** órgano vasculoso de la lámina terminal
- **OVX:** ovariectomía
- **SFO:** órgano subfornical
- **SRAA:** sistema renina-angiotensina-aldosterona
- **ROS:** especies reactivas de oxígeno
- **s.c.:** subcutáneo

- **SNC:** sistema nervioso central
- **SNS:** sistema nervioso simpático
- **UI:** unidades internacionales
- **VP:** vasopresina

ÍNDICE

RESUMEN.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1. Regulación del fluido corporal.....	10
1.1.1. La regulación osmótica.....	10
1.1.2. La regulación del volumen.....	12
1.1.3. La sed.....	15
1.1.3.1. Tipos de sed.....	16
1.1.3.1.1. La sed por deshidratación intracelular u osmótica.....	16
1.1.3.1.2. Sed por deshidratación extracelular o hipovolémica,.....	17
1.2. Estrógenos.....	18
1.2.1. Mecanismos de actuación.....	18
1.2.2. Influencia sobre la osmolalidad y volumen de los fluidos corporales.....	20
1.2.3. Menopausia inducida.....	21
1.3. Nuevas sustancias sintéticas con efecto estrogénico: Bisfenol A (BPA).....	22
1.3.1. Mecanismos de disrupción endocrina.....	24
1.3.2. Exposición humana/animal al BPA.....	24
1.3.3. Modo de acción.....	24
1.3.4. Curva dosis-dependiente.....	25
1.3.5. Administración de BPA.....	26
1.4. Hipótesis.....	27
1.5. Objetivo.....	27
2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
2.1. Ovariectomía bilateral.....	29
2.1.1. Procedimiento.....	30
2.1.2. Valoración postquirúrgica tras 24 h de los animales.....	30
2.2. Ingesta hidrosalina y test de deprivación hídrica.....	30
2.3. Otros parámetros valorados.....	31
2.3.1. Extracción de sangre.....	31
2.3.2. Medición de la glucemia.....	31
2.3.3. Extracción y pesado de órganos.....	31
2.3.4. Osmolalidad.....	32
2.4. Estadísticos.....	32
3. RESULTADOS.....	33

3.1. Ingesta diaria	33
3.2. Peso de los individuos experimentales y grasa abdominal	35
3.3. Test de deprivación hídrica	36
3.4. Test de preferencia por NaCl:.....	38
3.5. Hematocrito y glucemia	38
3.6. Osmolalidad del plasma sanguíneo.....	40
3.7. Oviductos	40
4. DISCUSIÓN.....	42
5. CONCLUSIONES.....	48
6. BIBLIOGRAFÍA.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Fig. 1. Regulación osmótica frente a una subida de Na ⁺ en plasma.....	11
Fig. 2. Respuestas integradas a los cambios de volemia y presión arterial.....	13
Fig. 3. Sistema renina-angiotensina (RAS) y efectos de la angiotensina II.	15
Fig. 4. Tipos de sed. Izqda.: sed hipovolémica o extracelular; dcha.: sed osmótica o intracelular.....	16
Fig. 5. Esquema del modo de acción de los distintos tipos de sed.....	18
Fig. 6. Efectos de los estrógenos frente a hipovolemia.	21
Fig.7. Estructura molecular del bisfenol A.....	23
Fig. 8. Estructura del Estradiol y del Bisfenol A.	25
Fig. 9. Comparación de la típica curva monotónica dosis-respuesta (izqda.) que siguen ciertas sustancias con la curva no monotónica del BPA (dcha.).	26
Fig. 10. Habitación con condiciones estándar y jaulas de confinamiento individuales.	28
Fig. 11. Control del peso con balanza de las ratas y de la comida.	29
Fig. 12. Representación de una ovariectomía bilateral en rata.....	29
Fig. 13. Osmómetro de presión de vapor	32
Fig. 14. Ingesta diaria de comida (g/100g de p.c./día) de los 3 grupos experimentales: control (C), estradiol (E2) y bisfenol-A (BPA), de ratas hembras OVX.....	33
Fig. 15. Ingesta diaria de agua (g/100g de p.c./día) de los 3 grupos experimentales: control (C), estradiol (E2) y bisfenol-A (BPA), de ratas hembras OVX.....	34
Fig. 16. Ingesta diaria de solución salina (g/100g de p.c./día) de los 3 grupos experimentales: control (C), estradiol (E2) y bisfenol-A (BPA), de ratas hembras OVX.	34
Fig. 17. Evolución del peso corporal (g) en los distintos grupos tratamiento: control (C), estradiol (E2) y bisfenol-A (BPA), de ratas hembras OVX.	35
Fig. 18. Variación de la cantidad de grasa abdominal (g) en los distintos grupos experimentales: control (C), estradiol (E2) y bisfenol-A (BPA), en ratas hembras OVX.	36
Fig. 19. Ingesta de agua tras 24 horas de Deprivación hídrica. El test se realizó en los 3 grupos experimentales: control (C), estradiol (E2) y bisfenol-A (BPA), de ratas hembras OVX.....	37

Fig. 20. Ingesta salino (2.7%) tras 24 horas de Deprivación hídrica. El test se realizó en los 3 grupos experimentales: control (C), estradiol (E2) y bisfenol-A (BPA), de ratas hembras OVX.....	37
Fig. 21. Test de preferencia por el NaCl (%) de los distintos grupos experimentales: control (C), estradiol (E2) y bisfenol-A (BPA), en ratas hembras OVX, diariamente (izqda.) y durante el test de deprivación (dcha.).....	38
Fig. 22. Hematocrito (%) de los 3 grupos experimentales: control (C), estradiol (E2) y bisfenol-A (BPA), de ratas hembras OVX al final del tratamiento.....	39
Fig. 23. Glucemia (mg/dl) de los 3 grupos experimentales: control (C), estradiol (E2) y bisfenol-A (BPA), de ratas hembras OVX al final del tratamiento.....	39
Fig. 24. Osmolalidad (mmol/kg) de los 3 grupos experimentales: control (C), estradiol (E2) y bisfenol-A (BPA), de ratas hembras OVX al final del tratamiento.....	40
Tabla 1. Estado de los oviductos de los 3 grupos experimentales: control (C), estradiol (E2) y bisfenol-A (BPA), de ratas hembras OVX al final del tratamiento.....	41

RESUMEN

La regulación de los fluidos corporales es de vital importancia para los seres vivos. Cuando tales fluidos sufren variaciones de volumen o de osmolalidad se disparan mecanismos compensatorios del sistema nervioso central, hormonales y de comportamiento. El sistema hormonal por excelencia que regula la homeostasis de los fluidos es el SRAA, siendo la Ang II la hormona central encargada de desencadenar la sensación de sed, la única vía que tienen los animales para reestablecer los niveles de líquidos corporales. Hoy se sabe que hormonas como los estrógenos, además de sus efectos reproductivos, tienen también efectos no reproductivos, llegando a influir en la regulación de los fluidos corporales, en este caso disminuyendo la sensación de sed mediante su acción sobre el SNC y la Ang II. El creciente uso de nuevas sustancias sintéticas con las que debemos lidiar diariamente, ha hecho aumentar la preocupación por su posible toxicidad y efectos sobre nuestro organismo, ya que no todos son bien conocidos. Dentro de este grupo de sustancias se encuentra el disruptor endocrino bisfenol A, sintetizado por primera vez como xenoestrógeno. Su imitación de los efectos estrógenicos ya ha sido estudiada en ciertos parámetros, pero aún quedan muchas incógnitas por desvelar sobre las acciones ejercidas por esta sustancia y las dosis a las que tienen lugar. En el presente estudio se ha pretendido mostrar si la acción ejercida por el bisfenol A sobre la regulación de los fluidos corporales tiene lugar a una dosis dada, como ocurre en el caso del estrógeno. Si bien a una dosis diaria s.c. de 50 µg/kg de bisfenol A no se vio una influencia significativa sobre los parámetros estudiados, a parte de sus efectos reproductivos, sí se vieron los suficientes indicios para continuar con la investigación, posiblemente a dosis diferentes y con un número superior de ratas hembras experimentales.

Palabras clave:Regulación de fluidos, Estrógenos,Sed, SRAA, Ang II, Disruptor endocrino, Xenoestrógeno, Bisfenol A.

ABSTRACT

The regulation of body fluids is vital for the organisms' survival. Volume or osmolality body fluid changes trigger hormonal, behavior and central nervous system compensatory mechanisms. Hormonal fluid homeostasis is largely regulated by RAAS, being ANG II, the main hormone responsible for perceiving thirst, the only way for animals to restore the levels of body fluids. It is known that hormones like estrogens, in addition to their reproductive effects, exert other roles such as the regulation of body fluids. Thus, estrogens decrease the sensation of thirst by acting on the CNS and Ang II. The increasing use of new synthetic substances has improved concerns about their possible toxicity and deleterious effects on our health. Within this group of substances is the endocrine disruptor bisphenol A, first synthesized as a xenoestrogen. The estrogenic effect of BPA has been partially studied, but there are still many questions about the actions performed by this substance and the doses at which they occur. The aim of the present study is to determine if BPA regulation of body fluid occurs at a given dose as estrogens do. Besides some reproductive effects, the given daily dose of 50 mg/kg of BPA did not allow the observation of significant influence on the studied parameters. Further investigations, employing different BPA doses and a higher number of experimental animals with BPA will be required to unveil its effects.

Key words: Regulation of body fluids, Estrogens, Thirst, RAAS, Ang II, Xenoestrogen, Endocrine disruptor, Bisphenol A.

1. INTRODUCCIÓN

El equilibrio de los fluidos corporales varía a lo largo del ciclo reproductivo de los mamíferos a consecuencia de la fluctuación de los niveles de hormonas ováricas (Summy-Long, 2001). El volumen de plasma sanguíneo y la osmolalidad de tales fluidos se mantienen dentro de unos parámetros relativamente estables, por ello cuando se producen alteraciones en este equilibrio se desencadenan respuestas compensatorias, fisiológicas y de comportamiento (Dukekot et al, 1995).

1.1. Regulación del fluido corporal

La supervivencia durante condiciones constantemente cambiantes del entorno externo e interno requiere una adecuada perfusión de todos los tejidos del cuerpo para proporcionar suficientes metabolitos para el metabolismo celular. Para facilitar el intercambio el fluido debe tener un volumen y una presión adecuados. De acuerdo con ello, la homeostasis de los fluidos implica una regulación del volumen, de la presión y de la osmolalidad (Curtis, 2009).

1.1.1. La regulación osmótica

La osmorregulación es el proceso mediante el cual los seres vivos mantienen relativamente constante su medio interno, de manera que su composición química varía muy poco. Para ello, los organismos deben regular la entrada y salida de agua, sales minerales y otras sustancias; esto evita que el medio interno llegue a estados demasiado diluidos o concentrados (Garber, 2002). Un aumento o disminución de tan sólo 1 - 2% en la osmolalidad provoca respuestas compensatorias que afectan a la conducta, las hormonas y a las respuestas neuronales, y cuya finalidad es restaurar la concentración de fluidos a niveles óptimos. El Na^+ es el principal electrolito que contribuye a la osmolalidad de los fluidos corporales, encontrándose principalmente en el líquido extracelular (LEC). Así que la regulación del Na^+ será de gran relevancia para mantener la osmolalidad del plasma (290 mOsm/kg en la mayoría de mamíferos) (Hinchcliff, 2005).

Una elevada concentración de Na^+ en plasma estimula la liberación de la hormona antidiurética, vasopresina (VP) desde la hipófisis posterior, dando lugar a la concentración de la orina y favoreciendo la retención de líquidos. Al mismo tiempo, el aumento de la liberación de oxitocina (OT) por la pituitaria posterior y el péptido natriurético atrial (ANP) desde el corazón, promueven la excreción renal de Na^+ . Estas respuestas hormonales diluyen el Na^+ plasmático. Además de la reabsorción de agua renal también hay un aumento de la ingesta de líquidos (sed) en respuesta a la activación de osmorreceptores periféricos o centrales. La inhibición de las vías nerviosas centrales que median el consumo de sal, así como la supresión de las hormonas aldosterona (Aldo) y la angiotensina II (Ang II) impiden incrementos adicionales de Na^+ en plasma. Ambas hormonas actúan a nivel central para estimular la ingesta de sal y además sus efectos periféricos conducen a la retención de Na^+ . Como era de esperar, la disminución en los niveles de Na^+ en plasma produce efectos contrarios a los descritos anteriormente (Curtis 2009; Silverthorn, 2014) (Fig. 1).

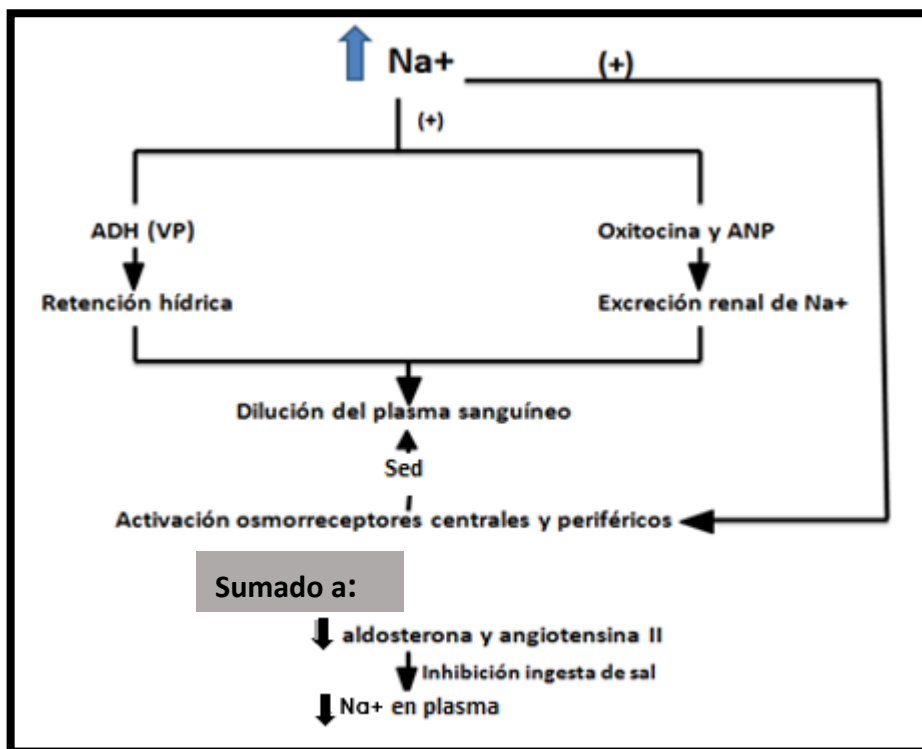


Fig. 1.Regulación osmótica frente a una subida de Na^+ en plasma. En el caso contrario, frente a una bajada de Na^+ en plasma toda la ruta se inhibiría.

Para el cuerpo es de vital importancia mantener la osmolalidad. El agua es capaz de atravesar libremente la mayoría de las membranas celulares, así que si la osmolalidad del líquido extracelular oscila, el agua entrará o saldrá de las células y como consecuencia se modificará también el volumen intracelular (Silverthorn, 2014). Si esto no se mantiene dentro de ciertos niveles se podría ver comprometida la funcionalidad de la célula, y por ello el mantenimiento de la homeostasis del fluidocelular es esencial.

1.1.2. La regulación del volumen

El aumento o disminución del volumen de fluido corporal también desencadena respuestas compensatorias. La pérdida de volumen vascular detectada por los barorreceptores situados en el corazón y los grandes vasos, activa el sistema nervioso simpático para producir vasoconstricción y taquicardia. Por otra parte, la pérdida de volumen estimula la liberación de VP y Ang II, los cuales actúan directamente sobre los vasos sanguíneos para producir vasoconstricción, aumentando así los efectos de la activación simpática. Al mismo tiempo, la VP promueve la retención de líquido para evitar una mayor pérdida de fluido en la orina, mientras que angiotensina II actúa en los sitios centrales para provocar la ingesta de agua y de sal. El aumento del volumen vascular produce lo contrario a lo descrito anteriormente (Mckinley et al, 2004).

Como se desprende del resumen anterior, los desajustes en los fluidos corporales provocan respuestas compensatorias que se clasifican en las siguientes categorías:

- 1) Actividad del sistema nervioso simpático y central: cambios en la presión arterial y en la frecuencia cardíaca.
- 2) Cambios hormonales en VP, OT, angiotensina II, Aldo, y los niveles de ANP.
- 3) Cambios conductuales: cambios en la ingesta de agua y sal.

Por lo tanto, las respuestas a los cambios en los fluidos corporales requieren la detección de una señal específica, así como la integración y coordinación de un

conjunto complejo de respuestas hormonales, neuronales y de comportamiento. El SNC es de gran importancia para estos requisitos (Almeida-Pereira et al, 2016; Curtis, 2009).

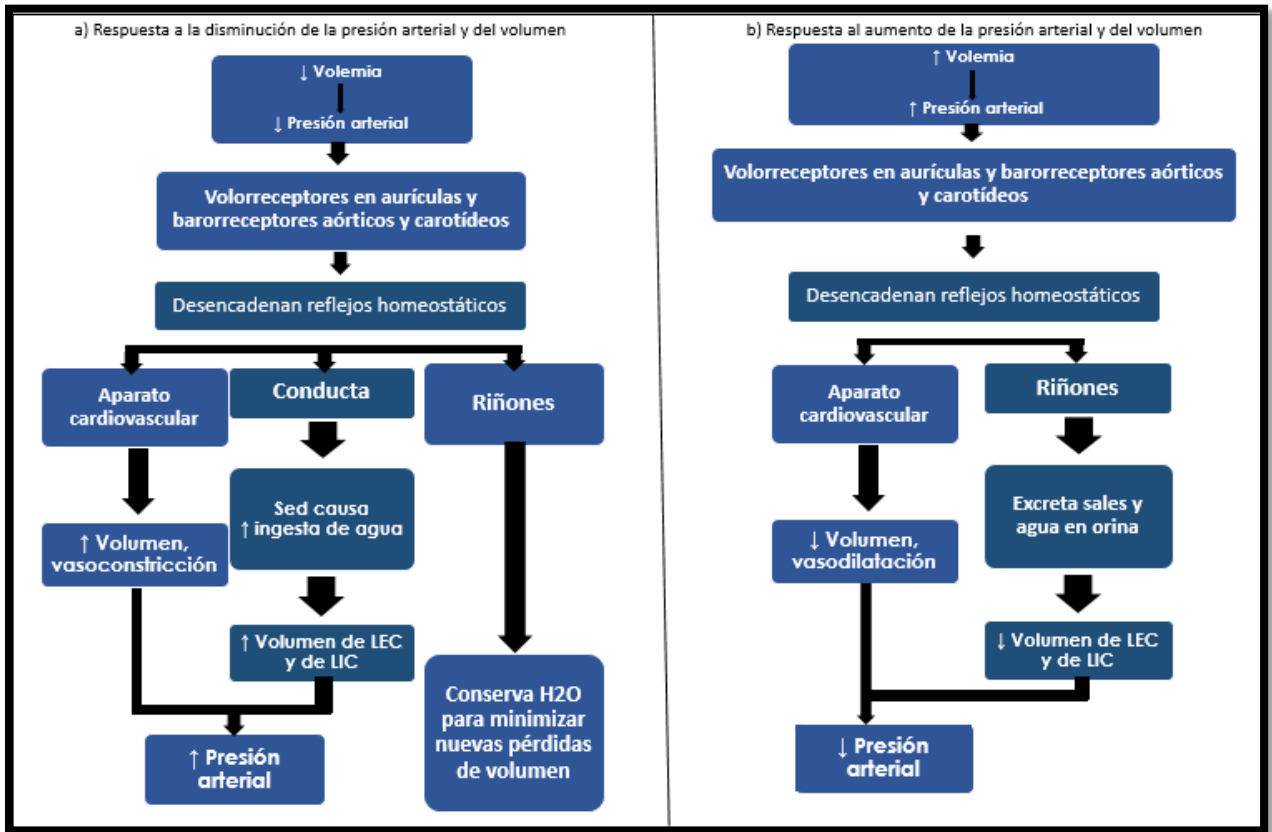


Fig. 2. Respuestas integradas a los cambios de volemia y presión arterial (Modificado de: Silverthorn, 2014).

Por lo general, todas las hormonas nombradas en la regulación hidrosalina se encuentran relacionadas a través del sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA).

El SRAA es considerado un sistema endocrino cuyos metabolitos activos tienen una amplia variedad de funciones en distintos órganos y tejidos (Lima, 2010). En la circulación, la proteasa renina secretada por el riñón convierte el angiotensinógeno del plasma (de origen hepático) en angiotensina I (Ang I) y esta, a su vez, es convertida en angiotensina II (Ang II) por la enzima convertidora de angiotensina (ECA), de origen pulmonar (Lima, 2010).

La Ang II es un potente vasoconstrictor que incrementa la resistencia vascular periférica y como consecuencia eleva la presión arterial. En situaciones de depleción de

volumen extracelular la Ang II reduce la excreción renal de Na^+ y agua alterando la hemodinámica renal y estimula la secreción de aldosterona por la corteza suprarrenal, la cual provoca mayor reabsorción hidrosalina a nivel del túbulo colector. La aldosterona es una hormona mineralocorticoide que no sólo actúa a nivel del riñón, sino que también tiene receptores en distintas áreas del cerebro. Cuando la aldosterona es liberada se une al receptor de mineralocorticoides (MR) situado en el cerebro, la unión lo activa desencadenando el apetito por lo salado (Fu, 2014). En varios estudios se llegó a la conclusión de que la Ang II y la aldosterona tienen efectos sinérgicos y juntas refuerzan el apetito por la sal (Epstein, 1982). Pero se debe puntualizar que, en contraste con la Ang II que estimula la ingesta de agua y en menor medida de sodio, los mineralocorticoides estimulan la ingesta de sodio con poco o ningún efecto sobre la ingesta de agua (Geerling, 2006; Vallon et al, 2005). Todo esto puede facilitar la regulación diferencial de la ingesta de agua y sodio (Fu, 2014).

Por combinación de los efectos de la Ang II, esta regula la presión arterial de forma directa al aumentar la resistencia vascular periférica, y de forma indirecta al aumentar el volumen sistólico y, por ende, el gasto cardiaco (Lima, 2010) (Fig. 3).

Ante una situación de hipovolemia, volumen disminuido de plasma sanguíneo: La ingestión de agua y Na^+ es el único medio para reparar las deficiencias de agua y Na^+ corporales. La sed y el apetito por la sal son los estados motivacionales que conducen a los animales a hallar y consumir agua y sustancias saladas. Frente al desequilibrio de los fluidos corporales el SNS ejerce su acción en cuestión de segundos, pero los efectos endocrinos no se empiezan a notar hasta minutos después. La Ang II y la aldosterona actúan sobre ciertas estructuras para estimular la sed y el apetito por el Na^+ en condiciones de hipovolemia. Más exactamente la Ang II aumenta el flujo simpático estimulando la liberación de VP y con ello la ingesta de agua y Na^+ , en menor grado (Johnson, 1997).

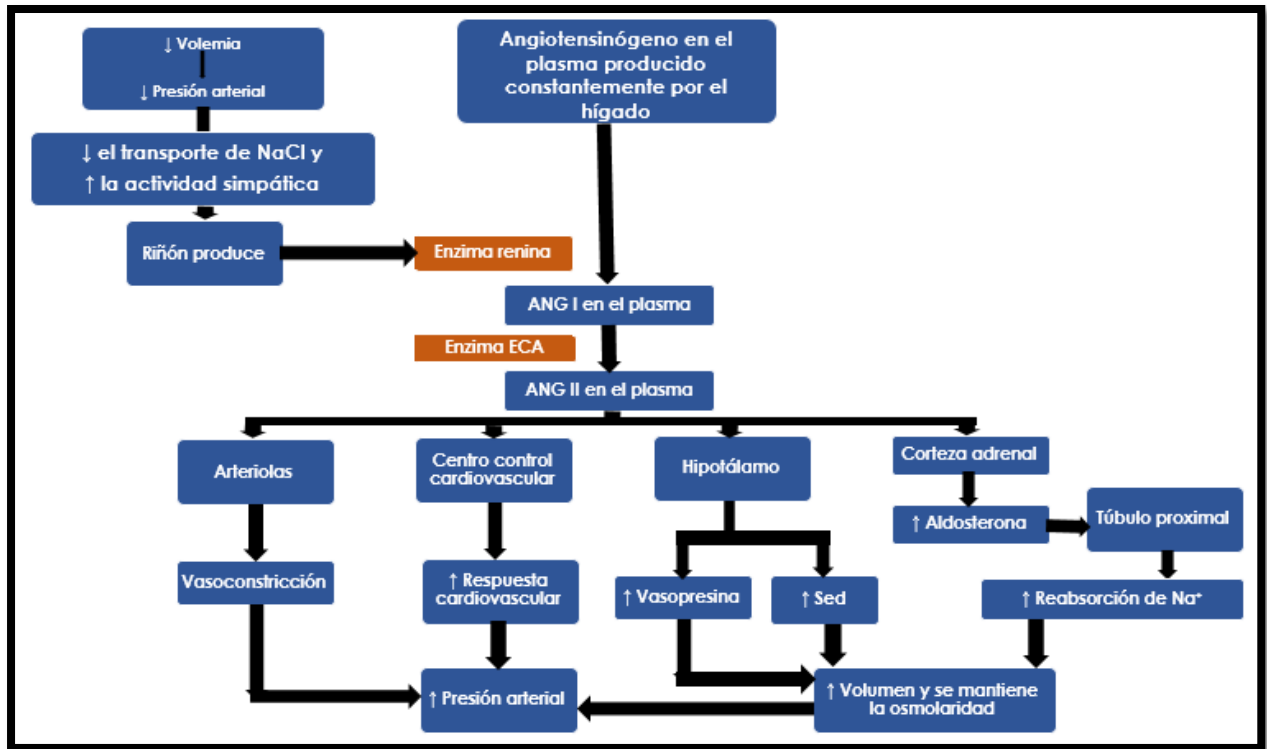


Fig. 3. Sistema renina-angiotensina (RAS) y efectos de la angiotensina II. (Modificado de: Johnson, 1997).

1.1.3. La sed

La sed, además del ansia o la necesidad de ingerir fluidos, es el mecanismo fisiológico que nos permite, junto con el sistema renal y la hormona antidiurética, mantener un estado adecuado de hidratación (Aragón Vargas, 1996). Se trata de un mecanismo esencial que interviene en el equilibrio de líquidos, siendo la única forma que tiene nuestro cuerpo de reponer fluidos, a parte de los obtenidos de la comida. La sed surge de una falta de líquidos o de un aumento en la concentración de ciertos osmolitos, como la sal. Si el volumen de agua del cuerpo cae por debajo de un cierto umbral o la concentración de osmolitos llega a ser demasiado alta, se produce la sed. Hay receptores y otros sistemas en el cuerpo que detectan tales variaciones (Silverthorn, 2014).

1.1.3.1. Tipos de sed

Dentro del concepto de la sed se puede distinguir entre "sed extracelular" y "sed intracelular", la extracelular es la generada por disminución del volumen y la intracelular es la que se da por el aumento de la concentración de osmolitos (Carlson, 2005) (Fig.4). Sin embargo, la gana de beber en sí misma es algo generado a partir del procesamiento central del cerebro, no importa la forma en que se detecta.

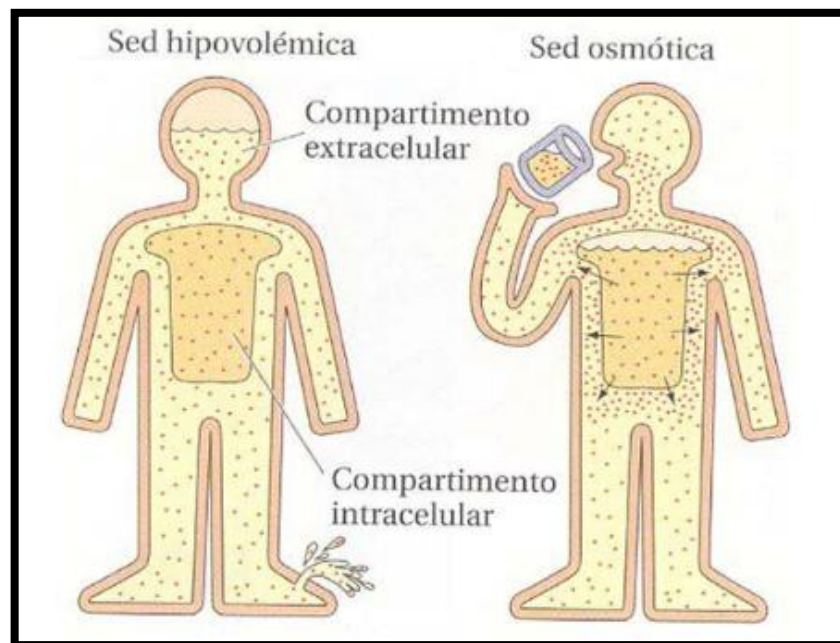


Fig.4. Tipos de sed. Izqda.: sed hipovolémica o extracelular; dcha.: sed osmótica o intracelular (Sacado de: <http://blogs.gamefilia.com/tidus-7/03-01-2012/47499/por-que-motivo-tenemos-sed>).

La sed es un mecanismo esencial de regulación del contenido de agua en el cuerpo y uno de los primeros síntomas de deshidratación. Tiene como objetivo final mantener el fluido intersticial a la misma concentración que el intracelular. Esta condición se llama isotónica y se produce cuando el nivel de solutos que está presente en ambos lados de la membrana celular es igual, de manera que el movimiento neto del agua es cero (Silverthorn, 2014).

1.1.3.1.1. La sed por deshidratación intracelular u osmótica se produce cuando aumenta la concentración de los solutos del fluido intersticial. Este aumento extrae agua

de las células, y se encogen en volumen. El aumento de la concentración de los solutos del líquido intersticial hace que el agua migre a través de las membranas celulares hacia el compartimento extracelular, por ósmosis, lo que provoca la deshidratación celular. Los osmorreceptores de los órganos circunventriculares (OCVs) son los encargados de detectar las variaciones de la osmolalidad que causan esta clase de sed y que estimularán a su vez una mayor liberación de vasopresina para la reabsorción renal de agua (Arau, 2013; Mckinley, 2009).

1.1.3.1.2. Sed por deshidratación extracelular o hipovolémica, se da a causa de la disminución del volumen sanguíneo, y se define como la sed causada por la pérdida de volumen de la sangre sin agotar el fluido extracelular. Puede ser causado por la pérdida de sangre, vómitos y diarrea. La hipovolemia es detectada por el riñón activando el SRAA, este desencadena la producción de la Ang II que usa la sangre para desplazarse. Uno de sus efectos es que actúa sobre la pituitaria posterior y la corteza suprarrenal causando una cascada de hormonas que producirán una retención de agua y sodio. También es responsable de la activación de la sed al actuar sobre los receptores de angiotensina AT1 del órgano subfornical (SFO) de la lámina terminal (Mckinley, 2009; Mckinley et al, 2004) (Fig. 5).

Dos órganos en concreto son los principales implicados en la mediación del apetito por la sal y la sed, el órgano vasculoso de la lámina terminal (OVLT) y el ya nombrado órgano subfornical (Wilson, 2005). Ciertos estudios han demostrado que mediante la ablación de cualquiera de estas áreas se reduce en gran medida la ingesta de agua y Na^+ en ratas tratadas con inyecciones intravenosas de Ang II (Morris, 2002). Sin embargo, la lesión de la SFO falla en la reducción de la ingesta de Na^+ en ratas adrenalectomizadas (ADX) (Wilson, 2002). Estos hechos junto con que el SFO tiene una gran cantidad de receptores AT1 para Ang II indican que es el principal centro encargado de desencadenar la sed (Mckinley, 2009).

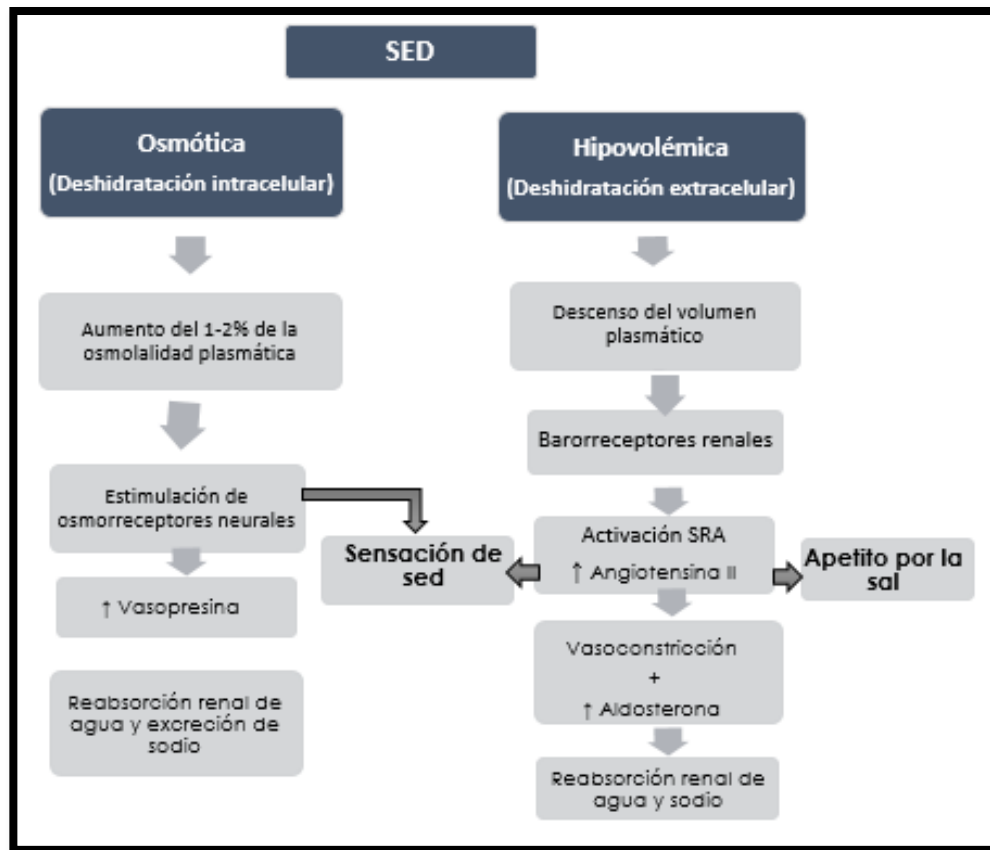


Fig. 5. Esquema del modo de acción de los distintos tipos de sed.

1.2. Estrógenos

Los estrógenos son hormonas sexuales esteroideas lipofílicas (derivadas del colesterol), principalmente femeninas, producidos en su mayoría por los ovarios pero también por la placenta durante el embarazo y en menor grado por las glándulas adrenales (Graves et al, 2011).

1.2.1. Mecanismos de actuación

En primer lugar, es importante tener en cuenta que los estrógenos: estradiol, estrona, estriol son una familia de compuestos de origen natural que, aunque bioquímicamente relacionados, son estructuralmente distintos y difieren en términos de concentraciones circulantes, actividad fisiológica, potencia y afinidad para los diversos subtipos de receptores estrogénicos (Barha, 2009; Curtis, 2009).

El 17- β -estradiol es el estrógeno elegido para nuestra investigación siendo considerado la forma más potente de estrógeno. Sus efectos centrales son atribuibles en su mayoría, a las acciones de esteroides clásicos: el estrógeno difunde en la célula y actúa a través de la unión con su receptor, formando un complejo que se une a un elemento de respuesta estrogénico nuclear, llegando a afectar a la expresión génica y a la transcripción. Este modo de actuación se considera como efectos genómicos lentos, pero el potencial de actuación de los estrógenos abarca más campos, habiendo comprobado en distintas investigaciones que también causa efectos no genómicos más rápidos (Falkenstein et al, 2000; Fannon, 2001). Se cree que el efecto del estrógeno sobre la ingesta de agua es el resultado de un mecanismo genómico, por lo tanto no se esperara una disminución de la ingesta hasta unas 26 horas después de la administración de un tratamiento de estradiol en ratas OVX (Krause, 2003).

Existen distintos tipos de receptores estrogénicos a los que se puede unir (ER β , ER α asociados a la membrana plasmática) (Barha, 2009). Cuando ya se conocía la existencia del ER α , mediante estudios con ratones Knockout con mutaciones en ese receptor, se observó una interrupción en su ciclo de retroalimentación hipotálamo-hipófisis-gonadal. Esto concordaba con la creencia general de que ER α era esencial para la reproducción en el plano de las gónadas, la pituitaria y el cerebro. En 1996, fue identificado un segundo ER (ER β) a partir de cDNA de próstata de rata (Rissman, 2008). Estudios posteriores con ratones Knockout para ER β , entre otros permitieron ver dos cosas, la primera fue la existencia de una mayor cantidad de ER β que de ER α fuera del hipotálamo, especialmente en el cerebelo, córtex y en el hipocampo; y la segunda que ER β puede mediar los efectos del estradiol sobre los comportamientos no reproductivos (Rissman, 2008).

El 17- β -estradiol tiene unas 40 veces más afinidad por los receptores ER β y ER α que su isómero 17- α -estradiol (Barha, 2009). Estos receptores se encuentran repartidos por todo el SNC, en particular en las áreas involucradas en el equilibrio de los fluidos corporales (Graves et al, 2011). El que se hayan encontrado en distintas zonas del cerebro, como en neuronas de oxitocina (OT) del hipotálamo, es una prueba de que los estrógenos además de tener efectos esteroideos clásicos sobre la expresión de genes que pueden conducir a cambios en la síntesis de neurotransmisores, afectar a la densidad de receptores o a la morfología neuronal, también pueden influir en la excitabilidad neuronal (Herbison, 1997; Qiu et al, 2003; Womble, 2002).

De todo lo citado se deduce que las diferentes respuestas causadas en el cuerpo por la acción del estradiol pueden deberse al tipo de receptor al que se una o incluso a que active mecanismos genómicos o no genómicos (Saleh, 2000).

1.2.2. Influencia sobre la osmolalidad y volumen de los fluidos corporales

Las evidencias acumuladas durante más de 40 años de investigaciones, como por ejemplo la existencia de ER en diversas áreas centrales implicadas en la regulación de los fluidos, señalan la posible influencia de los estrógenos sobre el control de los fluidos corporales, más específicamente en las respuestas compensatorias frente a perturbaciones del equilibrio osmótico y/o de volumen (Stern, 2003). Todo esto también se vio apoyado al observarse que el equilibrio de los fluidos corporales fluctúa según el nivel de hormonas ováricas a lo largo del ciclo reproductivo. Está bien establecido que los estrógenos son críticos para el comportamiento reproductivo de ratas hembras y que están implicados en el control del equilibrio de los líquidos corporales (Krause, 2003).

En rata hembra la ingesta de agua varía durante el ciclo reproductivo de 4 días, observándose un menor consumo de agua el día del estro (día con niveles más elevados de estrógenos), cuando de forma natural se cree que el estrógeno ejerce sus acciones de una forma más notoria (Chevalier, 2016; Krause, 2003).

El estrógeno altera la sensibilidad de detección de señales del SNC y, al mismo tiempo, actúa dentro de las vías centrales modificando el sistema de neurotransmisores que median respuestas específicas frente a desajustes osmóticos o de volumen (Curtis, 2015). Además se comprobó que disminuyen la presión arterial y la frecuencia cardiaca en reposo, así como la hipertensión producida por manipulación experimental. Para ello parecen actuar a múltiples niveles dentro del circuito del cerebro posterior que controla la función cardiovascular (Curtis, 2009).

La concentración plasmática umbral de Na^+ que resulta en la liberación de VP se ve reducida por la acción de los estrógenos, aunque el rango dinámico no se ve afectado. Unos niveles elevados de estrógenos provocan una menor concentración plasmática de Na^+ , un mayor volumen sanguíneo, o ambos, debido a la interacción estrógeno/VP. Según resultados obtenidos en estudios realizados en ratas tratadas con estrógenos en condiciones basales todo lo nombrado contribuiría a un volumen y

concentración de Na^+ plasmático disminuidos (hipovolemia e hiponatremia respectivamente) (Curtis, 2009).

Es importante destacar que los estrógenos como tal, son suficientes para atenuar la ingesta de agua y en menor grado de Na^+ estimulada por la acción de la Ang II (Almeida-Pereira et al, 2016), ya que reduce la activación del SNC (Fig. 6).

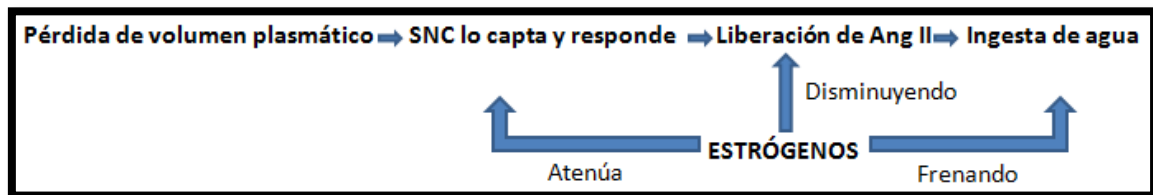


Fig. 6. Efectos de los estrógenos frente a hipovolemia.

Esto se apoya en evidencias que demuestran que el estrógeno regula la expresión del receptor de Ang II (Kim, 2014).

Se sabe que las mujeres muestran una mayor preferencia por lo salado según el momento del ciclo reproductivo, es decir, según sean sus niveles de hormonas gonadales (Curtis, 2015). Se piensa que el tratamiento con estradiol disminuye la percepción por lo salado y por lo tanto aumenta el consumo de NaCl . A ello se suman otros efectos como son la disminución del peso corporal y el aumento del peso uterino (Curtis, 2015; Graves et al, 2001).

1.2.3. Menopausia inducida

Es de destacar el aumento gradual de la presión arterial con la menopausia, lo que deja entrever la importancia de las hormonas sexuales femeninas en la regulación de esta (Kanaya, 2003).

Así que la terapia de reemplazo de estradiol se emplea para disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas ya que este se ve aumentado después de transcurrido el periodo fértil. El sistema renina-angiotensina central y periférico es uno de los principales reguladores de la presión arterial y la excreción y reabsorción de Na^+ . Básicamente se lleva a cabo a través de la acción vasoconstrictora

de la Ang II que promueve un aumento en la presión arterial, y del efecto vasodilatador del NO (Almeida-Pereira et al, 2016).

El estrógeno influye en toda esta regulación afectando a la expresión de los receptores de Ang II y estimulando la producción de NO (Graves et al, 2011).

Además de imitar parcialmente los cambios inducidos por la senescencia en mujeres, la ovariectomía bilateral también es un buen modelo para estudiar los efectos específicos de los estrógenos a través de su sustitución, ya que las ratas en estado natural se encuentran sometidas a cambios cíclicos en los niveles de estrógenos a causa de su ciclo reproductivo (Almeida-Pereira et al, 2016).

La pérdida de actividad ovárica desemboca en un cambio del entorno hormonal, con una caída en la cantidad de estrógenos que afecta a muchos tejidos del cuerpo y produce una gran variedad de síntomas (El Habachi, 2014).

Las hormonas sexuales femeninas actúan como antioxidantes endógenos, así que con la pérdida de estrógenos se ve incrementada la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y estrés oxidativo (OS). Se considera una de las causas de varios trastornos relacionados con la menopausia, siendo el aumento de peso uno de los más comunes (El Habachi, 2014). Esta subida en el peso está asociada con la deposición de grasa en el abdomen, adiposidad central, lo que aumenta la probabilidad de desarrollar resistencia a la insulina seguido de diabetes mellitus y enfermedad cardiaca (El Habachi, 2014).

1.3. Nuevas sustancias sintéticas con efecto estrogénico: Bisfenol A (BPA)

En los últimos tiempos la exposición a determinadas sustancias químicas se ha instalado en nuestra vida diaria (Bosch, 2016; Castro et al, 2013). Este es el caso del BPA (4, 40-dihidroxi-2,2-difenilpropano) (Acconcia et al, 2015; Bosch, 2016) (Fig. 7), se trata de una molécula liposoluble utilizada en la síntesis de plásticos de policarbonato y en resinas epoxi (Bosch, 2016). Se usa en botellas de agua, de refrescos, en el recubrimiento interno de latas, así como en recipientes de comida y bebida (Chichizola, 2003).

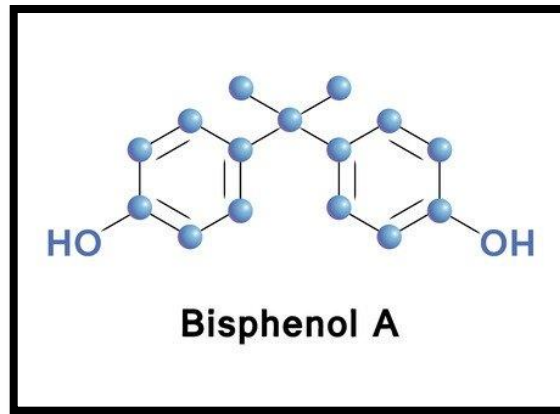


Fig.7. Estructura molecular del bisfenol A (Sacado de: <http://www.conasi.eu/blog/consejos-de-salud/bisfenol-a-bpa/>).

La mayoría de los seres humanos tienen niveles detectables de BPA en su organismo. Este se metaboliza rápidamente y se excreta con una vida media inferior a 6 horas, su presencia en el organismo a cantidades detectables demuestra la exposición constante a esta sustancia (Prins, 2011). Se trata de un monómero desarrollado por primera vez como estrógeno sintético en la década de 1890, pero no fue hasta 1930 que se informó de sus propiedades estrogénicas sobre el sistema reproductivo de ratas hembras (Acconcia et al, 2015).

A partir de entonces numerosos trabajos (Barha, 2009; Braniste et al, 2010) consideran esta sustancia como un disruptor endocrino (DE). Los DE son sustancias químicas exógenas al organismo animal o humano con actividad hormonal o antihormonal y que, actuando como agonistas o antagonistas hormonales pueden alterar la homeostasis del sistema endocrino en un organismo intacto, su progenie o su población (Pardo, 2008). Así que muchos estudios se están centrando en investigar la posible relación entre la actividad estrogénica (xenoestrógeno) del BPA y distintas alteraciones endocrino-metabólicas, entre las que cabe destacar trastornos hepáticos, tiroideos, obesidad, resistencia a la insulina y una mayor posibilidad de desarrollar diabetes, aumento en la excreción urinaria de proteínas, hipertensión y trastornos en el sistema neuroendocrino que controla la alimentación (Bosch, 2016; Gioiosa, 2007).

1.3.1. Mecanismos de disrupción endocrina

Los DE son capaces de influir sobre las acciones hormonales a través de dos mecanismos fundamentales:

- Afectando el papel de los esteroides endógenos por interacción directa (agonista o antagonista) con los receptores de estrógenos y andrógenos ubicados en la membrana o en el núcleo.
- Modificando las concentraciones de las hormonas sexuales o de sus receptores como consecuencia de acciones sobre sus vías metabólicas (Pardo, 2008).

1.3.2. Exposición humana/animal al BPA

Se ha comprobado que el BPA posee la misma potencia de acción tanto en células humanas como en las animales, este hecho hace que el conocimiento sobre el modo de actuación y efectos de esta sustancia cobre una mayor relevancia (Johnson, 1997) y se pueda estudiar de manera más fiable en animales de experimentación.

1.3.3. Modo de acción

La molécula de BPA tiene ciertas características estructurales que le confieren la capacidad de unirse a receptores estrogénicos (ER) nucleares y de membrana, como son ER $_{\alpha}$ y ER $_{\beta}$ (Fig. 8). Aunque también es cierto que el BPA muestra una afinidad por ellos unas 1000-2000 veces menor que el estrógeno más potente, el 17- β -estradiol (Acconcia et al, 2015), y por ello es considerado un estrógeno débil.

Los ligandos exógenos como el BPA, debido a su estructura química, no se alojan perfectamente en el dominio de unión al ligando del ER de tal manera que podrían no permitir algún cambio conformacional del ER pudiendo ejercer una acción agonista u antagonista, según el caso y la zona (Acconcia et al, 2015).

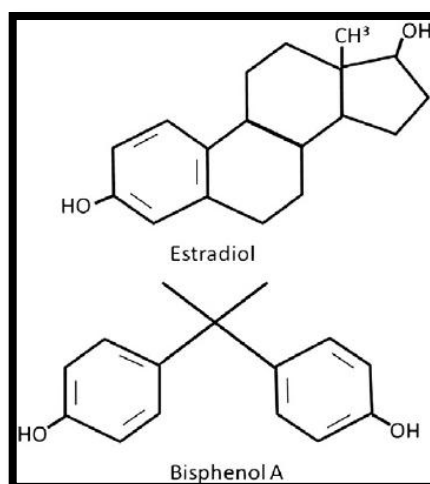


Fig. 8. Estructura del Estradiol y del Bisfenol A. (Tomado de: Wolstenholme, 2011).

1.3.4. Curva dosis-dependiente

Después de ciertos estudios utilizando distintas concentraciones de BPA se observaron algunas características de las acciones del BPA:

- Presenta una respuesta oscilante no monotónica, según la dosis. Muestra una curva bifásica en forma de U, o curva invertida con una fase ascendente y otra descendente en relación con la dosis de BPA utilizada (Fig. 9). Esto quiere decir que su efecto se ve aumentado a dosis tanto altas como bajas (Acconcia et al, 2015; Gioiosa, 2007).

Si todas o algunas de las acciones del BPA siguen esta curva no monotónica aún está por determinar (Acconcia et al, 2015).

Parece ser que sus efectos sobre el endotelio y la tensión sí están incluidos dentro de este tipo de curva ya que en ciertos estudios se ha demostrado que animales tratados con BPA en dosis bajas desarrollaron hipertensión y disfunción endotelial de forma dosis-dependiente (Bosch, 2016). El análisis de expresión génica por microarrays en células endoteliales murinas tratadas con BPA demostró la activación de genes implicados en la regulación vascular como la Ang II y la Ca-calmodulina cinasa II (CaMKII). Posteriormente se comprobó que esta activación de la CaMKII promueve el desacople enzimático de la óxido nítrico sintasa endotelial, lo que conduce a la producción de radicales libres de oxígeno en vez de óxido nítrico (NO), principal factor vasodilatador y protector del endotelio. Este aumento en la producción de radicales

libres de oxígeno indica que el BPA, además de producir hipertensión, podría participar en los mecanismos de daño vascular (Bosch, 2016).

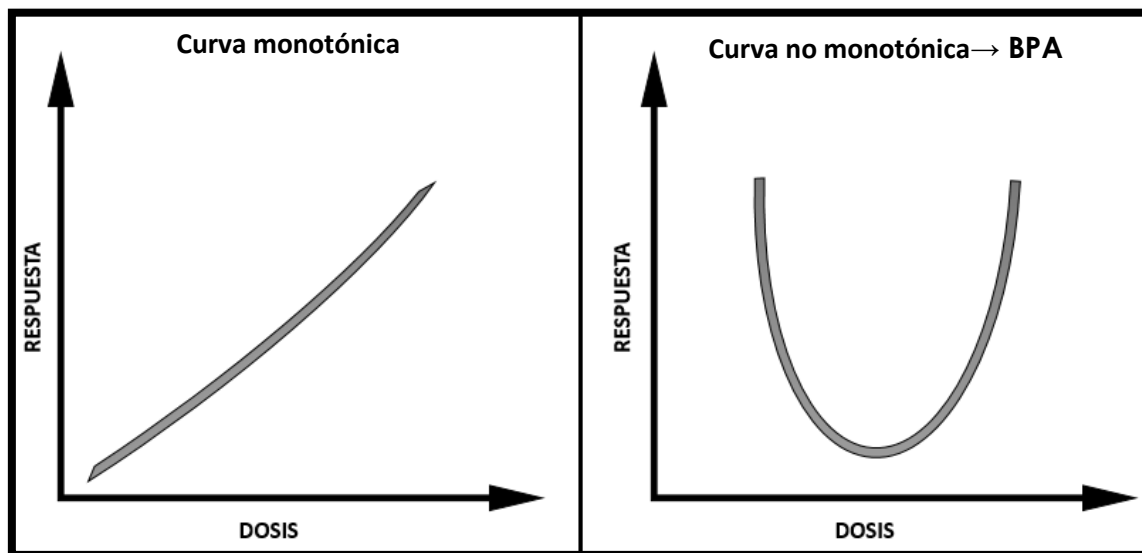


Fig. 9. Comparación de la típica curva monotónica dosis-respuesta (izqda.) que siguen ciertas sustancias con la curva no monotónica del BPA (dcha.).

1.3.5. Administración de BPA

Cuando se administra oralmente BPA desaparece rápidamente de la sangre ya que pasa primero por el hígado, donde se metaboliza en gran parte a glucurónido de BPA, que es hormonalmente inactivo (INFOSAN, 2009). En ratas adultas sólo un 10-20% de la dosis administrada alcanza los tejidos. Con la administración subcutánea se obtiene un mayor rendimiento del BPA al evitar ese primer paso por el hígado.

La principal ruta de eliminación en ratas es por las heces, seguida en importancia por la orina (INSHT, 2011).

1.4. Hipótesis

Como se ha dicho, el BPA se sintetizó como sustituto del estrógeno pudiendo unirse a sus receptores, por lo que también es capaz de imitar algunos de sus efectos sobre la reproducción. Por ello, la hipótesis planteada es que el BPA también debería poder modificar la regulación de los fluidos corporales como hace el estrógeno.

1.5. Objetivo

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es conocer si hay un cambio en la respuesta dipsogénica producida por el BPA en su papel como análogo del estrógeno, es decir, si el BPA a la dosis administrada ($50\mu\text{g} / \text{kg}$, s.c.) va a actuar de la misma manera que el estrógeno sobre el comportamiento ingestivo.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo en 15 ratas hembras de la cepa Wistar, con una media de edad de 4 meses y un peso entre 220-270 g. Estas fueron criadas y proporcionadas por el Bioterio de la Universidad de Oviedo.

Se colocaron en jaulas estándar individuales con agua, solución salina (2,7 %) y comida ad libitum desde un principio. Se mantuvieron bajo condiciones estandarizadas de temperatura y humedad, y bajo un ciclo luz-oscuridad de 12 horas (Fig. 10). Los experimentos se efectuaron a primera hora de la mañana para realizarlos lo más cerca posible de su periodo de máxima actividad, la noche.



Fig. 10. Habitación con condiciones estándar y jaulas de confinamiento individuales.

El cuidado de los animales y cada protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad de Oviedo, España, siguiendo la normativa vigente, el Real Decreto 53/2013, y la Directiva 2010/63/UE.

Las 15 ratas fueron identificadas, pesadas (Fig. 11) y divididas pseudoaleatoriamente en 3 grupos de 5 animales: grupo I para las inyectadas con bisfenol A [Sigma-Aldrich Corp (St. Louis, MO)], grupo II para las inyectadas con 17- β -estradiol (Sigma-AldrichCorp, Oakville, ON, Canadá) y grupo III para las ratas

control. Se ovariectomizaron y 7 días después se le administró diariamente a cada grupo una inyección subcutánea, de un volumen total de 0.1 ml, durante un periodo de 8 días, con las siguientes dosis:

- Grupo I: bisfenol-A (BPA) → BPA a dosis bajas (50 µg/kg, s.c.).
- Grupo II: estradiol (E2) → 17-β-estradiol a dosis fisiológica (10 µg/kg, s.c.).
- Grupo III: control (C) → vehículo de aceite de maíz y etanol absoluto (Panreac Química S.L.U.) en proporción 3:2.



Fig. 11. Control del peso con balanza de las ratas y de la comida.

2.1. Ovariectomía bilateral.

Todas las ratas fueron sometidas a ovariectomía bilateral (extirpación quirúrgica de ambos ovarios) (Fig. 12).

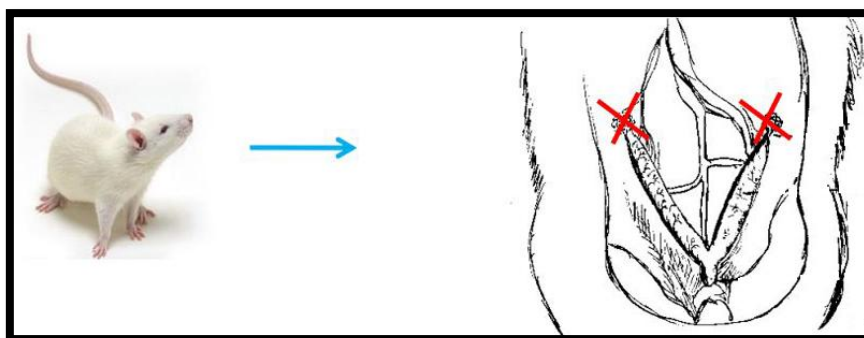


Fig. 12. Representación de una ovariectomía bilateral en rata (Modificado de: <https://www2.ufmg.br/imagensdoconhecimento/Imagens/Areas/Ciencias-Biologicas/Fisiologia-cardiovascular-Nivia-Santiago>).

2.1.1. Procedimiento

Se anestesia a los animales con xilacina/ketamina, sedante y anestésico en las concentraciones 75 mg/kg y 10 mg/kg respectivamente mediante inyección intraperitoneal. Se rasura y desinfecta con povidona yodada la zona quirúrgica. Se abre la piel longitudinalmente 2-3 cm por la línea alba del abdomen (lugar de unión de los paquetes musculares, evitando así el sangrado) y se corta el tejido subcutáneo y los planos musculares profundos en la misma dirección con tijera. Se separan las vísceras y el tejido adiposo abdominal con las pinzas de disección hasta que se localizan los oviductos, se realiza la hemostasia de estos en la zona proximal ovárica con un nudo de seda estéril seguida de la extirpación de los ovarios. Se finaliza con una sutura por planos, continua del tejido subcutáneo y discontinua de la piel con seda 3/0. Para finalizar se limpia con povidona yodada la herida quirúrgica.

Tras el procedimiento quirúrgico, los animales se dejan en reposo en sus respectivas jaulas individuales con agua, solución salina y comida para su recuperación. Diariamente, durante los dos días posteriores a la operación se les inyecta subcutáneamente del analgésico Carprofeno inyectable (Rymadyl, 50mg/ml, dosis 4 mg/kg s.c.).

2.1.2. Valoración postquirúrgica tras 24 h de los animales

Después de la cirugía se atendió la evolución de las ratas, dándole especial importancia al nivel de consciencia (actividad, respuesta a estímulos), y al control de herida quirúrgica (signos de infección, dolor, estado de la sutura).

2.2. Ingesta hidrosalina y test de privación hídrica

Una semana después de la operación y con los animales totalmente recuperados, empezó a realizarse el tratamiento de 7 días, posteriormente se realizó el test de privación hídrica media hora después de la última dosis del tratamiento. El test de privación hídrica consiste en quitar las dos botellas de cada jaula, la de agua y la de salino, 24 horas después se vuelven a colocar y quitar repetidamente realizando pesadas

de ambas botellas de cada jaula en distintos momentos (a los 0, 5, 10, 15, 30, 60 y 120 min).

2.3. Otros parámetros valorados

A continuación, las ratas fueron marcadas con sus números identificativos correspondientes y dormidas con una inyección intraperitoneal del anestésico equitesina (0,4ml/100g de p.c., mezcla anestésica compuesta por propilenglicol, pentobarbital sódico, hidrato de cloral y sulfato magnésico) para proseguir con los siguientes procedimientos: extracción de sangre, medición de la glucemia y del hematocrito, extracción y pesado de órganos, y cálculo de la osmolalidad del plasma sanguíneo.

2.3.1. Extracción de sangre

Se extrajo sangre con jeringuilla heparinizada (Heparina mayne 1 %, 1000 UI/ml, Mayne Pharma España, S.L.) directamente del corazón y se depositó en tubos también heparinizados para la posterior valoración del hematocrito, el cual se realizó mediante llenado y centrifugación de microcapilares para hematocrito (4500 r.p.m. / 8 min).

2.3.2. Medición de la glucemia

Se usó para la medida del azúcar en sangre una gota de la misma muestra extraída del corazón y depositada en una tira reactiva para poder valorarla con un glucómetro (Accu-Chek Aviva, Roche (Basel, CH)).

2.3.3. Extracción y pesado de órganos

Tras la extracción de sangre se extirparon los siguientes órganos y tejidos para su pesado y comparación: cerebro, corazón, hígado, bazo, páncreas, oviductos y grasa abdominal.

2.3.4. Osmolalidad

Por último, la sangre se puso en la centrífuga (Heraeus Labofuge 400 R, Thermo Scientific) y se separó el plasma para congelarlo hasta la medición de la osmolalidad mediante la utilización de un osmómetro (5500 Vapor Pressure Osmometer, Wescor) (Fig. 13).



Fig. 13. Osmómetro de presión de vapor

2.4. Estadísticos

Se utilizó el software IBM SPSS Statistics 22. Los datos se presentan como media \pm EEM (error estándar de la media). Todas las variables medidas fueron comparadas mediante el test estadístico de análisis de la varianza, ANOVA de un factor, usando el tipo de tratamiento (Control, Estradiol y BPA) como tal factor. Las comparaciones por parejas se realizaron a través del test Post-Hoc de Tukey, tomando como significación un valor de 0,05 para todo el estadístico.

3. RESULTADOS

A partir de las medidas tomadas y los procedimientos realizados a las 15 ratas ovariectomizadas (OVX) del experimento, pertenecientes a los grupos control (C), estradiol (E2) y bisfenol-A (BPA), se obtuvieron los resultados que se exponen a continuación.

3.1. Ingesta diaria

En la ingesta diaria de comida de los distintos grupos experimentales se ve cierta tendencia del grupo E2 a comer menos que los otros dos, llegando a presentar diferencias significativas ($p < 0,05$) los días 3 y 5 de tratamiento entre los distintos grupos: el día 3 en: C vs E2 ($p = 0,005$) y en E2 vs BPA ($p = 0,036$); y el día 5 en: C vs E2 ($p = 0,013$) y en E2 vs BPA ($p = 0,01$). Mientras que las ratas C y BPA ingieren unas cantidades de comida parecidas a lo largo de todo el tratamiento (Fig. 14).

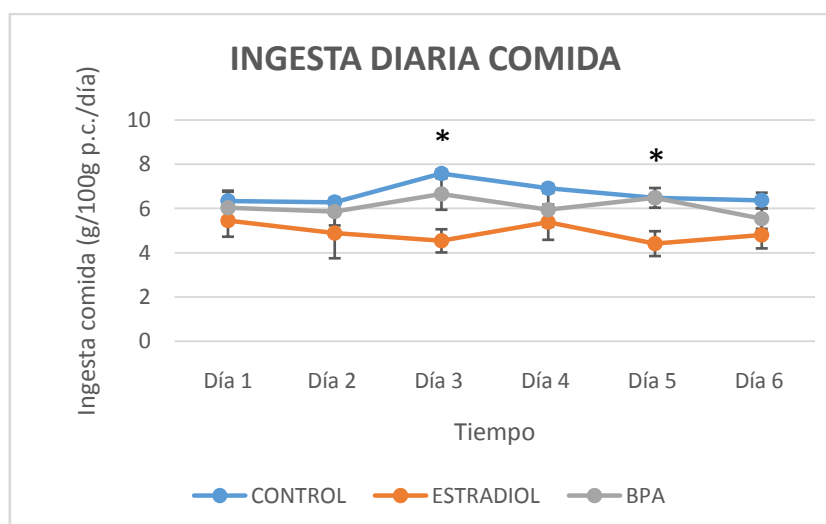


Fig. 14. Ingesta diaria de comida (g/100g de p.c./día) de los 3 grupos experimentales: control (C), estradiol (E2) y bisfenol-A (BPA), de ratas hembras OVX. * $p < 0,05$, E2 vs. BPA y C.

Los datos obtenidos en la ingesta diaria de agua no resultaron significativamente diferentes entre los grupos, ni se observó una evolución distinta entre tratamientos (Fig. 15).

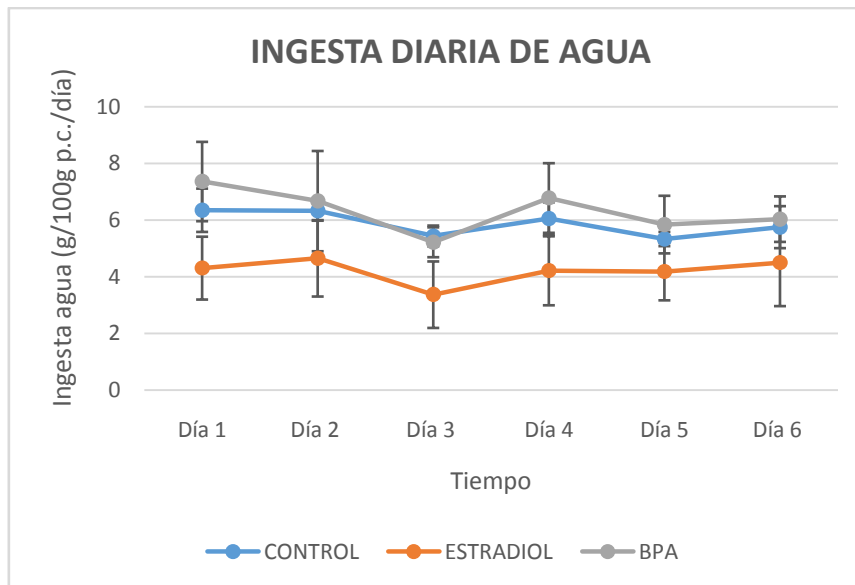


Fig. 15. Ingesta diaria de agua (g/100g de p.c./día) de los 3 grupos experimentales: control (C), estradiol (E2) y bisfenol-A (BPA), de ratas hembras OVX.

Al igual que con la ingesta de agua, la de solución salina tampoco mostró diferencias significativas entre grupos pero sí una tendencia clara de una mayor ingesta de este por parte del grupo E2 durante todos los días de tratamiento. Las ratas BPA ingirieron unas cantidades de solución salina parecidas a las de las C (Fig. 16).

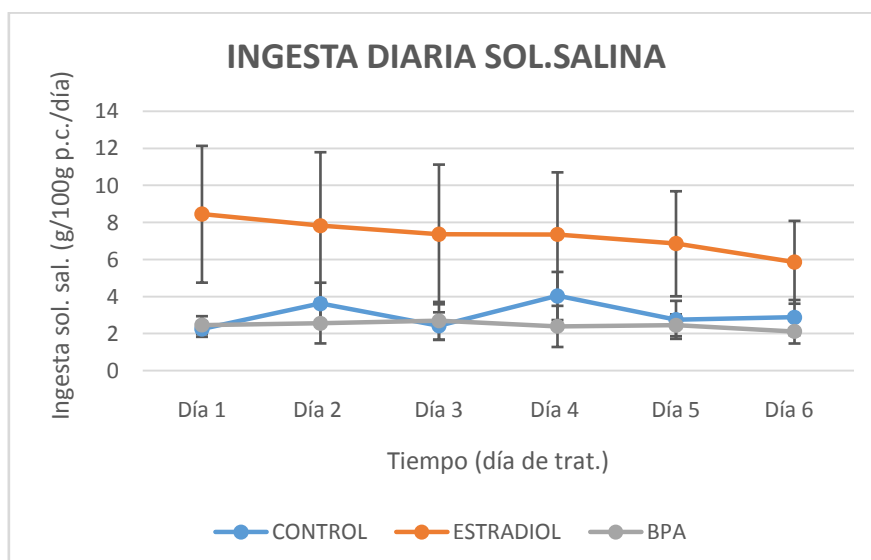


Fig. 16. Ingesta diaria de solución salina (g/100g de p.c./día) de los 3 grupos experimentales: control (C), estradiol (E2) y bisfenol-A (BPA), de ratas hembras OVX.

3.2. Peso de los individuos experimentales y grasa abdominal

Como se puede observar en la Fig. 17, el grupo C muestra una dinámica ascendente de ganancia de peso mientras que en los otros 2 grupos, E2 y BPA, es descendente, aunque bastante más marcada para el E2. De tal forma que se obtuvo una significancia positiva en todos los días de tratamiento respecto a la ganancia/pérdida de peso entre los distintos grupos experimentales menos en el primer día. Más concretamente en los días 2 y 3: C vs BPA ($p= 0,042$ y $0,02$ respectivamente) y en los días 4, 5 y 6: C vs BPA ($p= 0,01$, $0,008$ y $0,004$ respectivamente) y C vs E2 ($p= 0,022$, $0,013$ y $0,006$ respectivamente).

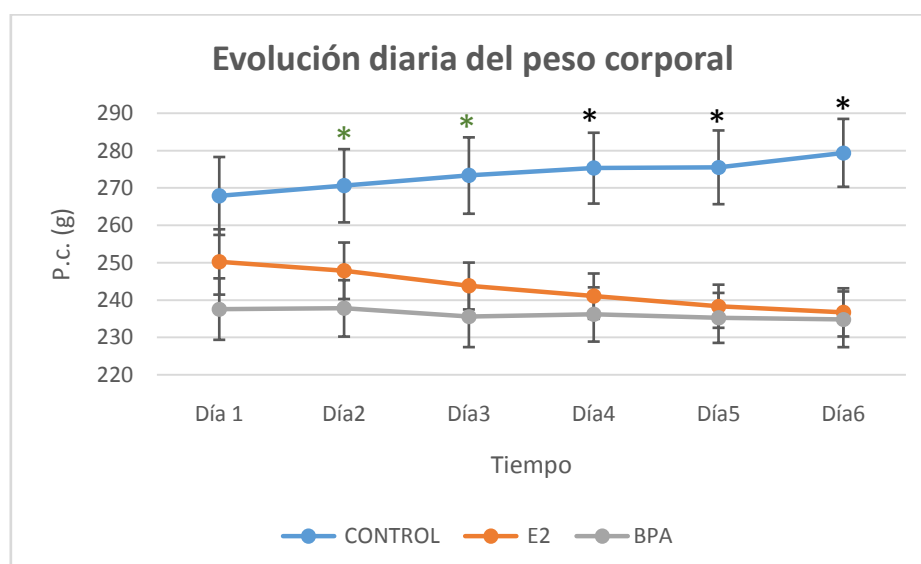


Fig. 17. Evolución del peso corporal (g) en los distintos grupos tratamiento: control (C), estradiol (E2) y bisfenol-A (BPA), de ratas hembras OVX. * $p < 0,05$, C vs BPA. * $p < 0,05$, C vs BPA y C vs E2.

A pesar de no obtener resultados con diferencias significativas en la cantidad de grasa abdominal entre los distintos grupos, se observó una posible tendencia de las ratas del grupo C a acumular una mayor proporción de grasa abdominal que los otros dos. El grupo E2 fue el que menos grasa abdominal presentó (Fig. 18).

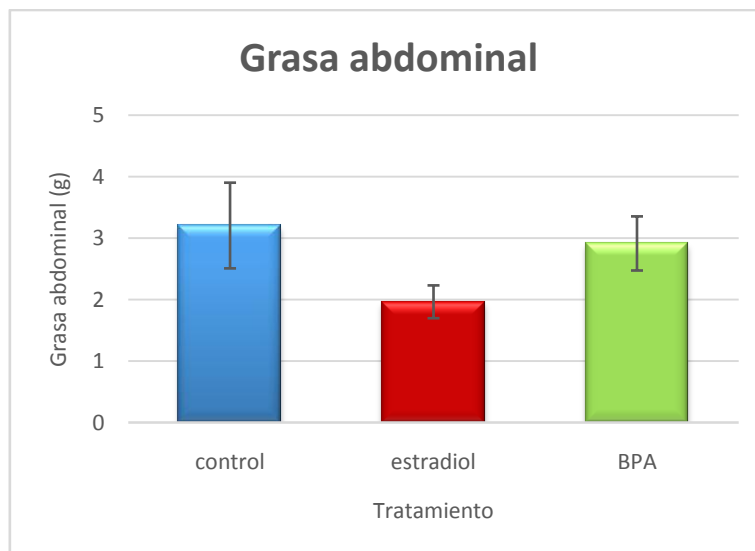


Fig. 18. Variación de la cantidad de grasa abdominal (g) en los distintos grupos experimentales: control (C), estradiol (E2) y bisfenol-A (BPA), en ratas hembras OVX.

3.3. Test de privación hídrica

El grupo estradiol mostró una clara tendencia a lo largo de todo el test a beber una menor cantidad de agua que los grupos C y BPA, llegando a haber diferencias significativas ($p < 0,05$) en la ingesta de agua entre E2 y BPA hasta los 15 primeros minutos de la prueba. El grupo BPA y el C mostraron una evolución muy similar menos a los 5 min del comienzo del test ya que se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$). Los valores de significancia a los 5, 10 y 15 min fueron: a los 5 min: C vs BPA ($p = 0,033$) y E2 vs BPA ($p = 0,009$); a los 10 y 15 min: E2 vs BPA ($p = 0,013$ y $0,019$ respectivamente) (Fig. 19).

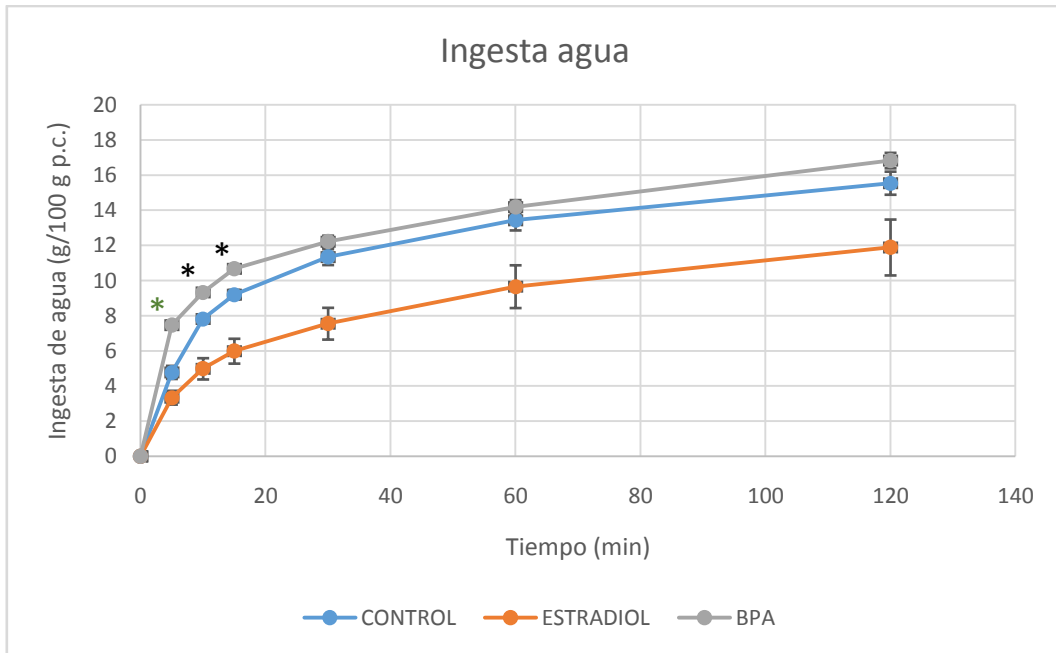


Fig. 19. Ingesta de agua tras 24 horas de privación hídrica. El test se realizó en los 3 grupos experimentales: control (C), estradiol (E2) y bisfenol-A (BPA), de ratas hembras OVX. * $p < 0,05$, C vs BPA y E2 vs BPA. * $p < 0,05$, E2 vs BPA.

Los resultados obtenidos y presentados en la Fig. 20 de la ingesta de salino de los 3 grupos de tratamiento (C, E2 y BPA) fueron muy semejantes entre sí a lo largo del test de privación, aunque es cierto que a las 2 horas parece que empieza a despuntar el E2 con una mayor ingesta.

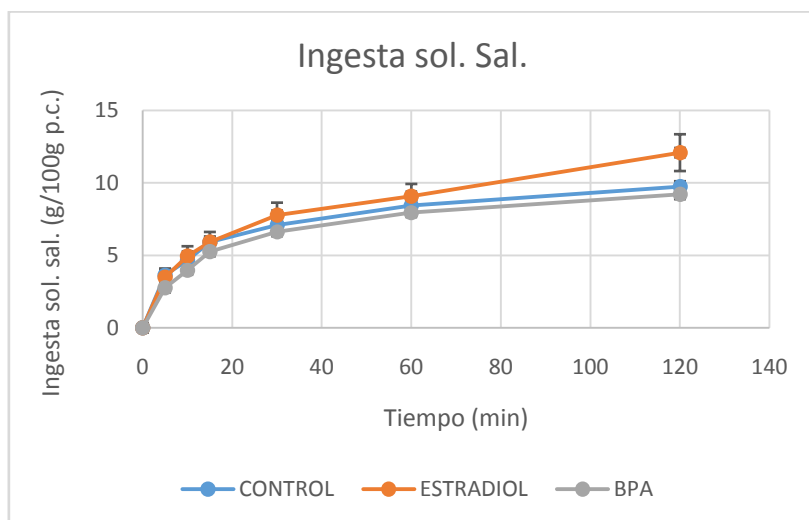


Fig. 20. Ingesta salino (2.7%) tras 24 horas de privación hídrica. El test se realizó en los 3 grupos experimentales: control (C), estradiol (E2) y bisfenol-A (BPA), de ratas hembras OVX.

3.4. Test de preferencia por NaCl:

La preferencia por la solución salina se calculó dividiendo el consumo total de solución salina entre la ingesta líquida total. El grado de preferencia por el NaCl no resultó significativo entre ninguno de los 3 grupos (C, E2 y BPA) tanto en la ingesta diaria como respecto al test de privación. Aunque en los 2 gráficos no se obtuvo significancia el grupo E2 muestra una mayor predilección por la ingesta de NaCl (Fig. 21).

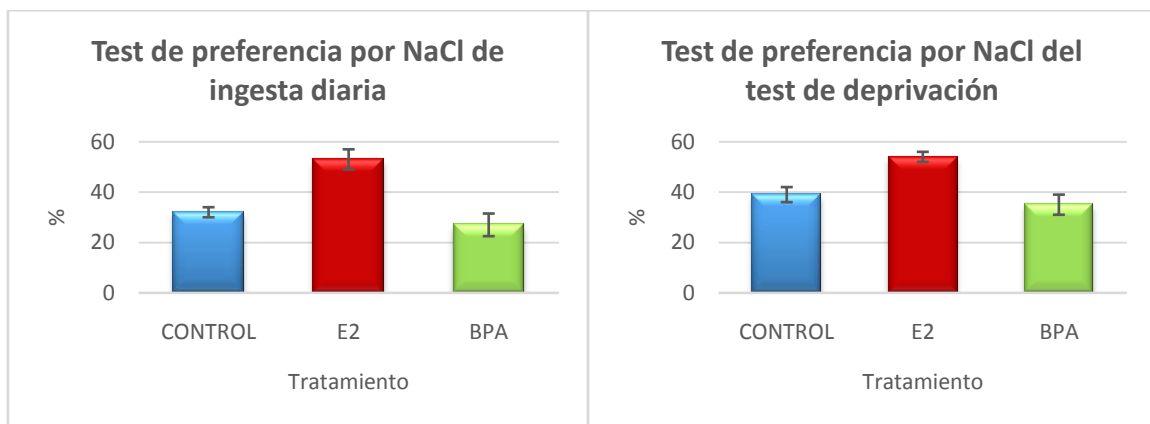


Fig. 21. Test de preferencia por el NaCl (%) de los distintos grupos experimentales: control (C), estradiol (E2) y bisfenol-A (BPA), en ratas hembras OVX, diariamente (izqda.) y durante el test de privación (dcha.).

3.5. Hematocrito y glucemia

Respecto a los datos del hematocrito obtenidos para cada grupo no se vieron diferencias lo suficientemente marcadas como para que resultasen significativas ($p > 0,05$), pero sí para poder ver cierto desnivel entre grupos, de tal forma que el C muestra un valor mayor que el E2 y este que el del BPA (Fig. 22).

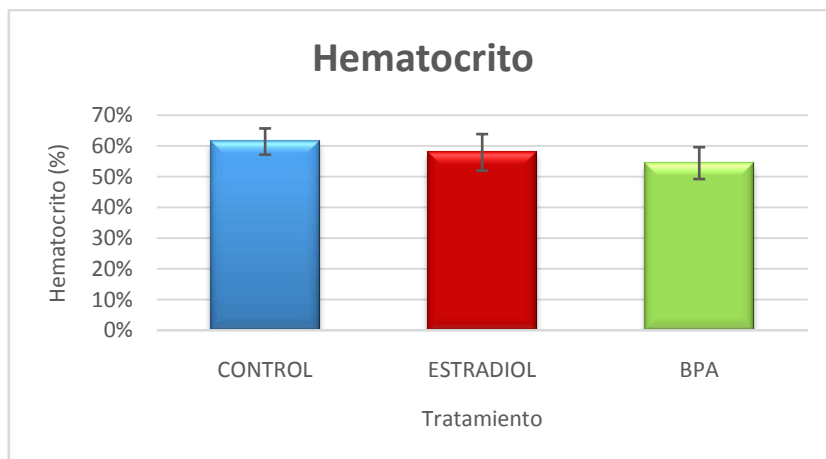


Fig. 22. Hematocrito (%) de los 3 grupos experimentales: control (C), estradiol (E2) y bisfenol-A (BPA), de ratas hembras OVX al final del tratamiento.

Como se puede comprobar en la Fig. 23 en todos los grupos se observó un nivel de glucemia elevado y sin diferencias significativas entre los grupos, aunque sí que en la gráfica se puede observar cierta tendencia a ser más elevada la glucemia en las ratas C que en las E2 y las BPA.

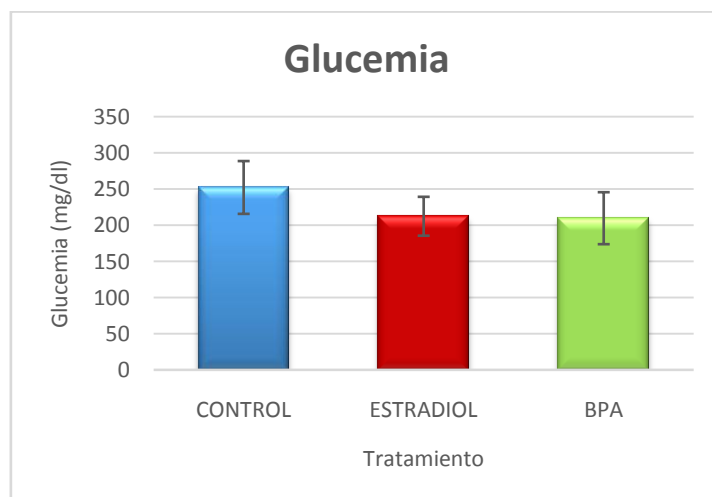


Fig. 23. Glucemia (mg/dl) de los 3 grupos experimentales: control (C), estradiol (E2) y bisfenol-A (BPA), de ratas hembras OVX al final del tratamiento.

3.6. Osmolalidad del plasma sanguíneo

Aunque respecto a la osmolalidad del plasma sanguíneo no se obtuvieron diferencias significativas entre los distintos grupos ($p > 0,05$), sí que se observa un posible aumento en las C respecto a las de BPA y aún más marcado en relación a las de E2 (Fig. 24).

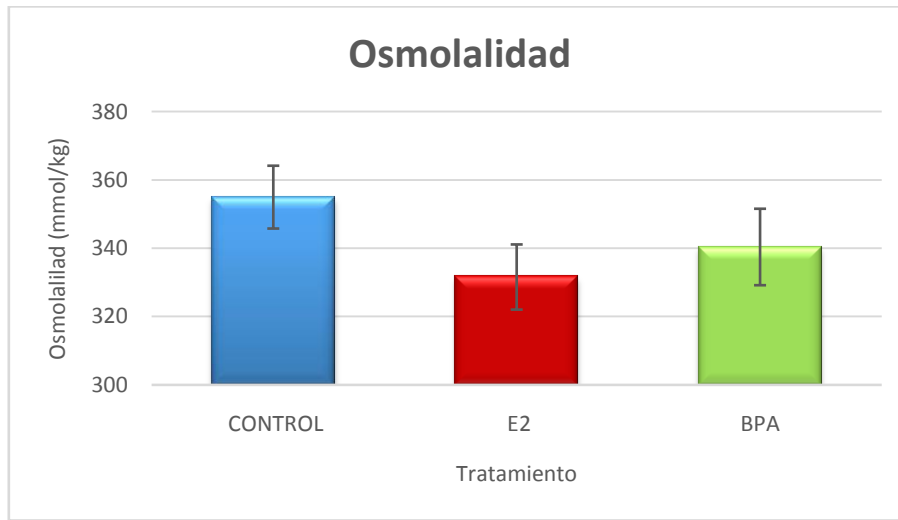


Fig. 24. Osmolalidad (mmol/kg) de los 3 grupos experimentales: control (C), estradiol (E2) y bisfenol-A (BPA), de ratas hembras OVX al final del tratamiento.

3.7. Oviductos

Tras una semana de la ovariectomía bilateral llevada a cabo a todas las ratas, seguida en los días posteriores de la aplicación del tratamiento correspondiente a cada grupo (C, E2 y BPA), se observó una evolución diferente de los oviductos entre grupos como se especifica en la Tabla 1. En las ratas C se atrofiaron mientras que en las E2 y en las BPA se mantuvieron como antes de la OVX, llegando a observarse signos de hipertrofia.

	Control	Estradiol	BPA
Oviductos post-tratamiento	Atrofiados	Hipertrofiados	Hipertrofiados



Tabla 1. Estado de los oviductos de los 3 grupos experimentales: control (C), estradiol (E2) y bisfenol-A (BPA), de ratas hembras OVX al final del tratamiento.

4. DISCUSIÓN

El efecto tóxico y la capacidad del BPA de actuar sobre receptores estrogénicos e imitar ciertos efectos de los estrógenos sobre el organismo humano está bien documentado (Chevalier, 2016). Pero el campo completo de actuación del BPA todavía hoy día no es conocido. Sus propiedades estrogénicas suscitan preocupación por la salud humana, sobre todo en lo referido a la reproducción, desarrollo, cánceres hormono-dependientes, diabetes tipo II y trastornos metabólicos, obesidad y enfermedades cardiovasculares (Chevalier, 2016).

Existen diversas publicaciones que demuestran que los estrógenos influyen sobre la regulación de los fluidos corporales, tanto en el volumen como en la osmolalidad. Por ello, el objetivo de este estudio fue evaluar si, al igual que el estrógeno, el BPA también puede actuar sobre la regulación de fluidos corporales. Los roedores son un buen modelo experimental para investigar los efectos de la exposición a xenoestrógenos sobre la fisiología y ciertos tipos de sistemas de comportamiento que se expresan de forma diferente según el sexo en humanos (Gioiosa, 2007), observando la misma potencia de efecto del BPA tanto en las células humanas como en los animales (Bosch, 2016).

En el protocolo de nuestro estudio se decidió administrar una dosis de 17- β -estradiol de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ s.c. porque es una dosis fisiológica y ya había sido utilizada en multitud de investigaciones anteriores permitiendo obtener resultados positivos del efecto de la hormona (Graves et al, 2011).

Para la elección de la dosis a administrar de BPA se tuvo en cuenta su nivel toxicológico. De acuerdo con la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA), se estableció un nivel mínimo de efecto adverso del BPA, 50 mg /kg / d. Tal valor se usó para la estimación de una dosis de referencia (50 μg / kg / d), la cual se supone segura, sin riesgo apreciable para la salud frente a una exposición diaria (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4674176/#bibr27-1559325815590395>).

Para el presente estudio se utilizaron ratas hembra Wistar ovariectomizadas (OVX) para así provocarles una menopausia inducida y evitar las variaciones hormonales endógenas propias del ciclo estral de la especie (Kim, 2014). Al grupo control se le trató con el vehículo, al estradiol se le suministró una terapia de reemplazo

hormonal con estrógenos, en nuestro caso 17- β -estradiol, y al grupo BPA se le administró el disruptor endocrino esperando los mismos resultados que en el caso de los estrógenos. Del grupo control, al no suministrarle las hormonas sexuales perdidas con la extirpación de los ovarios se espera un aumento de peso corporal y de grasa abdominal, un aumento en la glucemia y resistencia a la insulina, y la atrofia del útero (El Habichi, 2014).

Ya es bien conocido entre los investigadores que los estrógenos tienen efectos bien notorios sobre el aparato reproductor femenino; desde hace más de 45 años sucesivas investigaciones han ido corroborando lo mismo, que los estrógenos provocan un aumento del peso uterino, lo hipertrofian. Aunque difieren en el momento en el que se empieza a notar su acción, todos coinciden en que a partir de las 24 horas es perfectamente visible (Graves et al, 2011; Miura et al, 1971; Moggs et al, 2004). Existen multitud de estudios que coinciden en el efecto regulador de los estrógenos sobre la deposición de la grasa abdominal, reduciéndola (El Habichi, 2014).

La eficacia del procedimiento y la terapia con estrógenos en ratas hembras OVX se confirmó en base a la ganancia o no de peso corporal y uterino. El que el peso corporal del grupo estradiol haya disminuido y que los oviductos no estuviesen atrofiados al final del tratamiento con respecto al grupo control, confirma que la dosis administrada era la adecuada para que el 17- β -estradiol ejerciese su acción, por lo que se usó como control positivo del procedimiento.

Hay que tener en cuenta que el ensayo uterotrófico es de gran utilidad para determinar si una sustancia presenta la capacidad de alterar la funcionalidad hormonal del aparato reproductor femenino, cuantificado a través de una variación en el peso uterino. Se trata de un ensayo de fácil realización, sensibilidad y reproducibilidad, así como económicamente factible (Pardo, 2008).

Se parte de la premisa de que el bisfenol A es un xenoestrógeno, como se ha demostrado ya en diversos estudios (Acconcia et al, 2015; Barha, 2009; Braniste et al, 2010), así que para poder afirmar que también se está inyectando a una dosis efectiva se esperaría ver los mismos efectos en oviductos, peso corporal y grasa abdominal que con el estrógeno. En el presente estudio se obtuvieron datos positivos respecto a los oviductos, los cuales tampoco presentaron atrofia, y aunque la grasa abdominal no resultó significativa encontrándose en una mayor proporción que en las del grupo estradiol, bien es cierto que fue menor que en el caso del grupo control. El efecto del

BPA sobre la grasa corporal sigue sin estar claro ya que, por un lado debería tener el mismo efecto adelgazante que el estradiol pero existen estudios sobre exposición prenatal de ratones a BPA, entre otros (Chevalier, 2016), que obtuvieron como resultado un aumento de la obesidad y una hiperlipidemia, llegando a considerar al BPA como un “obesógeno” (sustancia que estimula la obesidad, aumenta la grasa corporal) (García-Mayor, 2012; Gioiosa, 2007). Hay muchas circunstancias o elementos que podrían estar influyendo sobre este factor, entre los que estarían: la edad de la exposición, el tiempo desde el comienzo de la exposición, la dosis,... (García-Mayor, 2012).

El tratamiento con estradiol es conocido por reducir tanto la ingesta de alimentos como el peso corporal (El Habachi, 2014) y, posiblemente, la menor ingesta sería uno de los factores, junto con un aumento de la actividad física, que llevaría a la pérdida de peso (Eckel et al, 2000; Geary y Asarian, 1999; Graves et al, 2011). En nuestro estudio se ve como el grupo estradiol tiene una cierta tendencia a comer menos que las control, en cambio la mayor pérdida de peso de las E2 sí que apareció como una tendencia clara y marcada, mientras que las control fueron engordando, corroborando los resultados de investigaciones antes citadas. Respecto a estos 2 factores no se observó una imitación del efecto estrogénico en la ingesta de alimento por parte del BPA, pero sí respecto a la pérdida de peso, aunque en menor medida. En ambos grupos experimentales (E2 y BPA) se notó cierta hiperactividad, lo que les pudo haber ayudado a adelgazar. El que el grupo BPA adelgazase aunque no tanto como el estradiol, quizás se haya debido a que se trata de un xenoestrógeno débil, mientras que el 17- β -estradiol tiene una acción muy potente. Es posible que a otras dosis de BPA pudiera llegar a observarse una tendencia mucho más similar entre ambos grupos (E2 y BPA).

En cuanto a la glucemia se obtuvieron unos niveles muy elevados en todos los grupos experimentales. Esto podría ser debido a un alto grado de estrés en las ratas, posiblemente por toda la manipulación de las mismas justo antes de la obtención de las muestras de sangre para hacer la medida. Debido al estrés, el organismo habría liberado adrenalina la cual mediante unión a receptores adrenérgicos provocaría una producción y liberación extra de glucosa (producida por glucogenólisis) y ácidos grasos en sangre por parte de los tejidos para poder producir más energía dentro de las células de todo el cuerpo a partir de esos sustratos (Collective Work Kennedy, 2016; Sircar, 2007). Lo que se resume en que situaciones de estrés derivarían en unos niveles de glucemia superiores a lo establecido como lo normal.

Los efectos metabólicos de los estrógenos sobre los niveles de glucosa son complejos, pero a través de diversos estudios se dio a conocer que la terapia de reemplazo estrogénico tiene un efecto reductor de la glucemia (El Habachi, 2014; Kanaya et al, 2003; Sztejnshajol, 2006). No sólo los estrógenos son capaces de provocar una disminución de la glucemia, Di Lorenzo, D. (2009) publica que una sustancia como el BPA podía imitar al estrógeno produciendo, al igual que este, una caída en los niveles de glucosa en sangre. En nuestro estudio aun habiendo obtenido una glucemia elevada en todos los grupos y sin diferencias intergrupales significativas, sí que se advierten, como en los estudios mencionados, unos niveles de glucosa inferiores en los grupos estradiol y BPA comparado con los valores del grupo control.

Al igual que en otras investigaciones, como en el caso de Graves et al (2011), no se encontraron diferencias en el hematocrito por tratamiento experimental entre los grupos estradiol y control, por lo que era de esperar el resultado obtenido en el que el BPA tampoco provocó diferencias.

El hematocrito está relacionado con la osmolalidad ya que es una medida indirecta del volumen del plasma (Graves et al, 2011). Frente a una situación de deshidratación el volumen sanguíneo disminuye y en consecuencia aumenta el hematocrito y la osmolalidad. Así que se podría afirmar que existe una correlación directa hematocrito/osmolalidad. Con lo que al no obtener resultados significativos en las diferencias entre grupos respecto al hematocrito era de esperar el mismo resultado en la osmolalidad.

Por otra parte son llamativos los niveles tan elevados de osmolalidad obtenidos. Una posible explicación podría estar en las altas cantidades de glucosa encontradas, puesto que es una molécula osmóticamente activa al estar presente en cantidades tan elevadas aumentaría consigo la osmolalidad.

Es importante destacar que los estrógenos como tal, son suficientes para atenuar la ingesta de agua y Na^+ (Almeida-Pereira et al, 2016). Esto se produce porque los estrógenos reducen la sensibilidad del SNC (Curtis, 2009) disminuyendo el estímulo para la producción y la consiguiente liberación de Ang II y con ello la acción de esta de provocar la sed, aunque se apoya más el hecho de que afecte a nivel de la expresión de su receptor (AT1) (Krause, 2003). Todo eso apoya nuestros resultados en los que se vio la misma evolución del grupo estradiol. Las ratas tratadas con estradiol bebieron menos agua que el resto de los grupos, y aunque en las pruebas diarias no hubo diferencias

relevantes, el test de privación reveló que frente a una situación de deshidratación tanto extracelular como intracelular, el estradiol provoca una menor ingesta de agua respecto al resto de los grupos. El estudio no se centró en saber si el estradiol actúa frente a la deshidratación extra o intracelular ya que lo que se buscó fue un efecto y una comparación global con el BPA. Sería adecuado realizar en el futuro experimentos enfocados a dilucidar esa cuestión.

No existe bibliografía suficiente que respalde los resultados obtenidos en la ingesta de agua del grupo tratado con BPA, pero si nos basamos simplemente en el hecho de que se están buscando efectos estrogénicos en la acción del BPA deberíamos obtener, al igual que en el grupo estradiol, una menor ingesta de agua del grupo BPA con respecto al control. Los resultados sólo salieron significativos en el test de privación hídrica a los 5 min C vs BPA, pero en sentido contrario al grupo E2, es decir, bebieron más agua que las control y mucha más que las tratadas con estradiol. Una posible explicación podría ser que el BPA no imitase al estrógeno en todos sus efectos o que simplemente no influya en la ingesta de agua a las dosis administradas.

Los ensayos realizados por Curtis revelaron que el tratamiento subcutáneo en ratas OVX con la misma dosis de estradiol que la usada en este trabajo (10µg/ kg/ d) aumenta la ingesta de salino, se cree que debido a que el estrógeno provoca una percepción menos intensa del sabor salado, con lo que se acabaría tomando más sal (Curtis, 2015). En nuestro estudio las ratas tratadas con la hormona bebieron, diariamente, más cantidad de solución salina que el resto de grupos, a pesar de que estos resultados no fuesen significativos.

Aunque los datos obtenidos de la ingesta de salino del test de privación hídrica no mostraron diferencias intergrupales relevantes, sí que a partir de los 60 min desde el comienzo del test se empieza a ver un mayor consumo por parte del grupo estradiol. Posiblemente si se hubiera seguido con el test o se hubiese dispuesto de un mayor número de ratas para el experimento tales resultados hubieran podido llegar a ser significativos. Esa tendencia se intentó volver a valorar mediante un test de preferencia por el NaCl para intentar aclarar el grado de tal preferencia de las ratas de los distintos grupos, pero aunque vuelve a mostrar que el grupo E2 tiene un mayor apetito por el NaCl que los demás, no se obtuvieron diferencias intergrupales relevantes.

Como apuntan los estudios de Gioiosa, 2007, la falta de respuesta en las ratas OVX tratadas con BPA en algunos parámetros podría deberse a que su acción sobre los

comportamientos no reproductivos son más sensibles a las alteraciones endocrinas durante los períodos críticos de la vida, como por ejemplo durante el desarrollo prenatal. O incluso la causa de la falta de resultados positivos también se podría explicar por la curva dosis-respuesta en forma de U o de curva invertida del BPA (Acconcia et al, 2015; Gioiosa, 2007), es decir, que la dosis para ese parámetro no haya sido la adecuada para poder llegar a visualizar un efecto. Ahondando un poco más en el tema también habría que considerar la posibilidad de que algunos parámetros estudiados no se acojan a ese tipo de curva en forma de U de dosis-respuesta del BPA (Acconcia et al, 2015).

5. CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos con 17- β -estradiol son los esperados con respecto a lo que aparece en la bibliografía: oviductos hipertrofiados, pérdida de peso corporal y de grasa abdominal, disminución de la glucemia, sin efecto sobre el hematocrito, menor ingesta de agua y mayor ingesta de solución salina
- Los resultados obtenidos con la dosis de 50 μ g/kg de BPA administrada imitan los efectos reproductivos sobre los oviductos de los estrógenos, pero no reproducen el resto de parámetros estudiados, por lo tanto, podemos concluir que o la dosis no es la apropiada o que la vía de actuación del BPA para la respuesta díptica no es análoga a la del estradiol.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Acconcia, F. et al. (2015). Molecular Mechanisms of Action of BPA. *Dose-Response: An International Journal*, 1-9.
- Almeida-Pereira, G. et al. (2016). Estradiol and Angiotensin II Crosstalk in Hydromineral Balance: Role of the ERK ½ and INK Signaling Pathways. *Neuroscience*, 322, 525-538.
- Aragón Vargas, L. F. (1996). *Hidratación para la actividad física*. (Memoria del III Simposio en Ciencias del Ejercicio y la Salud). Escuela de Educación Física y Deportes. Universidad de Costa Rica.
- Arau, S. et al. (2013). Thirst in critically III patients: from physiology to sensation. *Am. J. Crit. Care*, 22, 328-335.
- Barha, C. K. et al.(2009). *Low Doses of 17-α-Estradiol and 17-β-Estradiol Facilitate, Where as Higher Doses of Estrone and 17-α- and 17-β-Estradiol Impair, Contextual Fear Conditioning in Adult Female Rats*, [enlínea]. Canadá: University of British Columbia, Vancouver. Disponible en:
<http://www.nature.com/npp/journal/v35/n2/full/npp2009161a.html>
- Bosch, R. I. et al. (2016). El bisfenol A: un factor ambiental implicado en el daño nefrovascular. *Revista de la Sociedad Española de Nefrología*, 36 (1), 5-9.
- Braniste, V. et al. (2010). Impact of oral bisphenol A at reference dosis on intestinal barrier function and sex differences after perinatal exposure in rats. *PNAS*, 107, 448-453.
- Camargos de Figueirêdo, F. et al.(2010). Evidence that central action of paraquat interferes in the dipsogenic effect Ang II. *Neurotoxicology*, 31, 305-309.
- Carlson, N. R. (2005). *Fundamentos de Psicología Fisiológica*. SUNY Buffalo. Boston, MA: Pearson Custom Publishing.
- Castro, B. et al. (2013). Bisphenol A Exposure during Adullthoad Alters Expression of Aromatase and 5α-Reductase Isozimes in Rat Prostate. *PLoS ONE* 8,1-7.
- Chevalier, N. y Fenichel, P. (2016). Bisphenol A: Targeting metabolic tissues. *Rev. Endocr. Metab. Disord*.
- Chichizola (2003). Disruptores endocrinos. Efectos en la reproducción. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo*, 40, 172-188.

- Collective Work Kennedy, M. N. (2016). El azúcar en sangre y otras hormonas. *Diabetes Education Online*, [en línea]. San Francisco: Diabetes Teaching Center at the University of California. Disponible en: <http://dtc.ucsf.edu/es/tipos-de-diabetes/diabetes-tipo-2/compreension-de-la-diabetes-tipo-2/como-procesa-el-azucar-el-cuerpo/el-azucar-en-sangre-otras-hormonas/>
- Curtis, K. S. (2009). Estrogen and the central control of body fluid balance. *Physiology&Behavior*, 97, 180-192.
- Curtis, K. S. (2015). Estradiol and osmolality: Behavioral responses and central pathways. *Physiology&Behavior*, 152, 422-430.
- Di Lorenzo, D. (2009). A cascade of effects of bisphenol A. *Reproductive Toxicology*, 28 (4), 563-567.
- Duvekot, J. et al. (1995). Maternal volumen homeostasis in early pregnancy in relation to fetal growth restriction. *Obstet. Gynecol*, 85, 361-367.
- Eckel, L. A. et al (2000). Spontaneous meal patterns in female rats with and without access to running wheels. *Physiology&Behavior*, 70, 397-405.
- El Habichi, N. M. et al (2014). A comparative study between the effect of 17- β -estradiol and antioxidants combination on some menopausal changes in oophorectomised rats. *Middle East FertilitySocietyJournal*, 19, 303-313.
- Epstein, A. N. (1982). Mineralocorticoids and cerebral angiotensin may act together to produce sodium appetite. *Peptides*, 3, 493-494.
- Falkenstein, E. et al. (2000). Multiple actions of steroid hormones-a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol. Rev*, 52, 513-556.
- Fannon, S. A. et al (2001). An abridged history of sex steroid hormone receptor action. *J. Appl. Physiol*, 91, 1854-1859.
- Fu, Y. y Vallon, V. (2014). Mineralocorticoid-induced sodium appetite and renal salt retention: Evidence for common signaling and effector mechanisms. *NephronPhysiology*, 128, 8-16.
- Garber, S. (2002). *Biology*. [en línea] John Wiley and Sons. Disponible en: <http://dinamicadelavidamartha.blogspot.com.es/2013/03/de-los-seres-vivos-la-osmorregulacion.html>

- García-Mayor, R. V. (2012). Endocrine disruptors and obesity: Obesogens. *Endocrinología y nutrición*, 4, 261-267.
- Geary, N. y Asarian, L. (1999). Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and test meal size in ovariectomized rats. *Physiology&Behavior*, 67, 141-147.
- Geerling, J. C. y Loewy, A. D. (2006). Aldosterone-sensitive nts neurons are inhibited by saline ingestion during chronic mineralocorticoid treatment. *Brain Res*, 1115, 54-64.
- Gioiosa, L. et al (2007). Risk evaluation os Endocrine-Disrupting Chemicals: Effects of Developmental Exposure to low Doses of Bisphenol A on Behavior and Physiology in Mice (*Mus musculus*). *Dose-Response: An International Journal*, 1-8.
- Graves, N. S. et al (2011). Time course of behavioral, physiological, and morphological changes after estradiol treatment of ovariectomized rats. *Physiology&Behavior*, 103, 261-267.
- Herbison, A. E. (1997). Estrogen regulation of GABA transmission in rat preoptic área. *Brain Res Bull*, 44, 321-326.
- Hinchcliff, K.W. et al. (2005). *Equine Sports Medicine and Surgery*. Saunders Ltd.
- Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (2011). Bisfenol A Documentación toxicológica para el establecimiento del límite de exposición profesional de Bisfenol A. *Documentación Límites Exposición profesional*, 1-9.
- Johnson, A. K. y Thunhorst, R. L. (1997). The Neuroendocrinology of Thirst and Salt Appetite: Visceral Sensory Signals and Mechanisms of Central Integration. *Front Neuroendocrinology*, 18 (3), 293-353.
- Kanaya, A. M. et al (2003). Glycemic Effects of Postmenopausal Hormone Therapy: The Heart Attack and Estrogen/Progestin Replacement Study. A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *ACC Current journal*, 138, 1-9.
- Kim, J. M. (2014). Postmenopausal Hypertension and Sodium Sensitivity. *JournalMenopausal Medical*, 20, 1-6.
- Krause, E. G. et al (2003). Estrogen influences stimulated water intake by ovariectomized female rats. *Physiology&Behavior*, 79, 267-274.
- Lima, M. M. (2010). Sistema renina angiotensina y riesgo cardio-metabólico. Revisión. *Revista Venezolana de Endocrinología y Metabolismo*, 8 (1), 3-10.

- Mckinley, M. J. et al. (2001). Vasopressin secretion: osmotic and hormonal regulation by the lamina terminalis. *J. Neuroendocrinol*, 16, 340-347.
- McKinley, M. J. y Johnson, A. K. (2004). La regulación fisiológica de la Sed y la ingesta de líquidos. *Noticias de Ciencias Fisiológicas*, 19, 1-6.
- Mckinley, M. J. y Oldfield, B. J. (2009). Angiotensin II. *Encyclopedia of Neurociencia*, 389-395.
- Miura, S. et al. (1971). Hormonal effects of estrogen-protein conjugates on rat uterus. *Biol Reprod*, 5, 340-342.
- Moggs, J. G. et al. (2004). Phenotypic anchoring of gene expression changes during estrogen-induced uterine growth. *Environ Health Perspect*, 112, 1589-1606.
- Morris, M. et al. (2002). Fitts, Forebrain circumventricular organs mediate salt appetite induced by intravenous angiotensin II in rats. *Brain research*, 949, 42-50.
- Pardo Acosta, B. y Gómez Menéndez, R. (2008). Modelos in vivo más usados para la identificación de disrupción endocrina potencial del aparato reproductor. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 40, 25-38.
- Prins, G. S. et al. (2011). Serum Bisphenol A Pharmacokinetics and Prostate Neoplastic Responses following Oral and Subcutaneous Exposures in Neonatal Sprague-Dawley Rats. *Reprod. Toxicol.*, 31, 1-9.
- Qiu, J. et al. (2003). Rapid signaling of estrogen in hypothalamic neurons involves a novel G-protein-coupled. *J.Neurosci*, 23, 9529-9540.
- Red Internacional de Autoridades en materia de Inocuidad de los Alimentos (INFOSAN) (2009). Bisfenol A (BPA)-Estado actual de los conocimientos y medidas futuras de la OMS y la FAO. *INFOSAN No.5/2009*.
- Rissman, E. F. (2008). Roles of Oestrogen Receptors α and β in Behavioural Neuroendocrinology Beyond Yin/Yang. *J Neuroendocrinology*, 20 (6), 873-879.
- Saleh, T. M. y Connell, B. J. (2000). 17-beta-estradiol modulates baroreflex sensitivity and autonomic tone of female rats. *J Auton Nerv Syst*, 80, 148-161.
- Silverthorn, D. U. (2014). *Fisiología humana. Un enfoque integrado*. (6ª ed.). Editorial Médica Panamericana.
- Sircar, S. (2007). Medical physiology. *Thieme Publishing Group, Stuttgart*, 537-538.

- Stern, J. E. y Zhang, W. (2003). Preautonomic neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus contain estrogen receptor beta. *Brain Res*, 975, 99-109.
- Summy-Long, J. Y. y kadekaro. M. (2001). Role of circumventricular organs (CVO) in neuroendocrine responses: interactions of CVO and the magnocellular neuroendocrine system in different reproductive states. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 28, 590-601.
- Sztejnshajal, C. (2006). Estrogen treatment improves arterial distensibility, fibrinolysis, and metabolic profile in postmenopausal women with type 2 diabetes mellitus. *Metabolismclinical and Experimental*, 55, 953-959.
- Vallon, V. et al. (2005). SGK1 as a determinant of kidney function and salt intake in response to mineralocorticoid excess. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 289, 395-401.
- Wilson, W. et al. (2002). Salt appetite of adrenalectomized rats after a lesion of the SFO, *Behav. Brain Res.*, 136, 449-453.
- Wilson, W. L. et al (2005). Roles of brain angiotensins II and III in thirst and sodium appetite. *BrainResearch*, 1060, 108-117.
- Wolstenholme, J. T. et al. (2011). The role of Bisphenol A in shaping the brain, epigenome and behavior. *Hormones and Behavior*, 59, 296-305.
- Womble, M. D. et al. (2002). 17-beta-estradiol reduces excitatory post synaptic potential (EPSP) amplitude in rat basolateral amygdala neurons. *Neurosci. Lett.*, 331, 86.
- <http://blogs.gamefilia.com/tidus-7/03-01-2012/47499/por-que-motivo-tenemos-sed> [10-06-2016]
- <https://www2.ufmg.br/imagensdoconhecimento/Imagens/Areas/Ciencias-Biologicas/Fisiologia-cardiovascular-Nivia-Santiago> [10-06-2016]
- <http://www.conasi.eu/blog/consejos-de-salud/bisfenol-a-bpa/> [10-06-2016]
- <https://www2.ufmg.br/imagensdoconhecimento/Imagens/Areas/Ciencias-Biologicas/Fisiologia-cardiovascular-Nivia-Santiago> [5-06-2016]
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4674176/#bibr27-1559325815590395> [27-05-2016]