



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

EFFECTO DEL BISFENOL A, UTILIZADO EN LA
MANUFACTURA DE ENVASES ALIMENTARIOS,
EN ÚTERO DE RATAS EXPUESTAS DURANTE EL
PERIODO PERINATAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO DE ALIMENTOS
P R E S E N T A
NANCY ANGÉLICA MONTSERRAT GARCÍA GUZMÁN



MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente	M. en C. Lucía Cornejo Barrera
Vocal	Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
Secretario	Dra. Carmen Adriana Mendoza Rodríguez
1er Suplente	Dr. Guillermo Celestino Cardoso Saldaña
2do Suplente	Dra. Liliana Rocío González Osnaya

Laboratorio de Biología de la Reproducción,
Facultad de Química, L- 206 Edificio F, UNAM.

Asesora: _____
Dra. Carmen Adriana Mendoza Rodríguez.

Sustentante: _____
Nancy Angélica Montserrat García Guzmán.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio fue apoyado por fondos, PAPIIT (IN207207), PAIP (6190-08), UNAM, y **CONACYT** (46759-Q y P47829-Q) a quien agradezco la beca que me proporcionaron.

A la Dra. Adriana Mendoza Rodríguez por su cariño, amistad y paciencia, sobre todo por guiarme desde el primer día y hasta el término de esta tesis, gracias por todo el apoyo emocional y profesional que recibí en todo momento.

Al Dr. Marco Cerbón, por orientarme durante mi estancia en el laboratorio, por su valiosa amistad, por su apoyo incondicional, por su incansable buen humor y por todas las oportunidades que me brindó para crecer como persona y como profesionista.

A mis compañeros de laboratorio, sobre todo a aquellos que además de su amistad me brindaron su tiempo y ayuda tanto en el trabajo experimental como en el escrito: América, Elizabeth, Karina, Luciano, y Noemí. Gracias a Karolinska y a Moni por tantas risas, a Sonia y a Nacho por dedicarme tiempo cuando lo necesité, a Irene por su paciencia y ayuda en todo momento, a Mago por prepararnos el material necesario, y en general a todo el laboratorio por mantener un ambiente de trabajo alegre.

A la M. en C. Lucy Cornejo por sus valiosas observaciones, por su gentileza y consejos.

A mis profesores por todo su conocimiento, y particularmente a aquellos que me han apoyado y brindado su amistad fuera de clase.

Al Dr. Jaime Jasso Kamel y al Dr. Carlos Von Eiff por sus cuidados, amistad e interés por la ciencia.

A todos mis compañeros de carrera por el trabajo en equipo, por su apoyo emocional e intelectual, por tenerme presente, por los momentos de alegría, las desveladas, y los cansancios compartidos en esta facultad.

A mi compañero, cómplice, colega y amigo inseparable Ulises Hernández Durán por compartir tantos momentos de alegría y también de angustia, por soportarme, por apoyarme, por animarme, por ayudarme con los animales de experimentación, y por orientarme siempre que lo necesité.

Al Ing. Raúl Martínez por su apoyo, amistad, interés y afecto.

A Lulú por ser la mejor tía y amiga, y por tantos años de cariño.

A Jordi por toda su paciencia y ternura, por tolerar mis neurosis, por ser el mejor compañero, por impulsarme, por animarme y reanimarme y sobre todo por ayudarme a encontrar siempre una solución.

Y muy especialmente a mi Mamá por todo su amor, por intentar comprenderme, por aguantarme y ayudarme a encontrar mi vocación en cada etapa de mi vida, y porque juntas podemos logramos todo.

DEDICATORIA

A mis queridos abuelitos Juanita y Fer por ser una interminable fuente de amor y ternura cada instante de mi vida.

A mi mama, porque sin ti hubiera sido mas difícil.

A Jordi por impulsarme en todos los sentidos y por siempre estar presente.

Y por último a la UNAM y Facultad de Química por todo el conocimiento y valores que me brindaron.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	4
2. INTRODUCCIÓN.....	6
3. ANTECEDENTES.....	8
3.1 CICLO ESTRAL DE LA RATA.....	8
3.1.1 Niveles hormonales.....	8
3.1.2 Proliferación celular del útero durante el ciclo estral.....	12
3.1.3 Muerte celular del útero durante el ciclo estral.....	13
3.2 GENERALIDADES DEL BISFENOL A.....	15
3.2.1 Contaminación de medios acuosos con BPA.....	19
3.2.2 Contaminación de aire y suelo con BPA.....	20
3.2.3 Ingesta de alimentos contaminados con BPA.....	20
3.2.4 Empaques alimentarios como fuente de BPA y su migración al Ser humano.....	21
3.2.4.1 Contaminación a partir de productos enlatados.....	22
3.2.4.2 Contaminación con BPA a partir de productos plásticos.....	25
3.2.5 Cambios fisiopatológicos causados por BPA en el organismo... ..	26
3.2.5.1 Efectos del BPA en sistema reproductivo.....	30

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	34
5. OBJETIVO GENERAL.....	35
5.1 Objetivos particulares.....	35
6. HIPOTESIS.....	36
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	37
7.1 Anmales de experimentación.....	37
7.2 Suministro de Bisfenol A.....	37
7.3 Procesamiento del tejido.....	37
7.4 Determinación de apoptosis.....	38
7.5 Medición del epitelio luminal.....	38
7.6 Análisis Estadístico.....	39
8. RESULTADOS.....	40
8.1. Evaluación del peso corporal de las crías.....	40
8.2. Evaluación del ciclo estral.....	41
8.3. Cambios en los patrones de apoptosis en el epitelio uterino por administración de BPA.....	41
8.4. Incremento en el grosor del epitelio luminal uterino por tratamiento con BPA.....	45

	3
9. DISCUSIÓN.....	47
10. CONCLUSIONES.....	52
11. REFERENCIAS.....	53

1. RESUMEN

Recientemente se ha demostrado, que la exposición prolongada a disruptores endócrinos, como el bisfenol A (BPA), durante periodos críticos para el desarrollo, como las etapas prenatales y postnatales, podría afectar tanto el crecimiento como la salud del tejido reproductivo de los seres vivos. Sin embargo, estos estudios se han realizado con dosis elevadas del disruptor endócrino, por lo cual hacen falta más investigaciones con dosis bajas del disruptor, que son los niveles a los que estamos expuestos diariamente, para observar su efecto sobre el tracto reproductivo. El principal objetivo de este estudio fue determinar los efectos a largo plazo del BPA, suministrado por vía oral a dosis bajas durante la etapa perinatal sobre los patrones de muerte celular del epitelio luminal y glandular del útero de la rata durante las diferentes etapas del ciclo estral. Para lo anterior se utilizaron ratas gestantes de la cepa Wistar a las cuales se les suministró BPA en una concentración de 1.2mg/kg p.c. /día vía oral a partir del 6to día de la gestación y hasta el término de la lactancia. Al llegar las crías tratadas a la etapa adulta se les evaluó la regularidad del ciclo estral. La apoptosis de los epitelios uterinos se evaluó por medio de la técnica de TUNEL.

El 79.16% de las ratas tratadas con BPA, durante la gestación y lactancia, presentaron ciclos estrales irregulares, permaneciendo principalmente en la etapa del estro. Así mismo, se detectaron cambios anormales en la morfología celular del epitelio luminal y glandular del útero. No se observó un incremento en el peso corporal con respecto a las ratas control a pesar de haber sido reportado por otros autores después de un tratamiento a bajas dosis. El 94.11% del grupo control presentó marca de TUNEL en

fragmentos de DNA de células apoptóticas características de la etapa de estro, en epitelio luminal y glandular, en contraste no se obtuvo marcaje de TUNEL en el 60.71% de los úteros de los animales tratados perinatalmente con BPA, a pesar de encontrarse en etapa de estro, mientras que el 39.28% restante de estos tejidos de animales que recibieron el tratamiento perinatal con BPA si mostraron marcaje de TUNEL en el epitelio uterino.

Por otra parte, se encontró un aumento en el grosor del epitelio luminal estadísticamente significativo al comparar tejido de animales tratados con BPA y tejido perteneciente a los animales control.

En conclusión los resultados de este estudio sugieren que el disruptor endócrino evaluado BPA, a dosis bajas y exposición crónica por vía oral, induce alteración del ciclo estral, cambios en los patrones normales de muerte celular del epitelio luminal y glandular además de ejercer cambios en la medida del epitelio luminal del útero de la progenie de ratas de la cepa Wistar tratadas durante la etapa perinatal.

2. INTRODUCCIÓN

El Bisfenol-A (BPA) es un monómero sintetizado inicialmente como un estrógeno. Actualmente es utilizado en la manufactura de policarbonato, plástico y resinas epóxicas, así como las resinas que recubren las latas de alimentos y bebidas. Por lo cual tiene un elevado potencial para la exposición humana.

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) ha establecido un máximo aceptable de BPA de 0.05mg/kg/día (EPA, 1998). Por otra parte, la Sociedad de la Industria del Plástico de USA, ha recomendado el uso de 50 mg/kg/día como el nivel de dosis sin efecto observable (NOEL), y la dosis sin efecto adverso observable en la reproducción ni toxicidad en la progenie, fue recientemente identificada como 50 mg/kg/día de BPA (Tyl *et al.* 2002). Actualmente, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria EFSA publicó una IDA (ingesta diaria admisible) de 0,05 mg/Kg de peso corporal (EFSA 2007). Dosis menores a 50 mg/kg/día de BPA, serán consideradas en el intervalo de bajas dosis (Schönfelder *et al.*2004).

En el presente estudio, se analizaron los efectos a largo plazo del BPA, a dosis bajas suministrado por vía oral durante la etapa perinatal y lactancia sobre el tracto reproductivo femenino. Se detectaron, a nivel citológico, en el útero de la progenie de las ratas expuestas al estrógeno sintético, las células que presentan apoptosis. Lo anterior se analizó por medio de la técnica de TUNEL, la cual representó una estrategia metodológica adecuada para analizar científicamente la relación entre el disruptor endócrino en estudio, el índice de

muerte celular programada y la morfología celular en el epitelio luminal y glandular del útero de las ratas tratadas.

Dosis bajas (1.2 mg BPA/kg p.c./día) y largos tiempos de exposición al BPA vía oral, inducen alteración del ciclo estral y cambios anormales en la morfología y organización celular del epitelio luminal y glandular del útero de rata, así como cambios en el patrón de apoptosis de los epitelios uterinos.

3. ANTECEDENTES

3. CICLO ESTRAL DE LA RATA

3.1.1 Niveles hormonales

La rata es un mamífero de ovulación espontánea, esto es, la ovulación no depende de una estimulación externa como en el caso del conejo, en el cual es necesaria la cópula para que se presente la ovulación. Así mismo, las ratas ovulan durante todo el año y su ciclo estral está constituido por cuatro etapas: proestro, estro, metaestro (también llamado diestro temprano) y diestro. Las ratas presentan ciclos de cuatro a cinco días de duración. En ratas que presentan ciclo de cuatro días de duración, los niveles de estradiol en plasma periférico son basales (8 ± 2 pg/ml) durante el estro. Los niveles de estradiol en plasma empiezan a aumentar en la tarde del metaestro y durante el diestro hasta llegar a su máximo valor (45 ± 2 pg/ml) a las 9:00 am del proestro. Durante la tarde del proestro los niveles de estradiol caen rápidamente y alcanzan valores basales en las primeras horas de la mañana del estro (Figura 2). El estradiol es secretado por los folículos de De Graaf que se encuentran en desarrollo. Los tipos celulares responsables de dicha secreción son las células de la teca interna y las células de la granulosa (Butcher *et al.*, 1974).

Durante el ciclo estral se presentan dos incrementos en los niveles de progesterona secretada en plasma periférico (Figura 2). Durante la tarde del proestro se observa un incremento de progesterona, la cual alcanza su valor

máximo entre las 6:00 y 9:00 pm (46 ± 7 ng/ml). Los niveles de progesterona vuelven a niveles basales (2 ± 1 ng/ml) para la mañana del estro (Butcher *et al.*, 1974; Freeman, 1988). Un segundo pico, de origen lúteo, se presenta alrededor del mediodía del metaestro (24 ± 3 ng/ml), se prolonga hasta las primeras horas de la mañana del diestro y desciende a niveles basales poco tiempo después del amanecer del diestro.

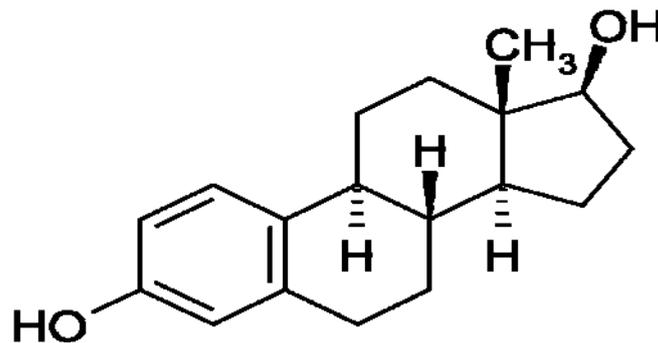


Figura 1. Estradiol

El cambio en las concentraciones de hormonas durante el ciclo estral afecta la actividad del oviducto, útero, cervix y vagina, así como también algunos efectos fisiológicos generalizados. El aumento en la concentración de estrógenos en la sangre desencadena un estímulo neural cíclico que activa la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por el hipotálamo (Brown-Grant *et al.*, 1970; Butcher *et al.*, 1974; Freeman, 1988).

Durante el ciclo estral, el útero de la rata presenta cambios en estructura y función en forma dependiente de hormonas esteroides. Las células del epitelio luminal proliferan durante el metaestro, el diestro y el proestro mientras que el epitelio glandular solamente prolifera durante el metaestro y el diestro. El mayor índice apoptótico del epitelio luminal y glandular se presenta en la etapa del estro

y es menor en el metaestro siendo casi nulo en el diestro y proestro (Hafez, 1970).

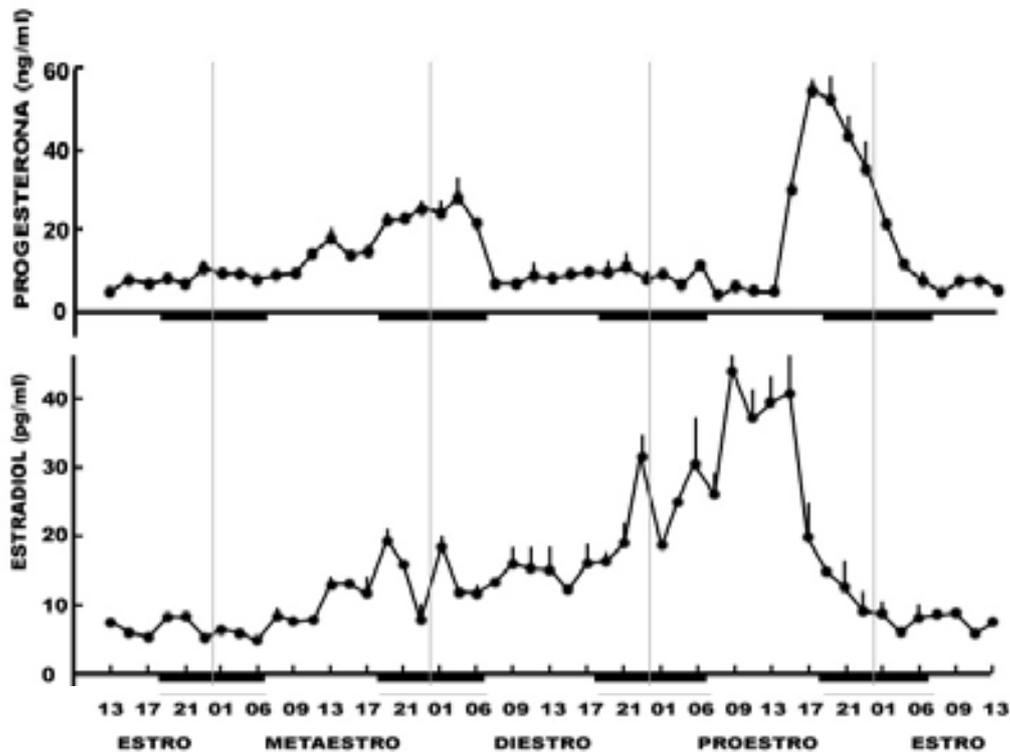


Figura 2. Concentraciones hormonales durante el ciclo estral. Concentración de progesterona y estradiol en plasma periférico obtenido en intervalos de 2 horas a través de los 4 días del ciclo estral de la rata. Las barras negras representan los intervalos de oscuridad en la colonia y los números en la base representan la hora del día (Freeman, 1988).

La forma más común como se determina la etapa del ciclo estral en el que se encuentra cada rata, es por medio del estudio de los cambios morfológicos en las células del epitelio vaginal. En un frotis vaginal pueden presentarse dos o más tipos celulares, pero es el tipo celular predominante el que indica la etapa del ciclo estral en el que se encuentra. Los tres diferentes tipos celulares que se pueden observar en un frotis vaginal de rata son: a) células epiteliales nucleadas, b) leucocitos polimorfonucleares y c) células epiteliales cornificadas. La pared

vaginal durante el estro presenta un aspecto seco, blanco y carente de brillo pero cambia durante el metaestro presentando un aspecto húmedo y rosado. Estos cambios están asociados con la cornificación de las capas superiores durante el estro y con la extensa descamación al final de esta etapa. A medida que se aproxima el proestro los tipos celulares presentes en los fluidos vaginales consiste de células epiteliales nucleadas y leucocitos y ocasionalmente algunas células cornificadas. Durante el proestro, los leucocitos desaparecen, las células epiteliales nucleadas aumentan en número y son gradualmente reemplazadas por células cornificadas sin núcleo. El principio del estro ocurre cuando el frotis presenta 75% de células nucleadas y 25% de células cornificadas. Eventualmente, las células cornificadas son las únicas presentes. El metaestro y el diestro se caracterizan por la aparición de un gran número de leucocitos y la desaparición de las células cornificadas (Hafez, 1970).

El útero también presenta cambios cíclicos, dependientes de esteroides, tanto en su estructura como en su función. Durante cada ciclo, el útero inicialmente se prepara para recibir y transportar el espermatozoide del cervix al oviducto, y subsecuentemente se prepara para recibir los embriones del oviducto. El útero está compuesto por dos capas: miometrio y endometrio. El miometrio es la porción muscular de la pared uterina. Consiste de dos capas de músculo liso: una capa gruesa interna que es circular y una capa más delgada externa que es longitudinal. Entre ambas capas se encuentra una capa de tejido conectivo que contiene nervios, vasos linfáticos y sanguíneos. El endometrio consiste de una matriz o estroma, sobre la cual se asienta un epitelio columnar simple bajo (epitelio luminal) con extensiones glandulares (epitelio glandular) que penetran el estroma (Hafez, 1970).

Durante el proestro, el endometrio está bajo la influencia de los estrógenos producidos por los folículos ováricos (fase folicular), su vascularización se incrementa, el epitelio se convierte en un epitelio columnar bajo y las glándulas presentan cierto crecimiento. La actividad proliferativa del epitelio da lugar a un gran incremento en el área superficial; la proliferación principal es del epitelio luminal. Las células epiteliales secretan un fluido de constitución líquida que contiene algunas proteínas, principalmente enzimas proteolíticas. En esta etapa aumenta la contractibilidad y excitabilidad del endometrio. Durante el estro y el metaestro (fase lútea) las estructuras del endometrio están controladas por la progesterona producida por el cuerpo lúteo: el endometrio se expande, el epitelio luminal se convierte a uno de tipo columnar alto y las glándulas crecen hasta su máximo tamaño, las glándulas ahora son activamente secretoras; secretan un fluido rico en glicoproteínas, azúcares y aminoácidos. Las células del estroma se hacen más largas y más hinchadas. La progesterona actúa sobre el miometrio causando el crecimiento de las células y, en contraste con los estrógenos, disminuye la excitabilidad de la musculatura uterina. Al final de la fase lútea, durante el diestro, el epitelio secretor se colapsa, el endometrio se reabsorbe y es reemplazado por una pequeña capa de estroma cubierta con tejido epitelial lista para entrar a un nuevo ciclo (Hafez, 1970).

3.1.2 Proliferación celular del útero durante el ciclo estral

Para determinar la etapa del ciclo en la cual proliferan cada uno de los epitelios uterinos se lleva a cabo la incorporación de 5-bromo-2'-deoxi-uridina (BrdU) al ADN de las células que se encuentran en la fase S del ciclo celular. La

BrdU incorporada se detecta por medio de un anticuerpo acoplado a rodamina. En la etapa de estro son pocos los núcleos positivos en ambos epitelios, lo que indica que en esta etapa ambos epitelios presentan su mínima actividad proliferativa. En cambio, el estroma presenta una alta actividad proliferativa en esta etapa del ciclo estral.

Los estudios realizados en el laboratorio donde se lleva a cabo esta investigación, reportan que la máxima proliferación de ambos epitelios (luminal y glandular) ocurre durante los días del metaestro y diestro, mientras que en el proestro únicamente prolifera el epitelio luminal y en el día del estro solo se observa proliferación en las células del estroma. Figura 3. (Mendoza- Rodríguez et al, 2003).

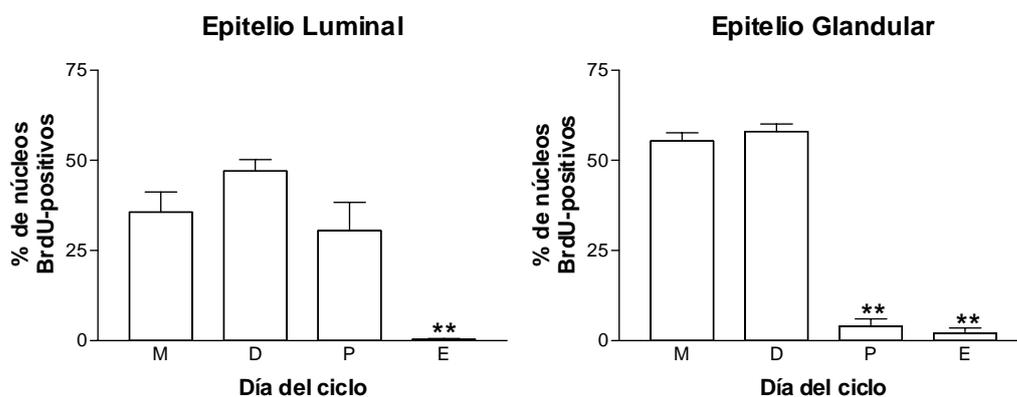


Figura 3. Cuantificación de proliferación en epitelio luminal y glandular del útero de rata por cada día del ciclo. M, metaestro; D, diestro; P, proestro; E, estro.

3.1.3 Muerte celular del útero durante el ciclo estral

La apoptosis o muerte celular programada es la forma más común de muerte en células eucariotas y está involucrada en la muerte coordinada de células somáticas que se encuentran en exceso, que son peligrosas o que se encuentran dañadas. Es un mecanismo fisiológico de suicidio que modula la

homeostasis en distintos tejidos. La muerte celular ocurre a lo largo de la vida de los organismos multicelulares y está estrictamente regulada. Es controlada por diversas señales intra y extracelulares, la cual se encuentra involucrada en la muerte coordinada de células somáticas que se encuentran en exceso, que son peligrosas o que se encuentran dañadas (Zörnig *et al.*, 2001). Se ha demostrado que el útero de diversos mamíferos, incluyendo el humano, presenta muerte celular por apoptosis (Sandow *et al.*, 1979; Pollard *et al.*, 1987; Spornitz *et al.*, 1994; Spencer *et al.*, 1996).

En nuestro laboratorio se han estudiado los patrones de muerte de los epitelios uterinos durante el ciclo estral. Se encontró que el mayor índice apoptótico del epitelio luminal y glandular se presenta en la etapa del estro y es menor en el metaestro siendo casi nulo en el diestro y proestro (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2002). Figura 4.

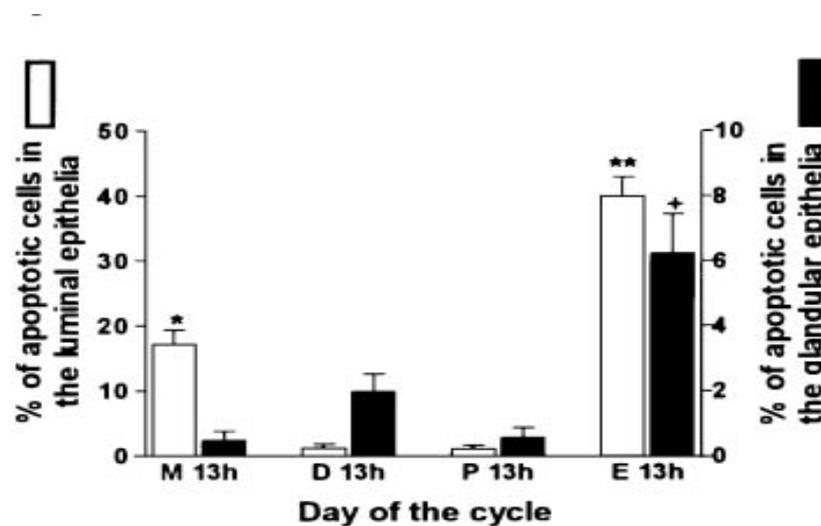


Figura 4. Índice apoptótico de los epitelios uterinos de la rata. Se muestran los índices apoptóticos de los epitelios luminal y glandular de la rata a las 13:00 horas de las diferentes etapas del ciclo estral. El mayor índice apoptótico se tiene en el día del estro (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2002).

3.2 GENERALIDADES DEL BISFENOL A (BPA).

Los disruptores endócrinos, son sustancias químicas, naturales o artificiales, exógenas al organismo que tienen la capacidad de alterar la homeostasis del sistema endocrino-reproductivo del cuerpo humano y de los animales. Estos compuestos mimetizan la acción de hormonas naturales, como el estradiol, en tejidos hormona dependientes y hormona sensibles, siendo dichos compuestos disruptores endócrinos responsables de varias anomalías reproductivas.

Varios investigadores tienen la hipótesis de que la exposición inadvertida y a largo plazo a estos disruptores durante periodos críticos para el desarrollo y cercanos a la etapa postnatal o *in útero*, podría afectar el crecimiento y la salud reproductiva de los seres vivos (Nava *et al.*, 2008). Es de gran interés el estudio del BPA debido a su acción como disruptor endócrino y su elevado potencial para la exposición humana.

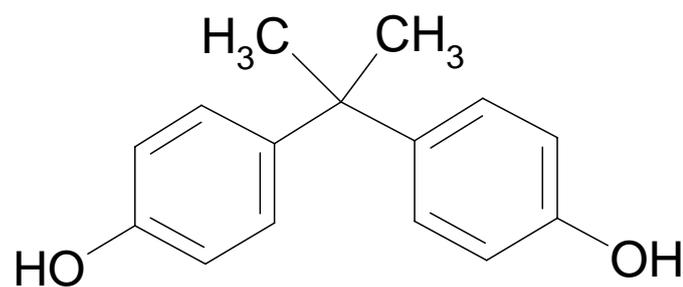


Figura 5. Bisfenol A (BPA).

El 2,2-(4,4'-dihidroxifenil)propano, 2,2'-bis(4-hidroxifenil)propano comúnmente nombrado Bisfenol A es un monómero formado por dos anillos fenólicos insaturados (Figura 5). Fue sintetizado inicialmente como un estrógeno y actualmente es empleado en la manufactura de policarbonato, plásticos y resinas epóxicas, así como en los recubrimientos internos de las latas de alimentos y bebidas, siendo uno de los compuestos estrogénicos industriales frecuentemente usados, y que ha sido detectado en víveres consumidos por humanos y animales (Vom Saal *et al.* 1998), por lo cual es uno de los primeros candidatos para evaluar la disrupción endócrina. En la tabla 1 se observan algunos de los posibles efectos que los disruptores endócrinos causan sobre la salud de los seres humanos.

Más específicamente el BPA, es utilizado en la producción de epóxidos, poliestireno, resinas de policarbonato las cuales son empleadas en la elaboración de curaciones dentales, biberones, recubrimientos internos de latas para alimentos, botellas para bebidas y empaques alimentarios en general, de los cuales el BPA ha demostrado tener la capacidad de migrar desde el polímero hacia el alimento contenido (Yamamoto *et al.* 1999). Dicha capacidad de migración aumenta con la exposición a altas temperaturas o con el uso constante del producto (Yamamoto *et al.* 1999; Yoshida *et al.*, 2001; Takao *et al.*, 2002). Se ha comprobado la migración de BPA desde el polímero hasta el alimento con métodos como HPLC, detección UV, cromatografía de gases – espectrometría de masas (CG-SM) así como cromatografía de líquidos – espectrometría de masas (CL-SM). Con dichas técnicas se observó que al evaluar la migración del BPA en agua, vinagre y aceite de oliva, por 10 días a 40°C este es mayor en aceite de oliva. Sin embargo en todos los casos los

valores han sido menores a los establecidos como migración límite de BPA en la Unión Europea (López-Cervantes *et al.*, 2003).

Debido a un aumento en el uso de productos elaborados con resinas epóxicas y de policarbonato, se ha incrementado la exposición humana al BPA. El ambiente (acuático, aire y suelo) puede ser una fuente de exposición al BPA, pero la principal vía de contacto humana son los alimentos. (López-Cervantes *et al.*, 2003).

Tabla 1. **Efectos que producen los disruptores endócrinos en la salud humana** (www.scielo.org.ar/scielo,2005).

Mujeres	Hijas	Hijos	Hombres
Cáncer de mama	Pubertad precoz	Criptorquidia (no descenso testicular)	Cáncer de testículos y próstata
Endometriosis	Cáncer vaginal	Hipospadias	Reducción del recuento espermático
Muerte embrionaria y fetal	Mayor incidencia de cánceres	Reducción del recuento espermático	Reducción de la calidad del esperma
Malformaciones en la descendencia	Deformaciones en órganos reproductores	Disminución del nivel de testosterona	Disminución del nivel de testosterona
	Problemas en el desarrollo del sistema nervioso central	Problemas en el desarrollo del SNC	Modificación de la concentración de hormonas tiroideas
	Bajo Peso al nacer	Bajo peso al nacer	
	Hiperactividad	Hiperactividad	
	Disminución del coeficiente intelectual.	Disminución del coeficiente intelectual.	

Estudios recientes han demostrado que la administración oral de BPA (10 mg/kg) resulta en la conversión de BPA en monoglucurónido conjugado, principal metabolito urinario del compuesto (Pottenger *et al* 2000). En enero de 2007 la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria EFSA realizó una evaluación de riesgos del BPA y publicó una IDA (ingesta diaria admisible) de 0,05 mg/Kg de peso corporal (EFSA 2007).

Con base en diversos estudios se ha propuesto que la ingesta diaria humana del Bisfenol A es menor a 1 microgramo /kg de peso corporal, siendo el BPA un disruptor endócrino, estas dosis pueden representar efectos adversos para la población humana, especialmente en fetos, por lo que este compuesto debe ser estudiado cuidadosamente, (Kang *et al.*, 2006).

La actividad estrogénica del BPA fue descubierta accidentalmente por el equipo de Krishnan (Krishnan *et al.*, 1993). Encontraron que después de esterilizar en autoclave agua en frascos de policarbonato, aumentó la tasa de proliferación de células MCF-7 de cáncer de mama, debido a la migración del BPA desde el frasco hasta el agua (Kang *et al.*, 2006).

El policarbonato ha tenido gran demanda en la manufactura de empaques alimentarios y botellas de plástico, ya que es un material que ofrece alta resistencia a temperaturas entre -40°C y 145°C, y a distintos ácidos y aceites, (Staples *et al.*, 1998).

Se ha demostrado que la presencia permanente de compuestos como el BPA en el ambiente a dosis variables y en contacto con el organismo, altera el

desarrollo y la fisiología normal en una gran variedad de seres vivos incluyendo al ser humano (Nava *et al.*, 2008).

3.2.1 Contaminación de medios acuosos con BPA

La solubilidad del BPA en agua va de 120 hasta 300 microgramos/mL, (Dorn *et al.*, 1987; Staples *et al.*, 1998). El BPA se puede encontrar en aguas residuales de industrias que lo emplean ya que no es completamente eliminado durante el tratamiento de las aguas de deshecho. Estas aguas son una fuente de contaminación del medio acuático (Staples *et al.*, 1998; Fürhacer *et al.*, 2000; Körner *et al.*, 200). El BPA en agua de ríos puede ser degradado bajo condiciones aeróbicas, (Dorn *et al.*, 1987; Ike *et al.*, 2000; Klecka *et al.*, 2001; Fromme *et al.*, 2002), pero no bajo condiciones de anaerobiosis (Kang and Kondo, 2002). Recientemente Kang y Kondo demostraron que *Pseudomonas sp.* y *Pseudomonas ptida*, son capaces de biodegradar el BPA (cercana de un 90%).

Un estudio reciente reportó que los niveles de BPA en pescado varían de 2 a 75 ng/g peso seco en el hígado y de 1 a 11ng/g peso seco en el músculo. El BPA también se detectó en pescados (1-6 ng/g peso seco) que vivieron en aguas donde no se encontró BPA en el agua (Belfroid *et al.*, 2002).

El BPA puede permanecer mas tiempo sin degradarse (casi 30 días) en agua de mar en comparación con agua de río, y la posibilidad de que los organismos marinos se contaminen con BPA es mucho mas alta que en organismos de ríos (Ying y Kookana, 2003; Kang y Kondo, 2005).

3.2.2 Contaminación de suelos y aire con BPA

El potencial de transporte del BPA al aire es mucho menor (<0.0001%) con respecto al del agua (aproximado a 30%) o al suelo (68% aprox.)(Staples *et al.*, 1998). Recientemente se ha reportado que la posibilidad de inhalar altas concentraciones de BPA en el aire es muy baja. Sin embargo los obreros de compañías que fabrican productos con base de BPA son una excepción (Rudel *et al.*, 2001).

El BPA puede ser absorbido desde la superficie de aguas por suelo y sedimentos, siendo mayores los niveles de BPA en sedimentos que en aguas. (Bolz *et al.*, 2001; Heemken *et al.*, 2001; Fromme *et al.*, 2002). La contaminación de suelos con BPA posiblemente se relaciona con los desechos humanos, domésticos e industriales (Kawahata *et al.*, 2004).

3.2.3 Ingesta de alimentos contaminados con BPA

La contaminación de alimentos es causada por la migración de BPA desde los empaques hacia el alimento. Resinas epóxicas producidas con BPA se utilizan como lacas para tapas de metal; estas superficies están en contacto con los alimentos y bebidas. Los plásticos de policarbonato son utilizados también como botellas, biberones y contenedores para alimentos y bebidas (Kang *et al.*, 2006).

Con el tiempo, el calor o el simple uso, las uniones éster del polímero son degradadas liberando monómeros de BPA, los cuales son liberados a los

alimentos, bebidas y medio ambiente. Debido a esto, la población en general esta inevitablemente expuesta al BPA, el cual es ingerido en dosis bajas en los alimentos enlatados y en los contenidos de las botellas y contenedores de plástico (Nava *et al.*, 2008).

Basheer y colaboradores (2004) reportaron que la concentración de BPA encontrada en mariscos (langostinos, cangrejos, almejas, calamares y pescado) de un supermercado en Singapur fue entre 13.3 y 213.1 ng/g en base húmeda. Por lo tanto el medio acuático, la ingesta de peces de agua dulce o mariscos contaminados con BPA puede ser la principal vía de contaminación para los seres humanos.

En Japón, el equipo de Imanaka ha detectado residuos de BPA en muestras de alimentos en lata, como carne de res en conserva, pollo, maíz y frijol en los niveles de 17-602 ng/g, 212 ng/g, 2.3-75 ng/g y 3.5-26 ng/g, respectivamente. Entre alimentos frescos, BPA ha sido detectado en muestras de pescado y de hígado en niveles desde trazas hasta 6.2 ng/g y 2.2 ng/g, respectivamente. En verduras, frutas y chocolates, se han detectado trazas de BPA (Imanaka *et al.*, 2001).

3.2.4 Empaques alimentarios como fuente de BPA y su migración al ser humano.

Los principales factores que influyen en la migración del BPA desde las superficies del empaque a los alimentos son tiempo y temperatura utilizados en el proceso de fabricación, así como si el producto terminado se debe calentar para su consumo (Kawamura *et al.*, 1999,2001; Munguía-López y Soto Valdéz

2001; Munguía-López *et al.*, 2005; Takao *et al.*, 2002; Goodson *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2003).

3.2.4.1 Contaminación a partir de productos enlatados

Se ha reportado que el BPA es liberado del recubrimiento interno de la lata al alimento o bebida al ser sometido a esterilización comercial y consumido por el ser humano (Brotons *et al.*, 1995). El BPA ha sido detectado en alimentos enlatados como vegetales, bebidas, pescado, fórmulas infantiles y productos cárnicos. Ver tabla 2.

En latas sometidas a tratamiento térmico de 121 °C, el nivel de migración de BPA (0.000006 mg/ml) después de 60 minutos de calentamiento, fue similar al observado después de 15 y 30 minutos a la misma temperatura (Kang *et al.*, 2003).

La migración de BPA también puede verse afectada por el tiempo de vida de anaquel acumulándose en el alimento (Munguía-López y Soto-Valdéz, 2001; Yoshida *et al.*, 2001; Munguía-López *et al.*, 2002, 2005).

Yoshida y colaboradores (2001) reportaron que la concentración de BPA en la porción sólida de vegetales en lata es mucho mayor que en la porción acuosa.

La migración del BPA desde los recubrimientos de las latas hacia el alimento, puede ser distinto entre industrias manufactureras, diferentes métodos de manufactura, y diferentes tipos de materias primas para la elaboración de los distintos recubrimientos (Horie *et al.*, 1999; Kawamura *et al.*, 2001; Takao *et al.*, 2002).

Alimentos con alto contenido de cloruro de sodio o aceites vegetales pueden favorecer la migración del BPA durante el tratamiento térmico (López-Cervantes y Paseiro-Lozada, 2003). Por lo tanto para reducir la migración de BPA desde el recubrimiento de latas, los tiempos de calentamiento y las temperaturas necesitan ser reexaminadas muy cuidadosamente.

Tabla 2. Niveles De BPA En Alimentos Enlatados, Reportados Por Varios Investigadores (Kang *et al.*,2006).

ALIMENTO EN LATA	NO. DE MUESTRAS	CONCENTRACIÓN DE BPA (MEDIDA Y RANGO) (ng/g)		REFERENCIA
Cárnicos	8	130	(17–602)	Imanaka et al. (2001)
	5	110	(17–380)	Goodson et al. (2002)
	6	21	(<20–98)	Thomson and Grounds (2005)
Pescado	10	22	(ND hasta 43)	Goodson et al. (2002)
	8	23	(<20–109)	Thomson and Grounds (2005)
	9	30	(<5–102)	Munguía-López et al. (2005)
Frutas y vegetales	14	25	(2–75)	Imanaka et al. (2001)
	9	42	(ND hasta 95b)	Yoshida et al. (2001)
	10	25	(9–48)	Goodson et al. (2002)
	10	20	(ND hasta 76)	Brotons et al. (1995)
Bebidas	33	6	(<10–24)	Thomson and Grounds (2005)
	11	<1	(ND hasta <7c)	Goodson et al. (2002)
	80	18	(ND hasta 212)	Horie et al. (1999)
	4	<10		Thomson and Grounds (2005)
Fórmulas infantiles	3	31	(21–43)	Kang and Kondo (2003)
	14	5	(0.1–13a)	Biles et al. (1997a)

a niveles indetectables calculados como cero. **ND**, no detectables.

b niveles de BPA en porción sólida; niveles para todas las muestras en porción acuosa inferiores al límite de detección (<5 ng/g).

c <7, concentraciones de BPA detectables pero no cuantificables.

3.2.4.2 Contaminación con BPA a partir de productos plásticos

Los niveles de migración de BPA de contenedores de policarbonato usados son más altos en comparación con los de contenedores nuevos debido a la degradación del polímero. El carbonato es estable, pero puede llegar a hidrolizarse en agua caliente o a un pH alcalino. Por lo tanto, el BPA puede migrar del plástico después de que ha sido lavado y esterilizado en soluciones alcalinas o en agua caliente. A mayor uso de los contenedores de policarbonato mayor será la posibilidad de migración del BPA (Kang *et al.*, 2006).

Las migraciones de BPA de biberones de policarbonato fueron investigadas bajo condiciones severas (por ejemplo, en temperaturas altas por espacios de tiempo prolongados) simulando la migración en el peor de los casos según las recomendaciones de la FDA para artículos de uso repetido que están en contacto con el alimento. La migración de BPA en una superficie de botella de policarbonato de 6 cm × 4 cm fue encontrado en niveles de 1,0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ en agua y 5,9 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ para 50% de etanol después de calentar a 65 °C durante 10 días (Cao *et al.*, 2008).

En botellas y contenedores de policarbonato reutilizables, el llenado con agua caliente o calentando en horno de microondas a temperaturas altas aumentará el nivel de la migración de BPA (Cao *et al.*, 2008).

3.2.5 Cambios Fisiopatológicos causados por BPA en el organismo

Generalmente se piensa que los disruptores endocrinos ambientales son menos potentes que sus contrapartes naturales (hormonas endógenas), y que, por lo tanto, no tienen la capacidad de causar efectos adversos a la salud. Sin embargo, se ha demostrado que los disruptores endocrinos ambientales son capaces de producir múltiples efectos, que varían dependiendo de la dosis (Nava *et al.*, 2008).

El BPA puede ser liberado en el ambiente durante diversos procesos industriales, por lo cual a causa del uso esparcido de este disruptor endócrino, el potencial para la exposición humana es alto. Estudios toxicológicos en animales de laboratorio sugieren que esa exposición a BPA es asociada con anomalías morfológicas, funcionales y de conducta relacionada a la reproducción. La exposición de fetos de roedor a dosis bajas de BPA de 20 – 400 µg/kg/día produce los efectos estrogénicos postnatales. En machos, la producción diaria de esperma se reduce y aumenta el peso de la próstata, y en la hembra, el desarrollo del tejido reproductivo se ve modificado, la interrupción de la diferenciación sexual en el cerebro, los cambios a largo plazo en la vagina, en el crecimiento y la pubertad se aceleran (Howdeshell *et al.* 1999; Kubo *et al.* 2003; Markey *et al.* 2001; Nagel *et al.* 1997; Schönfelder *et al.* 2002; Vom Saal *et al.* 1998; Welshons *et al.* 1998; White *et al.* 1994).

Ante el hecho de que los seres humanos estamos expuestos al BPA, se han practicado análisis de orina para identificar el compuesto (Matsumoto *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003; Calafat *et al.*, 2005; Kawaguchi *et al.*, 2005; Liu *et al.*,

2005; Ye *et al.*, 2005). Calafat y colaboradores (2005) reportó haber detectado BPA (≥ 0.1 ng/ml) en el 95% de las muestras de orina reunidas de 394 adultos estadounidenses con diferentes edades, lugares de residencia y sexo. Muchos estudios sugieren que los altos niveles de BPA en orina pueden ser posiblemente correlacionados con el consumo de alimentos enlatados (Inoue *et al.*, 2003; Matsumoto *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2003).

El BPA se absorbe a través del intestino delgado y penetra en la circulación entero hepática prolongando así su presencia en el metabolismo (Oishi *et al.*, 2008).

En ratones tratados con BPA por vía oral, en dosis comparables con los niveles de exposición ambiental (0.02–0.1 mg/kg/día), se observó que el BPA es un poderoso disruptor de meiosis, el proceso de la división de células productoras de esperma u óvulos, llevando a aneuploidía (Hunt *et Al.* 2003). Aneuploidía (un error en la división celular) durante meiosis es considerada la causa más común conocida del retraso mental así como la causa genética de infertilidad en humanos (Hassold y Hunt 2001).

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) ha establecido un máximo aceptable o dosis de referencia (DRf) de BPA de 0.05mg/kg de peso corporal/día (EPA, 1998). La comisión europea de Comités Científicos calculó, en el 2002, que la ingesta diaria de BPA es cercana a 0.0016 mg/kg peso corporal/día en infantes, de 0.0012 mg/kg peso corporal/día en niños de 4-6 años y de 0.0004 mg/kg peso corporal/día en adultos (EC 2002). Por otra parte, la Sociedad de la Industria del Plástico de USA, calculó en ese mismo año, el uso de 50 mg/kg/día como el nivel de dosis sin efecto

observable (NOEL), y la dosis sin efecto adverso observable en la reproducción ni toxicidad en la progenie, fue recientemente identificada como 50 mg/kg/día de BPA (Tyl *et al.* 2002). Actualmente, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria EFSA publicó una IDA (ingesta diaria admisible) de 0,05 mg/Kg de peso corporal (EFSA 2007).

Muchos estudios sugieren que la absorción y distribución del BPA en órganos maternos y fetales es extremadamente rápida y que el BPA puede fácilmente pasar a través de la placenta después de una administración oral a ratas gestantes (Miyakoda *et al.*, 1999, 2000; Takahashi y Oishi, 2000).

El BPA es glucuronidado por la UDP-Glucuronosiltransferasa (UGT) en el hígado. El glucurónido del BPA es el metabolito principal en la orina, mientras que el BPA libre es el principal componente en heces. A pesar de las diferentes rutas de administración, la dosis suministrada y el modelo experimental, el BPA libre se excreta en heces en un rango de 56 -82% y sus metabolitos en orina se encuentran en un rango de 13-28% (Knaak y Sullivan, 1996; Yokota *et al.*, 1999; Pottenger *et al.*, 2000; Snyder *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2006). Mas del 99% del BPA libre y sus metabolitos son excretados en heces y orina, mientras que menos del 1% es retenido en tejido, según estudios del metabolismo del BPA (Kamrin, 2004).

En el hígado, la actividad de UGT tiene una importante función para la eliminación de BPA. La UGT en el hígado fetal humano esta presente en una concentración cinco veces menor en comparación con el de los adultos (Capiello *et al.*, 2000). Por lo tanto un feto puede correr mayor riesgo a efectos adversos causados por BPA que un adulto.

Oishi y colaboradores han evaluado si microorganismos probióticos como *Bifidobacterium brevis*, cepa Yakult (BbY) y *Lactobacillus Cassei Shirota* (LcS) podrían ejercer un efecto protector contra la exposición dietética al BPA, suministrando BPA vía oral en concentraciones de 0.1mg, 0.25mg y 0.5mg por rata, detectando BPA en heces, encontrando que ambos probióticos reducen la absorción intestinal del BPA facilitando su excreción en heces de ratas y reduciendo el riesgo de alteraciones causadas por disruptores endócrinos.

3.2.5.1 EFECTOS DEL BPA EN SISTEMA REPRODUCTIVO

Estudios con ratas gestantes han demostrado que el BPA se transmite rápidamente de la madre al feto, activando los receptores a estrógenos (Kim *et al.*, 2002). Varios autores afirman que la exposición prolongada e inadvertida de este compuesto durante periodos críticos del desarrollo puede afectar la salud reproductiva y general de los seres vivos (Nava *et al.*, 2008).

Efectivamente, se ha observado, en ratas expuestas perinatalmente al BPA, irregularidades del ciclo estral así como en tejido reproductivo (Papaconstantinou *et al.*, 2000; Rubin *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2002). Más aún, se ha reportado que estos disruptores endócrinos se han relacionado con el incremento en la frecuencia de distintos tipos de cáncer, entre ellos el de sistemas reproductivos (Nava *et al.*, 2008). Actualmente, no se cuenta con las estrategias adecuadas para evaluar el riesgo que representan a la salud reproductiva estos compuestos presentes en alimentos y bebidas consumidos en nuestro país, ya que no se evalúan los efectos que tienen estas sustancias a dosis relativamente bajas (Nava *et al.*, 2008). Por lo tanto, es necesario evaluar el efecto que tienen bajas dosis de BPA sobre el organismo siendo necesaria la evaluación de dichos efectos a nivel molecular.

La exposición a compuestos estrogénicos durante periodos críticos del crecimiento fetal podría resultar en efectos adversos para el desarrollo de los órganos reproductivos. Estudios *in vitro* han demostrado que el BPA compite con el estradiol (E_2) uniéndose a los receptores a estrógeno alfa ($ER\alpha$) (Schönfelder *et al.* 2004), e induce la expresión del receptor a progesterona (PR) (Krishnan *et al.*, 1993; Soto *et al.*, 1995). Sin embargo, la capacidad de

estas sustancias como el BPA para inducir las rutas metabólicas relacionadas a la secreción de hormonas asociadas con mecanismos endocrino-disruptivos en gran parte no han sido determinadas. (Wozniak *et al.*, 2005).

Por otra parte la exposición perinatal a compuestos estrogénicos exógenos, como el BPA, puede producir efectos irreversibles (Newbold RR *et al.*, 1995; Bern *et al.*, 1992). Estos efectos irreversibles han sido evaluados en ratas de cepa Sprague-Dawley, y se han observado alteraciones permanentes en el ciclo estral en hembras expuestas al BPA en la etapa perinatal, lo cual podría ser causa de una fertilidad limitada y una disminución en el proceso reproductivo (Rubin *et al.*, 2001). Kato y colaboradores reportaron en el 2002 que después de suministrar 1mg BPA/cría de rata Sprague-Dawley, vía subcutánea, durante el periodo neonatal hasta el día post natal (PND) 9, encontraron anomalías en órganos reproductivos de hembras como apertura vaginal temprana, irregularidad del ciclo estral, disminución en el área ocupada por el cuerpo lúteo en el ovario y múltiples folículos quísticos en el ovario (Kato *et al.*, 2002).

La etapa y periodo de exposición a BPA, son muy importantes, ya que se ha observado que una exposición limitada de animales adultos puede producir efectos reversibles. Sin embargo, la exposición perinatal a estos compuestos estrogénicos produce efectos irreversibles (Nava *et al.*, 2008).

Existen reportes de distintos estudios realizados a diferentes dosis, tiempos y en diferentes cepas de roedores, algunos de los cuales son resumidos en la Tabla 3 (Nava *et al.*, 2008).

Tabla 3. Efectos reportados por la administración de BPA en modelos murinos. (Nava *et al.*, 2008).

Cepa	Periodo y Etapa de Exposición	Ruta de admón.	Rango de Dosis	Dosis mínima positiva	Referencia	Efectos reportados
C57 BL/6	Hembras de 4 semanas y 6 a 8 meses de edad.	V.O. S.G.	20, 40 y 100 ng/g de peso corporal por vía oral	20 ng/g	Hunt, et al, 2003	Incremento en disturbios meióticos, incluyendo aneuploidias e incremento en los niveles de no-disyunción.
F344 y SD	Hembras de 7-8 sem. de edad OVEX.	V.I.P. Implantes de SILASTIC.	18.75, 37.5, 50, 75, 150 y 200 mg/Kg de BPA.	37.5 mg/Kg	Steinmetz, et al, 1998	Incremento en niveles del mRNA c-fos aprox. 7 a 9 veces los normales a 2 hrs. Incremento del grosor del epitelio vaginal y luminal, y estimula queratinización.
Alpk: AP rata	PND 21-22 con peso entre 38-48 g,	V.O. y SC	Estudio 1. 400 y 600 mg/Kg Estudios 2 y 3. 800 mg/Kg	600 mg/Kg	Ashby and Tinwell, 1998	Apertura vaginal prematura e incremento de peso en útero.
CF - 1 ratón	GD 11 - 17	V.O. S.G.	2.4 µg/g	2.4 µg/g	Howdeshell et al, 1999	Incremento del peso corporal, disminución del tiempo entre la apertura vaginal y el primer estro.
SD	Ratas de 2-3 meses de edad. GD 6-PND 21	V.O disuelto en el agua	0.1 mg/Kg y 1.2 mg/Kg	0.1 mg/Kg	Rubin et al, 2001	Incremento del peso corporal. Alteración en patrones del ciclo estral. Bajos niveles de LH en plasma. El incremento de peso se mantuvo por más tiempo en la dosis baja.
SD	GD 6 - 21	V.O. S.G	0.1 y 50 mg/Kg por día de BPA	0.1 mg/Kg	Schönfelder et al, 2002	No queratinización de superficie epitelial a dosis baja, en dosis alta el efecto es similar pero menos pronunciada. Falta de expresión de la variante de

						64kDa de ER α durante el estro a dosis baja. Falta de expresión de ER α en vagina durante el estro a dosis alta
C57 BL/6 ratón	Fetos de 18.5 días de gestación	Pellets	20 μ g/Kg de peso corporal/día	20 μ g/Kg	Susiarjo, et al, 2007	Incremento en anomalías sinápticas, incremento de asociaciones terminales (end to end) y aumento en la frecuencia de recombinación.
CD – 1 ratón	Hembras de 8 semanas de edad. GD9 – PND4	Pumps (ILP)	25 y 250 ng BPA/Kg.	25 ng/Kg.	Markey et al, 2005	Incremento del área total del árbol ductal y del número de conductos terminales, extremos terminales y brotes alveolares. Incremento significativo del número de células epiteliales que expresan PR

Abreviaturas: CD (Cesarea derivadas de ratas SD), SD (Sprague- Dawley) GD (día gestacional) PND (día post natal), V.O. (Vía oral), V.I.P (Vía Intra peritoneal), V.S.C. (Vía Sub cutánea), S.G. (sonda gástrica), ILP (implantes osmóticos de liberación prolongada).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Ha sido demostrado que el BPA tiene efectos adversos en el sistema endócrino de modelos murinos, sin embargo existen datos en la literatura que proponen evaluar a distintas dosis el efecto del BPA durante largos periodos de tiempo en modelos *in vivo*, además de que no se cuenta con datos suficientes a nivel molecular.

La sociedad de la industria del plástico de USA, ha recomendado el uso de 50 mg de BPA/kg/día como el nivel de dosis sin efecto observable (NOEL), sin embargo se ha reportado que la exposición prenatal de los roedores a disruptores endócrinos a dosis menores de la recomendada induce anormalidades en el tracto reproductivo, el cual es similar en anormalidades en humanos.

En este trabajo se evaluarán los efectos que tiene el BPA suministrado por vía oral a dosis de 1.2mg/kg/día, a nivel molecular en el tejido reproductivo de las crías de las ratas tratadas durante el periodo de gestación y lactancia.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto que tiene el BPA, suministrado a bajas dosis por vía oral, durante la etapa perinatal sobre el tejido reproductivo de ratas.

5.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar efecto que ejerce el BPA, suministrado a bajas dosis por vía oral durante la etapa perinatal, en el incremento de la masa corporal.
2. Analizar los efectos que el tratamiento perinatal con BPA tiene sobre la regularidad del ciclo estral, por medio del estudio de los cambios morfológicos en las células del epitelio vaginal.
3. Determinar los efectos biológicos causados en útero de la progenie de ratas expuestas al BPA vía oral durante el periodo de gestación y lactancia.
4. Evaluar a nivel molecular el proceso de muerte celular del tejido uterino, después del tratamiento con bajas concentraciones de BPA vía oral *in útero* y lactancia de ratas.

6. HIPÓTESIS

Los efectos a largo plazo que producen los estrógenos sintéticos, como el BPA, suministrados a dosis bajas durante largos periodos de exposición al compuesto, pueden detectarse a nivel citológico en el útero con técnicas de TUNEL ya que estas representan una estrategia metodológica adecuada para analizar científicamente la relación entre disruptor endócrino en estudio y la muerte celular del útero de ratas.

Se espera que el BPA como disruptor endócrino ejerza efectos anormales tanto en el ciclo estral como en la citología del útero de las ratas que recibieron el tratamiento en etapa perinatal, además de incrementar su masa corporal.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Animales de experimentación

Para este proyecto se seleccionaron ratas hembras adultas gestantes cepa Wistar con 200g de peso corporal aproximadamente, mantenidas bajo ciclos de 12 hr:12 hr de luz/oscuridad con comida *ad libitum*. Se registró el peso corporal solamente de las crías hembras a partir del tercer día de nacidas y posteriormente cada 5 días hasta los 90 días de edad, haciendo uso de balanza analítica (Rubin *et al* 2001). A partir de la edad adulta se les determinó la etapa del ciclo estral por frotis vaginales diarios, por aproximadamente 4 semanas.

7.2 Suministro de Bisfenol A

A partir del día 6 de la gestación y durante el periodo de lactancia (21 días), se suministró diariamente, vía oral BPA (Sigma Aldrich) diluido en etanol al 0.1%, y disuelto en agua *ad libitum*, en una concentración de 1.2 mg/kg de peso corporal/día en bebederos de vidrio, para evitar que compuestos provenientes de botellas de plástico que contengan policarbonato interfieran en los resultados de éste estudio.

7.3 Procesamiento del tejido

Tanto los animales control como los que recibieron tratamiento perinatal con BPA, se sacrificaron por decapitación, a las 13:00 hrs en etapa de estro. En seguida del sacrificio se extrajo el útero de cada animal fijándolos individualmente en formalina al 3.7% por 24hr y después 1hr en PBS 1X (Mendoza-Rodríguez *et al.* 2002). Se deshidrató el tejido con una serie de

concentraciones crecientes de etanol y se aclararon con xilol en Histoquinet (equipo Microm GmbH 69190. Cat No. 813140 W.Germany) y posteriormente fueron incluidos en bloques de parafina.

Se realizaron cortes de 5µm de grosor en microtomo y se montaron en laminillas tratadas con Poli-L-lisina (Sigma Aldrich P 8920 USA). Dichos cortes se desparafinaron durante 20 minutos a 60°C y posteriormente se rehidrataron en soluciones de concentraciones decrecientes de etanol hasta agua destilada y PBS (solución buffer de fosfatos) 1X (Mendoza-Rodríguez *et al.* 2002).

7.4 Determinación de apoptosis

La detección de células apoptóticas se realizó con la técnica de TUNEL sobre los cortes histológicos. Estos se trataron según las recomendaciones del fabricante del kit de detección *in situ* de muerte celular (In situ cell death detection kit, TMR red; Boehringer Mannheim. Roche) el cual se basa en el marcaje de los extremos libres 3'-OH del DNA (generados por la degradación del DNA durante la muerte celular), con un nucleótido modificado (tetra-methyl-rodamine-dUTP) por medio de la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). La detección de células apoptóticas se realiza observando la preparación en un microscopio con fluorescencia.

7.5 Medición del epitelio luminal

El grosor del epitelio luminal de los tejidos analizados con la técnica de TUNEL, fue medida bajo microscopio y luz de fluorescencia, con la ayuda del programa Nikon DS Cooled Camera Head DS-5Mc/DS-2MBWc., Versión 3.0.

7.6 Análisis estadístico

Los datos sobre crecimiento de las crías utilizadas para este proyecto así como los datos cuantitativos de la técnica de TUNEL y medición del epitelio luminal, fueron evaluados por medio de un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) seguida por una prueba de comparación múltiple de Tukey y t de student. Se usó el programa Prism 2.01 para obtener gráficos y para calcular los valores de probabilidad y los errores estándar de la media (\pm ESM).

8. RESULTADOS

8.1 Evaluación del Peso corporal de las crías

En las ratas tratadas perinatalmente vía oral con BPA, al contrario de las expectativas, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el peso corporal con respecto a las ratas control, hasta los 90 días de edad. Por lo tanto la dosis empleada no induce un incremento de la masa corporal. Figura 6.

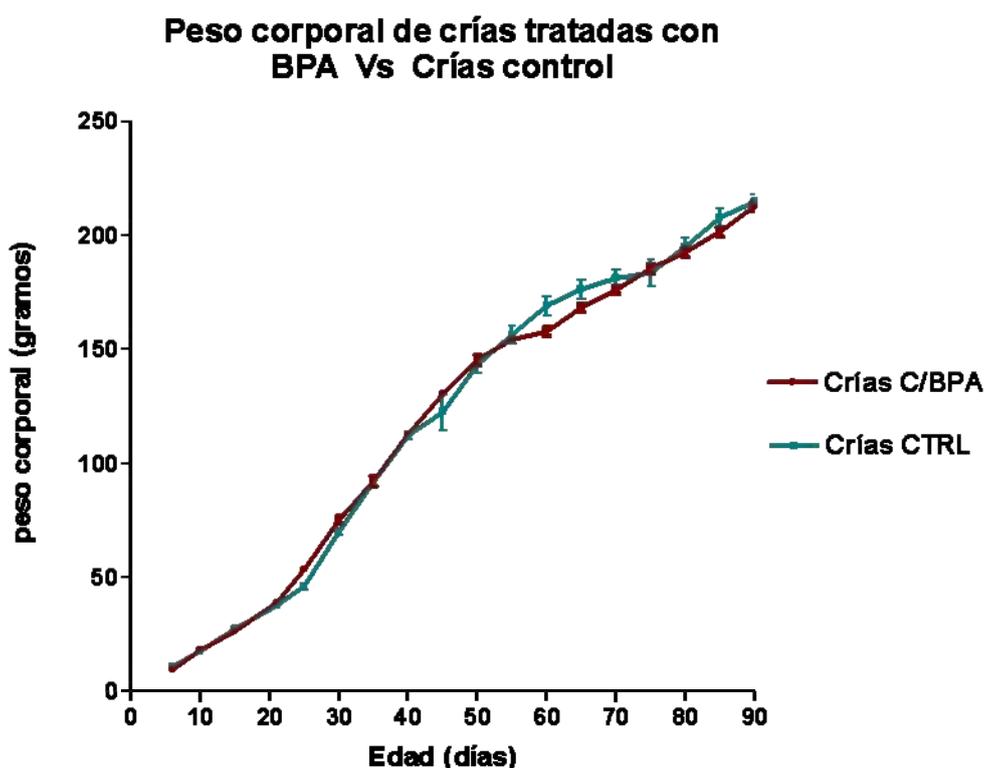


Figura 6. Registro del peso corporal de crías de ratas tratadas con BPA durante etapa perinatal y de crías control, cada 5 días, a partir de los 6 días de nacidas hasta los 90 días de edad. No se reporta diferencia significativa entre ambos grupos después del análisis estadístico. La gráfica muestra el promedio \pm ESM.

8.2 Evaluación del ciclo estral

Se observó también que el 79.16% de las ratas tratadas durante la gestación y la lactancia presentó una alteración del ciclo estral, y el 20.83% de ratas restante aparentemente presentaron ciclos regulares de 4 a 5 días, pues al analizar diariamente la citología de los frotis vaginales se comprobó que los animales se ubicaron en una etapa de estro permanente, gráfico 2, mientras que en el grupo control el 93.75% de las ratas presentaron ciclos regulares de 4 días y solamente en el 6.25% se observaron irregularidades del ciclo estral, sin observar ninguna etapa del ciclo estral de forma permanente. Figura 7.



Figura 7. Porcentaje de animales que presentaron ciclos estrales regulares (■) e irregulares (■) tratados con BPA y controles.

8.3 Cambios en los patrones de apoptosis en el epitelio uterino por administración de BPA

Una vez que quedó demostrada la pérdida del ciclo estral se procedió a aplicar la técnica de TUNEL a los cortes histológicos que previamente se

colocaron en laminillas tratadas con poli-L-lisina, se desparafinaron y se rehidrataron. Se permeabilizó con Proteinasa K (stock : Proteinase K, PCR grade, 20.6mg/mL in 10mM Tris-HCL, pH 7.5. Roche Diagnostics GmbH.) y Triton X-100 al 0.1 % (t-octilfenoxipolietoxietanol, Sigma Ultra.), y posteriormente se incubó con la solución de TUNEL (In situ cell death detection kit , TMR red, Roche Diagnostics GmbH.) por 60 minutos 37 ° C en cámara húmeda, Para el control negativo, se omitió la solución de TUNEL.

En los cortes analizados en microscopio de fluorescencia, fue claramente observable que el 94.11% del grupo control presentó marcaje de TUNEL en fragmentos de DNA de células apoptóticas características de la etapa de estro, en epitelio luminal y glandular, (Figura 8 A-B). En contraste no se obtuvo marcaje de TUNEL en el 60.71% de los úteros de los animales tratados perinatalmente con BPA (Figura 8 C-D), a pesar de encontrarse en etapa de estro, donde existe el mayor índice apoptótico del epitelio luminal y glandular. El 39.28% restante de estos tejidos de animales que recibieron el tratamiento perinatal con BPA, sí mostraron marcaje de TUNEL en el epitelio uterino, (Figura 8 E-F y Figura 9).

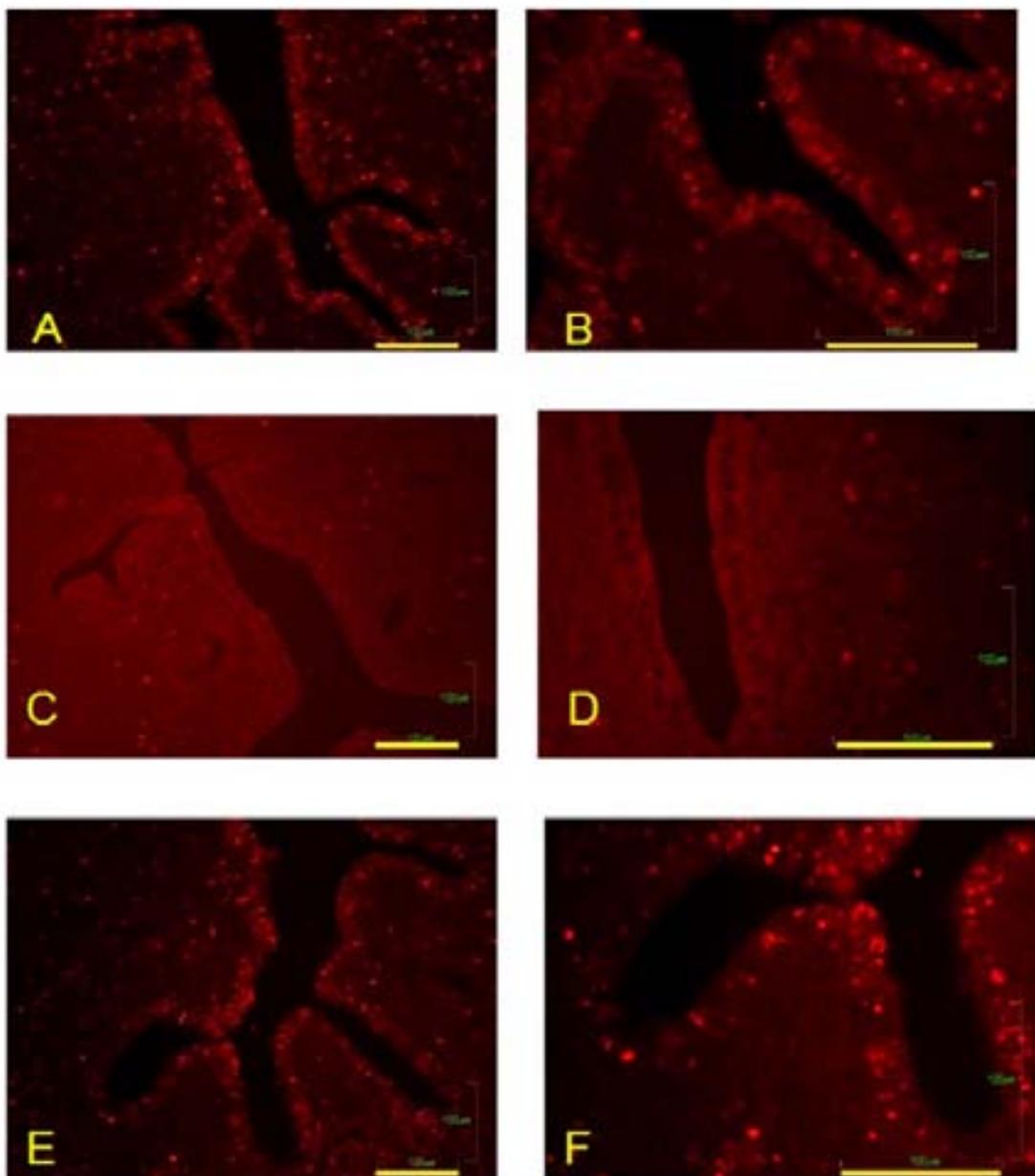


Figura 8. Cortes histológicos de 5 μm de grosor de útero de ratas analizados por la técnica de TUNEL. **(A-B)** Rata control en etapa de estro. El epitelio luminal se encuentra marcado con TUNEL, indicando muerte celular característica de esta etapa del ciclo estral. **(C-D)** Ratas tratadas durante periodo perinatal con BPA, en etapa de estro permanente. Se observa epitelio luminal sin marca de TUNEL, a pesar de encontrarse en etapa de estro. **(E-F)** Rata en etapa de estro permanente, tratada durante etapa perinatal con

BPA. Se observan zonas del epitelio luminal con marca de TUNEL indicando muerte celular. Barra = 100 μ m

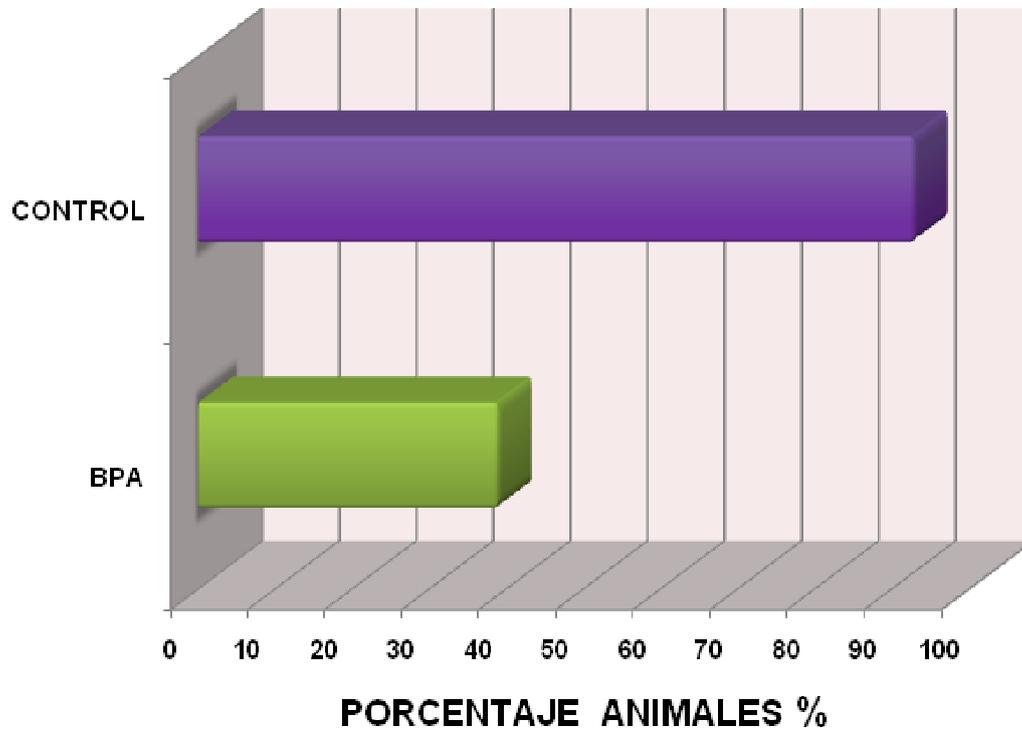


Figura 9. Porcentaje de animales que presentaron marcaje de TUNEL en los epitelios uterinos en la etapa del estro. **BPA**, animales sometidos al tratamiento con BPA durante etapa perinatal; **Control**, animales control tratados con etanol al 1 %.

8.4 Incremento en el grosor del epitelio luminal uterino por tratamiento con BPA.

Puesto que para esta investigación es relevante la citología del epitelio uterino, se realizaron mediciones del ancho del epitelio luminal en distintos cortes del grupo control (Figura 10A) y en distintos cortes del grupo tratado con BPA (Figura 10B). El resultado de estas mediciones indicó que si existen diferencias estadísticamente significativas en el grosor del epitelio uterino entre los animales tratados con BPA durante la etapa perinatal (tanto los que mostraron marcaje de túnel y los que no mostraron marca) y los animales control (Figura 11). Así mismo, no se encontró diferencia significativa en el grosor del epitelio luminal entre los animales que recibieron el tratamiento con BPA durante la gestación y lactancia que si mostraron marca de TUNEL y los que no mostraron marcaje (Figura 11).

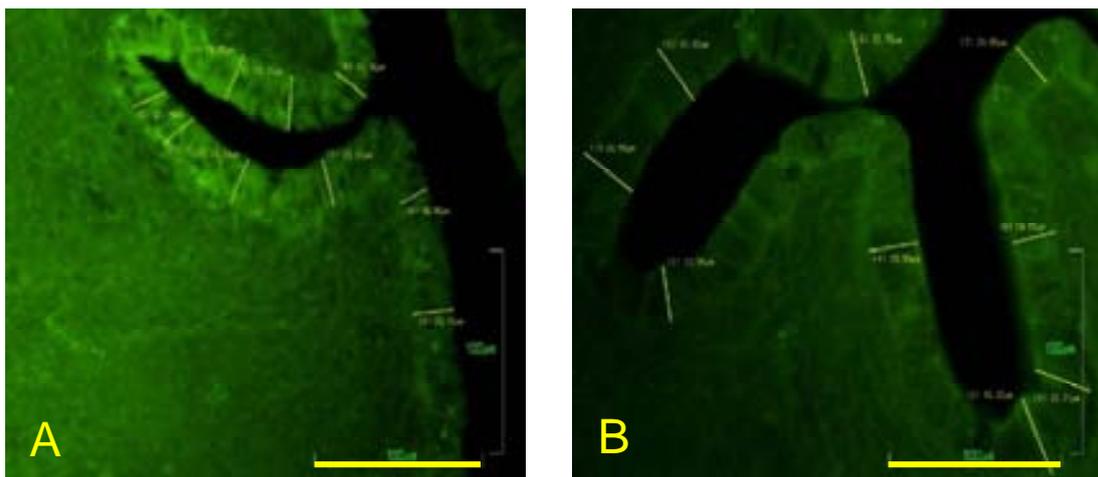


Figura 10. Evaluación del grosor del epitelio luminal. (A) Rata control en etapa de estro. **(B)** Rata tratada durante el periodo perinatal con BPA, en etapa de estro permanente. Barra= 100 μ m.

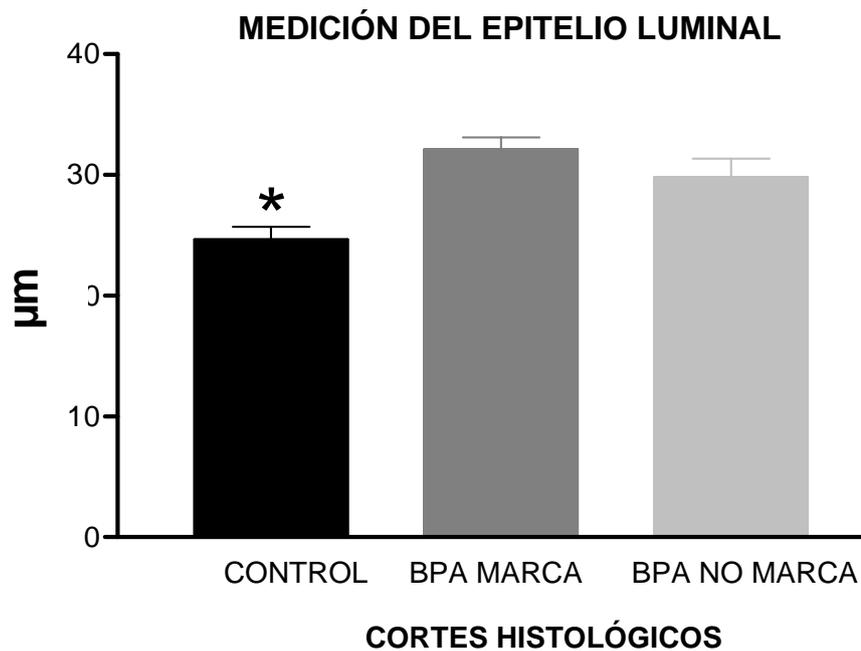


Figura 11. Comparación del grosor del epitelio luminal en cortes histológicos de animales de experimentación. **CONTROL**, animales control tratados con etanol al 1%. **BPA MARCA**, animales tratados con BPA durante la etapa perinatal que presentaron marcaje de TUNEL en epitelio uterino. **BPA NO MARCA**, animales tratados con BPA durante la etapa perinatal que no presentaron marcaje de TUNEL en epitelio uterino a pesar de encontrarse en etapa de estro. * $p < 0.05$ vs. BPA MARCA y BPA NO MARCA.

9. DISCUSIÓN

El BPA es un compuesto que tiene actividad hormonal y recientemente ha recibido mucha atención debido a su alta exposición al ser humano. Actualmente es usado en la fabricación de policarbonatos, plásticos y resinas epóxicas, así como en los recubrimientos internos de las latas de alimentos y bebidas. Se ha detectado que se filtra a los alimentos contenidos en las latas y botellas, así como de los selladores dentales (Yamamoto *et al.* 1999). Estos reportes sugieren que los humanos rutinariamente ingieren BPA. Se ha detectado los niveles de BPA en plasma materno y fetal, y en el tejido de placenta al nacimiento en humanos (Schonfelder *et al.*, 2002; Ikezuki *et al.*, 2002). Se ha detectado que las concentraciones de BPA en fluido amniótico son 5 veces mayores que las detectadas en plasma materno. Debido a la alta exposición humana a este compuesto se han llevado a cabo diversos estudios para evaluar el efecto que tiene el BPA sobre los tejidos hormono regulados. Pruebas *in vitro* e *in vivo* han demostrado que es capaz de unirse a RE α (Schönfelder *et al.* 2004) e inducir un efecto estrogénico en sistema reproductivo (Krishnan *et al.*, 1993; Soto *et al.*, 1997; Villalobos *et al.*, 1995). La mayoría de los estudios *in vivo* en los que evalúan el potencial estrogénico del BPA se han llevado a cabo en roedores inmaduros u ovariectomizados en los cuales se evalúa su potencial uterotrópico. Los resultados de estos estudios son controversiales ya que hay estudios que reportan que el BPA si tiene efectos uterotrópicos (Cook *et al.*, 1997; Gray y Ostby, 1998; Dodge *et al.*, 1996, Ashby y Tinwell, 1998; Papaconstantinou *et al.*, 2000) mientras que otros no lo detectan (Gould *et al.*, 1998; Coldham *et al.*, 1997). La diferencia entre los diferentes estudios son la especie y cepa de animal utilizado, la concentración de BPA suministrada así como la vía de

administración. Entre los que si detectan efectos uterotrópicos, reportan que la administración de BPA desde una concentración de 500 mg/ kg/ día hasta 30 mg/kg/día por diferentes vías es capaz de inducir un incremento del peso uterino, respecto a los animales control, en roedores adultos ovariectomizados o inmaduros (Cook *et al.*, 1997; Gray y Ostby, 1998; Dodge *et al.*, 1996, Ashby y Tinwell, 1998; están en el artículo de Papaconstantinou *et al.*, 2000). Una sola inyección ip de BPA de 37.5 mg/ Kg indujo la proliferación de las células epiteliales de ratas F344 y una dosis más baja de 0.3 mg/ kg/ día fue capaz de inducir hipertrofia del epitelio luminal uterino y secreción de mucosa (Steinmetz *et al.*, 1998; Papaconstantinou *et al.*, 2000). Los efectos producidos por el BPA son revertidos por la administración de un compuesto anti-estrogénico (ICI 182,780), lo que sugiere que los efectos inducidos por el BPA son mediados por el receptor a estrógenos (Papaconstantinou *et al.*, 2000).

La etapa y periodo de exposición a BPA, son muy importantes, ya que se ha observado que una exposición limitada de animales adultos puede producir efectos reversibles. Sin embargo, la exposición perinatal a estos compuestos estrogénicos produce efectos irreversibles (Nava *et al.*, 2008). Estudios recientes han demostrado que las perturbaciones hormonales durante el desarrollo fetal y neonatal pueden predisponer a los individuos a diversas enfermedades o disfunciones en la etapa adulta, tales como la hipertensión y enfermedades coronarias (Sallout y Walker , 2003), obesidad (Oken y Gillman, 2003; Newbold *et al.*, 2005; 2007), y problemas reproductivos, incluyendo infertilidad/subfertilidad, y un incremento de tumores uterinos (Newbold *et al.*, 2000) y cáncer de mama (Davis *et al.*, 1993). Así mismo, la exposición perinatal al BPA induce una

variedad de anomalías en el tracto reproductivo, incluyendo la apertura vaginal prematura (Honma *et al.*, 2002), pubertad temprana (Howdeshell *et al.*, 1999), alteraciones del ciclo estral (Markey *et al.*, 2003), niveles alterados de LH en plasma (Rubin *et al.*, 2001) y morfología ovárica anormal (Markey *et al.*, 2003).

Sin embargo, pocos estudios se han llevado a cabo para determinar, a nivel molecular los efectos que provoca a largo plazo la exposición a BPA durante el periodo perinatal sobre el tracto reproductivo (Markey *et al.*, 2005; Varayoud *et al.*, 2008). Es por ello que en este trabajo se evaluó el efecto que provoca a largo plazo la exposición a BPA durante periodos críticos de la diferenciación, como son el embarazo y la lactancia, sobre la muerte celular de los epitelios uterinos. Así mismo se evaluó el peso de las crías expuestas durante etapa perinatal, la regularidad del ciclo estral y la morfología uterina. El BPA se suministró disuelto en agua, ya que este es uno de los medios más comunes por medio de los cuales los humanos estamos expuestos a este compuesto. La dosis utilizada, 1.2 mg/ Kg/ día, la cual es menor a la aprobada por la Sociedad de la Industria del Plástico Norteamericano (50 mg/ kg/ día) fue estimada por el equipo de Rubin (2001) al medir los niveles de BPA que diariamente fueron consumidos por ratas gestantes a través del agua de sus bebederos.

Después de analizar estadísticamente los datos obtenidos en este experimento, no se encontraron diferencias significativas entre los pesos corporales de las ratas tratadas con BPA y las ratas del grupo control, Figura 4. Por lo tanto, es posible afirmar que el BPA vía oral disuelto en agua a una concentración de 1.2 mg/kg suministrado durante la etapa perinatal, no induce un aumento en la masa corporal de la rata, por lo que existe una discrepancia

entre estos resultados y los reportados por otros autores (Ashby-Tinwell (1998), Howdeshell (1999) y Rubin(2001)), quienes han afirmado que bajas dosis de BPA vía oral, estimula el incremento del peso corporal en modelos murinos. Estas diferencias se pueden deber a las distintas condiciones en las metodologías a seguir, como especie y cepa de los animales utilizados así como el estrés al cual son sometidos al utilizar sondas gástricas o cirugías. Así mismo, detectamos que un 79.16% de las ratas tratadas con BPA no presentan ciclos estrales regulares, mientras que en el grupo control solamente un 6.25% no presentan ciclos regulares (Figura 7). Nuestros resultados coinciden con los publicados por autores como Laws (2000), Rubin (2001), Kato (2003), y colaboradores, entre otros, al reportar falla en la presencia de ciclos regulares. La mayoría de los animales presentaron estros persistentes, es por ello que se decidió analizar la muerte de los epitelios uterinos a nivel molecular.

Se ha comprobado que en la etapa del estro, existe el mayor porcentaje de muerte celular del epitelio glandular y luminal, de acuerdo con el equipo de Mendoza-Rodríguez, 2002 (Figura 2), lo cual lo confirmamos en el 94.1% de los animales del grupo control, al observar marca de TUNEL en ambos epitelios evidenciando la fragmentación del DNA. Sin embargo, en el 60.7% de los animales que recibieron el tratamiento con BPA no mostraron marcaje en epitelio a pesar de mantenerse persistente la etapa del estro y ser sacrificados a las 13:00 h. Por lo tanto, el tratamiento con BPA altera directamente el proceso de muerte celular en el epitelio uterino de la rata.

Siendo relevante para esta investigación la citología del epitelio uterino, nuestros resultados coinciden con los reportados por el equipo de Steinmetz (1998), (tabla 3), al indicar un incremento del grosor del epitelio luminal, pues al

examinar el resultado de las mediciones aplicadas a los cortes histológicos de animales tratados con BPA, y a los cortes histológicos de animales control que estadísticamente si existen diferencias significativas entre ambos grupos.

En el laboratorio de Biología de la Reproducción donde se desarrolló este trabajo, se ha encontrado que las ratas se aparean en la tarde y noche del proestro. Si el animal no se aparea, entonces se lleva a cabo la muerte celular del epitelio uterino. Esto debe de ocurrir en las primeras horas del día del estro. Es por ello que el sacrificio de los animales en etapa de estro se realizó a las 13:00 horas, entonces al no observar muerte celular en el epitelio de ratas tratadas con BPA, es posible afirmar que la exposición prolongada al BPA afecta la citología en tejido uterino de ratas, y por lo tanto tiene un papel fisiológico importante durante el ciclo estral en el útero de la rata.

Por los resultados observados en este experimento se logró afirmar que la exposición perinatal a compuestos como el BPA puede ejercer efectos en el tejido reproductivo alterando los patrones normales de muerte celular en el epitelio, pues se observó este efecto después de la pubertad de las ratas, La exposición perinatal a estrógenos sintéticos como el BPA puede alterar las etapas del ciclo estral en roedores.

10. CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio afirman que el BPA, a dosis de 1.2mg/kg por vía oral durante la etapa perinatal:

- Induce alteración del ciclo estral, manteniendo constante la etapa de estro en la progenie de ratas de la cepa Wistar tratadas durante la gestación y la lactancia.
- No estimula el incremento de la masa corporal en las crías de ratas tratadas.
- Estimula un aumento anormal en el grosor del epitelio luminal.
- Provoca una relevante alteración en los patrones normales de muerte celular del epitelio luminal y glandular del útero de las crías de ratas tratadas, ya que no se observaron células apoptóticas en los epitelios uterinos de las ratas en la etapa de estro, en la cual bajo condiciones normales existe el mayor índice apoptótico.
- Los disruptores endócrinos, como el BPA, de amplio uso en la vida diaria del humano, alteran profundamente la fisiología reproductiva al ser consumidos a muy bajas dosis durante el desarrollo perinatal.

11. REFERENCIAS.

- Ashby J, Tinwell H. Uterotropic activity of Bisphenol-A in the immature rat. *Environ Health Perspect* 106: 719–720. 1998.
- Basheer, C., Lee, H.K., Tan, K.S. Endocrine disrupting alkylphenols and bisphenol A in coastal waters and supermarket seafood from Singapore. *Marine Pollut. Bull.* 48, 1145–1167. 2004.
- Belfroid, A., van Velzen, M., van der Horst, B., Vethaak, D. Occurrence of bisphenol A in surface water and uptake in fish: evaluation of field measurements. *Chemosphere* 49, 97–103. 2002.
- Bern HA. Diethylstilbestrol syndrome: present status of animal and humans studies. In: *Hormonal Carcinogenesis* (Li J, Nandi S, Li SA, eds). New York: Springer-Verlang, 1992.
- Bolz, U., Hagenmaier, H., Körner, W., Phenolic xenoestrogens in surface water, sediments, and sewage sludge from Baden-Württemberg, south-west Germany. *Environ. Pollut.* 115, 291–301, 2001.
- Butcher RL, Collins WE, Fugo NW, Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 β throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinol.* 94, 1704. 1974
- Branham W, Zehr D; Sheehan D, Differential sensitivity of rat uterine growth and epithelium hypertrophy to estrogens and antiestrogens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 203, 297-303, 1993.
- Brotons JA, Olea-Serrano M, Villalobos M, Pedraza V, Olea N. Xenoestrogens released from lacquer coating in food cans. *Environ Health perspect.* 103: 608-612. *Proc. Ntl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 6535-6540. 1995.
- Brown-Grant K, Exley D, Naftolin F, Peripheral plasma oestradiol and luteinizing hormone concentrations during the oestrus cycle of the rat. *J Endocr* 48, 295. 1970.
- Calafat, A.M., Kuklennyik, Z., Reidy, J.A., Caudill, S.P., Ekong, J., Needham, L.L., Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ. Health Perspect.* 113, 391–395. 2005.
- Cao X., Corriveau J., Migration of Bisphenol A from polycarbonate baby and water bottles into water under severe conditions. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 6378-638. 2008

Cappiello, M., Giuliani, L., Rane, A., Pacifici, G.M., Uridine 5'-diphosphoglucuronic acid (UDPGLcUA) in the human fetal liver, kidney and placenta. *Eur. J. Drug Pharmacokine.* 25, 161–163. 2000.

Coldham N., Dave M., Sivapathasundaram S., McDonnell D., Connor C., Sauer M., Evaluation of a recombinant yeast cell estrogen screening assay. *Environ. Health Perspect.* 105, 734-742. 1997.

Cooke J, Buchanan D, Setiawan T, Brody J, Korach K, Taylor J, Lubahn D, Cunha G. Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. 1997.

Davis DL, Bradlow HL, Wolff M, Woodruff T, Hoel DG, Anton-Culver H. Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. *Environmental Health Perspectives*;101:372–377. 1993

Dodge, J., Glasebrook A., Magee D., Phillips D., Sato M., Short L., Bryant H., Environmental estrogens : Effects on cholesterol lowering and bone in the ovariectomized rat. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 59, 155-161. 1996

Dorn, P.B., Chou, C.S., Gentempo, J.J., Degradation of bisphenol A in natural waters. *Chemosphere* 16, 1501–1507. 1987.

EC (European Commission), Commission directive 90/128/EEC relating to plastics materials and articles intended to come into contact with foodstuffs. *Off. J. Eur. Commun.* L297, 26–30. 1990.

EC (European Commission) Opinion of the Scientific Committee on Food on Bisphenol A. SCF/CS/PM/3936 Final. Scientific Committee on Food, Brussels, Belgium. 2002.

EC (European Commission), Commission directive of 1 March 2004 amending directive 2002/72/EC relating to plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs. *Off. J. Eur. Commun.* L71, 8–21. 2004.

EFSA (European Food Safety Authority) Jan. 2007.

EPA (U.S. Environmental Protection Agency), Bisphenol A Reference Dose for Chronic Oral Exposure (RfD) in Integrated Risk Information System (IRIS), A Toxicology Data File on the National Library of Medicine's (NLM) TOXNET System. 1988.

Freeman ME, The ovarian cycle of the rat. En *The Physiology of Reproduction*, (E Knobil y J Neill, ed) pp 1893, Raven Press, Ltd, New York. 1988.

Fromme, H., Küchler, T., Otto, T., Pilz, K., Müller, J., Wenzel, A., Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Res.* 36, 1429–1438. 2002.

Fürhacker, M., Scharf, S., Weber, H., Bisphenol A: emissions from point sources. *Chemosphere* 41, 751–756. 2000.

Goodson, A., Summerfield, W., Cooper, I., Survey of bisphenol A and bisphenol F in canned foods. *Food Addit. Contam.* 19, 796–802. 2002.

Goodson, A., Robin, H., Summerfield, W., Cooper, I. Migration of bisphenol A from can coatings-effects of damages, storage conditions and heating. *Food Addit. Contam.* 21, 1015–1026. 2004.

Gould J., Leonard L., Maness S., Wagner B., Conner K., Zacharewski T., Safe S., MacDonell D., Gaido K., Bisphenol A interacts with the estrogen receptor alpha in a distinct manner from estradiol. *Mol. Cell. Endocrinol.* 142, 203-214. 1998.

Gray L., and Ostby J., Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: Endocrine versus nonendocrine mechanisms. *Toxicol.Ind. Health.* 14, 159-184. 1998.

Hafez ESE, Female reproductive organs. En: *Reproduction and breeding techniques for laboratory animals* (Hafez ESE, ed) pp 74, Lea y Febiger, USA. 1970.

Hardin B. D., Bond G. P., Sikov M.R. Andrew F.D. Beliles R.P. and Niemeier R. W. Testing of selected workplace chemicals for teratogenic potential. *Scand. J.Work Environ Health* 7, 66-75. 1981.

Hassold T, Hunt P. To ERR (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2:280–291. 2001.

Heemken, O.P., Reincke, H., Stachel, R., Theobald, N., The occurrence of xenoestrogens in the Elbe River and the North Sea. *Chemosphere* 45, 245–259. 2001.

Honma S, Suzuki A, Buchanan DL, Katsu Y, Watanabe H, Iguchi T. Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reprod Toxicol*;16:117–122. 2002

Horie, M., Yoshida, T., Ishii, R., Kobayashi, S., Nakazawa, H., Determination of bisphenol A in canned drinks by LC/MS. *Bunseki Kagaku* 48, 579–587 (in Japanese). 1999.

Howdeshell KL, Hotchkiss AK, Thayer KA, Vandenberg JG, vom Saal FS . Environmental toxins—exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* 401:763–764. 1999.

Howe SR, Borodinsky L, Lyon RS. Potential exposure to bisphenol A from food contact use of epoxy coated cans. *J Coat Technol* 70:69–74. 1998.

Hunt PA, Koehler KE, Susiarjo M, Hodges CA, Ilagan A, Voigt RC, et al. Bisphenol A exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Curr Biol* 13:546–553. 2003.

Imanaka M, Sasaki K, Nemoto S, Ueda E, Murakami E, Miyata D, Tonogai Y Determination of bisphenol A in foods using GC/MS., *Apr*;42(2):71-8. Japanese. PMID: 11486386 [PubMed - indexed for MEDLINE]. 2001

Inoue, K., Kawaguchi, M., Funakoshi, Y., Nakazawa, Y., Size-exclusion flow extraction of bisphenol A in human urine for liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 798, 17–23. 2003.

Ike, M., Jin, C.S., Fujita, M., Biodegradation of bisphenol A in the aquatic environment. *Water Sci. Technol.* 42, 31–38. 2000.

Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y, Kamei Y, Taketani Y. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum Reprod*; 17:2839–2841. 2002.

Kamrin, M.A., Bisphenol A: a scientific evaluation. *Medscape Gen. Med.* 6, 7. 2004.

Kang, J.H., Kondo, F. Determination of bisphenol A in milk and dairy products by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Food Prot.* 66, 1439–1443. 2003.

Kang, J.H., Kito, K., Kondo, F. Factors influencing the migration of bisphenol A from cans. *J. Food Prot.* 66, 1444–1447. 2003.

Kang, J.H., Ri, N., Kondo, F. *Streptomyces* sp. strain isolated from river water has high bisphenol A degradability. *Lett. Appl. Microbiol.* 39, 178–180. 2004.

Kang, J.H., Kondo, F., Bisphenol A degradation in river water is different from that in seawater. *Chemosphere* 60, 1288–1292. 2005.

Kang, J.H., Katayama, Y., Kondo, F., Biodegradation or metabolism of bisphenol A: from microorganisms to mammals. *Toxicology* 217, 81–90. 2006.

Kang, J.H., Kondo, F., Bisphenol A in the surface water and freshwater snail collected from rivers around a secure landfill. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 76, 113–118. 2006.

Kang J, Kondo F, Katayama Y., Human exposure to Bisphenol A. *Toxicology* 226, 79-89. 2006.

Kato H., Ota T., Furuhashi T., Ohta Y., Iguchi T. Changes in reproductive organs of female rats treated with Bisphenol A during the neonatal period. *Reproductive Toxicology* 17 283-284. 2003.

Katsuda S, Yoshida M, Watanabe T, Kuroda H, Ando-Lu J, Takahashi M, Hayashi H and Maekawa A. Estrogen receptor mRNA in uterin of normal estrous cycling and ovariectomized rats by in situ hybridization. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 221, 207-214. 1999.

Kawahata, H., Ohta, H., Inoue, M., Suzuki, A., Endocrine disrupter nonylphenol and bisphenol A contamination in Okinawa and Ishigaki islands. Japan-within coral reefs and adjacent river mouths. *Chemosphere* 55, 1519–1527. 2004.

Kawaguchi, M., Sakui, N., Okanouchi, N., Ito, R., Saito, K., Izumi, S., Makino, T., Nakazawa, H., Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography–mass spectrometry for measurement of phenolic xenoestrogens in human urine samples. *J. Chromatogr. B* 820, 49–57. 2005.

Kawamura, Y., Koyano, Y., Takeda, Y., Yamada, T., Migration of bisphenol A from polycarbonate products. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 39, 206–212 (in Japanese). 1998.

Kawamura, Y., Sano, H., Yamada, T., Migration of bisphenol A from can coatings to drinks. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 40, 158–165 (in Japanese). 1999.

Kawamura, Y., Inoue, K., Nakazawa, H., Yamada, T., Maitari, T., Cause of bisphenol A migration from cans for drinks and assessment of improved cans. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* 42, 13–17 (in Japanese). 2001.

Kim JC, Shin HC, Cha SW, Koh WS, Chung MK, Han SS. Evaluation of developmental toxicity in rats exposed to the environmental estrogen bisphenol A during pregnancy. *Life Science* 69:2611-25, 2001.

Klecka, G.M., Gonsior, S.J., West, R.J., Goodwin, P.A., Markham, D.A., Biodegradation of bisphenol A in aquatic environments: river die-away. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2725–2735. 2001.

Knaak J., Sullivan L., Metabolism of bisphenol A in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 8, 175–184. 1966.

Körner E., Bolz U., Süßmuth W., Hiller G., Schuller W., Hanf V., Hagenmaier H., Input/output balance of estrogenic active compounds in a major municipal sewage plant in Germany. *Chemosphere* 40, 1131–1142. 2000.

Krishnan A., Stathis P., Permuth S., Tokes L., Feldman D., Bisphenol A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132, 2279–2286.1993.

Kubo K, Arai O, Omura M, Watanabe R, Ogata R, Aou S. Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats. *Neurosci Res* 45:345–356. 2003.

Kwack SJ, Kwon O, Kim HS, Kim SS, Kim SH, Sohn KH, et al. Comparative evaluation of alkylphenolic compounds on estrogenic activity in vitro and in vivo. *J Toxicol Environ Health Part A* 65:419–431. 2002.

Laws S., Carey S., Ferrell J., Bodman G., Cooper R., Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, Bisphenol A and methoxychlor in rats. *Toxicol Sciences* 54, 154-167.2000.

Liu Z., Wolff M., Moline J., Analysis of environmental biomarkers in urine using an electrochemical detector. *J. Chromatogr. B* 819, 155–159. 2005.

López-Cervantes J., Paseiro-Losada P., Determination of Bisphenol A and its migration from, PVC stretch film used for food packaging. *Food Additives and Contaminants*, Vol 20, Issue 6. 2003.

Markey CM, Luque EH, de Toro MM, Sonnenschein C, Soto AM. In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. *Biol Reprod* 65:1215–1223. 2001.

Markey CM, Coombs MA, Sonnenschein C, Soto AM. Mammalian development in a changing environment: exposure to endocrine disruptors reveals the developmental plasticity of steroid hormone target organs. *Evol Dev*;5:67–75.2003

Matsumoto, G., Comparative study on organic constituents in polluted and unpolluted inland aquatic environments. 2. Water Res. 16, 551–557. 1982.

Matsumoto G., Ishiwatari R., Hanya T., Gas chromatographic mass spectrometric identification of phenols and aromatic acids in river waters. Water Res. 11, 693–698. 1977.

Matsumoto A., Kunugita N., Kitagawa K., Isse T., Oyama T., Foureman G., Morita M., Kawamoto T., Bisphenol A levels in human urine. Environ. Health Perspect. 111, 101–104. 2003.

Matsumoto, J., Yokota, H., Yuasa, A., Developmental increase in rat hepatic microsomal UDP-glucuronosyltransferase activities toward xenoestrogens and decrease during pregnancy. Environ. Health Perspect. 110, 193–196. 2002.

Mendoza-Rodriguez A. , Merchant-Larios H., Segura Valdéz L., Moreno-Mendoza N., Cruz E., Arteaga-López P., Camacho-Arroyo I., Dominguez R, Cerbón M., Expression of p53 in luminal and glandular epithelium during de growth and regresión of rat uterus during the estrous cicle. Molecular reproduction and development. 61:445-452. 2002.

Mendoza-Rodriguez A., Merchant-Larios H., Segura Valdéz L., Moreno-Mendoza N., Cruz E., Arteaga-López P., Camacho-Arroyo I., Dominguez R., Cerbón M. *C-fos* and estrogen receptor gene expresión pattern in the rat uterine epithelium during the estrous cicle. Molecular reproduction and development. 64:379-388. 2003.

Miyakoda H., Tabata M., Onodera S., Takeda K., Passage of bisphenol A into the fetus of the pregnant rat. J. Health Sci. 45, 318–323. 1999.

Miyakoda H., Tabata M., Onodera S., Tadedo K., Comparison of conjugative activity, conversion of bisphenol A to bisphenol A glucuronide, in fetal and mature male rat. J. Health Sci. 46,269–274. 2000.

Monroy-Mendoza M.G., Cerbón-Cervantes M.A., Expresión de los genes p53, bcl-2,bax, bcl-xl y bc-xs durante la regresión del epitelio uterino de la rata. Laboratorio de Endocrinología Molecular.. Facultad de Química. Tesis. UNAM.2002.

Morrissey R, Lamb J, Morris R, Chapin R, Gulati D and Heindel J. Results and evaluations of 48 continuous breeding reproduction studies conducted in mice. Fundam. Appl. Toxicol. 13, 747-777. 1989

Munguía-López E., Gerardo-Lugo S., Peralta E., Bolumen S., Soto-Valdez H., Migration of bisphenol A (BPA) from can coatings into a fatty-food simulant and tuna fish. *Food Addit. Contam.* 22, 892–898. 2005.

Munguía-López E.M., Peralta E., Gonzalez-Leon A., Vargas-Requena C., Soto-Valdez H., Migration of bisphenol A (BPA) from epoxy can coatings to Jalapeno and an acid food simulant. *J. Agric. Food Chem.* 50, 7299–7302. 2002.

Munguía-López E.M., Soto-Valdez H., Effect of heat processing and storage time on migration of bisphenol A (BPA) and bisphenol A-diglycidyl ether (BADGE) to aqueous food stimulant from Mexican can coatings. *J. Agric. Food Chem.* 49, 3666-3671. 2001.

Nagel SC, vom Saal FS, Thayer KA, Dhar MG, Boechler M, Welshons WV. Relative binding affinity serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ Health Perspect* 105:70–76. 1997.

Nava K., Mendoza-Rodriguez A., Cerbón M. Impacto endocrino de sustancias químicas de uso común. *Revista de Educación Química. Segunda época vol. 19 núm. 1.* 27 – 33. 2008.

Newbold RR, McLachlan JA, Dietihylstilbestrol associated defects in murine genital tract development. In *Estrogens in the environment II: Influences on development* (McLachlan JA, ed), New York: Elsevier Science Publishing Company, 288-318. 1995.

Newbold RR, DiAugustine RP, Risinger JI, Everitt JI, Walmer DK, Parrott EC, Dixon D. Advances in uterine leiomyoma research: conference overview, summary, and future research recommendations. *Environ Health Perspect*;108:769–773. 2000.

Newbold RR, Padilla-Banks E, Snyder RJ, Jefferson WN. Developmental exposure to estrogenic compounds and obesity. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*;73:478–480. 2005.

Newbold RR, Padilla-Banks E, Snyder RJ, Phillips TM, Jefferson WN. Developmental exposure to endocrine disruptors and the obesity epidemic. *Reprod Toxicol*;23:290–296. 2007.

Oishi K., Sato T., Yokoi W., Yoshida Y., Ito M., Sawada Haruji. Effect of Probiotics, *Bifidobacterium breve* and *Lactobacillus casei*, on Bisphenol A Exposure in Rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72 (6), 1409–1415, 2008.

Oken E, Gillman MW. Fetal origins of obesity. *Obes Res*;11:496–506. 2003

Papaconstantinou D., Umbreit T., Fisher B., Goering L., Lappas T., Brown M. Bisphenol A- induced Increase in uterine weight and alterations in uterine

morphology in ovariectomized B6C3F1 mice: role of de estrogen receptor. *toxicological sciences* 56, 332-339.2000.

Pollard JW, Pacey J, Cheng SVY, Jordan EG, Estrogens and cell death in murine uterine luminal epithelium. *Cell Tissue Res* 249, 533. 1987

Pottenger L.H., Domoradzki J.Y., Markham D.A., Hansen S.C., Cagen S.Z., Waechter J., The relative bioavailability and metabolism of Bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicol. Sci.* 54, 3–18. 2000.

Rubin S., Murray K., Damassa A., C.King, M. Soto. Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects Body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Enviromental Health Perspectives*. Vol 109 num 7. 2001.

Rudel R., Brody J., Spengler D., Vallarino J., Geno W., Sun G., Yau A., Identification of selected hormonally active agents and animal mammary carcinogens in commercial and residential air and dust samples. *J. Air Waste Manage. Assoc.* 51, 499–513. 2001.

Sandow BA, West NB, Norman RL, Brenner RM, Hormonal control of apoptosis in hamster uterine luminal epithelium. *Am J Anat* 156, 15. 1979.

Schönfelder G., Friedrich K., Chahoud M., Chahoud I.. Developmental effects of prenatal exposure to Bisphenol A on the Uterus of rat offspring. *Neoplasia* Vol 6, No.5,pp.584-594.2004.

Schönfelder G, Wittfoht W, Hopp H, Talsness CE, Paul M, Chahoud I. Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ Health Perspect*; 110:A703–A707. 2002.

Sallout B, Walker M. The fetal origin of adult disease. *J Obstet Gynaecol*;23:555–560; 2003.

Spencer SJ, Cataldo NA, Jaffe RB Apoptosis in the human female reproductive tract. *Obstet Gynecol Surv* 51, 314. 1996

Soto AM, Fernandez MF, Luizzi MF, Oles Karasko AS, Sonnenschein C. Developing a marker of exposure to xenoestrogen mixtures in human serum. *Environ Health Perspect*; 105:647–654. 1997.

Spornitz UM, Rinderknecht BP, Edelmann A, Scheidegger B, Cairoli F Ultrastructure as a basis for dating of rat endometrium. *Anat Rec* 238, 163. 1994.

Staples CA, Dorn PB, Klecka GM, O'Block ST, Harris LR. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere* 36:2149–2173. 1998.

Steinmetz R, Mitchner NA, Grant A, Allen DL, Bigsby RM, Ben-Jonathan N. The xenoestrogen bisphenol A induces growth, differentiation, and c-fos gene expression in the female reproductive tract. *Endocrinology* 139: 2741–2747 (1998).

Snyder, R., Maness S., Gaido K., Welsch F., Sumner S., Fennell T., Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168, 225–234. 2000.

Takahashi, O., and Oishi, S. Disposition of orally administered 2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propane (Bisphenol A) in pregnant rats and the placental transfer to fetuses. *Environ. Health Perspect.* 108, 931–935. 2000.

Takahashi, O., and Oishi, S. Testicular toxicity of dietary 2,2-bis(4-hydroxyphenyl) propane (bisphenol A) in F344 rats. *Arch. Toxicol.* 75,42–51. 2001.

Takao Y, LeeHC, Kohra S, and Arizono K. Release of BPA from food can lining upon heating. *J Health Sci.* 48,331-334. 2002.

Triendl R. Genes may solve hormone-disrupter debate. *Nature* 409,274. 2001.

Tyl RW, Myers CB, Marr MC, Thomas BR, Keimowitz AR, Brine DR, Veselica MM, Fail PA, Chang TY, Seely JC, et al. Three-generation reproductive toxicity study of dietary BPA in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci* 74, 129-138. 2002.

Vom Saal FS, Cooke PS, Buchanan DL, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, et al. A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol Ind Health* 14:239–260. 1998.

Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS. The importance of protocol design and data reporting to research on endocrine disruption: response [Letter]. *Environ Health Perspect* 106:A316–A317. 1998.

White R, Jobling S, Hoare SA, Sumpter JP, Parker MG. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 135:175–182. 1994.

Wozniak A., Bulayeva N., Watson C., Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor alfa mediated Ca²⁺ fluxes

and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells. *Environ. Health Perspect.* 113, 431–439. 2005.

www.scielo.org.ar/scielo, *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* v.39 n.3 La Plata jun./sept. 2005

Yamamoto T. and Yasuhara A., Quantities of BPA leached from plastic waste samples. *Chemosphere* 38, 2569- 2576.1999.

Yang M., Kim S., Lee, S., Chang S., Kawamoto T., Jang J., Ahn Y., Biological monitoring of bisphenol A in a Korean population. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44, 546–551. 2003.

Ye X., Kuklennyik Z., Needham L., Calafat A., Quantification of urinary conjugates of bisphenol A, 2,5-dichlorophenol, and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in humans by online solid phase extraction-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 383, 638–644. 2005.

Ying GG, Williams B, Kookana R. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates. A review. *Environ Int* 28:215–226. 2002.

Ying GG, Williams B, Kookana R. Dillon P. Sorption and degradation of selected five endocrine disrupting chemicals in aquifer material. *Water Research* Volum 37, Issue 15, pp 3785-3791. 2003.

Yokota H., Iwano H., Endo M., Kobayashi T., Inoue A., Ikushiro S., Yuasa A., Glucuronidation of the environmental oestrogen Bisphenol A by an isoform of UDP-glucuronosyltransferase, UGT2B1, in the rat liver. *Biochem. J.* 340, 405–409. 1999.

Yokota H., Tsuruda Y., Maeda M., Oshima Y., Tadokoro H., Nakazono A., Honjo T., Kobayashi K., Effect of bisphenol A on the early life stage in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 1925–1930. 2000.

Yoshida T., Horie M., Hoshino Y., Nakazawa H. Determination of Bisphenol A in canned vegetables and fruit by high performance liquid chromatography. *Food Addit. Contam.* 18, 69– 75. 2001.

Zörnig M, Hueber AO, Baum W, Evan G, Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1551, F1. 2001.