



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN
PERINATAL DE BISFENOL S SOBRE LA
MUERTE CELULAR DEL EPITELIO UTERINO
DURANTE LA ETAPA DEL ESTRO EN RATAS”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

Edgar Solís Lemus



CIUDAD DE MÉXICO

2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE:DRA. CARMEN ADRIANA MENDOZA RODRÍGUEZ

VOCAL:.....DRA. MARIA EVA GONZALEZ TRUJANO

SECRETARIO:.....DRA. BERENICE OVALLE MAGALLANES

1^{er}.SUPLENTE:.....QFB. JAVIER AXOSCO MARIN

2° SUPLENTE:.....M. EN C. SOL CASTREJON CARRILLO

**EXPERIMENTO LLEVADO A CABO EN EL LABORATORIO CON NÚMERO 323
DEL EDIFICIO “F” DE LA FACULTAD DE QUÍMICA; CIUDAD UNIVERSITARIA,
U.N.A.M.**

ASESOR DEL TEMA:

DRA. CARMEN ADRIANA MENDOZA RODRÍGUEZ

SUSTENTANTE:

EDGAR SOLÍS LEMUS

Agradecimientos

Mis agradecimientos a la Dra Carmen Adriana Mendoza, por haberme brindado la oportunidad de desarrollar este trabajo de investigación y el haberme brindado la oportunidad de realizar el sueño con el que he soñado toda una vida “la investigación”.

Mi absoluta gratitud con Annia Alejandra Martínez y Luis Hernandez, por haberme enseñado, motivado y acompañado a lo largo del trayecto de este gran trabajo. Maestros de maestros.

Mi agradecimiento y admiración a Jesica Jiménez, este trabajo no estaría completo sin su apoyo.

Agradezco a la comunidad de profesores de la Facultad de Química y demás compañeros con los que tuve el gusto de compartir clases, por su apoyo y el permitirme el permitirme desarrollar valores y demás habilidades junto a extraordinarias personas.

Mi agradecimiento a Barbara Karen Mendoza, por ser esa chispa cálida que motiva en muchas ocasiones mi vida. A Erika González por enseñarme el valor de la perseverancia, a Nathali Alexxa Gazga por enseñarme el valor de las cosas y de los beneficios del trabajo duro. A Elisa Vega por compartir grandes aventuras y recordarme el gran valor de la amistad. A Cesar Nava por ser un gran compañero y amigo. A Rene Jo por motivarme en momentos difíciles de la carrera. A Isaac Miranda por ser motivo de inspiración en la recta final. Finalmente, a Daniel Hernandez por recordarme en todo momento la razón por la cual decidí involucrarme en el mundo científico.

Agradezco a mi familia por haberme brindado la oportunidad de apoyar mis estudios y el haberme forjado con valores íntegros, como lo son la honestidad, honradez y perseverancia, por mencionar algunos. Mil gracias.

"Porque la ciencia es un cuadrúpedo que camina sobre las cuatro siguientes patas:

la pata del empirismo, hecha de datos de experimentación u observación;

la pata de la racionalidad, hecha de teorías lógicamente constituidas;

la pata de la verificación, siempre necesaria;

la pata de la imaginación, puesto que las grandes teorías son producidas por una potente imaginación creadora.

Así, la ciencia es compleja, se produce por un movimiento cuadrúpedo que le impide paralizarse."

Edgar Morin.

Contenido

Resumen.....	7
Introducción.....	8
Antecedentes.....	10
Generalidades de los disruptores endocrinos	10
Disruptores Endocrinos con Actividad Estrogénica.....	10
Disruptores Endocrinos con Actividad Antiestrogénica.....	11
Disruptores Endocrinos con Actividad Antiandrogénica.....	12
Bisfenol a como Disruptor Endocrino	12
Efectos de BPA Sobre la Salud.....	13
Generalidades de Bisfenol s	15
Exposición de Bisfenol s.....	17
Bioacumulación de Bisfenol s.....	19
Metabolismo de Bisfenol s.....	21
Efectos de Bisfenol s Sobre la Salud.....	22
Regulación del Ciclo Estral en Ratas	24
Muerte Celular Programada (Apoptosis)	27
Planteamiento del Problema.....	30
Hipótesis.....	31
Objetivo General.....	31
Objetivos Particulares.....	31
Metodología.....	32
Condiciones de los Animales de Experimentación.....	32
Monitoreo del Ciclo Estral y Apareamiento.....	32
Administración de Bisfenol s a Ratas Wistar Hembras Gestantes (F0).....	34
Caracterización Fenotípica de las Crías (F1) en el Día 21 Posparto.....	35
Monitoreo del Ciclo Estral de las Crías (F1).....	35
Tratamiento de los Tejidos Extraídos de las Crías (F1).....	35
Evaluación de los Niveles Hormonales Séricos.....	36

Técnica de Tinción TUNEL	36
Conteo de células del Epitelio Uterino Luminal y Glandular	37
Análisis Estadístico de los Datos	37
Resultados	38
 Monitoreo del Periodo de Gestación de Ratas Wistar Gestantes (F0)	38
 Monitoreo del Peso en Ratas Wistar (F0) Después de la Concepción.....	38
 Distancia Anogenital Correspondiente a la Generación F1 en el Día 21 Post Parto	39
 Monitoreo del Peso de Ratas Wistar Correspondientes a la Generación F1	41
 Regularidad del Ciclo Estral en la Generación F1	43
 Cuantificación de Células en Estado de Apoptosis del Epitelio Luminal y Glandular Uterino	44
 Niveles Séricos de Progesterona y Estradiol	47
Discusión.....	48
Resumen de resultados y conclusión	55
Bibliografía.....	57

Resumen

Diversos estudios han demostrado los efectos adversos que presenta el disruptor endocrino bisfenol A (BPA) sobre la salud, por lo que el sector industrial ha propuesto utilizar polímeros constituidos a base de Bisfenol S (BPS) como alternativa segura para la elaboración de envases de plástico, recubrimientos térmicos, resinas, etc. Ya que los polímeros de este compuesto son más estables en condiciones de alta temperatura y a periodos largos de exposición solar en comparación con los polímeros elaborados a partir de BPA. En este estudio se analizaron diferentes variables de los animales en estudio para monitorear e identificar los posibles efectos adversos inherentes al BPS que actúan sobre el organismo, específicamente en la homeostasis del sistema reproductor femenino en ratas de la cepa Wistar.

En la práctica experimental se administró BPS en dos diferentes dosis a ratas de la cepa Wistar a partir del 6º día de gestación y se interrumpió la administración de la dosis hasta el día 21 posparto. Después de parir, a las ratas Wistar madre (F0) se les monitoreó el peso y se observó que no existen diferencias significativas entre los animales que recibieron el tratamiento en comparación con el control.

De las crías que se obtuvieron, a éstas se les monitoreó el peso y se midió la distancia anogenital. En ambos sexos, la distancia anogenital disminuyó de manera significativa en los grupos tratados a una dosis alta de BPS (20 mg/Kg/día). También se halló que el peso disminuyó significativamente en las crías macho para ambas dosis de BPS.

El grado de muerte celular del epitelio luminal y glandular se evaluó en las crías hembras en el estadio del estro de su ciclo estral, revelando que no existen diferencias significativas entre los animales expuestos con BPS con respecto al control.

Los resultados experimentales obtenidos indican que el BPS actúa como un disruptor endocrino debido a que este compuesto es capaz de alterar la homeostasis de los sujetos en estudio. Este compuesto fue capaz de interactuar con el feto por vía uterina durante el periodo de gestación y por leche materna durante la lactancia, alterando así el adecuado desarrollo fisiológico de cada individuo en estudio. Los resultados sugieren que la exposición a este compuesto no modifica el patrón apoptótico del epitelio luminal y glandular en el estadio del estro.

Introducción

El bisfenol s (BPS) es un compuesto de naturaleza orgánica, el cual es empleado en la industria como una alternativa segura para la elaboración de diversos empaques para el almacenamiento de diferentes productos alimenticios. Anteriormente se empleaba con mayor frecuencia el análogo a este compuesto, el bisfenol a (BPA). El BPA es un disruptor endocrino ampliamente estudiado debido a que este ha demostrado que la exposición al humano funge como factor de riesgo para predisponer al individuo a enfermedades tales como ovario poliquístico, infertilidad, cromosomas fetales anormales, feminización del feto, alteraciones inmunológicas y del desarrollo fisiológico (Mollo y Montaña , 2013).

Las investigaciones respecto a los efectos del BPS sobre la homeostasis en seres humanos se encuentran limitadas hoy en día, ya que muy pocos países han modificado sus políticas para prohibir el uso de BPA dentro del sector industrial. Cao-Xu y colaboradores (2019) demostraron la existencia de BPS en productos alimenticios procesados, mientras que la investigación de Russo y otros (2017), así como también de Simoneau y colaboradores (2011), hallaron en biberones la presencia de BPS. Estos estudios sugieren que las concentraciones de BPS comienzan a aparecer en los productos alimenticios que consume el humano, por lo que la exposición crónica de este compuesto podría llegar a ser la causa del padecimiento de diferentes enfermedades.

Se ha evidenciado la presencia de BPS en leche materna en diferentes poblaciones humanas (Deceuninck et al., 2015; Niu et al., 2017; Dualde et al., 2019), por lo cual se ha demostrado que diferentes seres vivos, así como el propio ser humano, se encuentran expuestos desde etapas tempranas del desarrollo al disruptor endocrino BPS. Además, Huang y colaboradores (2019) atribuyen al BPS ser el causante de nacimientos prematuros que padecieron madres expuestas a este disruptor endocrino.

El BPS, al ser análogo del BPA, es considerado como un disruptor endocrino en el humano. Los disruptores endócrinos son sustancias químicas de origen natural o sintético, exógenas al organismo las cuales tienen la capacidad de alterar la homeostasis de los sistemas endócrino y reproductivo, ya que estas sustancias son capaces de mimetizar la acción de las diferentes hormonas endógenas del individuo, alterando así la homeostasis de tejidos hormono dependientes y hormono sensibles (Nava et al., 2008).

Hoy en día se ha demostrado que la exposición de BPA conlleva a efectos dañinos para la salud. Por tal motivo, la industria ha optado por el uso de alternativas seguras tales como los polímeros sulfonados. El uso de estos polímeros ha evidenciado la creciente presencia de BPS en diferentes productos alimenticios, pinturas y solventes, por lo que es de gran importancia el investigar los efectos del BPS sobre la salud.

En el presente estudio se evaluó el patrón apoptótico que presentó el epitelio luminal y glandular en ratas de la cepa Wistar, las cuales fueron expuestas a diferentes dosis de BPS por parte de la madre (periodo de gestación y lactancia) administrada con BPS por vía oral.

Antecedentes

Generalidades de los disruptores endocrinos

Los disruptores endocrinos (DE) son definidos como aquellas sustancias exógenas que pueden actuar como agonistas o antagonistas hormonales, los cuales son capaces de alterar la síntesis, almacenamiento y metabolismo hormonal. Además estas sustancias tienen la capacidad de actuar en organismos intactos, así como en su descendencia. Se han reportado, a lo largo de los años, los efectos adversos observados en la salud sexual y reproductiva, los cuales incluyen: pubertad prematura, ciclo estral alterado, retraso en la ovulación, incapacidad de la implantación del blastocisto al epitelio uterino y malformaciones fetales (Sweeney, 2002). Los DE son capaces de alterar la programación durante el desarrollo en las etapas fetal y postnatal del individuo, incrementando así la susceptibilidad a padecer enfermedades específicas en la edad adulta. La exposición materna a diferentes xenobióticos durante el embarazo y la lactancia tienen como consecuencia las alteraciones fenotípicas en su descendencia.

Los DE son clasificados según su origen. Ejemplo de ello es si son de origen natural (fitoestrógenos) o de origen sintético (residuos o productos de degradación de pinturas y plásticos). Además, los DE son sustancias altamente lipofílicas, lo que les permite a estas su almacenamiento por periodos prolongados en el tejido adiposo y son capaces de almacenarse y atravesar la barrera hematoencefálica. Esta propiedad les permite una distribución en el organismo del individuo permitiendo así llegar a órganos blanco. Estos compuestos pueden tener actividad estrogénica, antiestrogénica o antiandrogénica. Debido a estas diferentes actividades, estos compuestos son capaces de interactuar y alterar el eje hipotalámico-hipófisis-gónada, así como otros ejes neuroendocrinos tales como el eje tiroideo, el sistema inmune, etc. (Guzmán y Zambrano, 2007)

Disruptores Endocrinos con Actividad Estrogénica

Los estrógenos son hormonas esteroideas que actúan a través de los receptores a estrógenos (RE) α y β (Locia et al., 2013). Se ha demostrado la existencia de estos receptores a estrógenos en diferentes tejidos, tales como en el útero, vagina, glándulas mamarias, hipotálamo, hipófisis, testículos, riñón, entre otros tejidos que conforman al individuo. La unión del estrógeno y receptor forman un complejo esteroide-receptor el cual es capaz de arribar e interactuar con el material genético. La unión del complejo a la secuencia diana en el DNA da como resultado la transcripción del sitio de reconocimiento y posteriormente en la síntesis de proteínas o transcritos reguladores de procesos fisiológicos implicados en el desarrollo del individuo.

Entre los diferentes DE con actividad estrogénica encontramos a octilfenol, bisfenol A, genisteína, daidzeína y dietilestilbestrol (DES), por mencionar algunos.

Este último compuesto, DES, fue utilizado como medicamento en los años 50s y 60s para la prevención de abortos espontáneos y otras complicaciones del embarazo. Consecuencia de esto, los niños nacidos de las madres tratadas por DES durante el embarazo mostraron anomalías urogenitales, así como también se observaron irregulares menstruales, disminución de la fertilidad, adenoma vaginal de células claras, baja calidad de los espermatozoide, quistes epididimales, etc. (Veurink et al., 2005). Durante el desarrollo del feto se presentan diferentes etapas tales como la diferenciación de los tejidos reproductivos. Esta etapa es crucial, ya que los disruptores endocrinos con actividad estrogénica tienen la capacidad de interactuar con los receptores a estrógenos alterando así la diferenciación tisular y dando como resultado malformaciones en los genitales internos (Greco et al., 1993).

Adicionalmente, se ha observado que los fitoestrógenos y otros DE estrogénicos administrados durante el periodo neonatal y durante la lactancia en ratas actúan sobre el eje reproductivo y dan como resultado el incremento del peso uterino, pubertad prematura y ciclo estral alterado. En este último se observa el estadio del estro persistente y masculinización hipotalámica (Lewis et al., 2003).

Disruptores Endocrinos con Actividad Antiestrogénica

Los antiestrogénicos son compuestos que antagonizan la acción de los estrógenos compitiendo por el receptor afín a estos. Cabe recordar que los estrógenos están implicados en la proliferación y diferenciación de diferentes células que conforman órganos sensibles a estrógenos. Ejemplo de ello es el útero, en el cual se ha evidenciado que la presencia de sustancias exógenas con actividad antiestrogénica son considerados como factores de riesgo para el desarrollo de cáncer en útero. El mecanismo por el cual estos compuestos actúan primeramente es por la unión que tienen con el RE, lo cual permite la dimerización del receptor y suprimir la actividad biológica consustancial al RE. Se ha reportado que el efecto antiestrogénico se lleva a cabo a través de la inhibición del factor de transcripción TAF-2 (Barrón et al., 2001).

Entre los compuestos con actividad antiestrogénica más estudiados se encuentran los compuestos derivados de dioxinas y compuestos similares a dioxinas como los bifenilos policlorados, los cuales son empleados como pesticidas, solventes industriales, fabricación de plásticos, entre otras aplicaciones. Estas sustancias funcionan como agonistas del receptor a arilcarbono, dicho receptor tiene una actividad sobre los receptores a estrógenos, la interacción receptor-DE altera la homeostasis del individuo (Petersen et al., 2006). Se ha observado que la exposición que tienen estos compuestos en niñas menores de 8 años de edad provoca alteraciones en la homeostasis del desarrollo del individuo. Los efectos observados son el retraso en el inicio de la pubertad y en el alargamiento de los ciclos menstruales (Warner et al., 2004). Además se ha reportado que la

exposición de este tipo de DE antiestrogénicos en edad adulta incrementa la probabilidad de padecer diferentes tipos de cáncer (Warner et al., 2002).

Disruptores Endocrinos con Actividad Antiandrogénica

Los compuestos con actividad antiandrogénica son todas aquellas sustancias capaces de impedir la acción del andrógeno sobre su efector. Puede entenderse también como antiandrógenos a todas aquellas sustancias que logran frenar la actividad del eje hipotálamo-hipofisis-ovario y a aquellas que también son capaces de inhibir enzimas que intervienen en la síntesis de andrógenos (Devoto y Aravena, 2006).

Los compuestos antiandrogénicos tienen un papel importante para el desarrollo adecuado de los machos, ejemplo de ello es en la masculinización de los órganos reproductores y de cerebro (Skakkebaek et al., 2001). Las sustancias más estudiadas con actividad antiandrogénica son generalmente pesticidas tales como: vinclozolin y el diclorodifenildicloroetileno (metabolito bioacumulable y poco biodegradable del diclorodifeniltricloroetano). También se han estudiado compuestos de origen industrial como los ftalatos, dioxinas y los policlorobifenilos (PCB); además se sabe que fármacos como la flutamida dispone de esta actividad antiandrogénica. Los efectos que se han reportados de estas sustancias van desde una alta incidencia en malformaciones urogenitales y la disminución de la proporción de machos respecto a hembras en la fauna silvestre. Estudios en roedores han revelado que la administración prenatal de flutamida o ftalatos producen una baja calidad del espermatozoide, alto índice de apoptosis en los estadios andrógeno-dependientes del desarrollo espermático y demasculinización hipotalámica y conductual por la exposición fetal a dioxinas y PCB (Guzmán y Zambrano, 2007).

Bisfenol a como Disruptor Endocrino

El bisfenol a (BPA) fue sintetizado en el año 1891 por el químico ruso Aleksandr Dianin mediante la condensación de la acetona utilizando como catalizador de la reacción ácido clorhídrico o una resina de poliestireno sulfonado. El BPA es utilizado principalmente para la elaboración de plásticos a partir de policarbonato (**Figura 1**) el cual es empleado en diferentes industrias para la elaboración de botellas de agua, biberones, dispositivos médicos y dentales, electrodomésticos, entre otros. Este DE es ampliamente estudiado debido a la alta exposición de diferentes organismos a este compuesto. La exposición a este DE es considerado como un factor de riesgo para padecer enfermedades como lo son ovario poliquístico, problemas en la fertilidad femenina, cromosomas fetales anormales, feminización, alteraciones inmunológicas y del desarrollo (Mollo y Montaña., 2013).

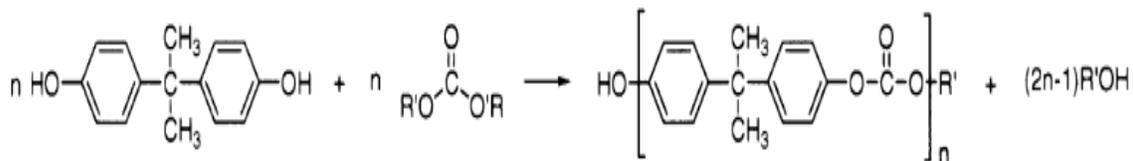


Figura 1. Síntesis de policarbonato (PC) a partir de Bisfenol A (BPA) y carbonatos de dialquilo/diarilo (Sabu y Visakh, 2012).

Se ha reportado que existen trazas de BPA en aire (2 – 208 ng/m³), suelo y agua (8 – 21 ng/mL). Se tiene evidencia de que BPA es capaz de migrar desde las paredes del material de envase hasta el interior del producto alimenticio, cabe mencionar que esta sustancia también se encuentra a concentración de trazas en animales marinos para consumo humano. La agencia de protección ambiental de los estados unidos (US EPA) considera que una ingesta diaria de BPA igual o mayor a 0.05 mg/Kg/día puede generar consecuencias negativas en el individuo. Respecto a la migración de BPA a un determinado material, diferentes agencias sanitarias han predeterminado valores para la migración según su criterio, ejemplo de ello es la nación nipona que estableció un valor de 2.5 mg/Kg, mientras que los Estados Unidos han establecido que 0.6 mg/Kg corresponde al valor permisible para la migración de este DE al material establecido (Gwynne, 2000).

El BPA como DE es capaz de interactuar con el sistema endocrino alterando el mensaje endocrino en diferentes formas. Esta sustancia es capaz de mimetizar la acción de diferentes hormonas, lo que le permite ocupar el sitio de unión del receptor actuando como agonista o antagonista a dicho receptor. La interacción del DE sobre los receptores del órgano diana conlleva a alteraciones en el sistema hormonal. lo que conlleva a irregularidades neurológicas o reproductivas, ya que las hormonas están implicadas en el control de la reproducción, la organización del cerebro, y el metabolismo, alterando así la coordinación fisiológica entre órganos (Mollo y Montaña, 2013).

Efectos de BPA Sobre la Salud

Estudios in vivo de BPA relacionan a este compuesto como el principal causante de distintos tipos de cáncer, la capacidad que tiene este compuesto como carcinógeno se debe a que es capaz de actuar como un estrógeno sintético el cual actúa sobre los RE, modulando así la expresión de determinados genes o proteínas; a consecuencia de tal efecto se ha demostrado que una exposición de 100nM de BPA en líneas celulares la expresión de los genes HOTAIR y HOXC6 aumentan. La sobreexpresión del gen HOXC6 es utilizada como indicador de distintos tipos de cáncer de mama, ya que se ha demostrado que el aumento de

los niveles de expresión en este gen induce la expresión de factores de crecimiento tumoral, lo que facilita la formación de colonias de células tumorales en las glándulas mamarias (Hussain et al., 2015). Por otra parte, el gen HOTAIR es un gen que se encuentra sobreexpresado en los tejidos con cáncer de mama y que al igual que el gen anterior los niveles de expresión se ven alterados por la exposición a BPA (Bhan et al., 2014). Adicional a lo antes descrito, la exposición de BPA tiene como efecto la inhibición del gen caspasa 3, la proteína resultado de la traducción de dicho gen, es una proteína clasificada como caspasa la cual tiene como principal función mediar los procesos celulares relacionados al proceso apoptótico, por lo que al alterar la expresión de este gen se alteran los procesos de muerte celular programada del individuo y existe una promoción en el desarrollo de tumores (Ptak et al., 2013).

Se ha demostrado que el BPA es capaz de alterar el desarrollo de la placenta y consecuentemente promover complicaciones en el embarazo y en el desarrollo del feto, una de las principales causas de tales efectos es debido a la capacidad que tiene este compuesto para la estimulación y liberación de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG); consecuencia de los niveles altos de hCG puede resultar en partos prematuros o en una limitación del crecimiento del feto (Rajakumar et al., 2015).

La exposición a concentraciones bajas de BPA (0.5-50 mg/Kg/día) son capaces también de producir daño al DNA, dicho daño es consecuencia en el incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), malonildialdehído, óxido nitroso y radicales libres. Se ha comprobado que BPA es capaz de alterar la efectividad de los mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo, ya que esta sustancia es capaz de disminuir la actividad de enzimas antioxidantes en el tejido hepático (catalasa, superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa) (Van Esterik et al., 2015).

De los diferentes efectos ya mencionados provocados por la exposición de BPA, diversos estudios sugieren que el BPA es capaz de alterar diferentes parámetros metabólicos ocasionando así la presencia de enfermedades metabólicas, como pueden ser la obesidad, diabetes y síndrome metabólico. Se ha correlacionado las enfermedades metabólicas con alteraciones en el DNA. La predisposición genética y los contaminantes ambientales son capaces de alterar el genoma del individuo. Se ha estudiado el grado de metilación del DNA y se ha observado que la exposición de BPA en el individuo suscita en el incremento del grado de metilación del DNA y esto conlleva al incremento de la diferenciación de adipocitos en células preadipocitarias, por lo que se les vincula a tales efectos a una mejora en el estímulo de la adipogénesis y en un aumento en la probabilidad de desarrollar obesidad a futuro (Sales et al., 2013).

Finalmente se sabe que el sistema reproductivo es susceptible a alteraciones causadas por diferentes sustancias exógenas encontradas en el ambiente,

ejemplo de ello el BPA. En diferentes estudios se ha correlacionado que la exposición a BPA produce alteraciones en la homeostasia del sistema reproductivo. Tales alteraciones van desde la reducción de la fertilidad, el deterioro de la función masculina, cambios en las concentraciones de hormonas sexuales y en la reducción de la calidad de los espermatozoides (García et al., 2015).

Generalidades de Bisfenol s

El bisfenol-S (BPS) (nombre IUPAC: 4,4'-sulfonildifenol) es un compuesto orgánico con dos grupos hidroxifenil unidos a un grupo sulfonil (**Figura 2**).

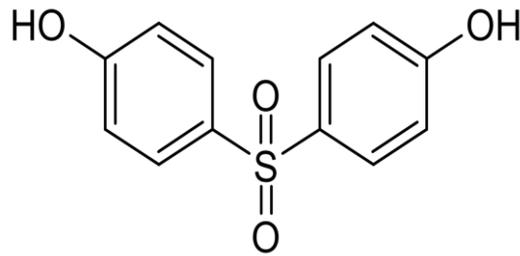


Figura 2. Estructura química correspondiente a bisfenol-s.

El compuesto BPS es empleado en la industria como un monómero para realizar la síntesis de polímeros sintéticos tales como el poliétersulfona (PES) y polisulfona (PSU). Además, este compuesto es utilizado para la elaboración de resinas epoxi (**Figura 3**). Estos polímeros hoy en día se utilizan como una alternativa aparentemente segura en sustitución del policarbonato el cual es utilizado en la industria para elaborar diferentes materiales de empaque tales como botellas, biberones, empaques herméticos, etc. Cabe recordar que uno de los productos de degradación del policarbonato es el BPA, del cual se ha reportado los efectos dañinos para la salud debido a la actividad estrogénica que este presenta. Agencias regulatorias como la comisión europea ha establecido el límite específico de migración (SML) para el BPS el cual corresponde a 0.05 mg/Kg de comida. El comité científico de alimentos (SCF) de la unión europea no ha emitido el valor para una ingesta diaria aceptable (ADI) ni ha reportado el valor para la ingesta diaria tolerable (TDI).

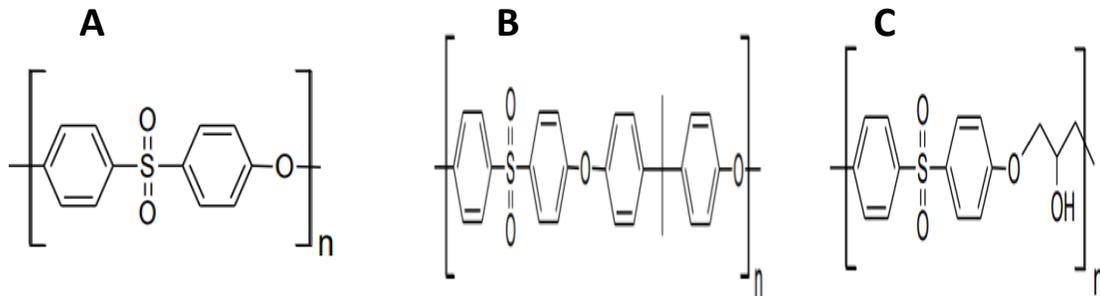


Figura 3. Estructuras químicas de los diferentes polímeros sulfonados empleados para materiales de empaque para alimentos. **(A)** Poliétersulfona. **(B)** Polisulfona. **(C)** Resina epoxi, basada en BPS.

Las propiedades físico químicas propias del BPS se muestran en la **tabla 1**, en ella observamos que el peso molecular del compuesto es equivalente a 250.57g/mol, este parámetro indica que este compuesto es capaz de atravesar membranas biológicas con facilidad debido a que se ha reportado que aquellos fármacos con peso molecular correspondiente a un intervalo de 250 – 500, son capaces de traspasar membranas biológicas como lo es la membrana placentaria. Reforzando la premisa anterior, como se puede apreciar en la **tabla 1** el valor de Log P asociado a BPS es equivalente a 1.65, este valor indica que este compuesto es más a fin a disolventes no polares, lo cual sugiere que dicho compuesto es liposoluble y consecuencia de ello es capaz de a travesar membranas biológicas de baja permeabilidad como lo es la barrera hemato – encefálica (Bernhardi 2004). Además, el valor de pKa asociado para este compuesto corresponde a 8.2 y se ha reportado que aquellos fármacos con pKa básico tienen una tasa de ionización más alta en la circulación fetal, lo que repercute en que sustancias como el BPS sean asequibles a exposiciones directas con el feto (Ávila y Solís, 2016).

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas reportadas en la literatura para el compuesto bisfenol s.		
Propiedad	Valor o Descripción	Unidades
Peso molecular	250.27	g/mol
Descripción física	Polvo cristalino de color blanco, se ha reportado que la morfología de las partículas que conforman al polvo es en forma de aguja.	
Punto de fusión	240.5	°C
Solubilidad	Insoluble en agua, pero soluble en etanol y ligeramente soluble en benceno y dimetilsulfóxido (DMSO).	
Densidad	1.3663	g/cm ³ valor reportado a una temperatura igual a 15°C
Coeficiente de partición octanol/agua (log Kow)	1.65	
Constante de disociación (pKa)	8.2	Valor reportado a una temperatura igual a 25°C

Exposición de Bisfenol s

En un estudio realizado por Cao-Xu Liang y colaboradores (2019), analizaron un total de 159 muestras de productos alimenticios, dichas muestras forman parte de la dieta de la población canadiense. En dicho estudio se analizó por cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas la concentración de BPS presente en productos alimenticios. Cabe mencionar que además de analizar al BPS se analizaron otros posibles disruptores endocrinos tales como bisfenol E (BPE), bisfenol B (BPB), bisfenol F (BPF) y bisfenol AF (BPAF). Los resultados obtenidos fueron que para alimentos enlatados se encontró la presencia de BPF a una concentración de 25 – 2360ng/g y BPA a una concentración de 5.3 – 41 ng/g. Para el BPS se obtuvo que para alimentos enlatados no se hallaron concentraciones detectables de este compuesto, mientras que para alimentos preparados a partir de carne y productos cárnicos se encontró la presencia de BPS a una concentración de 1.2 – 35 ng/g. En otro estudio se detectó la presencia

de BPS en 21% de 267 alimentos, incluyendo bebidas, vegetales, frutas, cereales y carne colectada en Albany, Nueva York, EUA. Por otro lado, investigadores han reportado la presencia de BPS en productos plásticos, recubrimientos de latas de comida, así como también en los empaques de comida, en biberones, juguetes, materiales de uso odontológico, en productos de cuidado personal, en papeles térmicos, entre otros. También se ha reportado la presencia de BPS en el medio ambiental, tal es así que se ha reportado la presencia de este compuesto en el polvo de interiores, agua fluvial, mantos acuíferos, lodos de alcantarilla y en sedimentos marinos (Wu et al 2018). Respecto a los productos alimenticios Liao y Kannan (2013) analizaron por cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplado a espectrometría de masas, un equivalente de 267 muestras de diferentes productos alimenticios provenientes de Estados Unidos y China, evidenciando así la presencia del disruptor endocrino BPS en al menos el 21% del total de los alimentos de los alimentos analizados, estos comprenden desde bebidas, vegetales, frutas, cereales y carne; en este último producto alimenticio se encontró BPS en una proporción equivalente al 43%.

Hoy en día se sabe que la exposición del humano ante los disruptores endocrinos ocurre desde etapas tempranas de la vida, siendo así que Lehmler y colaboradores (2018) evidenciaron la presencia de diferentes disruptores endocrinos en la orina de diferentes personas en estudio (**Figura 4**), evidenciando que la mayor exposición ante estos DE ocurre en la edad adulta (20 – 39 años de edad), así mismo esta conjetura aplica para la exposición del humano hacia el BPS. Aunque no existen valores para la ingesta diaria permisible para el consumo humano o para la exposición diaria de BPS, se debe de tener en consideración los efectos negativos que pueda provocar hacia los seres vivos la exposición de este compuesto. La población más susceptible a los efectos negativos sobre la salud de los disruptores endocrinos, tales como el bisfenol s, son los recién nacidos ya que estos presentan un bajo peso corporal y bajo desarrollo del metabolismo para la desintoxicación (Da Silva et al.,2019).

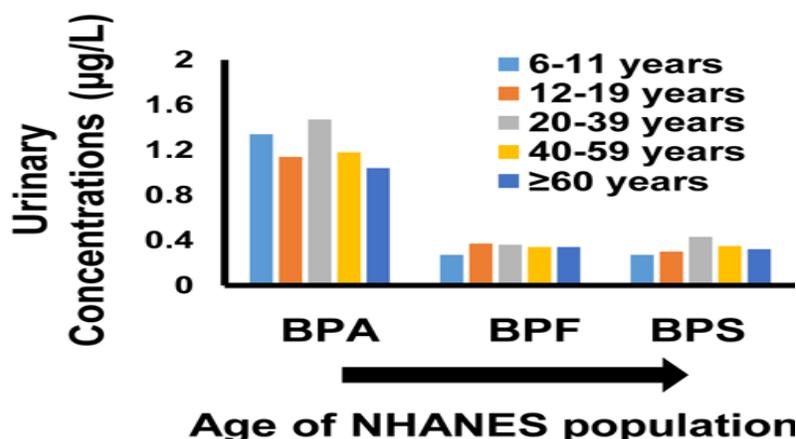


Figura 4. Concentración ($\mu\text{g/L}$) de BPA, BPF y BPS presentes en orina, las muestras recolectadas corresponden a la población de los EUA y fueron divididas en 5 grandes grupos en un intervalo de edad específico (Lehmler et al., 2018).

Cabe mencionar que, al emplear el BPS en la industria para la fabricación de materiales de empaque para el envasado de diferentes alimentos, se debe de tener en consideración el impacto negativo que repercute en los diferentes seres vivos que conforman los diversos ecosistemas, este impacto es causado por los residuos generados por el consumo de los productos alimenticios, así como también los residuos generados durante la fabricación de las diferentes presentaciones de material de empaque.

Bioacumulación de Bisfenol s

En 2012 varios investigadores se dieron a la tarea de obtener las concentraciones de BPS presente en la orina de diferentes sujetos en estudio, las diferentes muestras de orina fueron obtenidas de diferentes países tales como los EUA, Japón, China, India, Corea del sur, Kuwait, Malasia y Vietnam. Las muestras recolectadas fueron analizadas mediante HPLC acoplado a espectrometría de masas (LOQ=0.02 ng/mL). Los resultados que obtuvieron fueron los siguientes: el país que obtuvo la mayor concentración de BPS fue Japón con una concentración de 1.18 ng/mL, seguido por EUA con una concentración de 0.299 ng/mL, China con una concentración de 0.226 ng/mL, Kuwait con una concentración de 0.172 ng/mL y finalmente Vietnam con una concentración de 0.160 ng/mL (Liao et al., 2012). Este estudio fue el primero en evidenciar la exposición a la cual se ve sometido el humano ante el BPS. Cabe destacar que las concentraciones bioacumuladas de BPS en los diferentes países estudiados no se vieron afectadas por variables propias a la población tales como la raza, edad y género. Con los resultados obtenidos de este estudio se estimó el promedio para la ingesta diaria de BPS. Dicho valor corresponde a 0.009 – 0.004 $\mu\text{g/Kg}$ peso corporal/día para niños y adultos, respectivamente (basándose en un peso nominal de 30 y 60 Kg). Otro estudio realizado únicamente en la población de los EUA demostró que la

concentración promedio de BPS presente en la orina de adultos fue de 0.37 $\mu\text{g/L}$ mientras que para niños este valor fue de 0.29 $\mu\text{g/L}$ (Lehmler et al.,2018).

Deceuninck et al. (2015) determinaron la concentración de diferentes bisfenoles en leche materna proveniente de madres francesas, de las 30 muestras recolectadas solo una muestra presentó BPS a una concentración de 0.23 $\mu\text{g/Kg}$ peso corporal. Adicionalmente en China se realizó otro estudio de la misma naturaleza en la cual se analizaron 20 muestras de leche materna proveniente de diferentes madres, obteniendo que en una sola muestra se hayo la presencia de BPS a una concentración de 0.683 $\mu\text{g/L}$ (Niu et al., 2017). Otro estudio realizado en Valencia, España reportó la presencia de BPS en una muestra del total de 120 muestras analizadas de leche materna, la concentración que se determinó corresponde a 0.37 ng/mL (Dualde et al., 2019). Otros estudios demuestran que el BPS es capaz de pasar de la madre al hijo por medio de la leche materna.

La concentración de BPS en la población humana se hace más evidente con el paso del tiempo, ya que muchos fabricantes han optado por discontinuar el uso del policarbonato (PBP) dentro de la industria para así sustituirlo por polímeros sulfonados. La presencia de estos polímeros dentro de la industria alimenticia ha repercutido en un incremento en la bioacumulación de bisfenol s, exponiendo así a los seres vivos ante un nuevo disruptor endocrino el cual antes no era considerado como un factor de riesgo para la salud (**Figura 5**).

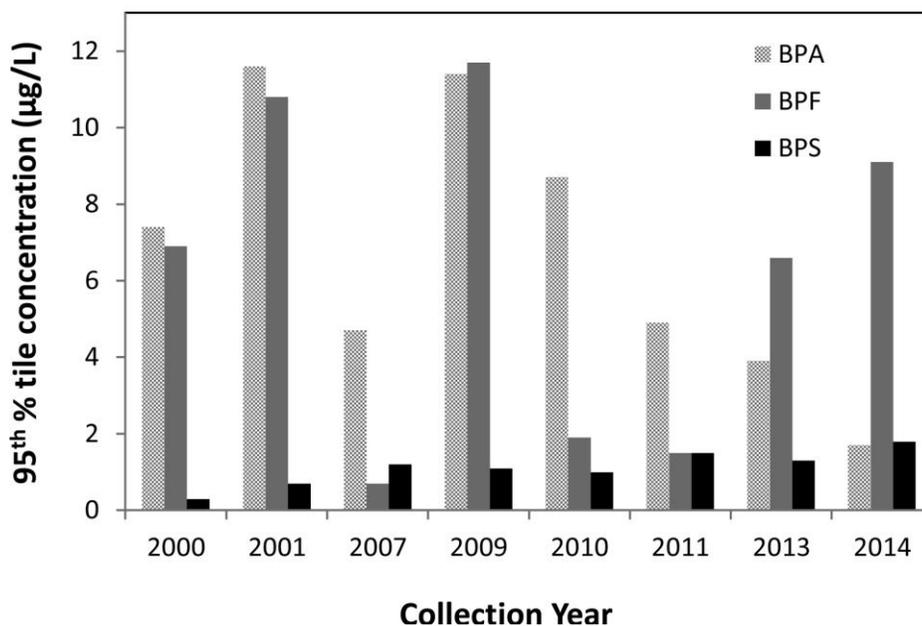


Figura 5. Percentil 95 de la concentración total ($\mu\text{g/L}$) de BPA, BPF y BPS presentes en muestras de orina reunidas a lo largo de un año proveniente de la población adulta estadounidense (Ye et al., 2015).

Metabolismo de Bisfenol s

Las reacciones de transformación metabólica de xenobióticos se llevan a cabo dentro de un organismo vivo y principalmente estas reacciones se llevan a cabo en las células que conforman al hígado (hepatocitos), este tipo de reacciones metabólicas se clasifican generalmente en dos fases. La fase I se produce la funcionalización o transformación del xenobiótico mediante reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis. Dichas reacciones son capaces de alterar los grupos funcionales presentes en la molécula, o en su defecto se crean otras estructuras moleculares, esto con la finalidad de convertir al xenobiótico en una molécula más polar para que de esta manera sea excretada con mayor facilidad del organismo o en su defecto sirva como sustrato para reacciones de la fase II. Durante la fase II se combinan moléculas endógenas (conjugación) para dar como resultado compuestos más polares, menos lipofílicos y, en consecuencia, más fáciles de excretar mediante la orina o en las heces. Las reacciones metabólicas de la fase II son en general conjugaciones con ácido glucurónico, con sulfato, con aminoácidos, con glutatión y finalmente se encuentran las reacciones de acetilación y metilación (Galbis 2004).

Song y colaboradores (2017) han reportado que el BPS administrado por vía oral en ratones se metaboliza por las reacciones de fase II. Los metabolitos hallados principalmente fueron bisfenol s glucurónido (BPS-G) y bisfenol s sulfato (BPS-S). La ruta de excreción de BPS principalmente fue por la orina en la cual se recobró un total de 52.8% a 78.1% del total administrado. Además, el BPS-G fue el principal metabolito hallado en orina, mientras que las máximas concentraciones de los metabolitos de BPS en orina ocurren a las 6h después de haber administrado BPS por vía oral. Cabe destacar que la mayor concentración de los metabolitos generados por BPS se encuentra en orina mientras que el restante de BPS se encuentra en las heces sin que este DE haya sido metabolizado y adicionalmente se detectó la presencia de trazas de BPS y de sus metabolitos en tejidos del tracto digestivo.

En un estudio para determinar los parámetros farmacocinéticos inherentes a bisfenol s en humanos, se reportó que una administración vía oral equivalente a 8.75µg BPS/Kg peso corporal en jóvenes sanos, las muestras de suero y orina fueron recolectadas en un intervalo de 48h y se evidenció que dicho compuesto tiene una rápida absorción en el tracto gastrointestinal ya que las concentraciones plasmáticas de BPS comienzan a ser evidentes en un tiempo promedio de 1h (0.7 ± 0.3h) hasta las 7h después de haber sido administrado el BPS, este comienza a ser excretado principalmente en orina. El tiempo de vida media para la eliminación de BPS es equivalente a 6.93 h (Oh et al., 2018).

La importancia de conocer las vías metabólicas que el disruptor endocrino bisfenol s llega a presentar dentro de organismos vivos ayuda a comprender la biotransformación que sufre dicha sustancia dentro del organismo, cabe resaltar

que la principal ruta de administración de este DE ocurre por vía oral. Se sugiere que BPS es capaz de acumularse en tejido adiposo y en los tejidos donde se lleva a cabo la absorción, es posible que esta característica del compuesto sea la razón por la cual se presenten efectos adversos propios de BPS a diferentes concentraciones.

Efectos de Bisfenol s Sobre la Salud

Ghayda y colaboradores (2019) reportaron la asociación que existe entre la calidad de esperma de humano con las concentraciones de BPS encontradas en la orina de diferentes sujetos en estudio. En este estudio se reportó que el 76% de las muestras analizadas se encontraron concentraciones mayores a 0.1 µg/L de BPS, las concentraciones de BPS encontradas en los sujetos en estudio son asociadas al uso de suavizante de telas, uso de pinturas y disolventes, así como también a la ingesta de carne de vaca y queso antes de 24h de la recolección de orina. Aquellos sujetos que tuvieron altas concentraciones de BPS en orina es probablemente debido a un alto índice de masa corporal. Respecto a la calidad del semen de los sujetos en estudio, se realizó una comparativa entre aquellos sujetos en estudio en los que se detectó BPS en orina contra los que no presentaron. Los resultados mostraron que la calidad de semen disminuyó para aquellos sujetos en los que se detectó BPS en orina. La presencia de BPS en orina es atribuida a altos valores de índice de masa corporal (obesidad) la cual es asociada a su vez con el estilo de vida que el individuo lleva en su día a día.

En una comparativa que realizaron investigadores de nacionalidad china, demostraron que el BPS al igual que el BPA están probablemente correlacionados con nacimientos prematuros para aquellas madres embarazadas que mostraron concentraciones de estos disruptores endocrinos en orina (Huang et al., 2019).

Se ha reportado que la administración de BPS por vía oral en ratones produce diferentes efectos que repercuten en la homeostasis de la glucosa y en el desarrollo de diabetes tipo 1. Los efectos observados están asociados al sexo del individuo y a la dieta que este tenga. Los resultados reportados fueron que a una administración de 30 µg BPS/Kg de peso corporal en hembras con una dieta a base de soya, se observó un significativo decremento en el desarrollo de diabetes tipo 1 y además se observó que los niveles de glucosa en sangre sin ayuno disminuyeron. En contraste, la exposición de BPS en machos mostró un incremento en la resistencia a la insulina y concentraciones variadas en los niveles de glucosa en sangre. Sin embargo, para los machos que tuvieron una dieta libre de fitoestrógenos mostraron un aumento en la tolerancia a la glucosa y una menor resistencia a la insulina (Xu et al., 2019).

Un estudio realizado en células hepáticas y renales en presencia de BPS se reportó que la viabilidad de las células se reduce en un 16% a un 45% en presencia de concentración de BPS que oscila en un rango de 1 µM a 0.1 mM. Los investigadores atribuyen este efecto a que el BPS es capaz de aumentar la

concentración de las especies reactivas de oxígeno (ERO) en ambas líneas celulares. Sin embargo, las células renales mostraron una mayor citotoxicidad en comparación con las células hepáticas. El BPS es capaz de incrementar los niveles de las ERO lo cual induce al aumento del estrés oxidativo y por ende la viabilidad de la célula se encuentre disminuida. (Zhang et al., 2016).

Se ha documentado que la administración de BPS en ratas macho conlleva a efectos negativos en el sistema reproductor masculino. Investigadores han reportado que a una dosis equivalente de BPS a 50 µg BPS/Kg/día existen efectos adversos tales como, el incremento de ERO y el aumento de la lipoperoxidación en el testículo, además de que se evidenció la reducción de la actividad de enzimas antioxidantes y del contenido de proteínas, se observó también que los niveles de testosterona en plasma y en testículos fueron disminuidos a exposiciones altas de BPS. Las afecciones observadas causadas por el BPS en sistema reproductor masculino escalan al nivel macro ya que se observaron diferencias morfológicas en los testículos, ejemplo de ello fue la reducción del epitelio seminífero (Ullah et al., 2016).

Da Silva y colaboradores (2019) realizaron un estudio sobre la descendencia de ratas las cuales fueron expuestas a diferentes dosis de BPS administradas de manera directa a la madre, la descendencia fue expuesta de manera indirecta al BPS por los fluidos corporales de la madre, placenta y leche materna. Se reportó que los machos que fueron tratados a una dosis de 50 µg/Kg/día de BPS, en el día del destete presentaron hipotrigliceridemia e hipertiroxinemia, mientras que las hembras que fueron tratados con la misma dosis presentaron niveles altos de hidroxicolecalciferol. En edad adulta los sujetos experimentales de ambos sexos, tratados a las dosis antes mencionadas de BPS, mostraron una ingesta baja de alimento en comparación con el grupo control. Además, los machos mostraron una disminución en la deposición visceral de adipositos. Respecto a la conducta de los machos, estos mostraron un incremento en la ansiedad y un incremento en la actividad motora. Para aquellos animales que fueron expuestos a una dosis de 10 µg BPS/Kg/día, en edad adulta las hembras mostraron una disminución en los niveles circulantes de progesterona. Este estudio evidencia que la exposición materna de BPS a su descendencia conlleva a efectos adversos sobre la regulación del triacilglicerol, en los niveles hormonales, así como también en el comportamiento de la progenie.

Ahsan y colaboradores (2018) realizaron una comparativa entre los efectos del BPS y BPA sobre el desarrollo del sistema reproductor femenino en ratas, hallando así que para a dosis altas (50mg BPS o BPA/Kg peso corporal) las concentraciones plasmáticas de testosterona y estradiol incrementaron significativamente, mientras que los niveles en plasma de progesterona, hormona luteinizante (LH) y hormona estimuladora de folículo (FSH) disminuyeron significativamente. Resultado de estos cambios plasmáticos puede correlacionarse con el retraso en la pubertad y en las alteraciones sobre la periodicidad del ciclo

estral que se llegaron a observar durante dicho estudio. Los resultados obtenidos por los investigadores sugieren que, a altas concentraciones de BPS y BPA administradas por vía subcutánea, llegan a tener las mismas alteraciones endocrinas en ratas hembras.

Regulación del Ciclo Estral en Ratas

El ciclo estral de la rata dura aproximadamente entre 4 a 5 días. Las fases que constituyen al ciclo corresponden a: proestro, estro, metaestro y diestro. Las diferencias que existen entre los diferentes estadios que conforman al ciclo estral de la rata son los que se muestran en la tabla 2:

Tabla 2. Cambios morfológicos que presentan el ovario, útero, epitelio vaginal y la conducta de ratas hembras durante el ciclo estral.

Fase	Ovario	Útero	Vagina	Conducta
Proestro	En él se presenta un rápido crecimiento de folículos. Degeneración de los cuerpos lúteos del ciclo previo.	Útero distendido con flujo aumentando su tamaño.	Epitelio grueso. Células epiteliales superficiales. Frotis vaginal con abundancia de células epiteliales.	Estado receptivo a la copulación hacia el final de proestro.
Estro	Maduración de folículos. Ovulación.	Máxima distensión. Inicio de degeneración vacuolar del epitelio uterino.	Epitelio grueso. Capa de células cornificadas en la superficie. Frotis vaginal con abundancia de células escamosas.	Receptividad máxima. Lordosis. Copulación. Máxima probabilidad de fertilización.
Metaestro	Formación de cuerpos lúteos.	Alguna degeneración vacuolar, pero también regeneración.	Descamación del epitelio cornificado. Epitelio delgado. Invasión de leucocitos. Frotis vaginal con abundancia de células escamosas.	No hay receptividad.
Diestro	Crecimiento de los cuerpos lúteos. Folículos de varios tamaños.	Regeneración del epitelio uterino.	Epitelio delgado. Regeneración del epitelio. Frotis vaginal con abundancia de leucocitos y células epiteliales.	No hay receptividad.

El ciclo estral está mediado por el eje hipotálamo – hipofisiario-gonadal, por lo cual en el torrente sanguíneo del individuo se encuentran diferentes concentraciones de diferentes hormonas a lo largo del ciclo (**figura 6**), lo que provoca un cambio morfológico en los tejidos del sistema reproductor y en la conducta. El crecimiento folicular ocurre por la producción de la hormona adenohipofisaria estimulante de folículos (FSH). Los folículos ováricos a su vez secretan estrógenos que tienen efecto de retroalimentación positiva sobre la secreción de la hormona luteinizante (LH) esta acción es realizada por la adenohipófisis, la concentración máxima de LH ocurre durante el estadio del proestro, lo que ocasiona la ovulación. La secreción de estrógenos al tejido vaginal conlleva a la estimulación y queratinización del epitelio vaginal. Además, a consecuencia de lo antes mencionado, el útero sufre de hiperemia y de la acumulación de fluido. Tras el estro, los folículos que han liberado óvulos se transforman en cuerpos lúteos durante la fase del diestro. El cuerpo lúteo secreta progesterona y en menor grado estrógenos. La progesterona induce la mucificación del epitelio vaginal. En el útero se inicia la degeneración epitelial durante el estro, con la condición de que no haya existido fertilización del óvulo (Cruz y Pásaro, 1998).

El epitelio uterino se encuentra expuesto a diferentes hormonas que son segregadas por el eje hipotálamo – hipofisiario-gonadal, la presencia de hormonas y las concentraciones en las que estas se encuentran, son las causantes de la proliferación y muerte celular que se presentan en el epitelio uterino. Esta característica que ocurre en el epitelio permite comparar los patrones de proliferación que ocurren durante el estadio del metaestro al proestro, así como también la comparación del patrón apoptótico que ocurre durante el estadio del estro; con la finalidad de evidenciar el desbalance homeostático que ocurre en el tejido uterino bajo la presencia de xenobióticos capaces de alterar las rutas metabólicas implicadas en el adecuado funcionamiento del sistema reproductor femenino.

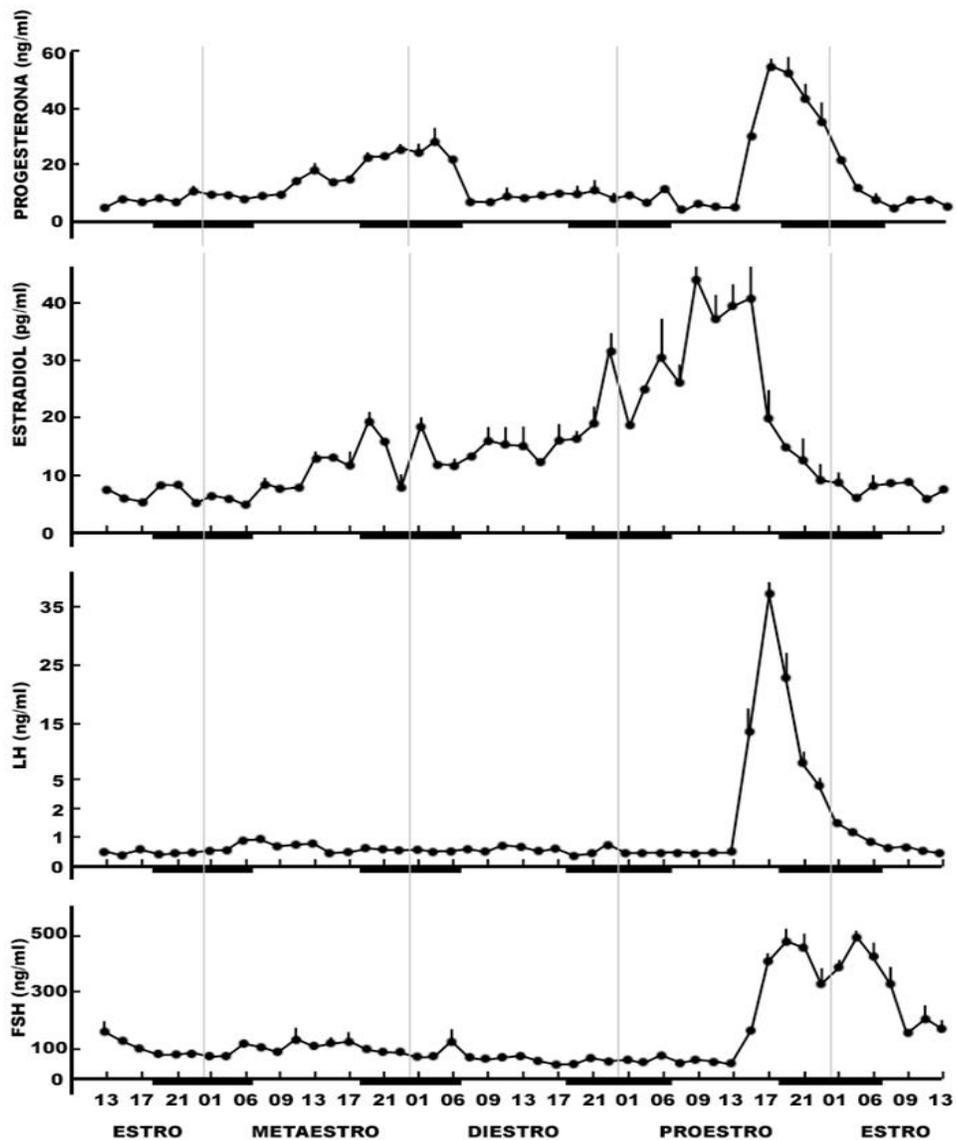


Figura 6. Niveles hormonales que conforman el ciclo estral en ratas hembras. El ciclo estral comprende un periodo de cuatro días aproximadamente. En la etapa del proestro se observa el aumento de la concentración de las hormonas (Progesterona, Estradiol, Hormona Luteinizante (LH) y Hormona estimuladora de foliculo (FSH)) involucradas en la regulación del ciclo estral, mientras que la etapa consiguiente de dicho ciclo corresponde a la etapa del estro en donde es apreciable la disminución de los niveles hormonales (Freeman 1988).

Muerte Celular Programada (Apoptosis)

La apoptosis o muerte celular programada es el proceso en el cual las células se autodestruyen sin desencadenar reacciones inflamatorias mediadas por el sistema inmune y además no se produce cicatrización en los tejidos. Dentro de este proceso de apoptosis se puede distinguir tres etapas; activación, propagación y ejecución.

En la etapa de activación durante el proceso apoptótico puede ocurrir de dos maneras, por una inducción negativa tales como la pérdida de una actividad supresora, la falta de factores de crecimiento o la disminución de los contactos que la rodean; por otra parte, esta la inducción positiva la cual está asociada al resultado de la unión de un ligando con un receptor. Los receptores que participan en la apoptosis se pueden clasificar en dos grupos: aquellos cuya actividad conduce directamente a la muerte celular, ejemplo de estos receptores son el receptor Fas y el receptor de necrosis tumoral (TNF). Existen además los receptores que desempeñan una función fisiológica, pero que al sobre-activarse pueden inducir indudablemente a la muerte celular, ejemplo de estos receptores son: el receptor de glutamato, de trombina y canales iónicos dependientes de voltaje.

Iniciada la fase de activación hacia la apoptosis, la célula comienza la etapa de decisión en la cual se decide si se debe de sobrevivir o se debe de desencadenar la muerte celular. En esta etapa la mitocondria juega un papel importante ya que este organelo sufre de una alteración en la permeabilidad de su membrana la cual es ocasionado por la formación de un complejo multiproteico el cual conduce a la liberación del contenido intramitocondrial como lo es el citocromo C, el factor inductor de apoptosis y miembros de la familia de las caspasas.

Liberado el contenido mitocondrial al citoplasma de la célula, se da inicio a la fase de ejecución en donde ocurre la proteólisis, la cual es un proceso irreversible una vez comenzada. Entre las proteasas implicadas en los procesos de muerte celular se encuentran las caspasas, las calpaínas, la granzima B, por mencionar algunas. Las caspasas se diferencian en tres grupos: caspasas implicadas en la producción de citocinas (caspasas 1, 4, 5 y 13), caspasas de señalización o de activación de otras caspasas (caspasas 2, 8, 9 y 10) y caspasas efectoras de muerte o ejecutoras (caspasas 3, 6 y 7) las cuales hidrolizan sustratos selectivos. La activación de las caspasas da lugar a la hidrólisis de secuencias específicas de tetrapéptidos que contienen un residuo de aspartato en el material genético. Entre los sustratos de estas enzimas se encuentran elementos estructurales del citoesqueleto tales como la actina, fodrina, proteína Tau y catenina; como sustrato se encuentran también enzimas encargadas de reparar o degradar el DNA tales como las enzimas PARP (poly ADP ribose polymerase) y DNAasa; también se encuentra como sustratos los factores de transcripción como lo son el retinoblastoma y HDM2 (human murine doble minute 2); las caspasas también

reconocen a proteínas reguladoras tales como la proteína cinasa C, fosfatasa 2 A, cinasas de adhesión focal, por mencionar algunas.

La apoptosis por lo tanto es considerada como una muerte natural fisiológica, que da resultado hacia una eliminación de células no deseadas o dañadas. La apoptosis se activa cuando: en las etapas de desarrollo donde se produce un exceso de células ejemplo de ello es en la apertura del tracto digestivo que ocurre durante el desarrollo del embrión; el proceso apoptótico también ocurre en la selección de linfocitos, ya que estos son capaces de desempeñar mecanismos de defensa frente a tumores en que intervienen células que incluyen los linfocitos T citotóxicos, natural killer y macrófagos. La desregulación de las etapas antes mencionadas conduce a situaciones patológicas en el individuo.

Las técnicas empleadas para la detección de los procesos apoptóticos en las células son los siguientes (Jordan 2003):

- ❖ El uso de fluorocromos capaces de intercalarse en el DNA. Ejemplo de estos colorantes son el etidio, propidio y Hoechst.
- ❖ El empleo de microscopia electrónica.
- ❖ Electroforesis en gel de agarosa de DNA aislado de tejidos o cultivos celulares.
- ❖ Tinción de TUNEL (terminal desoxinucleotidil transferasa).

La apoptosis se puede llegar a observar en diferentes células que conforman al tejido uterino tales como: estroma, epitelio glandular y epitelio luminal; esto depende del estadio del ciclo estral en el que se encuentre el individuo. La muerte celular programada (apoptosis) se observa en células que conforman el estroma durante varios estadios del ciclo estral con excepción del estro. Mientras que las células que conforman el epitelio luminal y glandular presentan la máxima apoptosis durante el estro y disminuye durante el metaestro. Los niveles en sangre de estradiol y de progesterona regulan el recambio celular que ocurre en el epitelio uterino, ejemplo de ello son los niveles de estrógeno que regulan mecanismos apoptóticos en las células que conforman el epitelio, mientras que los niveles de progesterona regulan el grado de apoptosis en células del estroma (Dharma 2001, Mendoza-Rodríguez et al., 2002).

Se sabe que en el sistema reproductor femenino la expresión y distribución de los receptores a estrógenos alfa ($ER\alpha$) y beta ($ER\beta$) son los responsables del desarrollo, maduración y funcionalidad del útero. Además, se ha demostrado que el $ER\alpha$ desempeña un papel importante en la diferenciación y proliferación del epitelio uterino mientras que su contraparte $ER\beta$ desempeña una acción anti proliferativa en el tejido uterino. Investigadores demostraron que una exposición de BPA 50 mg/kg/día incrementó la expresión de $ER\alpha$, así mismo la expresión

para ER β disminuyó en todas las dosis usadas de BPA, lo cual repercutió en una amplia proliferación celular en el tejido uterino (Schönfelder et al., 2004).

Ahsan y colaboradores (2018) evidenciaron que en ratas hembras la administración vía subcutánea de BPS a una dosis de 50mg BPS/Kg/día en un periodo de 10 días el cual comprende desde el día post natal 1 hasta el día post natal 10, se observó que las concentraciones de testosterona y estradiol en plasma incrementaron significativamente mientras que para las concentraciones de progesterona, hormona luteinizante (LH) y hormona estimuladora de folículo (FSH) en plasma disminuyeron significativamente respecto al grupo control, lo cual pone de manifiesto la capacidad de este compuesto de alterar la homeostasis del sistema endocrino. Cabe resaltar que variables como la regularidad del ciclo estral y la etapa de la pubertad fueron modificadas debido a la exposición de este disruptor endocrino, resultando así en la irregularidad del ciclo estral y en el desarrollo de una pubertad prematura.

Tanto en las investigaciones de Ahsan et al (2018) y de Schönfelder et al (2004) confirman que la etapa del estro fue predominante a lo largo del ciclo estral de los individuos expuestos a una dosis alta de BPA. Esto sugiere que los mecanismos apoptóticos que emplean las células del epitelio uterino se podrían ver afectados por la sobreexpresión del ER α y las alteraciones en sangre de los niveles hormonales de estrógenos y progesterona, lo cual repercute en la disrupción del ciclo estral, predominando el estadio del estro.

Planteamiento del Problema

Hoy en día se sabe que desde la concepción, los individuos están expuestos a los disruptores endocrinos. Estos son capaces de afectar el desarrollo adecuado de los individuos, lo que ocasiona el padecimiento de diferentes enfermedades en etapas tempranas de la vida o en etapas adultas. De forma general, los disruptores endocrinos son capaces de alterar la homeostasis de los sistemas endocrino y reproductivo, ya que estas sustancias son capaces de mimetizar la acción de las hormonas endógenas.

Al reportar los efectos adversos inherentes al BPA, la industria ha optado por el uso de polímeros sulfonados como alternativa segura. Por esta razón, los estudios que se han realizado hoy en día respecto a la presencia de disruptores endocrinos en humanos, han hallado la presencia de bisfenol s (BPS). Con el tiempo, los niveles de exposición de BPS en el humano y otros seres vivos han ido en aumento. Los estudios que se han realizado del BPS sobre los efectos adversos asociados a este compuesto son limitados. Es por esta razón, por lo que el presente proyecto está enfocado en estudiar los efectos que se llegan a presenciar bajo la exposición de BPS durante periodos críticos del desarrollo, como lo son la gestación y la lactancia sobre la descendencia. La principal variable de este estudio es el patrón apoptótico que presentan los epitelios luminal y glandular uterino con los cuales se tiene la finalidad de evidenciar la alteración de la homeostasis del sistema reproductor femenino ocasionada por el disruptor endocrino BPS administrado de forma indirecta.

Hipótesis

Debido a que el bisfenol s es considerado un análogo al bisfenol a. entonces se esperaría que el bisfenol s sea capaz de alterar los parámetros asociados al desarrollo (tiempo de gestación, distancia anogenital y peso) y también a los parámetros asociados al sistema reproductor (ciclo estral y patrón apoptótico) sobre la descendencia. Así como observar un decremento en el número de células en apoptosis en el epitelio luminal y glandular para los grupos administrados con bisfenol s.

Objetivo General

Estudiar el efecto de la administración de diferentes dosis de bisfenol s sobre parámetros asociados al desarrollo y sistema reproductor, así como en el patrón apoptótico involucrado en la regulación del ciclo estral.

Objetivos Particulares

Evaluar el efecto de diferentes dosis de bisfenol s en ratas gestantes (F0) sobre:

- a) Tiempo de gestación.
- b) Peso ganado después de haber dado a luz.

Evaluar el efecto de diferentes dosis de bisfenol s en la descendencia de las ratas (F1) sobre:

- a) Distancia anogenital al día del destete.
- b) Peso ganado durante el crecimiento después del destete.
- c) Regularidad del ciclo estral.
- d) Patrón apoptótico de los epitelios uterinos en etapa adulta en el día del estro.
- e) Concentración de estradiol y progesterona en el día del estro.

Metodología

Condiciones de los Animales de Experimentación

En el estudio se trabajó con ratas wistar hembras adultas n=30 (F0), las cuales fueron separadas e identificadas según al grupo de tratamiento que se les asignó (**Tabla 3**). Las condiciones de trabajo fueron las siguientes: estrictos periodos de luz:oscuridad 12h:12h, con agua y comida *ad libitum*. El control y manejo de los animales se realizó en la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA), Facultad de Química, UNAM. Adicionalmente se trabajó con un grupo de ratas Wistar machos adultos n=10, los cuales fueron criados bajo las mismas condiciones antes mencionadas.

Este estudio contó con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química.

Tabla 3. *Nomenclatura asignada a las ratas Wistar hembra (F0) para su debida identificación durante el trabajo experimental.*

Nomenclatura	Tratamiento	Nomenclatura	Tratamiento	Nomenclatura	Tratamiento
C 1,1	Control	C 3,1	BPS alta	C 5,1	BPS baja
C 1,2	Control	C 3,2	BPS alta	C 5,2	BPS baja
C 1,3	Control	C 3,3	BPS alta	C 5,3	BPS baja
C 1,4	Control	C 3,4	BPS alta	C 5,4	BPS baja
C 1,5	Control	C 3,5	BPS alta	C 5,5	BPS baja
C 2,1	Control	C 4,1	BPS alta	C 6,1	BPS baja
C 2,2	Control	C 4,2	BPS alta	C 6,2	BPS baja
C 2,3	Control	C 4,3	BPS alta	C 6,3	BPS baja
C 2,4	Control	C 4,4	BPS alta	C 6,4	BPS baja
C 2,5	Control	C 4,5	BPS alta	C 6,5	BPS baja

Monitoreo del Ciclo Estral y Apareamiento

Para el monitoreo del ciclo estral de las ratas Wistar hembras (F0), el monitoreo fue realizado de lunes a viernes antes del mediodía (12:00h). Para el monitoreo del ciclo estral fue necesario tomar un frotis vaginal, el cual fue realizado de la siguiente manera, con un asa bacteriológica previamente esterilizada al rojo vivo con la flama de un mechero de etanol y posteriormente enfiada con agua destilada. Se procedió a introducir el asa bacteriológica a la cavidad vaginal con la finalidad de obtener el frotis vaginal, el cual subsecuentemente fue depositado sobre la superficie de un portaobjetos previamente identificado. Dicho

procedimiento fue repetido para cada una de las ratas en estudio, con la finalidad de generar evidencia documental de la regularidad del ciclo estral de las ratas Wistar hembras en experimento y subsecuente a esto aparear a las ratas hembras con los machos en experimentación.

La tinción de los frotis vaginales se realizó mediante una técnica de tinción diferencial Hematoxilina/Eosina. Esta tinción fue llevada a cabo de la siguiente manera: un volumen de hematoxilina (Sigma-Aldrich) se adicionó de tal forma que la superficie del portaobjetos que contenía las muestras vaginales se encontrara cubierta en su totalidad por este reactivo, y se dejó reposar la laminilla durante un intervalo de tiempo de 8 minutos. Pasado el tiempo de reposo, la placa se enjuagó con agua destilada y se secó a temperatura ambiente. El portaobjetos con las muestras vaginales fue sumergido en una disolución de carbonato de litio saturado (Merck) por un periodo de 5 segundos, para posteriormente ser enjuagado con agua destilada. Finalmente, la placa se secó a temperatura ambiente. Posteriormente, a la placa se le adicionó un volumen de eosina (Sigma-Aldrich) de tal forma que la superficie del portaobjetos que contenía las muestras vaginales se encontrara cubierta en su totalidad por este reactivo, y se dejó reposar la laminilla durante un intervalo de 5 minutos. Pasado el tiempo de reposo, la placa se enjuagó con etanol al 70% (Meyer) y se secó la placa a temperatura ambiente. Finalizada la técnica de tinción se procedió a observar los frotis vaginales al microscopio (Nikon eclipse E 200).

Las muestras fueron observadas al microscopio con la finalidad de revelar la etapa del ciclo estral en la cual se encontraba la rata Wistar hembra tratada. El criterio empleado para revelar las muestras se muestra en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Resultados de las observaciones realizadas a los portaobjetos que contienen los frotis vaginales de ratas wistar hembras, teñidos con hematoxilina/eosina y observados en el microscopio con el objetivo de 40X.	
Estadio del Ciclo Estral	Descripción
Proestro	Células del epitelio vaginal nucleadas con forma ovoide que se encuentran agrupadas en forma de racimos de uva. El colorante que se aprecia en el microscopio es el de la hematoxilina en el núcleo (morado) y el citoplasma se observa naranja.
Estro	Células del epitelio vaginal descamadas, no presentan núcleo y forman grandes aglomerados de células. El colorante que retienen es el de la eosina.
Metaestro	Células del epitelio vaginal descamadas sin núcleo y además se observan células nucleadas y la abundancia de leucocitos, los cuales se tiñen de morado y son más pequeños que las células del epitelio.
Diestro	Pocas células en comparación de los otros estadios, se observan células de todo tipo, pero en menor proporción.

Obtenidos los resultados del estadio del ciclo estral de cada una de las ratas Wistar hembras por tres semanas, se procedió con el apareamiento de los animales en experimentación. En la tarde, cuando la rata Wistar hembra se encontraba en proestro, ésta se separó de la caja en donde se encontraba con las demás ratas para ser colocada en una caja independiente, la cual previamente fue identificada junto con el macho. A la mañana siguiente, el macho fue retirado, se procedió en tomar un frotis vaginal y, posteriormente se tiñó la muestra (hematoxilina/eosina) con la finalidad de evidenciar la presencia de espermatozoides en la muestra vaginal. El día en el que fue tomado el frotis vaginal y evidenciando mediante la tinción hematoxilina/eosina la presencia de espermatozoides, ese día fue considerado como Día de Gestación 1 (**DG1**).

Administración de Bisfenol s a Ratas Wistar Hembras Gestantes (F0)

El Bisphenol s (BPS) es un compuesto que recientemente fue incorporado a diferentes ramas de la industria. Es debido a esto que la información respecto a la bioseguridad del compuesto es escasa o poco accesible respecto a las dosis seguras que presenta dicho compuesto. La TDI (dosis de referencia o dosis de ingesta diaria aceptable) corresponde a la cantidad de una sustancia química a la que un ser vivo puede estar expuesta diariamente por un periodo de tiempo extendido sin sufrir efectos adversos. La dosis de referencia del compuesto en estudio (BPS) no está reportada, por lo que se tomó en consideración la información publicada del TDI de su análogo Bisfenol A (BPA), la cual corresponde a 0.05 mg/Kg peso corporal/día. Esta información es la que reportan la Agencia de Protección al Medio Ambiente y la Agencia de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos de Norte América. El NOAEL (dosis sin efecto adverso observable) reportado por la National Toxicology Program (NTP) de los Estados Unidos de Norte América para Bisfenol s (BPS) que es igual a 60 mg/Kg peso corporal/día. En este estudio se emplearon dosis por debajo del NOAEL reportado, además de que se tomó en consideración la información reportada por agencias regulatorias de los Estados Unidos de Norte América para el BPA. Por lo anterior, las dosis administradas de BPS a dosis alta y baja fueron las siguientes, 20 mg/Kg/día y 0.05 mg/Kg/día respectivamente. La vía de administración de los diferentes tratamientos fue oral.

El monitoreo del volumen ingerido de agua se realizó *ad libitum* con la finalidad de obtener el promedio del volumen consumido para dar inicio a la administración de las diferentes dosis de Bisfenol s (Sigma). A partir del día 6 de gestación (**DG6**), los animales bajo estudio fueron administrados de la siguiente manera: a los grupos control se les administró el vehículo (etanol al 1% en agua); al grupo tratado BPS a dosis baja de 0.05 mg BPS/Kg peso corporal/día utilizando como

vehículo una disolución de etanol al 1% en agua; al grupo tratado con BPS a dosis alta se le administró una dosis de 20 mg BPS/Kg peso corporal/día utilizando el mismo vehículo. Adicionalmente, se realizaron ajustes en las dosis debido al volumen ingerido por cada grupo en estudio.

La interrupción del tratamiento con BPS para los grupos tratados (control, BPS dosis alta y BPS dosis baja) se realizó el día 21 después del parto (día del destete).

Caracterización Fenotípica de las Crías (F1) en el Día 21 Posparto

Las crías de los diferentes tratamientos fueron destetadas en el día 21 posparto. El día del destete cada una de las crías fue sexada a partir de la distancia anogenital medida por el instrumento Vernier (Cemex). El criterio que se estableció para dicha caracterización fue el siguiente: si la distancia anogenital era menor o igual a 12.5 mm se consideró a la cría como hembra y si la distancia anogenital era mayor a 12.5 mm se consideró como macho. Adicionalmente, el peso de cada uno de los animales en experimentación se evaluó ese mismo día y posteriormente cada 7 días se volvió a medir el peso de estos hasta el día 91 posparto para hembras y 134 para machos. La distancia anogenital obtenida fue dividida entre la raíz cubica del peso, con la finalidad de realizar la corrección de la distancia anogenital en función del peso.

Una vez identificadas las crías entre hembras y machos, estas fueron separadas e identificadas con relación a su progenitora y del tratamiento que recibió esta. Las crías se alimentaron con agua libre de BPS y comida *ad libitum*.

Monitoreo del Ciclo Estral de las Crías (F1)

A las hembras F1 se les realizó el monitoreo del ciclo estral a partir del día posparto 90 y después de la recolección de frotis vaginales y subsecuentemente tinción hematoxilina/eosina. Lo anterior para evidenciar el estadio en el cual se encontraba cada rata tratada. Una cría por cada camada se seleccionó (control, BPS dosis alta, BPS dosis baja), además se escogieron aquellas crías que presentaron ciclos regulares, por lo menos dos ciclos y se sacrificaron en el estadio del estro por decapitación antes de las 12:00h del mismo día. A éstas se les extrajo el útero para posteriormente ser procesado y se procedió con la recolección de sangre.

Tratamiento de los Tejidos Extraídos de las Crías (F1)

De las crías que fueron sacrificadas por decapitación en el estadio del estro, mediante una disección se extrajo el tejido uterino, el cual se liberó de tejido graso y fue fijado introduciéndolo en una disolución de paraformaldehído al 4% en PBS 1X. Posteriormente, los tejidos fueron deshidratados sumergiéndolos en

disoluciones de concentración creciente de etanol, después fueron tratados con xilol y finalmente en parafina. Este proceso se realizó en el equipo Histokinette (STP 120). Finalmente, el tejido procesado fue incluido en bloques de parafina.

A partir de los bloques se obtuvieron cortes histológicos de 5 μm de grosor de cada animal que recibió el tratamiento empleando el equipo Microtomo (Leica). Dichos cortes fueron fijados en laminillas previamente tratadas con poli-L-lisina.

Evaluación de los Niveles Hormonales Séricos

A las crías hembras que fueron sacrificadas por decapitación se les extrajo una muestra de sangre, la cual fue procesada en la centrifuga con la finalidad de separar el coagulo del suero. El suero fue extraído de la matriz (coagulo-suero) mediante técnica de pipeteo empleando una pipeta Pasteur. El suero extraído se colocó en tubos eppendorf, los cuales fueron resguardados a condiciones de congelación a -70°C .

La obtención de los niveles séricos de progesterona (P4) y estradiol (E2) fue realizado a partir del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (DRG intruments GmbH, Marburg, Alemania). La sensibilidad de los ensayos fue de 0.4 pg/mL para E2, mientras que para P4 correspondió al 0.1 ng/mL. Los coeficientes de variación intra e interensayo para el E2 fueron del 7.84% y 7.01% respectivamente, mientras que para P4 corresponde a 8.01% y 7.56%.

Técnica de Tinción TUNEL

Los tejidos en la laminilla fueron desparafinados incubándolos a 60°C durante 30 minutos. Posteriormente, los tejidos fueron sumergidos en xilol, y rehidratados en soluciones de concentración decreciente de etanol hasta llegar a agua destilada. Para exponer antígenos se empleó disoluciones de citrato de sodio 10mM a pH=6.0 y para permeabilizar la membrana celular Triton X-100 al 5% disuelto en PBS 1X.

Los tejidos uterinos que recibieron el tratamiento fueron incubados con el reactivo TUNEL a 37°C por 1 h y en completa oscuridad. El control positivo fue tratado con la enzima DNAsa I a 37°C por 10 min, y posteriormente fue tratada con el reactivo de TUNEL. El control negativo únicamente fue tratado con el reactivo Label, el cual no contiene la enzima Terminal deoxinucleotidil transferasa. Finalmente, cada laminilla fue montada con Fluoroshield (Sigma) adicionado con DAPI. Los cortes histológicos fueron observados en un microscopio de fluorescencia (Nikon E600) y fotografiados. La tinción de TUNEL se observó rojo y la tinción nuclear con DAPI se observó en azul. De cada animal se fotografió todo el epitelio luminal y glandular y se cuantificaron el número de núcleos totales en cada uno de los epitelios y el número de núcleos marcados con TUNEL. Se evaluaron 10 animales por tratamiento.

Conteo de células del Epitelio Uterino Luminal y Glandular

El programa en línea Photoshop (<https://photoshoponline.pro/es/online-photoshop/>) se empleó para empalmar las imágenes de color rojo y azul, y de esta forma poder realizar el conteo de células en estado de apoptosis del epitelio luminal y glandular del útero como se muestra en la Figura 7.

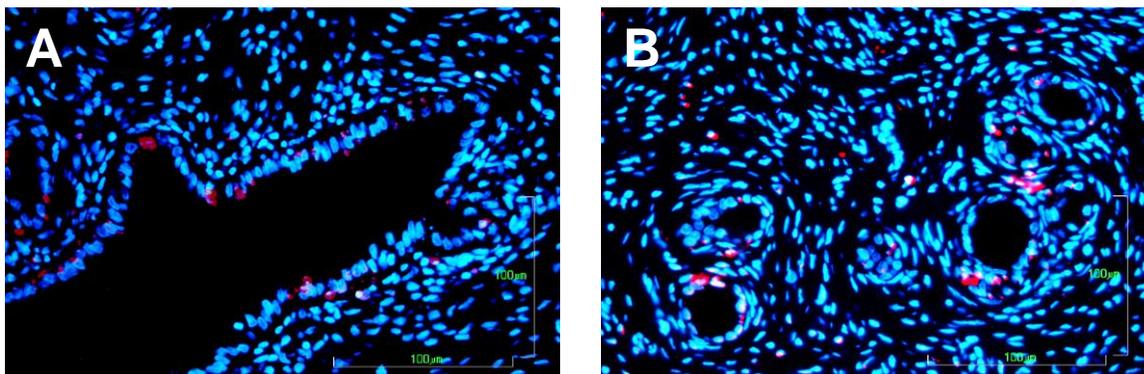


Figura 7. Micrografía obtenida a partir de microscopia de fluorescencia, los tejidos fueron teñidos empleando la técnica de TUNEL. **A)** Epitelio luminal. **B)** Epitelio glandular. Las células teñidas en rojo son aquellas células que están en apoptosis. Barra = 100 μ m

Análisis Estadístico de los Datos

El análisis de los resultados obtenidos se llevó a cabo por medio de los programas Prism®, Microsoft Excel®, Adobe Photoshop® y FV10-ASW 1.7®.

Para cada una de las pruebas estadísticas realizadas se empleó un análisis de varianza de una sola variable (ANOVA) seguido de la prueba de Dunnett con la finalidad de conocer la existencia de diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos respecto al control.

Resultados

Monitoreo del Periodo de Gestación de Ratas Wistar Gestantes (F0)

Las hembras pertenecientes a la generación F0 fueron apareadas con machos la tarde del día del proestro de su ciclo estral. La fecundación por parte del macho a la hembra se evidenció por una tinción diferencial realizada en el frotis vaginal que se obtuvo al día siguiente de que ocurriera o no la fecundación. La presencia de espermatozoides en la muestra tratada corroboraba la fecundación de la hembra. El día en el que se observó espermatozoides en el frotis vaginal fue considerado como el primer día de gestación (DG1). A partir de lo antes mencionado se realizó el conteo de los días de gestación que tuvo cada rata hasta el día de nacimiento de los neonatos. En la Figura 8 se muestra el tiempo de gestación (días) de los grupos tratados comparados respecto al grupo control, donde no se encontraron diferencias significativas.

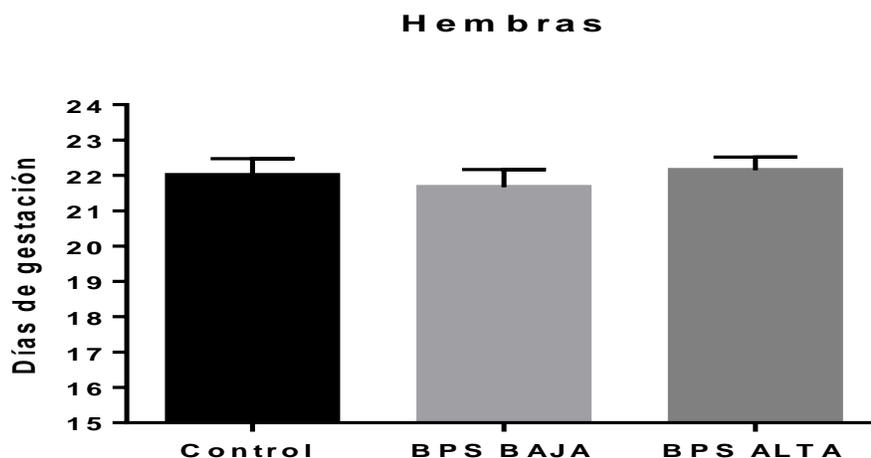


Figura 8. Número de días de gestación de las ratas madres (F0), las cuales fueron tratadas con BPS durante la gestación. Se presenta el valor promedio \pm ES. La dosis empleada para los grupos de BPS dosis baja fue de 0.05 mg/Kg/día, BPS dosis alta fue de 20 mg/Kg/día y grupo control fue tratado con una solución de etanol 1.0% en agua.

Monitoreo del Peso en Ratas Wistar (F0) Después de la Concepción

A las ratas hembras F0 que dieron a luz se les monitoreó el peso a partir del día del destete y cada 7 días se registró su peso. En la Figura 9 se muestra la

comparación de los pesos que se registraron de las madres después del periodo de lactancia. El análisis estadístico indicó que no existen diferencias significativas en el peso de los grupos tratados respecto al control.

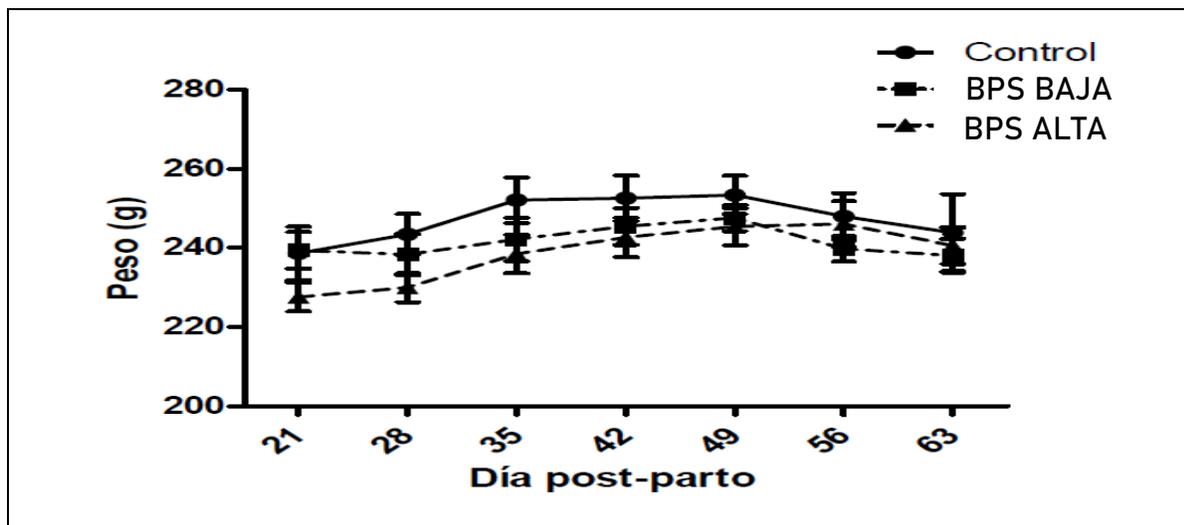


Figura 9. *Peso corporal de las ratas hembras F0 después del destete, que fueron administradas con BPS vía oral. Se presenta el valor promedio \pm ES. BPS-L, BPS dosis baja; BPS-H, BPS dosis alta.*

Distancia Anogenital Correspondiente a la Generación F1 en el Día 21 Post Parto

La medición de la distancia anogenital (DAG) de las crías (F1) se realizó con la finalidad de asignarles el sexo propio de estas. Los valores medidos de la DAG/peso^{1/3} de los grupos expuestos a BPS y el grupo control fueron analizados estadísticamente. Se observó una disminución significativa entre la dosis alta de BPS (20 mg BPS/Kg/día) respecto al grupo control. Lo antes mencionado se observó en las crías de ambos sexos, tanto hembras (Figura 10) como en machos (Figura 11).

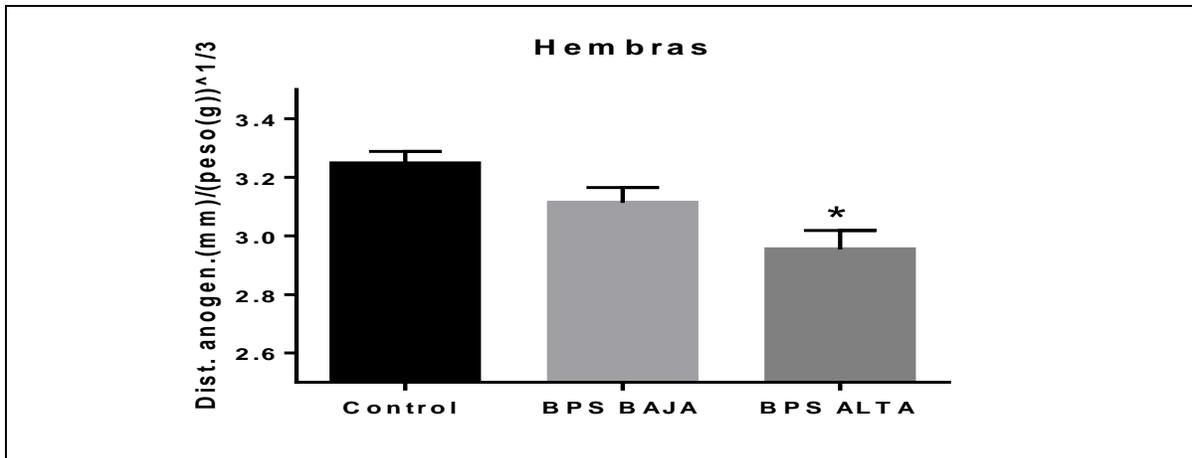


Figura 10. Relación de la distancia anogenital (mm) entre la raíz cubica del peso (g) de las crías hembras (F1) al día 21 de lactancia, que es cuando fueron destetadas. Se presenta el valor promedio \pm ES. * $p < 0.05$ respecto al control.

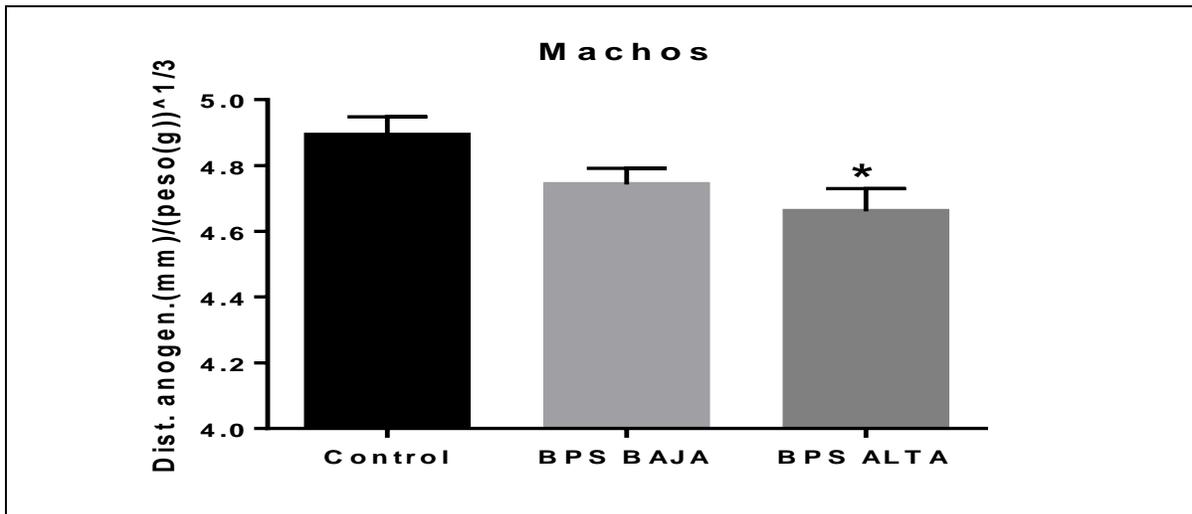
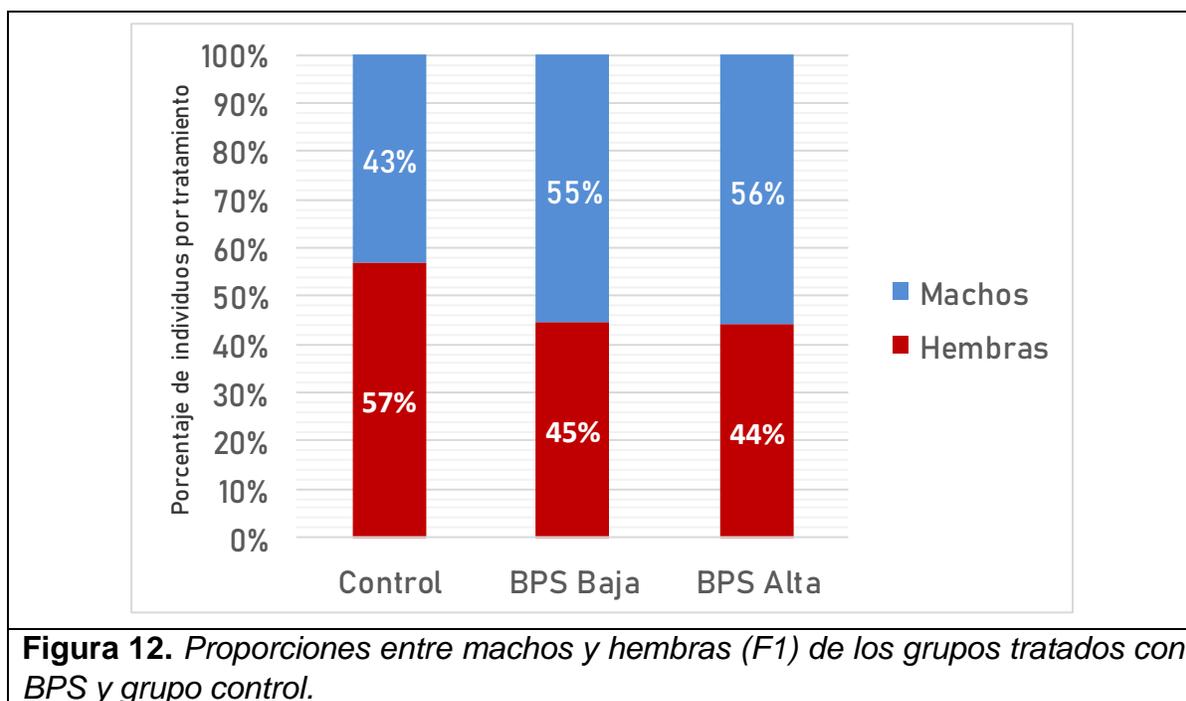


Figura 11. Relación de la distancia anogenital (mm) entre la raíz cubica del peso(g) de las crías machos (F1) al día 21 de lactancia, que es cuando fueron destetados. Se presenta el valor promedio \pm ES.
* $p < 0.05$ respecto al control.

Además, el análisis estadístico se realizó entre el número de hembras del total de crías nacidas de los grupos tratados con BPS respecto al control. No se hallaron diferencias significativas entre los diferentes grupos. Esto mismo ocurre para los machos. En la Figura 12 se muestra la gráfica comparativa de los porcentajes de hembras y machos de los grupos tratados con BPS y el grupo control, respectivamente. Cabe resaltar que a dosis alta y baja de BPS el porcentaje de hembras disminuyó apreciablemente; sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa.



Monitoreo del Peso de Ratas Wistar Correspondientes a la Generación F1

El peso de las crías de sexo masculino se monitoreó a partir del día 21 post parto y posteriormente la medida del peso de las ratas se determinó cada 7 días respecto a la medición anterior, llevando así una serie de mediciones consecutivas del día 21 hasta el día 84 postparto. Además, los registros de los pesos se obtuvieron en los días 123, 128 y 134 postparto correspondientes a los machos. En estos datos se hayo una disminución estadísticamente significativa en el peso de los machos expuestos a una dosis baja de BPS respecto al control (Figura 13).

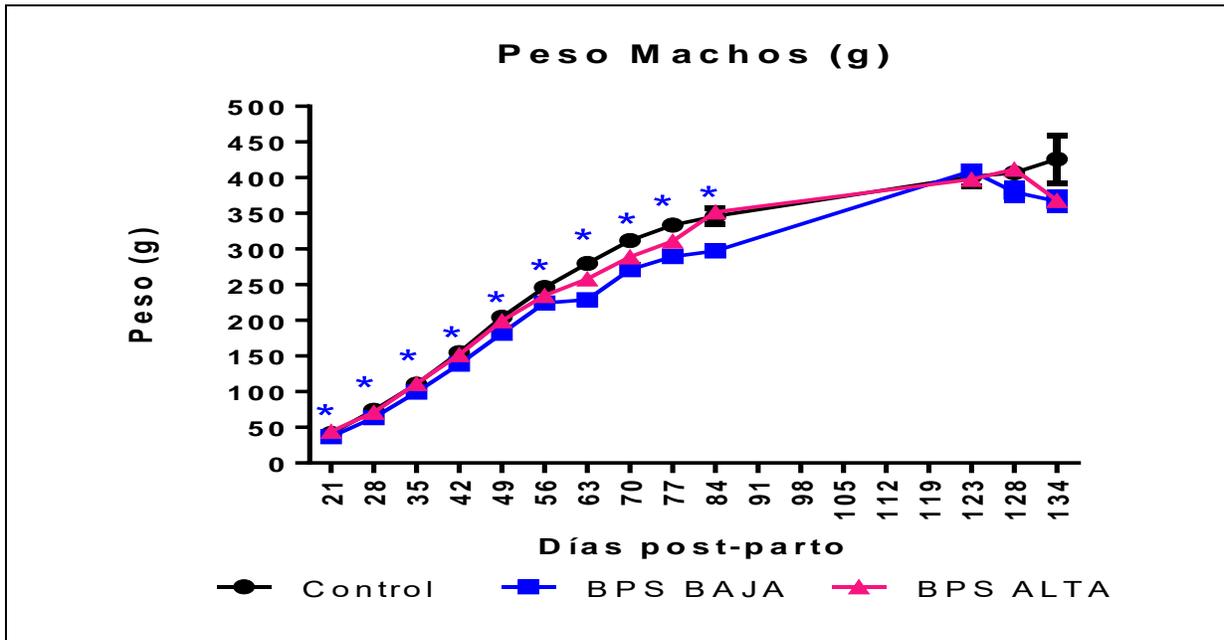


Figura 13. *Peso (g) de las ratas macho (F1). Dichos pesos se obtuvieron a partir del día 21 post-parto el cual corresponde al día en el que fueron destetados, consecuencia de ello el tratamiento fue interrumpido. Se presenta el valor promedio \pm ES. * $p < 0.05$ BPS baja respecto al control.*

En el caso de las crías de sexo femenino, el peso se monitoreo a partir del día 21 hasta el día 91 post parto en donde se realizaron mediciones consecutivas de 7 días de diferencia entre cada medición. Se observó diferencia estadísticamente significativa con el aumento en el peso en las crías expuestas a una dosis alta de BPS en los días 49, 63, 77 y 84 post parto; por otro lado, se encuentra la disminución del peso en las crías expuestas a una dosis baja de BPS en los días 21, 28, 35, 42, 70 y 77 post parto (Figura 14).

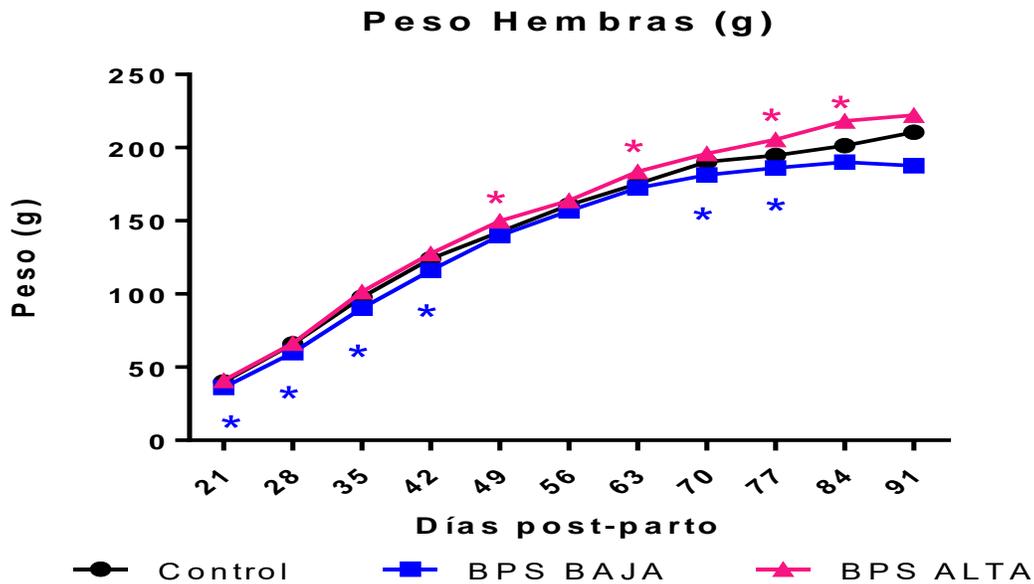


Figura 14. *Peso (g) de las ratas hembra (F1), dichos pesos se obtuvieron a partir del día 21 post-parto el cual corresponde al día en el que fueron destetados, consecuencia de ello el tratamiento fue interrumpido. Se presenta el valor promedio \pm ES*

* $p < 0.05$ BPS alta respecto al control.

* $p < 0.05$ BPS baja respecto al control

Regularidad del Ciclo Estral en la Generación F1

La regularidad del ciclo estral de las ratas hembras pertenecientes a la generación F1 del grupo control, así como también de los grupos expuestos con BPS a dosis baja y se monitoreó durante el experimento. En la figura 15 se muestra la comparativa de cada etapa entre los grupos expuestos con BPS respecto al grupo control, en el cual se compara el promedio correspondiente al número de días de cada etapa del ciclo estral de las ratas hembras de la F1, no encontrando así diferencias significativas entre los grupos.

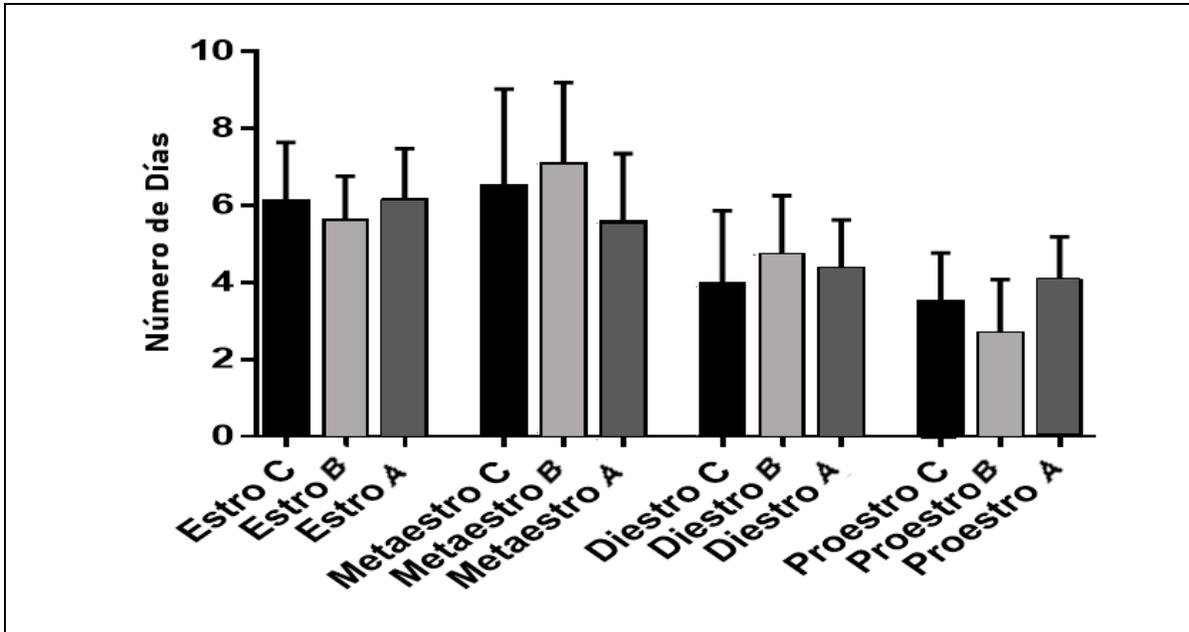


Figura 15. Grupos expuestos con BPS respecto al grupo control, en el cual se compara el promedio del conteo de los días en el que cada rata hembra presentó las etapas características del ciclo estral (Estro, metaestro, diestro y proestro). Se muestra el valor promedio \pm ES.

C: Grupo control

B: Bisfenol baja (0.05mg BPS/Kg/día)

A: Bisfenol alta (20mg BPS/Kg/día)

Cuantificación de Células en Estado de Apoptosis del Epitelio Luminal y Glandular Uterino

En la Figura 16 se muestran las micrografías de los cortes histológicos de tejido uterino teñidos por la técnica de tinción TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick-End Labeling), donde se realizó el conteo de las células totales que conforman el epitelio luminal y glandular (teñidas de color azul) para posteriormente realizar el conteo de las células en estado de apoptosis (teñidas de rojo).

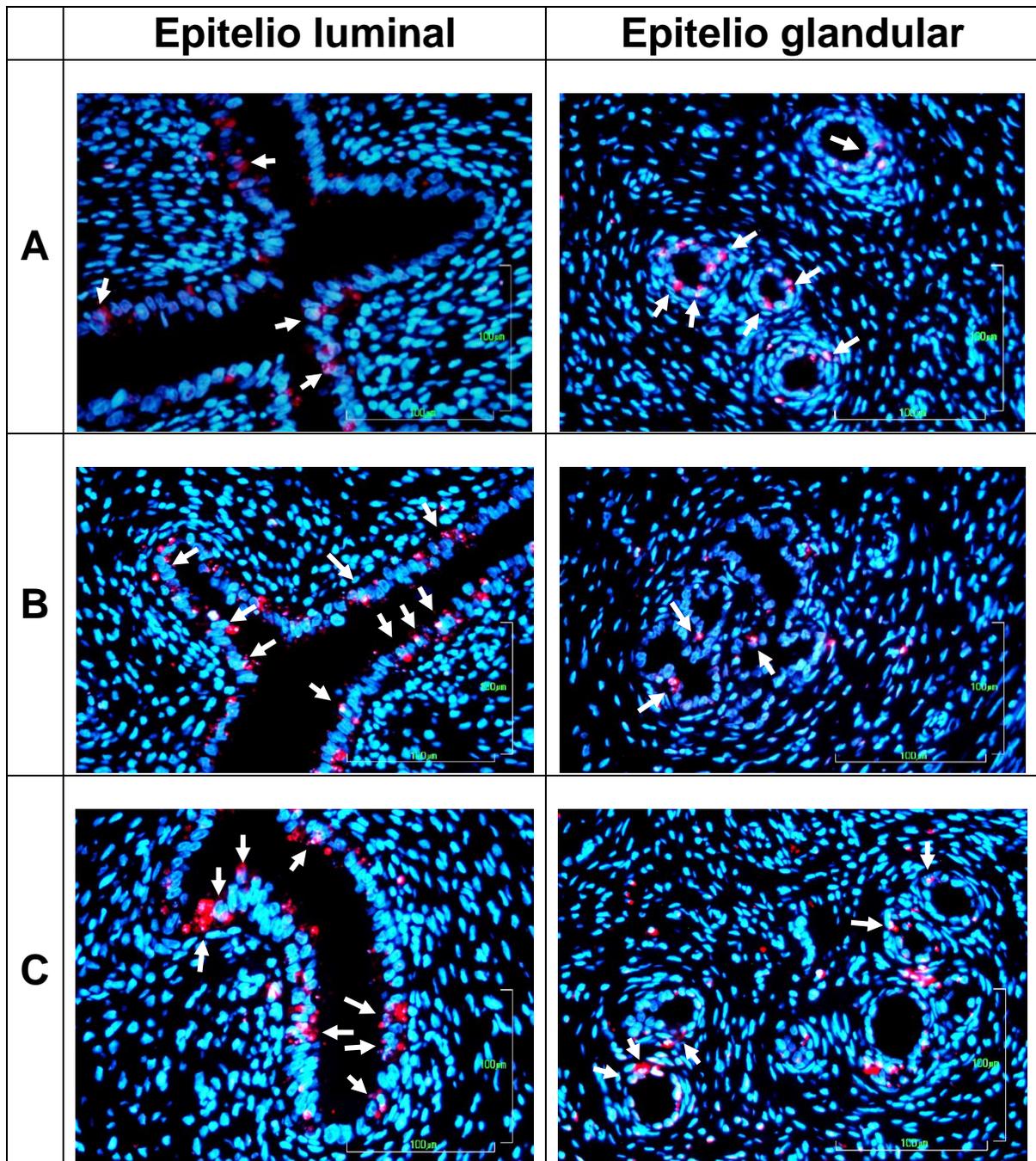


Figura 16. Micrografía obtenida a partir de microscopía de fluorescencia, en la cual los tejidos obtenidos de los animales en estudio fueron teñidos por la técnica de tinción TUNEL con la finalidad de revelar y diferenciar a las células que conforman al epitelio uterino (azul) de las células en estado de apoptosis (rojo). **A)** Micrografía del epitelio luminal y glandular que corresponden al grupo control. **B)** Micrografía del epitelio luminal y glandular que corresponden al grupo tratado con BPS dosis baja 0.05 mg/Kg/día. **C)** Micrografía del epitelio luminal y glandular que corresponden al grupo tratado con BPS dosis alta 20 mg/Kg/día.

En la Figura 17 se muestran las gráficas que corresponden al porcentaje de células en estado de apoptosis (índice apoptótico) que corresponden al epitelio luminal uterino, mientras que para el epitelio glandular se muestra en la Figura 18. No se encontraron diferencias significativas en ningún grupo expuesto a diferentes dosis de BPS respecto al control en los diferentes epitelios luminal y glandular uterino.

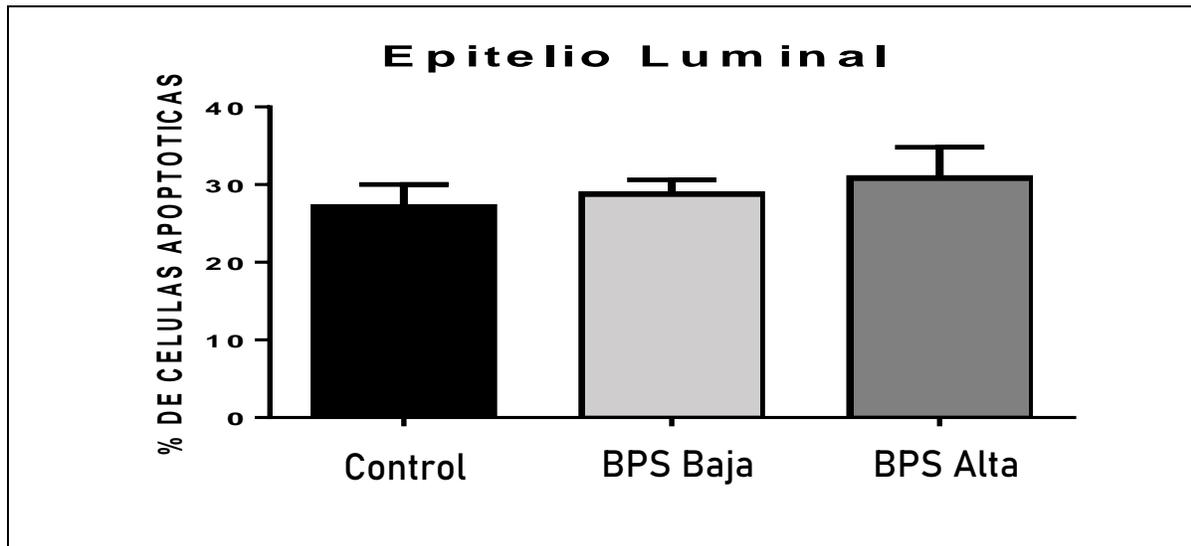


Figura 17. Porcentaje de células apoptóticas en el epitelio luminal durante el estro del ciclo estral de las ratas hembras (F1). Se muestra el valor promedio \pm ES.

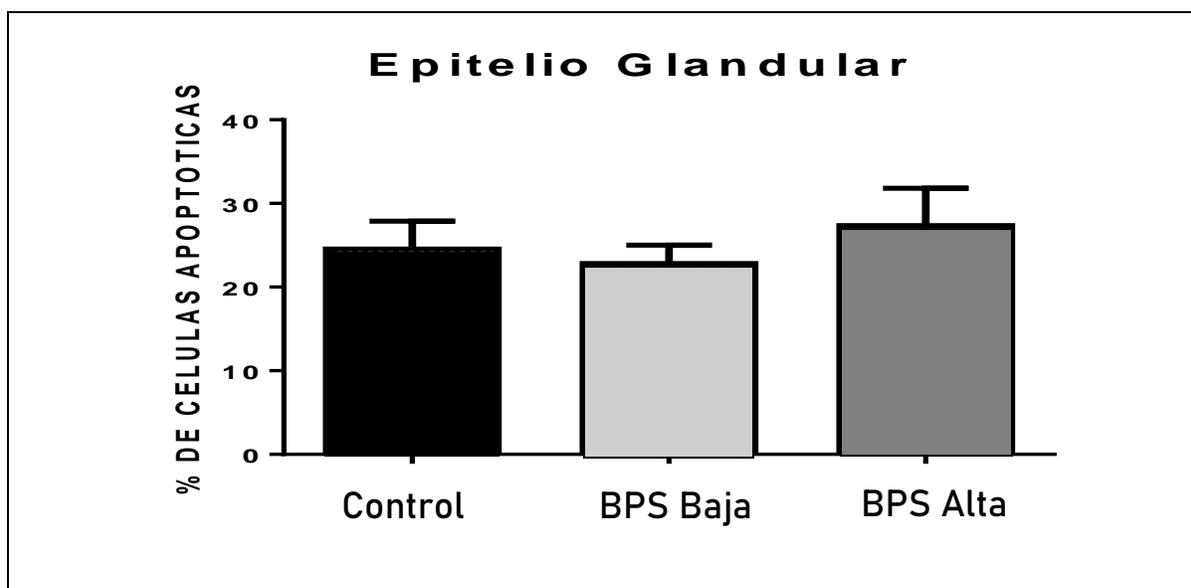


Figura 18 Porcentaje de células apoptóticas en el epitelio glandular durante el estro del ciclo estral de las ratas hembras (F1). Se muestra el valor promedio \pm ES.

Niveles Séricos de Progesterona y Estradiol

Los niveles de estradiol presentes en suero se determinaron como se aprecia en la Figura 19 y se realizó la estadística entre las ratas pertenecientes a la generación F1 expuestas a diferentes dosis de BPS respecto al grupo control. No se observaron diferencias significativas en los niveles circulantes de estradiol. Esto mismo ocurrió en los niveles séricos de progesterona (Figura 20) no hallando diferencias significativas entre los grupos expuestos a BPS respecto al grupo control.

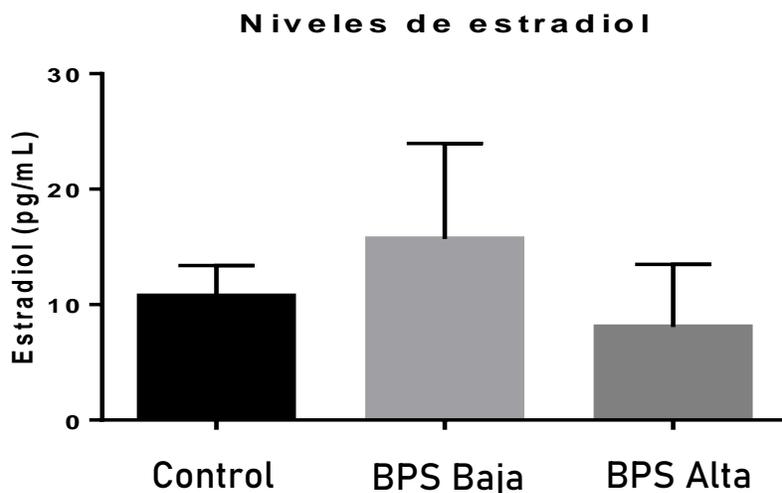


Figura 19. Análisis comparativo de la concentración de estradiol (pg/mL) entre las crías hembras (F1) durante el estro. Los niveles de estradiol fueron obtenidos del suero. Se muestra el valor promedio \pm ES.

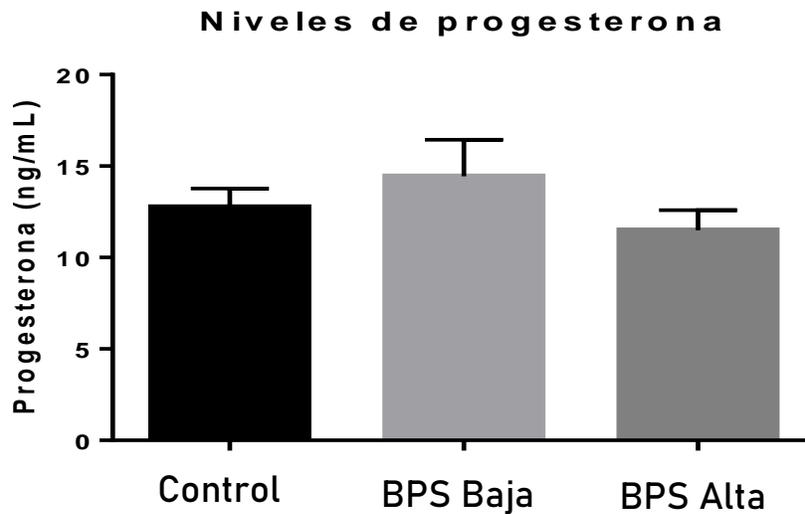
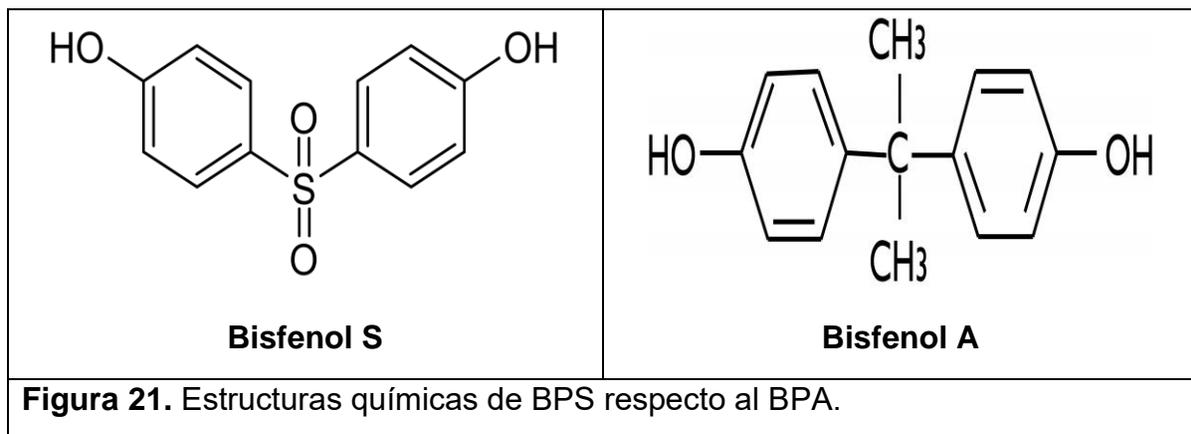


Figura 20. Concentración de progesterona (ng/mL) entre las crías hembras (F1) durante el estro. Los niveles de progesterona fueron obtenidos a partir del suero. Se muestra el valor promedio \pm ES.

Discusión

En el análisis de resultados, debido a que aún no existe basta información en lo que concierne a los efectos inherentes del BPS sobre la salud, se tomó como referencia los estudios realizados anteriormente del BPA, ya que este disruptor endocrino ha sido bien estudiado. Además, el BPS muestra una estructura análoga al BPA (**Figura 21**), es por esta razón que se piensa que pueden tener las mismas consecuencias en el organismo pero a menos impacto.



Como se había mencionado con anterioridad, la dosis de referencia de BPS no está reportada, por lo que se tomó en consideración la información publicada del TDI de su análogo BPA la cual corresponde a 0.05 mg/Kg peso corporal/día. Esta información es la que reportan la Agencia de Protección al Medio Ambiente y la Agencia de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos de Norte América. El NOAEL (dosis sin efecto adverso observable) reportado por la National Toxicology Program (NTP) de los Estados Unidos de Norte América para BPS es igual a 60 mg/Kg peso corporal/día. En este estudio se emplearon dosis por debajo del NOAEL reportado, además de que se tomó en consideración la información reportada por agencias regulatorias de los Estados Unidos de Norte América para el BPA, por lo cual las dosis que fueron administradas de BPS a dosis alta y baja fueron las siguientes, 20 mg/Kg/día y 0.05 mg/Kg/día, respectivamente. La vía de administración de los diferentes tratamientos fue vía oral, ya que este es la fuente principal de exposición del ser humano a estos compuestos.

En el presente estudio se evaluó el efecto que existe entre las variables involucradas en la homeostasis del sistema reproductor femenino (patrón apoptótico), así como también las variables asociadas en el desarrollo fisiológico (distancia anogenital, peso) de diferentes sujetos en estudio bajo una exposición perinatal a distintas dosis de bisfenol S (BPS) administrada por vía oral a las madres gestantes. Dicha exposición de BPS inicio en el día 6 de gestación y concluyó el día 21 post parto, siendo así la exposición a este disruptor endocrino por parte de la generación F1 durante el periodo de gestación y por la ingesta de leche materna durante la lactancia.

Las ratas gestantes (F0), a las cuales se les administró BPS vía oral durante el DG6 hasta el día post parto 21, se les monitoreó el tiempo de gestación a cada una (**Figura 8**) encontrando así que el periodo de gestación no presentó diferencias significativas entre aquellas ratas que fueron expuestas a BPS respecto al control. En un estudio realizado en China en la provincia de Wuhan, investigadores se dieron a la tarea de analizar los altos niveles de los disruptores endocrinos BPA y BPS en orina con la finalidad de correlacionar la exposición a estos DEs con la disminución del periodo gestacional y al aumento de nacimientos prematuros. Los resultados que obtuvieron para el BPA fueron que, a altas concentraciones de este compuesto presente en orina, los nacimientos prematuros se correlacionaron estadísticamente, indicando así que este compuesto está involucrado en la alteración de la homeostasis del periodo gestacional durante el embarazo. Esta correlación entre nacimientos prematuros y disruptor endocrino, no ocurre con las altas concentraciones de BPS presentes en orina de mujeres embarazadas en diferentes momentos del periodo gestacional, lo cual indica que este compuesto no altera de manera significativa la homeostasis del periodo gestacional (Huang et al., 2019). Los resultados que obtuvieron Huang y colaboradores (2019) concuerdan con los resultados obtenidos, estos resultados

son indicativos de que una exposición vía oral de BPS a diferentes dosis a lo largo del embarazo no es un factor de riesgo para padecer nacimientos prematuros.

A las ratas hembras (F0) que fueron expuestas a diferentes dosis de BPS por vía oral se les monitoreó el peso hasta el día 63 post parto, no encontrando así, diferencias significativas entre la dosis alta y dosis baja de BPS respecto al control (**Figura 9**). Ullah y colaboradores (2016) elucidaron que una administración oral sub crónica (28 días) de BPS a diferentes concentraciones en ratas adultas macho de la cepa Sprague Dawley, no presentaron cambios significativos en el peso corporal en función del tiempo respecto al control. Anteriormente, Yamasaki y colaboradores (2014) hallaron que en ratas hembras de la cepa Crj:CD administradas por vía subcutánea con BPS a diferentes concentraciones, no se hallaron diferencias significativas en la ganancia de peso corporal de los sujetos en estudio. Se ha reportado que una administración de 28 días consecutivos por vía oral de BPS (1, 2, 5, 25, 50 μg de BPS/Kg/día) en ratas macho de la cepa Sprague Dawley cuya edad oscila entre los 70 – 80 días post parto, no se hallaron diferencias significativas en el peso (Ullah et al., 2016). Estos resultados refuerzan que una administración por vía oral de BPS no altera el peso corporal de los individuos. Estos estudios son indicativos de que a una exposición directa vía oral o subcutánea del disruptor endocrino bisfenol s a altas o bajas concentraciones ya sea en hembras o en machos, no conlleva a cambios significativos en el peso corporal del individuo.

La distancia anogenital (DAG) es un parámetro indicativo del desarrollo sexual. Como se aprecia en la **Figura 10** (hembras F1) y en la **figura 11** (machos F1), los grupos expuestos a una dosis baja de 0.05 mg BPS/Kg/día no mostraron diferencias significativas en la relación DAG/(peso)^{1/3} respecto al grupo control. Sin embargo, aquellos individuos que fueron expuestos a una dosis alta de 20 mg BPS/Kg/día, la DAG/peso^{1/3} disminuyó significativamente tanto en hembras como en machos respecto a los grupos control. La disminución de la DAG/peso^{1/3} en aquellos sujetos expuestos a dosis altas de BPS, es indicativo de que este compuesto es capaz de alterar aquellos mecanismos implicados en la regulación del desarrollo de los órganos sexuales en etapas tempranas del crecimiento.

Mammadov y colaboradores (2018) observaron que la DAG/peso^{1/3} disminuyó significativamente en una población de humanos varones recién nacidos a exposiciones altas de BPA (8.26 ng/mL) presentes en la sangre del cordón umbilical. El efecto asociado a altas dosis de BPA repercute en una disminución en la distancia anogenital en los varones, este mismo efecto fue observado bajo una exposición de BPS a una dosis alta (20 mg/Kg/día) durante el periodo gestacional y de lactancia en roedores, lo cual sugiere que una exposición de BPS in útero al igual que el BPA, denotan una actividad anti androgénica sobre el desarrollo genital del feto masculino, esto es debido a la similitud estructural entre ambos compuestos (**Figura 21**). Los andrógenos desempeñan un papel importante en el desarrollo de los machos, este tipo de compuestos son los

responsables de la masculinización de los órganos reproductivos y del cerebro. Se ha reportado que la exposición fetal de compuestos con actividad antagonista al receptor de andrógenos, o inhibidora de la síntesis de los mismos, es asociada con malformaciones urogenitales (Mammadov et al. 2018).

En lo que concierne a las hembras tratadas con BPS, un estudio reveló que la exposición perinatal a BPA a una dosis de 0.025 mg/Kg peso corporal, disminuyó significativamente la DAG/peso^{1/3} de las crías hembras expuestas a esta dosis respecto al grupo control (Christiansen et al., 2014). La administración de BPA fue por vía oral y la exposición que tuvieron los sujetos a este disruptor endocrino fue in útero y durante el periodo de lactancia, las condiciones de este estudio son similares a las que atañen nuestra investigación. Las similitudes entre ambos estudios son la vía de administración de los disruptores endocrinos y el tiempo de exposición que sufrieron los sujetos en estudio (in útero y lactancia) reforzando así los efectos observados en la distancia anogenital, dicha variable disminuyó significativamente en las crías hembras a una dosis de 20 mg de BPS/Kg/día respecto al grupo control.

Los resultados observados en el decremento de la distancia anogenital en las crías (F1) tanto en hembras como en machos, pone de manifiesto que a una exposición de niveles altos de BPS durante el periodo perinatal, se producen alteraciones durante el periodo de gestación en la vías de señalización endocrinas involucradas en el desarrollo normal del sistema reproductivo lo cual conlleva a padecer en un futuro de anomalías en las funciones del sistema reproductor, ejemplo de ello son las alteraciones en la fertilidad.

En lo que concierne al número de machos nacidos que fueron expuestos con BPS respecto al grupo control no hubo diferencias significativas. Esto mismo ocurre con las crías hembras que fueron expuestas a BPS, no se halló diferencias estadísticamente significativas entre los grupos expuestos con BPS respecto al grupo control. Sin embargo, en una comparativa de los porcentajes del total de crías nacidas, podemos observar que el porcentaje de crías macho aumentó en los grupos expuestos con ambas dosis de BPS (0.05 mg BPS/Kg/día y 20 mg BPS/Kg/día), por lo que se puede apreciar que el porcentaje de machos aumentó respecto al porcentaje de hembras. Caso contrario ocurre en el grupo control en donde la tendencia de los porcentajes de machos es menor respecto al porcentaje de hembras (**Figura 12**). Se ha reportado que los disruptores endocrinos que tienen actividad anti androgénica son capaces de disminuir las proporciones de los machos respecto a las hembras en la fauna silvestre (Gray et al., 2001).

Respecto a las crías **macho** que fueron expuestos a BPS, en el registro del peso ganado el cual corresponde a la **Figura 13**, se aprecia que en aquellos machos que fueron expuestos a una dosis de 0.05 mg BPS/Kg/día el peso disminuyó significativamente en el día 21 post parto, así mismo este decremento en el peso se mantiene en los días 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 77 y 84 post parto. No obstante,

en el día 123 en el que se realizó el registro del peso, no se observaron diferencias significativas entre los individuos expuestos a BPS respecto al grupo control, lo cual es indicativo que la ganancia de peso se restablece conforme el individuo se aproxima a la etapa adulta. Por otro lado, los individuos que fueron expuestos a una dosis de 20 mg BPS/Kg/día, no mostraron diferencias significativas en el peso ganado respecto al grupo control. Da Silva y colaboradores (2019) realizaron un estudio en condiciones similares al presente estudio. Este estudio consistió en una exposición a BPS durante el periodo de gestación y de lactancia en ratas de la cepa Wistar, las ratas madres (F0) fueron administradas por vía oral a dos diferentes dosis de BPS (10 µg BPS/Kg/día y 50 µg BPS/Kg/día), no se encontraron diferencias significativas en el peso de las crías macho ni de las crías hembra. Las diferencias existentes entre ambos estudios se pudieran deber al ajuste del número de individuos pertenecientes al estudio, ya que da Silva et al (2019) ajustó un total de 4 crías macho y 4 crías hembra por camada, mientras que en el presente estudio se emplearon a todas las crías de la camada para realizar el monitoreo del peso, es debido a esta diferencia por la cual en el presente estudio, aparte de observar las tendencias también se dilucidan las diferencias significativas entre los grupos tratados con BPS respecto al control.

Como se puede apreciar en la **Figura 14** el peso ganado de las crías **hembra** (F1) muestra diferencias significativas en ambas dosis de BPS. Las crías hembras expuestas a una dosis baja de BPS (0.05mg de BPS/Kg/día) se halló que existe una disminución significativa en el peso los días 21, 28, 35 y 45 post parto, así mismo la disminución del peso se vuelve a observar en los días 70 y 77 post parto. Xu y colaboradores (2019) observaron que la exposición directa de BPS en ratones propensos a desarrollar diabetes tipo 1, conlleva a una disminución en el peso corporal a lo largo del tiempo en hembras, así como también en machos.

Por otro lado, aquellas crías hembra que fueron expuestas a una dosis alta de BPS (20 mg BPS/Kg/día) se observó un aumento en el peso corporal (**Figura 14**) en los días: 49, 63, 77 y 84 post parto. El BPS al ser una sustancia análoga al BPA (**Figura 21**) se espera que ambas sustancias compartan efectos adversos dependientes de la dosis, ejemplo de ello es el aumento del peso corporal en las crías hembra expuestas al disruptor endocrino BPS durante el periodo gestacional y de lactancia. Se ha reportado que la exposición perinatal en roedores a BPA conlleva a cambios significativos en el peso corporal. Diversas investigaciones han demostrado que el aumento del peso en roedores es dependiente de la dosis del disruptor endocrino, así como también el sexo de los individuos expuestos al DE (Rubin et al., 2009). Vandenberg y colaboradores (2008) obtuvieron resultados semejantes a los de este estudio, empleando como disruptor endocrino al BPA, los resultados obtenidos fueron el incremento del peso corporal fue más persistente en las crías hembra que en machos y que la dosis en la que este incremento en el peso corporal fue estadísticamente significativo fue en el grupo que fue expuesto a

una dosis baja de BPA (0.1 mg BPA/Kg/día). En comparación con los resultados reportados del BPA sobre los cambios que existen en el peso corporal y los resultados de este trabajo empleando BPS, corroboramos que la naturaleza del BPS como disruptor endocrino conlleva a alteraciones en la homeostasis del individuo, las cuales son consecuencia de la exposición en etapas tempranas del desarrollo (periodo de gestación y de lactancia) y que además los efectos adversos que el BPS llega a presentar son dependientes de la dosis y del sexo, ya que en este estudio observamos que el decremento del peso corporal es más persistente en machos que fueron expuestos a una dosis baja de BPS (0.05 mg BPS/Kg/día), este decremento en el peso corporal también lo podemos observar en hembras que fueron expuestas a esta misma dosis de BPS; por lo contrario, el aumento del peso corporal es apreciable únicamente en hembras que fueron expuestas a una dosis alta de BPS (20 mg BPS/Kg/día).

El objetivo principal de este estudio es el de evaluar el cambio que pueda llegar a presentar el patrón apoptótico presente en el epitelio luminal y el epitelio glandular uterino a consecuencia de la exposición in útero y durante la lactancia del disruptor endocrino BPS. Como se aprecia en la **Figura 17** se realizó el análisis estadístico entre el % de células en apoptosis que conforman al epitelio luminal uterino de los grupos expuestos a BPS respecto al grupo control, no hallando diferencias estadísticamente significativas.

En lo que respecta al cambio en el porcentaje de células apoptóticas que conforman el epitelio glandular uterino (**Figura 18**), no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratado con BPS respecto al grupo control.

Mendoza-Rodríguez y colaboradores (2011) han demostrado que una exposición de BPA durante el periodo de gestación y de lactancia, repercute en la descendencia en el decremento del índice apoptótico de las células que conforman al epitelio luminal y glandular uterino durante el estadio del estro del ciclo estral. En comparación con los resultados obtenidos con la exposición de BPS respecto a la exposición con BPA, en el presente estudio no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células apoptóticas (índice apoptótico) en aquellas células que conforman el epitelio luminal y glandular uterino en el estadio del estro, por lo cual se sugiere que las dosis empleadas de BPS en este estudio no alteran la homeostasis de la descendencia en lo que respecta en la apoptosis de las células antes mencionadas durante el estro.

Por otro lado, se evaluó el nivel hormonal de E2 (**Figura 19**) y P4 (**Figura 20**) en la descendencia femenina dando como resultado que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos expuestos con BPS respecto al grupo control.

Se ha reportado que una exposición de BPA in útero y durante la lactancia no conlleva a cambios significativos en los niveles de E2 y P4 sobre la descendencia

(Mendoza-Rodríguez et al., 2011). Los resultados reportados para BPA concuerdan con los reportados en esta investigación ya que la exposición a BPS no altera los niveles de E2 y P4. Estos resultados están ligados con la regularidad del ciclo estral de las ratas que recibieron el tratamiento con BPS (**Figura 1**), ya que no observaron diferencias significativas en el periodo del estro de los grupos expuestos con BPS respecto al grupo control. Sin embargo, Rubin y colaboradores (2001) han reportado que una administración de BPA a dosis de 0.1mg BPA/Kg/día y 1.2mg BPA/Kg/día administrada por vía oral a ratas de la cepa Sprague-Dawley durante el día 6 de gestación hasta terminar el periodo de lactancia, se demostró que las crías expuestas a BPA indirectamente, repercutió directamente en los niveles hormonales, siendo así, el decremento de la hormona luteinizante (LH) y en la prolongación del estadio del estro del ciclo estral sobre la descendencia. Es por esta razón que se analizaron los niveles de E2 y P4 en este estudio ya que son hormonas que participan en la regulación del ciclo estral, y por ende están implicadas en los cambios en las fases del ciclo ya que de ocurrir cambios en los niveles séricos de estas hormonas y otras hormonales tales como FSH, LH y GnRH; puede repercutir en problemas de fertilidad y e incrementar la disposición de desarrollar de diferentes tipos de cáncer en tejidos sensibles a estas hormonas, ejemplo de ello es el tejido uterino.

Resumen de Resultados y Conclusión

Las conclusiones a las que llegamos en el presente estudio son las siguientes:

- La administración directa vía oral de BPS a 0.05 mg BPS/Kg/día y 20 mg BPS/Kg/día durante el periodo de DG6 hasta el día post parto 21 no alteró el periodo de gestación, por lo que se sugiere que este disruptor endocrino no es susceptible a incrementar los nacimientos prematuros en ratas.
- La administración directa vía oral de BPS no ocasionó diferencias significativas en el peso corporal de las ratas hembras F0 después de haber sido expuestas a BPS. Lo anterior evidencia así que una exposición directa prolongada de BPS no conlleva a cambios en el peso corporal en hembras.
- La exposición indirecta de BPS (in útero y lactancia) sobre la descendencia no repercutió en cambios estadísticamente significativos en el número de hembras y machos. Sin embargo, es apreciable que la proporción de hembras disminuyó en los grupos expuestos a dosis alta y baja de BPS.
- Tanto para hembras como en machos pertenecientes a la F1 que fueron expuestas a una dosis de 20 mg BPS/Kg/día se observó una disminución en la DAG/peso^{1/3}, lo cual sugiere que probablemente el BPS a esta dosis tenga una actividad anti androgénica sobre la homeostasis en el desarrollo sexual que ocurre durante el periodo gestacional.

En lo que concierne al peso corporal de los sujetos de experimentación que fueron expuestos a BPS, observamos que existen diferentes efectos ocasionados por este disruptor endocrino los cuales están asociados al género y a la dosis de BPS con el cual fue expuesto.

- Los machos y hembras correspondientes a la F1 que fueron expuestos a una dosis 0.05 mg BPS/Kg/día mostraron una disminución en el peso corporal.
- En lo que respecta a hembras correspondientes a la F1 que fueron expuestas a una dosis de 20 mg BPS/Kg/día, éstas mostraron un aumento en el peso corporal.

Respecto a las diferencias observadas en el peso corporal, esto es indicativo de que el BPS produce efectos adversos sobre la descendencia ya que este compuesto fue capaz de reprogramar alguna(s) ruta(s) metabólica(s) involucrada(s) en el peso corporal, las cuales se desconocen.

- La exposición de BPS aparentemente no repercute en la homeostasis del sistema reproductor femenino sobre la descendencia, ésto se sugiere ya que no existieron diferencias estadísticamente significativas en el índice de apoptosis de las células que conforman el epitelio luminal y glandular uterino.

La premisa antes dicha se refuerza con los resultados de los niveles séricos de P4 y E2, ya que no se encontraron diferencias significativas en la concentración de estas hormonas en los sujetos que fueron expuestos con BPS.

En conclusión, el BPS produce efectos adversos sobre la descendencia tanto en hembras como en machos, específicamente sobre el peso corporal y el desarrollo de los órganos sexuales, lo cual indica que el BPS presenta efectos adversos atenuados en comparación con los efectos adversos reportados para el BPA.

Bibliografía

- [1]Ahsan N, Ullah H, Ullah W, Jahan S. Comparative effects of bisphenol s and bisphenol a on the development of female reproductive system in rats; a neonatal exposure study. *Chemosphere* 2018. 118 (12).
- [2]Ávila S, Solís W. Aspectos farmacocinéticos a tomar en cuenta durante la prescripción de fármacos en el embarazo. *Medicina Legal de Costa Rica* 2016. 33 (1).
- [3]Bhan A, Hussain I, Ansari K. I, Bobzean S. A, Perrotti L. I, Mandal S. S. Bisphenol A and diethylstilbestrol exposure induces the expression of breast cancer associated long noncoding RNA HOSTAIR in vitro and in vivo. *The journal of steroid biochemistry and molecular biology* 2014. 141: 160-170.
- [4]Barrón G. A, Arias M. J, Castro R. I. Antiestrógenos: mecanismo de acción y aplicaciones clínicas. *Salud publica Méx* 2001. 43 (6): 577-584.
- [5]Cao Xu-Liang, Kosarac I, Popovic S, Zhou S, Smith D, Dabeka R. LC-MS/MS análisis of bisphenol s and five other biphenols in total diet food simples. *Food Additives and Conraminants: Part A* 2019. DOI: 10.1080/19440049.2019.1643042
- [6]Christiansen S, Axelstad M, Boberg J, Vinggaard A. M, Pedersen G. A, Hass U. Low dose effects of bisphenol a on early sexual development in male and female rats. *Reproduction*, 2014; 147: 477 – 487.
- [7]Cruz R. R, Pásaro R. Control endocrino del ciclo reproductor en la rata: una experiencia docente utilizando un método de caracterización citológico. *Revista de Enseñanza Universitaria*, 1998. Pp: 545 – 554.
- [8]da Silva B. S, Pietrobon C. B, Bertasso I. M, Lopes B. P, Carvalho J. C, Silva N. P, Santos T. R, Neto S. C, Manhaes A. C, Oliveira E, de Moura E. G, Lisboa P. C. Short and long effects of bisphenol s (BPS) exposure during pregnancy and lactation on plasma lipids, hormones, and behaviour in rats. *Environmental Pollution*, 2019; 250: 312 – 322.
- [9]Dharma S. J, Kholkute S. D, Nandedkar T. D. Apoptosis in endometrium of mouse during estrous cycle. *Indian J Exp Biol*, 2001; 39 (3): 218 – 222.
- [10]Deceunink Y, Bichon E, Marchand P, Boquien C, Legrand A, Boscher C, Antignac J. P, Le Bizec B. Determination of bisphenol a and related substitutes/analogues in human breast milk using gas chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Bioana Chem*, 2015; 407: 2485 – 2497.
- [11]Devoto C. E, Aravena C. L. Actualización de la terapia del hirsutismo. *Rev Chil Obstet Ginecol* 2006; 71 (6): 425-431.

- [12]Dualde P, Pardo O, Corpas B. F, Kuligowski J, Gormaz M, Vento M, Pastor A, Yusa V. Biomonitoring of bisphenols a, f, s in human milk and probabilistic risk assessment for breastfed infants. *Science of the Total Environment*, 2019; 668: 797 – 805.
- [13]European Commission. 2011. Commission regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. Official Journal of the European Union.
- [14]Freeman M. E. The ovarian cycle of the rat. *Physiology of reproduction*. Raven Press Ltd., New York, 1988: pp. 1893-1928.
- [15]Galbis P. J. A. Panorama actual de la química farmacéutica. 2a Edición. SEVILLA. España. 2004.
- [16]García A. J, Gallego C, Font G. Toxicidad del bisfenol a: revision. *Rev. Toxicol* 2015; 32: 144-160.
- [17]Ghayda R. A, Williams P. L, Chavarro J. E, Ford F. B, Souter I, Calafat A. M, Hauser R, Alarcón L. M. Urinary bisphenol s concentrations: potential predictors of and associations with semen quality parameters among men attending a fertility center. *Environment International*, 2019; 131.
- [18]Greco T. L, Duello T. M, Gorski J. Estrogen receptors, estradiol, and diethylstilbestrol in early development: the mouse as a model for the study of strogen receptor and estrogen sensitivity in embryonic development of male and female reproductive tracts. *Endocr Rev* 1993; 14: 59-71.
- [19]Gray L. E, Ostby J, Furr J, Wolf C. J, Lambright C, Parks L, Veeramachaneni D. N, Wilson V, Price M, Hotchkiss A, Orlando E, Guillette L. Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. *Human Reproduction Update*, 2001; 7 (3): 248 – 264.
- [20]Guzmán C, Zambrano E. Compuestos disruptores endocrinos y su participación en la programación del eje reproductivo. *Revista de Investigación Clínica* 2007; 59 (1): 73-81.
- [21]Gwynne L. Bisphenol A: a known endocrine disruptor, A WWF European toxics programme report, April 2000.
- [22]Haynes, W.M. (ed.) CRC Handbook of Chemistry and Physics. 91st ed. Boca Raton, FL: CRC Press Inc., 2010-2011, p. 3-54
- [23]Huang S, Li J, Xu S, Zhao H, Li Y, Zhou Y, Fang J, Liao J, Cai Z, Xia W. Bisphenol a an bisphenol s exposures during pregnancy and gestational age – a longitudinal study in China. *Chemosphere*, 2019; 237.

- [24]Hussain I, Bhan A, Ansari K. I, Dep P, Bobzean S. A, Perrotti L. I, Mandal S. S. Bisphenol A induces expresión of HOXC6, an estrogen-regulated homeobox-containing gene associated with breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Gene Regulatory Mechanisms* 2015; 1849: 697-708.
- [25]Jordan J. Apoptosis: muerte celular programada. *OFFARM*, 2003; 22 (6): 100 – 106.
- [26]Lehmler H-J, Liu B, Gadogbe M, Bao W. Exposure to bisphenol a, bisphenol f, and bisphenol s in U.S. Adults and children: the national health and nutrition examination survey 2013 – 2014. *American Chemical Society* 2018; 3: 6523 – 6532.
- [27]Lewis R. W, Brooks N, Milburn G. M, et al. The effects of the phytoestrogen genistein on the postnatal development of the rat. *Toxicol Sci* 2003; 71: 74-83.
- [28]Liao C. Y, Kannan K. Concentrations and profiles of bisphenol a and other bisphenol analogues in foodstuffs from the united states and their implications for human exposure. *J. Agric. Food Chem*, 2013; 61: 4655-4662.
- [29]Liao C, Liu F, Alomirah H, Loi V. D, Mohd M. A, Moon H-B, Nakata H, Kannan K. Bisphenol s in urine from the united states and seven asian countries: ocurrence and human exposures. *Environmental Science and Technology* 2012; 46: 6860-6866.
- [30]Locia J, Hernandez M, Aranda G, et al. The role of estrogens and their receptors in prevention and promotion of proliferative diseases in the prostatic gland. *Eneurobiología* 2013; 4(8).
- [31]Mammadov E, Uncu M, Dalkan C. High prenatal exposure to bisphenol a reduces anogenital distance in healthy male newborns. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*, 2018; 10(1): 25 – 29.
- [32]Mendoza R. C. R, García G. M, Baranda A. N, Morimoto S, Perrot A. M, Cerbón M. Administration of bisphenol a to dams during perinatal period modifies molecular and morphological reproductive parameters of the offspring. *Reproductive Toxicology*, 2011; 21: 177 – 183.
- [33]Mollo T. J. C. Montaña C. L. A. Endocrine disruptos in plastic (bisphenol a and phthalates). *Revista SCientífica* 2013; 11 (1).
- [34]Nava C. K, Mendoza R. C. A, Romano R. P, Cerbón M. Impacto endócrino de sustancias químicas de uso común. *Educación Química*, 2008; 19 (1): 27 - 33.
- [35] Niu Y, Wang B, Zhao Y, Zhang J, Shao B. Highly sensitive and high throughput method for the analysis of bisphenol analogues and their halogenated derivatives in breast milk. *J Agric Fooof Chem*, 2017. 65: 10452 – 10463.

- [36]Oh J, Weon C. J, Ahn Y. A, Kim S. Pharmacokinetics of bisphenol s in humans after single oral administration. *Environment International*, 2018; 112: 127 – 133.
- [37]Petersen S. L, Krishnan S, Hudgens E. D. The aryl hydrocarbon receptor pathway and sexual differentiation of neuroendocrine functions. *Endocrinology* 2006; 147: S33-S42.
- [38]Ptak A, Rak-Mardyla A, Gregoraszczyk E. L. Cooperation of bisphenol a and leptin in inhibition of caspase-3 expression and activity in OVCAR-3 ovarian cancer cells. *Toxicology in Vitro* 2013; 27: 1937-1943.
- [39]Rajakumar C, Guan H, Langlois D, Cernea M, Yang K. Bisphenol a disrupts gene expression in human placental trophoblast cells. *Reproductive Toxicology* 2015; 53: 39-44.
- [40]Rubin B. S, Murray M. K, Damassa D. A, King J. C, Soto A. M. Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environment Health Perspectives*, 2001; 109 (7): 675-680
- [41]Rubin B. S, Soto A. M. Bisphenol a: perinatal exposure and body weight. *Mol Cell Endocrinol*, 2009; 304: 1 – 17.
- [42]Russo G, Barbato F, Cardone E, Fattore M, Albrizio S, Grumetto L. Bisphenol a and bisphenol s release in milk under household conditions from baby bottles marketed in Italy. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 2017. DOI: 10.1080/03601234.2017.1388662
- [43]Sabu T, Visakh P. M. Handbook of engineering and specialty thermoplastics polyethers and polyesters. Volume 3. Scrivener. 2012.
- [44]Sales L. B, Kamstra J. H, Cnijn P. H, Van Rijt L. S, Hamers T, Legler J. Effects of endocrine disrupting chemicals on in vitro global DNA methylation and adipocyte differentiation. *Toxicology in vitro* 2013; 27: 1634-1643.
- [45]SCF. 2000. Opinion the scientific committee on food on the 10th additional list of monomers and additives for food contact materials. [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/sci-com_scf_out62_en.pdf]
- [46]Schönfelder G, Friedrich K, Paul M, Chahoud I. Developmental effects of prenatal exposure to bisphenol a on the uterus of rat offspring. *Neoplasia*, 2004; 6 (5): 584 – 594.
- [47]Shakkebaek N. E, Rajpert-de Meyts E, Main K. M. Testicular dysgenesis síndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* 2001; 16: 972 – 978.

- [48]Silva B. S, Pietrobon C. B, Bertasso I. M, Lopes B. P, Carvalho J. C, Silva N. Pm Santos T. R, Neto S. C, Manhaes A. C, Oliveira E, Moura E. G, Lisboa P. C. Short and long- term effects of bisphenol s (BPS) exposure during pregnancy and lactation on plasma lipis, hormones, and behavior in rats. *Environmental Pollution*, 2019; 250: 312 – 322.
- [49]Simoneau C. Valzacchi S. Morkunas V. Den Eede V. Comparison of migration from polyethersulphone and polycarbonate baby bottles. *Food Additives and Contaminants* 2011; 28 (12): 1763-1768.
- [50]Skakkeback N. E, Rajpert-De Meyts E, Main K. M. Testicular dysgenesis syndrome : an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* 2001; 15: 972 – 978.
- [51]Song Y, Xie P, Cai Z. (2017). Metabolism of bisphenol s in mice after oral administration. DOI: 10.1002/rcm.8051
- [52]Sweeney T. Is exposure to endocrine disrupting compounds during fetal/post-natal development affecting the reproductive potential of farm animals? *Domestic Animal Endocrinology* 2002; 23: 203-209.
- [53]Ullah H, Jahan S, Ain Q. U, Shaheen G, Ahsan N. Effect of bisphenol s exposure on male reproductive system of rats: a histological and biochemical study. *Chemosphere*, 2016; 152: 383 – 391.
- [54]US EPA; Estimation Program Interface (EPI) Suite. Ver. 4.10. Jan, 2011. Available from, as of Oct 19, 2012
- [55]Van Esterik J. C. J, Vitins A .P, Hodemaekers H. M, Kamstra J. H, Legler J, Pennings J. L. A, Steegenga W. T, Lute C, Jelinek J, Issa J. P.J, Dollé M. E. T, Van der Ven L. T. M. Liver DNA methylation analysis in adult female C57BL/6JxFVB mice following perinatal exposure to bisphenol A. *Toxicology Letters* 2015; 232: 293-300.
- [56]Vandenberg L. N, Maffini M. V, Schaeberle C. M, Ucci A. A, Sonnenschein C, Rubin B. S, Soto A. M. Perinatal exposure to the xenoestrogen bisphenol a induces mammary intraductal hyperplasias in adult CD-1 mice. *Reprod Toxicol*, 2008.
- [57]Veurink M, Koster M, Berg J. The history of DES, lessons to be learned. *Pharm World Sci* 2005; 27: 139-143.
- [58]Warner M, Eskenazi B, Mocarelli P, et al. Serum dioxin concentrations and breast cancer risk in the Seveso women’s health study. *Environ Health Perspect* 2002; 110: 625 – 628.

[59]Warner M, Samuels S, Mocarelli P, et al. Serum dioxin concentrations and age at menarche. *Environ Health Perspect* 2004; 112: 1289 – 1298.[60]Wu L. H, Zhang X. M, Wang F, Gao C. J, Chen D, Palumbo J. R, Guo Y, Zeng E. Y. Occurrence of bisphenol s in the environment and implications for human exposure: a short review. *Science of the Total Environment*, 2018; 615: 87-98.

[61]Xu J, Huang G, Guo T. L. (2019). Bisphenol s modulates type 1 diabetes development in non-obese diabetic (NOD) mice with diet and sex-related effects. *Toxics*. DOI: 10.3390/toxics7020035

[62]Yamasaki K, Noda S, Imatanaka N, Yakabe Y. Comparative study of the uterotropic potency of 14 chemicals in a uterotrophic assay and their receptor-binding affinity. *Toxicology Letters*, 2004; 146: 111 – 120.

[63]Ye X, Wong L-Y, Kramer J, Zhou X, Jia T, Calafat A. M. Urinary concentrations of bisphenol a and three other bisphenols in convenience samples of U.S adults during 2000-2014. *Environmental Science and Technology*, 2015, DOI:10.1021/acs.est.5b02135.

[64]Zhang R, Liu R, Zong W. Bisphenol s interacts with catalase and induces oxidative stress in mouse liver and renal cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016; 64 (34): 6630 – 6640.