



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

---

---

Efecto de la exposición al Bisfenol S y vitamina E o ácido fólico sobre la morfología testicular y la expresión de proteínas de la barrera hematotesticular en ratas macho.

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

**PRESENTA**

CAROLINA ZÁRATE GARCÍA



México, Ciudad de México. 2023



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**      **Profesor:** REBECCA ELIZABETH FRANCO Y BOURLAND

**VOCAL**            **Profesor:** RAQUEL ORTEGA MUÑOZ

**SECRETARIO**    **Profesor:** MARÍA ELENA IBARRA RUBIO

**1er. SUPLENTE**   **Profesor:** SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO

**2° SUPLENTE**    **Profesor:** MARTHA LETICIA JIMÉNEZ PARDO

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

UNAM, Facultad de Química, Edificio F, Laboratorio 213 y 120.

## **ASESOR DEL TEMA:**

---

Dra. María Elena Ibarra Rubio

## **SUSTENTANTE (S):**

---

Carolina Zárate García



# AGRADECIMIENTOS.

*Esta tesis fue apoyada por el proyecto 319631 de CONACYT Fronteras de la Ciencia: Convocatoria de Paradigmas y Controversias de la Ciencia 2022, y por el Subprograma 127 de la Facultad de Química: Formación básica en investigación, a quienes agradezco por brindarme el apoyo económico necesario para impulsar mi titulación y por ayudar a iniciar mi formación en el campo de la investigación.*

## Índice

1.	Resumen.....	12
2.	Antecedentes.....	15
2.1.	Generalidades de la morfología testicular .....	15
2.1.1.	<i>Morfología testicular y su regulación hormonal.....</i>	<i>15</i>
2.1.2.	<i>Espermatogénesis .....</i>	<i>16</i>
2.1.3.	<i>Ciclo del epitelio seminífero .....</i>	<i>17</i>
2.2.	Barrera Hematotesticular .....	19
2.2.1	<i>Definición de la barrera hematotesticular.....</i>	<i>19</i>
2.2.2	<i>Conformación de la barrera hematotesticular.....</i>	<i>20</i>
2.2.3	<i>Proteínas estructurales de la barrera hematotesticular .....</i>	<i>21</i>
2.2.3.1	<i>Proteínas de uniones estrechas.....</i>	<i>21</i>
2.2.3.2	<i>Proteínas de las especializaciones ectoplásmicas .....</i>	<i>23</i>
2.2.3.3	<i>Proteínas de uniones comunicantes o “gap”.....</i>	<i>24</i>
2.2.4	<i>Función de la barrera hematotesticular .....</i>	<i>25</i>
2.3	Disruptores endócrinos.....	26
2.4	Bisfenoles como disruptores endócrinos .....	26
2.4.1	<i>Bisfenol A.....</i>	<i>27</i>
2.4.2	<i>Bisfenol S.....</i>	<i>28</i>
2.4.3	<i>Efectos de los bisfenoles A y S sobre la salud reproductiva masculina .....</i>	<i>30</i>
2.4.4	<i>Regulación del consumo de los bisfenoles .....</i>	<i>34</i>
2.5	Efecto de antioxidantes como atenuantes de la toxicidad reproductiva .....	36
2.5.1	<i>Vitamina E.....</i>	<i>37</i>
2.5.2	<i>Ácido Fólico.....</i>	<i>38</i>
3.	Planteamiento del problema .....	39
4.	Hipótesis.....	39
5.	Preguntas de investigación .....	39
6.	Objetivo general .....	40
6.1.	Objetivos particulares.....	40
7.	Materiales y métodos.....	41
7.1	Animales .....	41
7.2	Diseño del estudio .....	41
7.3	Histología del tejido .....	43

7.3.1	<i>Inclusión en resina epóxica (EPON 812)</i> .....	43
7.3.2	<i>Inclusión en parafina</i> .....	44
7.4	Morfometría de los túbulos seminíferos .....	44
7.4.1	<i>Determinación del índice de maduración en el epitelio de los túbulos seminíferos</i> .....	46
7.4.2	<i>Determinación del área del epitelio seminífero</i> .....	46
7.4.3	<i>Determinación del índice histopatológico en el epitelio de los túbulos seminíferos</i> .....	46
7.5	Cuantificación de las proteínas de la BHT mediante la técnica de Western Blot .....	49
7.5.1	<i>Extracción de proteína</i> .....	49
7.5.2	<i>Cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford</i> .....	49
7.5.3	<i>Electroforesis SDS-PAGE</i> .....	50
7.6	Análisis estadístico de los datos. ....	55
8.	Resultados .....	56
8.1	Morfometría de los túbulos seminíferos .....	56
8.2	Expresión de las proteínas de la BHT y del receptor de andrógenos .....	66
9.	Discusión .....	71
9.1	Morfometría de los túbulos seminíferos .....	71
9.2	Expresión de proteínas de la BHT y del RA. ....	76
9.2.1	<i>ZO-1</i> .....	76
9.2.2	<i>Claudinas</i> .....	77
9.2.3	<i>Ocludina</i> .....	78
9.2.4	<i>Conexina 43</i> .....	79
9.2.5	<i>N-cadherina</i> .....	80
9.2.6	<i>ZO-2</i> .....	81
9.2.7	<i>Receptor de andrógenos</i> .....	82
10.	Conclusión. ....	84
11.	Perspectivas.....	84
12.	Referencias .....	85
	Anexo I. Reactivos preparados para la histología del tejido. ....	92
	Anexo II. Esquemas del proceso de Western Blot realizado para cuantificar las proteínas de la BHT. ...	93
	Anexo III. Reactivos preparados para el análisis de Western Blot. ....	94
	Anexo IV. Figuras complementarias .....	96



## Índice de figuras.

<i>Figura 1.</i> Esquema de la regulación hormonal de la espermatogénesis .....	15
<i>Figura 2.</i> Esquema del proceso de espermatogénesis. ....	16
<i>Figura 3.</i> Dibujo de la composición celular de las etapas del ciclo del epitelio seminífero de la rata. ....	18
<i>Figura 4.</i> Dibujo de la barrera hematotesticular en el epitelio seminífero. ....	19
<i>Figura 5.</i> Estructura general de los bisfenoles. ....	27
<i>Figura 6.</i> Comparación de las estructuras químicas del bisfenol A (BPA) y el bisfenol S (BPS) .....	28
<i>Figura 7.</i> Monitoreo del peso de los animales de estudio y peso de sus testículos. ....	43
<i>Figura 8.</i> Clasificación de los túbulos seminíferos de acuerdo con los tres intervalos establecidos de las etapas del CES.....	45
<i>Figura 9.</i> Parámetros para la determinación del Índice histopatológico .....	48
<i>Figura 10.</i> Imágenes representativas del AES e IHP de los túbulos seminíferos en el rango de etapas I a VII del CES de los grupos tratados con ambas dosis de BPS y ambos antioxidantes .....	58
<i>Figura 11.</i> Imágenes representativas del AES e IHP de los túbulos seminíferos en el rango de etapas VIII a IX temprana del CES de los grupos tratados con ambas dosis de BPS y ambos antioxidantes.....	59
<i>Figura 12.</i> Imágenes representativas del AES e IHP de los túbulos seminíferos en el rango de etapas IX tardía a XIV del CES de los grupos tratados con ambas dosis de BPS y ambos antioxidantes.....	60
<i>Figura 13.</i> Imágenes representativas de la heterogenicidad de los resultados presentados y errores en la fijación del tejido .....	61
<i>Figura 14.</i> Cuantificación del AES, en los diferentes rangos de etapas del CES establecidos para la evaluación morfológica de los túbulos seminíferos.....	63
<i>Figura 15.</i> Cuantificación del IHP en los diferentes rangos de etapas del CES establecidos para la evaluación morfológica de los túbulos seminíferos.....	65
<i>Figura 16.</i> Expresión de las proteínas de la BHT y del RA en el testículo de los animales tratados con ambas dosis de BPS y el antioxidante AF.....	69
<i>Figura 17.</i> Expresión de las proteínas de la BHT y del RA en el testículo de los animales tratados con ambas dosis de BPS y el antioxidante VE .....	70
<i>Figura 18.</i> Parámetros de calidad espermática de los animales de estudio después del tratamiento con BPS y ácido fólico o vitamina E durante 19 semanas .....	72
<i>Figura AII.1.</i> Esquema del proceso de electroforesis utilizando el equipo Mini-PROTEAN® Tetra Cell de BioRad.....	93
<i>Figura AII.2.</i> Esquema del proceso de electrotransferencia utilizando el equipo Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell de BioRad.....	93
<i>Figura AIV.1.</i> Dibujo de la conformación de la BHT en rata .....	96
<i>Figura AIV.2.</i> Dibujo de las proteínas estructurales de la barrera hematotesticular.....	97
<i>Figura AIV.3.</i> Dibujo del efecto del BPA sobre la dinámica de la BHT en ratas adultas.....	98

## **Abreviaturas**

AES: Área del epitelio seminífero

AF: Ácido fólico (folato o vitamina B9)

ANOVA: Análisis de varianza (siglas en inglés)

ATP: Adenosin trifosfato

ATS: Área del túbulo seminífero

BHT: Barrera hematotesticular

BPA: Bisfenol A

BPS: Bisfenol S

BPSH: Dosis alta de bisfenol S (100 mg/kg/día)

BPSL: Dosis baja de bisfenol S (0.05 mg/kg/día)

BSA: Albúmina de suero bovino (siglas en inglés)

c/u: cada uno

CAGR: Tasa de crecimiento anual compuesta (siglas en inglés)

CAT: Catalasa

CES: Ciclo del epitelio seminífero

CG: Células germinales

CL: Células de Leydig

Cl-11: Claudina-11

Cl-3: Claudina-3

CS: Células de Sertoli

Cx-43: Conexina 43

DDSA: Anhídrido ácido dodecenilsuccínico

DMP30: 2,4,6-Tris-(dimetilaminometil)fenol

ECHA: Agencia europea de sustancias y mezclas químicas (siglas en inglés)

EE: Especializaciones ectoplásmicas

EEM: Error estándar de la media

EFSA: Autoridad europea de seguridad alimentaria (siglas en inglés)

EPON 812: Resina epóxica alifática basada en di o triglicidiléteres de glicerol (siglas en inglés)

EROS: Especies reactivas de oxígeno

EtOH: Etanol

FDA: Administración de alimentos y medicamentos de Estados Unidos (siglas en inglés)

FMVZ: Facultad de medicina veterinaria y zootecnia (de la UNAM)

FSH: Hormona folículo estimulante

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas

GSH: Glutati6n

H&E: Hematoxilina-Eosina

h: hora

H<sub>2</sub>O: Agua

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Per6xido de hidr6geno

H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>: Agua destilada

H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>: Agua desionizada (Milli-Q)

HCl: 6cido clorh6drico

HRP: Peroxidasa de r6bano picante

IDT: Ingesta diaria tolerable

IHP: 6ndice histopatol6gico

IM: 6ndice de maduraci6n

KCl: Cloruro de potasio

kDa: kilo Dalton

kg pc/d: kilogramo de peso corporal por d6a

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Fosfato monob6sico de potasio

LH: Hormona luteinizante

LOAEL: Nivel m6s bajo de efectos adversos observados (siglas en ingl6s)

MAGUK: Guanilato ciclasa asociadas a la membrana (siglas en ingl6s)

min: minuto(s)

mTOR: Blanco mecan6stico de rapamicina

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: Fosfato de sodio dib6sico

NaCl: Cloruro de sodio

N-cad: N-cadherina.

NIH: Institutos Nacionales de Salud (siglas en ingl6s)

NMA: N-metilanilina

NOAEL: Nivel de efectos adversos no observados (siglas en ingl6s)

NP40: Nonidet P-40

O<sub>2</sub>: Oxígeno

Ocl: Ocludina

OMS: Organización Mundial de la Salud

OsO<sub>4</sub>: Tetróxido de Osmio

PBS: Amortiguador salino de sulfatos (siglas en inglés)

PFA: Paraformaldehído

PND: Día postnatal (siglas en inglés)

PSA: Persulfato de amonio

PVDF: Polifluoruro de vinilideno

RA: Receptor de andrógenos

RET: Resistencia eléctrica transepitelial

RfD: Dosis oral de referencia (siglas en inglés)

RIPA: Radio inmunoprecipitación (siglas en inglés)

SCP: Selectividad de carga paracelular

SDS: Dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (siglas en inglés).

SOD: Superóxido dismutasa

T.A: Temperatura ambiente

T: Testosterona

TBS: Amortiguador salino de tris o tris salino

TBS-T: Amortiguador tris salino con Tween 20

TEMED: Tetrametilendiamina

TGF-β2: Factor de crecimiento transformante beta 2

TUNEL: Marcado de final de corte de dUTP de terminal deoxinucleotidil transferasa (siglas en inglés)

UE: Uniones estrechas

UG: Uniones comunicantes o “gap”

UNEP: Programa de las naciones unidas para el medio ambiente (siglas en inglés)

USEPA: Agencia de protección ambiental de Estados Unidos (siglas en inglés)

VE: Vitamina E

ZO-1: Zonula occludens 1

ZO-2: Zonula occludens 2

ZO-3: Zonula occludens 3

## 1. Resumen

En el testículo, la regulación de la espermatogénesis es un proceso complejo y multifactorial, no obstante, uno de los factores que se ha observado tiene especial relevancia en este proceso es la dinámica de la barrera hematotesticular (BHT), la cual se forma por las células de Sertoli (CS), y tiene como función principal proteger a las células germinales (CG) de sustancias presentes en los sistemas circulatorio y linfático. Esta dinámica, es controlada por el receptor de andrógenos (RA) a través de la mediación en la distribución, internalización, degradación y reciclaje de las proteínas de unión que participan en la estructura y función de la BHT.

Entre las proteínas de unión de la BHT, se encuentran las de uniones estrechas, como la ocludina y las claudinas, que previenen el paso de agua y otras moléculas entre el espacio paracelular y brindan polaridad a las CS; las de especializaciones ectoplásmicas, que median la adhesión de las CS y CG a través del complejo multifuncional de cadherina-catenina; los desmosomas, los cuales brindan una adhesión robusta entre las CG y las CS; las uniones comunicantes o “gap”, que permiten la difusión de metabolitos, segundos mensajeros, iones y moléculas pequeñas entre las CS; así como proteínas de andamiaje, adyacentes a las uniones estrechas, que se encargan de ligar las proteínas estructurales (como la ocludina y claudinas) al citoesqueleto de actina para que puedan ejercer su función. Un ejemplo de las proteínas de andamiaje son las zonula occludens (ZO).

A pesar de ejercer un papel protector sobre las CG, las proteínas de la BHT son muy susceptibles al daño causado por distintos tóxicos ambientales como son los disruptores endócrinos. Un disruptor endócrino es toda aquella sustancia que altera el equilibrio hormonal y el desarrollo embrionario, provocando efectos adversos sobre la salud de un ser vivo o de su descendencia y, por lo general, este tipo de compuestos tienen un comportamiento particular en sus curvas dosis-respuesta, pues a mayores dosis no siempre se obtiene un mayor efecto, e incluso a veces se observa que tienen mayores efectos nocivos con dosis menores.

La exposición a los disruptores endócrinos se ha extendido por todo el mundo y se puede producir por la ingestión de alimentos o agua, por inhalación de partículas presentes en el aire o por el contacto con la piel. Entre las sustancias que se han propuesto como potenciales disruptores endócrinos se encuentran los bisfenoles, los cuales son compuestos sintéticos que se utilizan como materiales intermediarios en la producción de plásticos de policarbonato y resinas epoxi, que constituyen la materia prima de productos de uso diario como envases plásticos, recubrimientos de latas, papeles térmicos, y tuberías para el transporte de agua, entre muchos otros.

El bisfenol A (BPA) es un disruptor endócrino que afecta particularmente la reproducción tanto en animales de laboratorio como en humanos. Por ejemplo, se ha observado que este compuesto disminuye la producción y calidad de los espermatozoides, causando problemas de erección y eyaculación; retrasa el desarrollo y diferenciación de las CG, pues altera la localización y expresión de las proteínas de la BHT; y disminuye las concentraciones séricas de hormonas importantes en la reproducción, entre muchos otros efectos. Así mismo, se ha observado que el BPA induce estrés oxidante en el testículo, lo cual podría afectar la espermatogénesis. De hecho, se ha reportado que el uso de antioxidantes, como el ácido fólico y la vitamina E, atenúan los efectos nocivos del BPA.

Para evitar los efectos negativos del BPA y cumplir con las restricciones, regulaciones y recomendaciones a nivel mundial sobre su uso, los fabricantes de plástico y sus derivados, lo han reemplazado gradualmente con compuestos de naturaleza y estructura química similar, como lo es el bisfenol S (BPS). Actualmente no existen restricciones para el uso del BPS en la fabricación de materiales plásticos, e incluso es considerado como seguro en la producción de artículos de uso frecuente que están en contacto con alimentos. Sin embargo, actualmente hay algunos reportes en donde se documenta que el BPS puede producir efectos nocivos en la reproducción.

Por lo anterior, en el presente proyecto se hipotetiza que la exposición de ratas macho a una dosis alta y una dosis baja de BPS provocará alteraciones diferentes en la histoarquitectura de los túbulos seminíferos, en la expresión de proteínas de la BHT y del receptor de andrógenos, y se espera que la administración de vitamina E y ácido fólico atenúe los efectos nocivos producidos por el BPS. Para probar esto, se evaluaron los cambios en la morfología del epitelio seminífero y en los niveles de las proteínas de la BHT y del receptor de andrógenos, en ratas macho Wistar, producidos tras la exposición a 100 o 0.05 mg/kg de peso corporal/día de BPS durante 4 meses, a partir del día 21 al 151 post parto. Así mismo, se evaluó el posible efecto protector del ácido fólico y la vitamina E en dosis de 20 y 100 mg/kg pc/d, respectivamente, con cada una de las dosis de BPS.

Los resultados mostraron que la exposición de ratas macho a una dosis alta (100 mg/kg pc/d) y una dosis baja (0.05 mg/kg pc/d) de BPS, durante 19 semanas provocó alteraciones en la histoarquitectura de los túbulos seminíferos, pues la exposición a la dosis alta de BPS disminuyó el área del epitelio seminífero, y la exposición a ambas dosis de BPS (alta y baja) aumentó el índice histopatológico, con respecto al grupo control. Sin embargo, ningún tratamiento con BPS provocó alteraciones sobre el índice de maduración.

Además, la exposición a ambas dosis de BPS disminuyó la expresión de la proteína ZO-1 en la barrera hematotesticular (BHT), pero no se observaron cambios significativos en la presencia de las demás

proteínas de la BHT analizadas (claudina 11, claudina 3, conexina 43, ocludina, N-cadherina y ZO-2) ni en la del receptor de andrógenos.

Por otro lado, la administración de ácido fólico y vitamina E ejerció un efecto benéfico sobre el aumento del índice histopatológico provocado por ambas dosis de BPS y parecen ejercer un efecto protector sobre la disminución de la expresión de la proteína ZO-1 inducida por la dosis alta de BPS pues, a pesar de que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas, la coadministración de cualquiera de los dos antioxidantes tendió a reducir la magnitud de esta disminución.

En conclusión, se detectaron alteraciones en la histoarquitectura de los túbulos seminíferos y en la expresión de la proteína ZO-1, y estas alteraciones fueron similares con las dosis altas y con la bajas del bisfenol. Por lo tanto, se demostró que el BPS puede inducir daño en el aparato reproductor masculino, y que el uso de antioxidantes como la vitamina E y el ácido fólico son una alternativa prometedora para atenuar al menos algunos de los efectos nocivos del BPS.

Por último, es importante resaltar que se requiere profundizar en el estudio de la toxicidad de este bisfenol, analizando, por ejemplo, otras dosis y buscando sus efectos sobre otros parámetros para poder establecer su peligrosidad y mejorar la regulación de su uso a nivel mundial.

## 2. Antecedentes

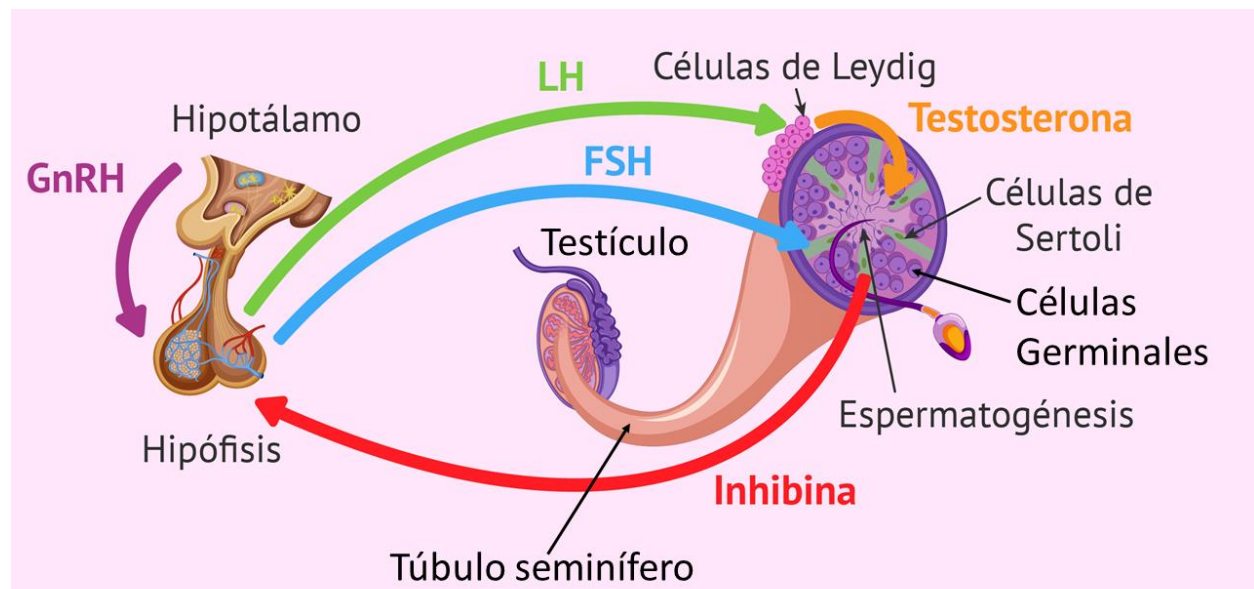
### 2.1. Generalidades de la morfología testicular

#### 2.1.1. Morfología testicular y su regulación hormonal

Los testículos constan de dos partes, las cuales son: (I) los túbulos seminíferos, que constituyen casi el 90% del peso del testículo de un adulto y es donde ocurre la espermatogénesis; y (II) el tejido intersticial, que contiene las células de Leydig secretoras de testosterona (T).

Las principales hormonas masculinas implicadas en la función reproductiva son aquellas involucradas en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, el cual consiste en la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) por el hipotálamo hacia la hipófisis, seguida por la consiguiente liberación de las hormonas luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH). El receptor para la FSH está situado en las células de Sertoli (CS) de los túbulos seminíferos, mientras que el receptor de la LH se sitúa en las células de Leydig intersticiales (Figura 1). Así mismo, la LH estimula la secreción de T por las células de Leydig y la FSH estimula la espermatogénesis en los túbulos seminíferos (Fox, 2011).

En los túbulos seminíferos, el epitelio contiene dos tipos celulares: las células de Sertoli (CS) y las células germinales (CG). Las primeras son las únicas células somáticas en este epitelio, se extienden desde la base del túbulo seminífero hasta el lumen, establecen las uniones celulares (entre CS-CS y CS-CG) y forman la barrera hematotesticular (BHT) en este epitelio, mientras que las segundas son las que participan en la espermatogénesis (Mruk & Cheng, 2015; Ni et al., 2019).



**Figura 1.** Esquema de la regulación hormonal de la espermatogénesis. Adaptado de Aparicio, M. & Reus, R. (2017).



### 2.1.2. Espermatogénesis

La espermatogénesis es el proceso fisiológico necesario para producir espermatozoides en el epitelio de los túbulos seminíferos (Ni et al., 2019). Las espermatogonias se sitúan en la región más externa de los túbulos seminíferos, sobre la membrana o lámina basal (Figura 2), y son células diploides que se duplican mediante división mitótica para dar origen a un espermatocito primario y otra espermatogonia, la cual seguirá dividiéndose para que pueda ocurrir la espermatogénesis de manera continua sin que se agote su número. El espermatocito primario generado se divide por meiosis; cuando un espermatocito primario diploide completa la primera división meiótica (o telofase I), las dos células que se producen se denominan espermatocitos secundarios. Al terminar la segunda división meiótica, cada uno de los espermatocitos secundarios produce dos espermátides haploides, como se muestra en el lado derecho de la Figura 2. Al final, las cuatro espermátides (producidas por la meiosis de ambos espermatocitos secundarios) se encuentran conectadas y pasan por un proceso de diferenciación, llamado espermiogénesis, para convertirse en espermatozoides maduros separados que son liberados hacia la luz o lumen del túbulo.

La espermiogénesis en la rata consta de 19 etapas denominadas con números arábigos (Figura 3). Tanto la espermatogénesis, como la espermiogénesis requieren de la participación de las CS y la BHT. La sucesión de fenómenos que ocurren durante toda la espermatogénesis se refleja en la disposición celular de la pared del túbulo seminífero, teniendo a las espermatogonias y a los espermatocitos primarios situados hacia el lado externo del túbulo, y a las espermátides y espermatozoides maduros situados hacia el lumen del túbulo seminífero, como se muestra en el lado izquierdo de la Figura 2 (Fox, 2011).

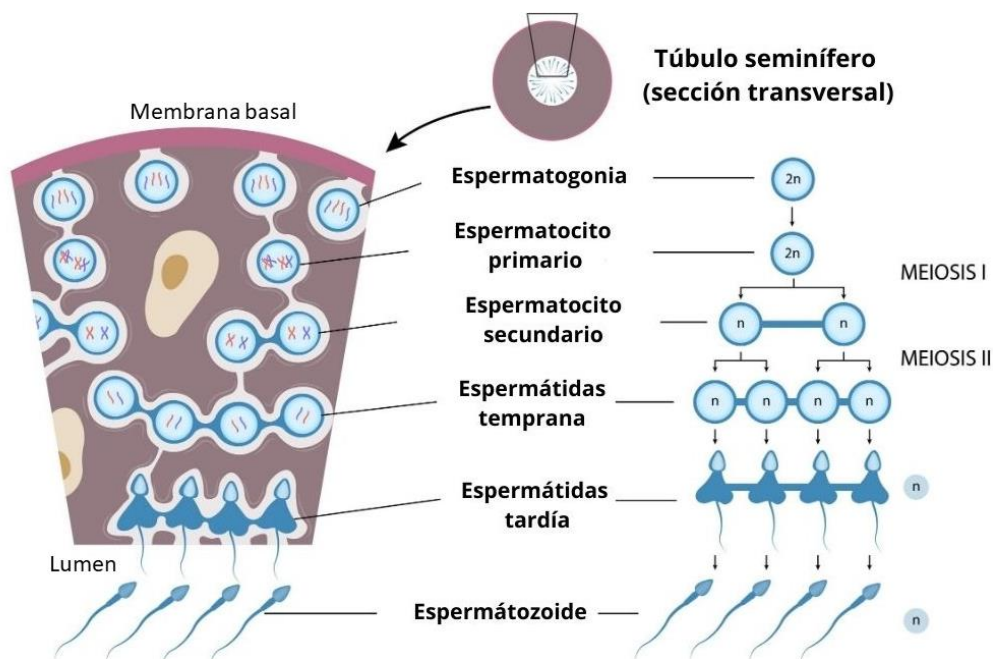
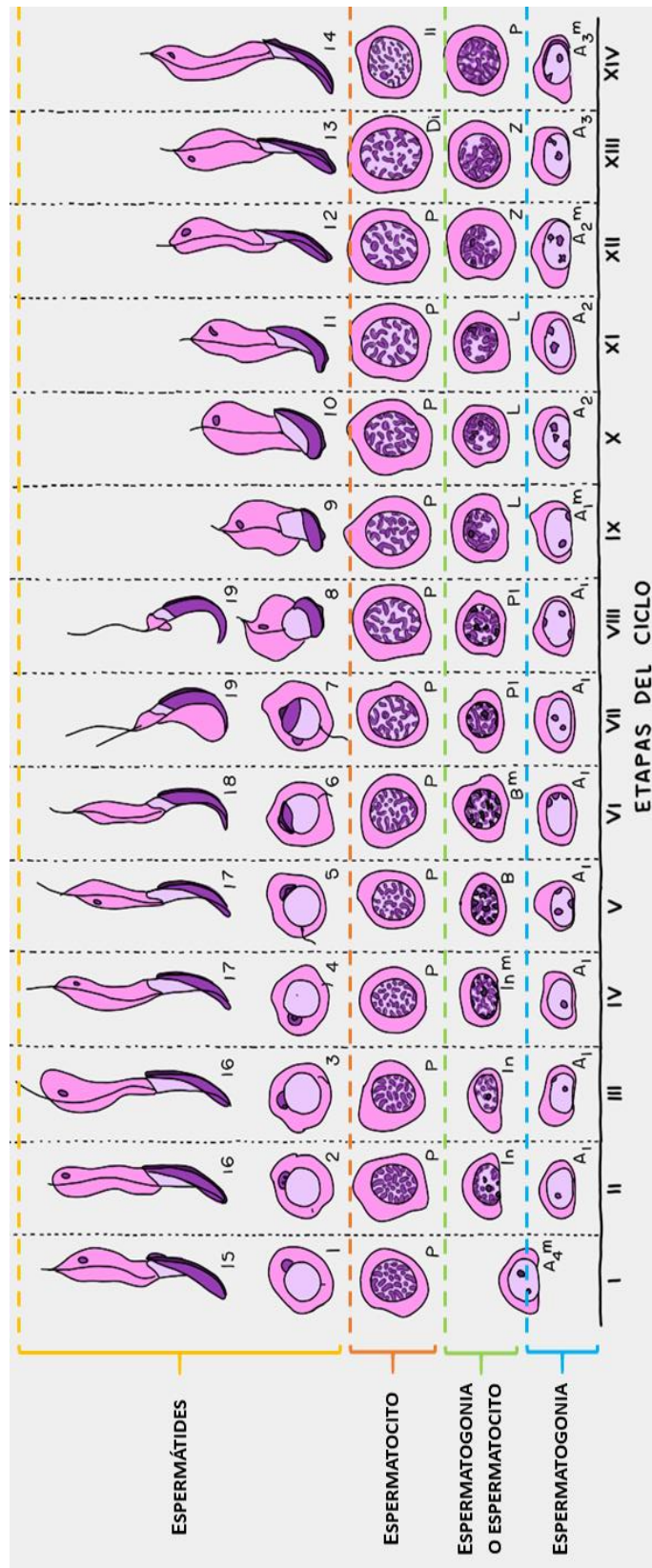


Figura 2. Esquema del proceso de espermatogénesis. Adaptado de Olando, O. (2019).

### **2.1.3. Ciclo del epitelio seminífero**

En una misma área del túbulo seminífero, el desarrollo de cualquier generación de CG (espermatogonias, espermatocitos o espermátides) está acompañada de otras generaciones de estas mismas CG, por lo tanto, las CG en el epitelio están organizadas en varias asociaciones celulares bien definidas. Estas asociaciones se suceden en el tiempo y en una secuencia que se repite indefinidamente. Esto ocurre tanto en la rata, como en el humano (Leblond & Clermont, 1952).

En la década de 1890, Von Ebnerl y Regaud llamaron “ciclo espermatogénico” a la serie completa de asociaciones celulares sucesivas. Sin embargo, este término se podía confundir con el de la espermatogénesis, por lo que Leblond & Clermont (1952) lo renombraron como “ciclo del epitelio seminífero” (CES) y lo definieron como “la serie de cambios que ocurren en un área determinada del epitelio seminífero, entre dos apariciones sucesivas de las mismas asociaciones celulares”. En la rata, el CES está subdividido en 14 etapas denominadas con números romanos y cada una de éstas abarca una asociación celular diferente, como se muestra a continuación en la Figura 3.



**Figura 3. Dibujo de la composición celular de las catorce etapas del ciclo del epitelio seminífero de la rata (I-XIV).** Cada columna identificada con un número romano de izquierda a derecha muestra los tipos celulares presentes en cada una de las asociaciones celulares encontradas en cortes transversales del túbulo seminífero. A<sub>(1-4)</sub> representa cuatro generaciones de espermatogonias de tipo A; In: espermatogonias intermedias; B: espermatogonia de tipo B; el subíndice "m" al lado de una espermatogonia indica la mitosis; las letras Pl, L, Z, P y Di representan espermátocitos en diferentes etapas de la meiosis; Pl: espermátocito en preleptoteno; L: espermátocito en leptoteno; Z: espermátocito en zigoteno; P: espermátocito en paquiteno; Di, diaquinesis de espermátocitos primarios; II, espermátocito secundario. Los números arábigos 1-19 representan cada uno de los pasos de la espermiogénesis de acuerdo con lo observado por Dym y Clermont en cuanto a los cambios observados en el núcleo y en la estructura acrosómica de las espermátides en secciones teñidas con la técnica PA-Schiff-hematoxilina.

*Nota. Dibujo realizado por Carolina Zárate García, adaptado de Fig. 2 Dibujo que ilustra la composición celular de las 14 fases del ciclo del epitelio seminífero de la rata (Dym & Clermont, 1970).*

## 2.2. Barrera Hematotesticular

### 2.2.1 Definición de la barrera hematotesticular

Las CS forman la barrera hematotesticular (BHT), la cual divide el epitelio seminífero en: el compartimiento basal, en donde se encuentran espermatogonias y espermatocitos en preleptoteno; y el compartimiento apical o adluminal, el cual contiene otros espermatocitos primarios y secundarios, espermatídes redondas y espermatídes elongadas, como se puede ver en la Figura 4 (Cheng & Mruk, 2012). Es importante mencionar que, durante las etapas VII-VIII del CES, los espermatocitos en las fases de leptoteno y preleptoteno de la meiosis se deben mover a través de la BHT y entrar al compartimiento adluminal (Figura 4) para poder continuar con su diferenciación y promover la liberación de espermatozoides hacia el lumen de los túbulos seminíferos en la etapa VIII del CES (Leblond & Clermont, 1952; Ni et al., 2019).

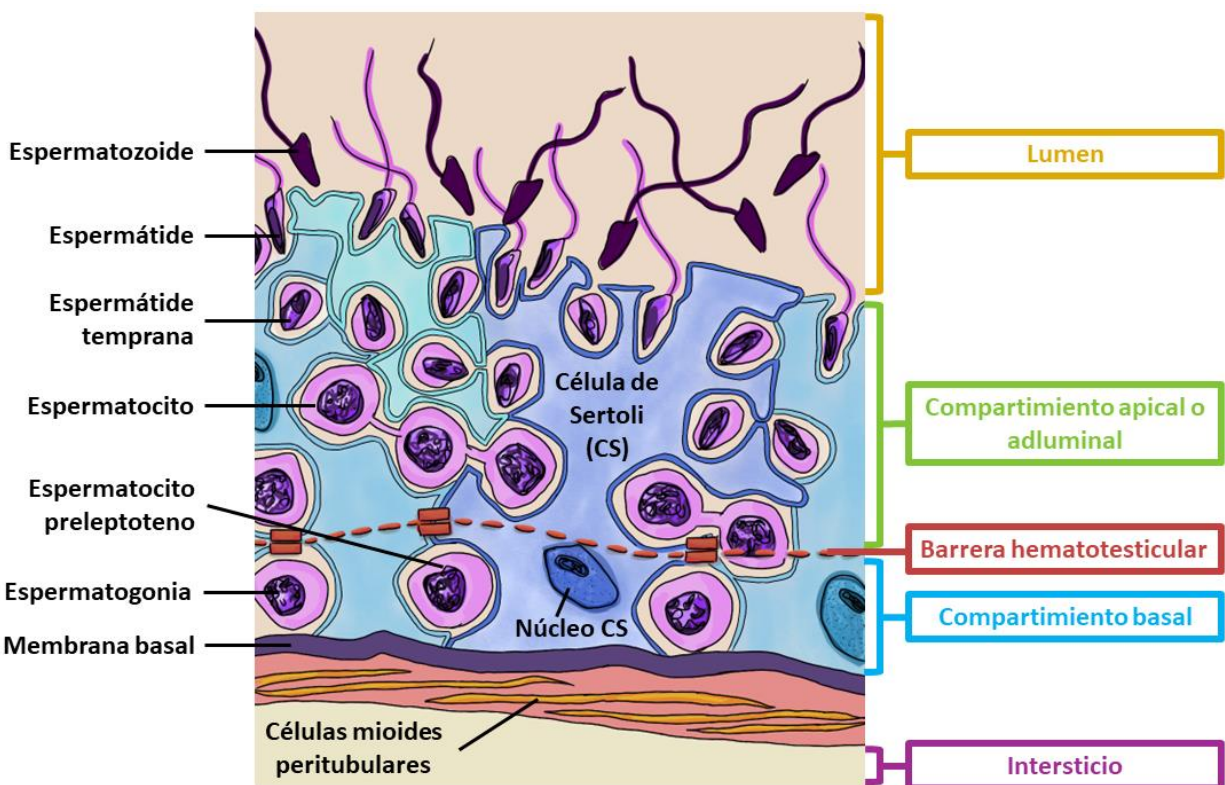


Figura 4. Dibujo de la barrera hematotesticular en el epitelio seminífero. Adaptado de Kaur et al. (2014).

## 2.2.2 Conformación de la barrera hematotesticular

En general, la barrera hematotesticular (BHT) en testículos mamíferos está compuesta por uniones especializadas entre células de Sertoli (CS) adyacentes en el epitelio seminífero, cerca de la membrana basal (Figura 4). En la rata, la BHT se empieza a formar en el día post natal (PND) 15-16, y se termina de formar en el PND 18-21 (Yan Cheng & Mruk, 2012).

La BHT cuenta con cuatro tipos de uniones intercelulares diferentes que participan en su estructura y función: (I) Uniones estrechas (UE), las cuales previenen el paso de agua y otras moléculas grandes entre el espacio paracelular (entre dos CS) y restringen el movimiento de proteínas y lípidos entre los dominios apical y basolateral de la membrana, generando la polaridad de las CS; (II) Especializaciones ectoplásmicas (EE), que median la adhesión a través del complejo multifuncional de las proteínas cadherina-catenina y pueden ser basales (EE entre CS-CS) o apicales (EE entre CS-CG); (III) desmosomas, los cuales son uniones célula-célula que brindan una adhesión más robusta entre las CS y las CG por medio de moléculas de adhesión integrales de membrana, como las cadherinas desmosomales (desmogleinas y desmocollinas) y unas proteínas llamadas armadillo (placoglobina y placofilinas), que unen las cadherinas desmosomales al citoesqueleto de los filamentos intermedios en las CS, y las plaquinas, que median el enlace entre los complejos de membrana y los filamentos intermedios subyacentes; (IV) Uniones comunicantes o “gap” (UG), presentes entre regiones de la membrana plasmática de las CS que contienen las UE y las EE basales, y forman canales célula-célula que permiten la difusión de metabolitos, segundos mensajeros, iones y moléculas pequeñas de menos de 1 kDa (Mruk & Cheng, 2015; Vogl et al., 2008). Véase *Figura AIV.1* en el Anexo IV de esta tesis.

Además, el área adyacente a las UE está enriquecida con varias proteínas de andamiaje, las cuales unen a las proteínas estructurales y las ligan al citoesqueleto de actina para que ejerzan su función. Las UE, EE y UG se unen a microfilamentos de actina, mientras que los desmosomas se unen a filamentos intermedios como la vimentina (Mruk & Cheng, 2015; Ni et al., 2019).

Cabe mencionar que, tanto las UE como las EE, son muy susceptibles a daño causado por tóxicos ambientales y a estrés por calor, los cuales causan cambios reversibles en los niveles de proteínas de UE y EE, afectando a su vez la permeabilidad de la BHT (Mruk & Cheng, 2015).

## **2.2.3 Proteínas estructurales de la barrera hematotesticular**

### **2.2.3.1 Proteínas de uniones estrechas**

Las uniones estrechas (UE) en la barrera hematotesticular (BHT) constituyen un micro dominio especializado de fibrillas que se reconstruyen continuamente y rodean a las células como un tipo de cinturón. Las fibrillas presentes en las CS o CG se unen directa o indirectamente a proteínas de señalización o de andamiaje, así como a proteínas del citoesqueleto. Este tipo de uniones están formadas por distintas proteínas transmembranales, entre las cuales se encuentran la familia de las claudinas, la familia de moléculas de adhesión de unión (JAM, por sus siglas en inglés) y la ocludina, entre otras (González-Mariscal et al., 2008; Mruk & Cheng, 2015).

Estas proteínas transmembranales se unen a la actina mediante proteínas citosólicas de andamiaje, como las proteínas zonula occludens (ZO) en las CS. Además, las UE contienen proteínas de regulación del tráfico vesicular, las cuales están involucradas en la señalización, polaridad celular y en la regulación de la expresión génica (González-Mariscal et al., 2008; Ni et al., 2019; Zavala-Zendejas & Rendón-Huerta, 2008).

A continuación, se describen un poco más en detalle algunas de las principales proteínas de UE, las cuales se eligieron como objeto de estudio en la presente tesis dada su abundancia en el testículo y/o su importancia para el funcionamiento de la BHT.

#### ***Zonula occludens (ZO).***

Las proteínas ZO son los andamios que establecen múltiples interacciones entre proteínas y unen diversas cinasas, fosfatasas, pequeñas proteínas G y factores de transcripción nucleares en las UE (González-Mariscal et al., 2008). ZO-1, ZO-2 y ZO-3 son miembros de la familia de proteínas MAGUK (guanilato ciclasa asociadas a la membrana, por sus siglas en inglés), que se asocian periféricamente a la membrana de las CS en su cara citosólica, y cuyos números reflejan el orden en el cual fueron identificadas inicialmente. Estas proteínas interactúan juntas y anclan proteínas de UE al citoesqueleto de actina. Además, las proteínas ZO 1 a 3 contienen varias señales de importación y exportación nuclear, aunque solo ZO-1 y ZO-2 se concentran en el núcleo cuando se exponen a condiciones adversas, como el estrés químico o heridas mecánicas, y también se asocian con proteínas implicadas en la regulación de la transcripción de genes y la proliferación celular (González-Mariscal et al., 2008).

### ***Claudinas.***

Las claudinas constituyen una familia de más de 20 proteínas con cuatro dominios transmembranales, cuyo peso varía de 17 a 27 kDa, y son las proteínas más abundantes en las UE. Estas proteínas tienen dos bucles extracelulares que muestran variabilidad en la distribución y el número de residuos cargados, lo cual es crucial para determinar la selectividad iónica paracelular de las UE, y por esto se dividen en clásicas (Claudinas 1-10, 14, 15, 17 y 19) y no clásicas (Claudinas 11-13, 16, 18 y 20-24), de acuerdo con sus similitudes en la secuencia de aminoácidos (González-Mariscal et al., 2008; Mruk & Cheng, 2015; Zavala-Zendejas & Rendón-Huerta, 2008).

La mayoría de las células en mamíferos expresan más de 2 claudinas juntas; una molécula de claudina se puede asociar con otra molécula de claudina (igual o diferente) presente en la membrana celular de una célula adyacente. La combinación de claudinas determina la resistencia eléctrica transepitelial (RET) y la selectividad de carga paracelular (SCP) de las UE. En general, las claudinas-4, 5, 8, 11, 14 y 18 aumentan la RET, mientras las claudinas-2, 7, 10, 15 y 16 aumentan la permeabilidad paracelular a cationes (Mruk & Cheng, 2015).

En el testículo, las claudinas 3 y 11 son las más expresadas durante las etapas VI-VIII y V-VII del ciclo del epitelio seminífero, respectivamente, lo cual coincide con el movimiento de los espermatozoides en preleptoteno y leptoteno a través de la BHT. La expresión de la claudina-3 (Cl-3) es regulada por andrógenos y esta proteína se encuentra en UE nuevas, las cuales se forman entre la membrana basal y las UE viejas, antes de los espermatozoides migrantes. La claudina-11 (Cl-11) está presente en las UE viejas (delante de los espermatozoides que atraviesan la barrera) e inhibe la proliferación de CS postnatales. Además de los andrógenos, hormonas como la FSH, citocinas (p. ej., TNF $\alpha$  y TGF $\beta$ ) y CG también regulan la expresión de las claudinas en las CS (Mruk & Cheng, 2015).

### ***Ocludina.***

La ocludina (Ocl) es una proteína de cuatro dominios membranales, dos bucles extracelulares y dos segmentos intracelulares, y está presente en los filamentos que constituyen a las UE.

En general, la Ocl controla la localización de proteínas polarizadas para establecer la polaridad celular y la dirección del movimiento celular en el epitelio intestinal, por lo que esta proteína podría tener un rol similar en el movimiento de los espermatozoides en preleptoteno y leptoteno a través de la BHT (Mruk & Cheng, 2015). Sin embargo, su rol en la fisiología es aún controversial dado que, si bien su

sobreexpresión afecta severamente la RET, ratones knock-out<sup>1</sup> de esta proteína son viables y presentan uniones estrechas con morfología aparentemente normal; además, las fibrillas de estas uniones son normales en células madre embrionarias deficientes de Ocl, por lo que se dice que esta proteína es importante, pero no necesaria para la función de la BHT (González-Mariscal et al., 2008; Mruk & Cheng, 2015).

### **2.2.3.2 Proteínas de las especializaciones ectoplásmicas**

La adhesión de las especializaciones ectoplásmicas (EE) es mediada por el complejo multifuncional cadherina-catenina, siendo la cadherina esencial para la función de la barrera hematotesticular (BHT) (Mruk & Cheng, 2015).

Las cadherinas son glicoproteínas transmembranales que median la adhesión intercelular homotípica dependiente de calcio. Por ejemplo, una cadherina en una célula se une a el mismo tipo de cadherina de una célula adyacente. Inicialmente fueron identificados tres tipos de cadherinas, las cuales se nombraron de acuerdo con el tejido en donde fueron descritas por primera vez: E-cadherina (epitelial), N-cadherina (neuronal) y P-cadherina (en la placenta). Actualmente, la superfamilia de cadherinas se divide en subfamilias que incluyen las cadherinas clásicas o tipo I, las tipo II (altamente relacionadas con las tipo I), cadherinas desmosomales, proto cadherinas y las cadherinas flamingo. De todas estas, las tipo I son las más estudiadas, pues son proteínas muy abundantes en uniones adherentes y tienen un solo dominio transmembranal; dentro de este tipo se encuentran las cadherinas N, E y P (Andersson et al., 1994; Sobarzo et al., 2006).

En el caso de la BHT, la expresión de la E y la N cadherina abunda en el epidídimo y testículo, respectivamente, y esto sucede tanto en la rata como en el humano. La N-cadherina (N-cad) se localiza en el epitelio seminífero y también en las uniones celulares entre las CS, en uniones asociadas a espermatoцитos y en la cabeza de espermátides alargadas en el testículo de ratas adultas (Andersson et al., 1994; Sobarzo et al., 2006).

---

<sup>1</sup> Ratón de laboratorio modificado genéticamente con un gen inactivado al reemplazarlo o interrumpirlo con fragmento artificial de DNA (NIH, 2020).



### 2.2.3.3 Proteínas de uniones comunicantes o “gap”.

Dentro de los complejos de unión en la BHT, las uniones comunicantes, a las que nos referiremos de ahora en adelante como uniones “gap” (UG), son importantes dado que es la única unión que sirve para el paso de iones y moléculas de menos de 1-1.5 kDa entre las células. Este tipo de comunicación intercelular está involucrada en la división celular, crecimiento y apoptosis de varios tipos celulares. Las UG formadas por las proteínas conexina son canales de comunicación intercelulares entre CS adyacentes, que transportan moléculas de señalización biológica (Peña-Corona et al., 2022; Pointis et al., 2005; Sridharan et al., 2007).

En el testículo, la proteína “gap” más abundante es la conexina-43 (Cx43), la cual tiene una función crucial en el desarrollo y maduración de los espermatozoides. Esta proteína es expresada por las CS y por CG basales (como las espermatogonias y espermatoцитos) y participa en el acoplamiento entre CS adyacentes y entre CS y CG basales en los testículos de rata y humano. Además, la delección específica de Cx43 en CS de ratones knockout conlleva a fallas en la espermatogénesis, debido a un arresto en la meiosis, en el cual las espermatogonias no se diferencian en espermatoцитos (Peña-Corona et al., 2022; Pointis et al., 2005; Sridharan et al., 2007).

Para un esquema general de las proteínas estructurales de la BHT aquí mencionadas, véase *Figura AIV.2* en el Anexo IV de esta tesis.

#### 2.2.4 Función de la barrera hematotesticular

La barrera hematotesticular (BHT) tiene como función principal proteger las células germinales (CG) de sustancias presentes en los sistemas circulatorio y linfático y, junto con las CS, proveen un microambiente inmunoprivilegiado con el fin de que las CG puedan completar la meiosis y evitar la destrucción autoinmunitaria del espermatozoide (Fox, 2011; Mruk & Cheng, 2015; Ni et al., 2019).

Además de las CS, las células mioides peritubulares (Figura 4) también contribuyen a la función de la BHT al prevenir el paso de diversas moléculas tóxicas, como el nitrato de lantano, en el 85% de túbulos seminíferos en ratones (Mruk & Cheng, 2015). El oportuno ensamblaje y desensamblaje de las uniones celulares entre CS-CS y CS-CG es necesario para que se dé la migración de CG y la liberación de espermatozoides en la etapa VIII del ciclo del epitelio seminífero (CES) (Leblond & Clermont, 1952; Ni et al., 2019).

A pesar de que la BHT es una de las más fuertes barreras sangre-tejido, esta se debe reestructurar para permitir el tránsito de espermatoцитos en preleptoteno del compartimento basal al compartimento apical. Sin embargo, la barrera inmunológica que se le confiere a los túbulos seminíferos por la BHT no puede interrumpirse durante el CES (para evitar la producción de anticuerpos contra CG meióticas y post-meióticas). Para lograr esto, durante las etapas VIII-IX del CES se deben formar nuevas fibrillas de uniones estrechas (UE) en el lado basal de los espermatoцитos en preleptoteno/leptoteno, seguido de un desensamblaje de las fibrillas de UE en el lado luminal de los espermatoцитos. Por consiguiente, es necesaria la coordinación entre la testosterona (T) y el factor de crecimiento transformante beta 2 (TGF- $\beta$ 2), pues estas biomoléculas regulan la apertura y cierre de la BHT al afectar diferencialmente el destino de las proteínas integrales de membrana endocitadas.

La T es importante para la producción y localización de las proteínas que conforman la BHT, así como para que se den interacciones adecuadas entre ellas, para el adecuado reciclaje de proteínas endocitadas de regreso a la superficie celular (para mantener la adhesión celular), entre otras funciones; mientras que citosinas como TGF- $\beta$ 2 regulan a la baja las proteínas integrales de membrana en la BHT, al aumentar la cinética de internalización de proteínas como la ocludina y la N-cadherina (Chihara et al., 2016; de Freitas et al., 2016; Cheng & Mruk, 2012; Yan et al., 2008). Además, el mantenimiento de la espermatogénesis también depende de la dinámica de la BHT controlada por el receptor de andrógenos (RA), el cual media la cinética de proteínas de unión integral, incluyendo su distribución, internalización, degradación y reciclaje (de Freitas et al., 2016; Li et al., 2009).

Para un esquema general de este proceso, véase *Figura AIV.3* en el Anexo IV de esta tesis.

### 2.3 Disruptores endócrinos

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), los disruptores endócrinos se definen como agentes exógenos que interfieren con la síntesis, secreción, transporte, metabolismo, acción de unión o eliminación de hormonas naturales que están presentes en el cuerpo y son responsables de procesos de homeostasis, de reproducción y desarrollo y de provocar efectos adversos sobre la salud de un ser vivo o de su descendencia (OMS, UNEP., 2012). Esta organización menciona que la exposición a los disruptores endócrinos se ha extendido por todo el mundo, y se puede producir por la ingestión de alimentos o agua, por inhalación de partículas presentes en el aire o por el contacto con la piel. Así mismo, la OMS ha reportado que, aunque cerca de 800 sustancias químicas se han identificado como disruptores endócrinos (o al menos se sospecha que lo sean), son pocas las que se han investigado a fondo y la mayoría de las sustancias químicas comercializadas en el mercado no han sido evaluadas (International Programme on Chemical Safety., 2002; OMS, UNEP., 2012).

### 2.4 Bisfenoles como disruptores endócrinos

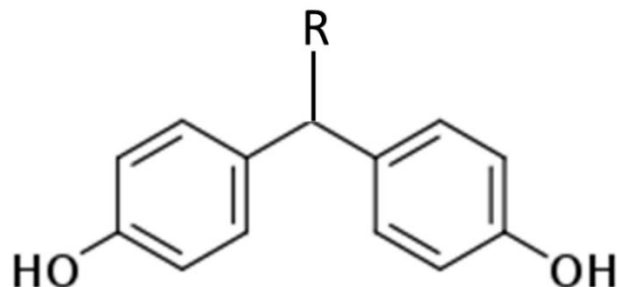
Los bisfenoles son sustancias sintéticas insolubles en agua, sin color, ni olor y la mayoría de ellos son sólidos a temperatura ambiente. Son utilizados en la industria de plásticos, como materiales intermediarios en la producción de barnices, termoplásticos y como antioxidantes en caucho, aceites y grasas (Fiege et al., 2000).

Los bisfenoles y sus análogos tienen actividad de disruptor endócrino. Estos compuestos interfieren con las hormonas<sup>2</sup> imitando su actividad, especialmente en la reproducción (Maffini et al., 2006; Molangiri et al., 2022). La estructura fenólica de los bisfenoles (Figura 5) imita a la del estradiol<sup>3</sup>, por lo que los bisfenoles también poseen actividad estrogénica, al afectar el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal; esto conlleva a una disminución de los niveles intratesticulares de testosterona durante la esteroidogénesis en las células de Leydig, hormona importante en el mantenimiento de los caracteres secundarios sexuales y en la espermatogénesis (Adegoke et al., 2020; Molangiri et al., 2022).

---

<sup>2</sup> Producto de secreción de ciertas glándulas que, transportado por el sistema circulatorio, excita, inhibe o regula la actividad de otros órganos o sistemas de órganos (RAE, s/f).

<sup>3</sup> Hormona esteroidea (derivada del colesterol) que se sintetiza a partir de la testosterona y regula la producción de espermatozoides, el líquido y la función eréctil (Jewell & Biggers, 2023).



**Figura 5. Estructura general de los bisfenoles.** El grupo R representa a cualquier sustituyente, de acuerdo con lo observado en el trabajo de Chen et al. (2016).

#### 2.4.1 Bisfenol A

Un ejemplo de bisfenol que ha demostrado ser un disruptor endócrino, es el bisfenol A, BPA, o 2,2-Bis(4-hidroxyfenol), el cual fue reportado en 1891 por el químico ruso Aleksandr Dianin y sintetizado por primera vez por T. Zincke en Alemania en 1905, mediante la condensación de dos moléculas de fenol con una molécula de acetona en presencia de ácido clorhídrico (Adegoke et al., 2020; García & Gallego, 2015; Huang et al., 2012).

Este compuesto se utiliza como un componente intermediario destinado a la fabricación de plásticos de policarbonato y resinas epoxi, las cuales se usan mucho en diversos productos de la vida diaria, como en medios digitales (p. ej, CDs y DVDs), equipo electrónico, automóviles, papel térmico (utilizado comúnmente en recibos o “tickets” de compras), equipo médico (como selladores dentales), retardantes de flama, objetos o recipientes destinados a entrar en contacto con los alimentos y bebidas (envases, recubrimientos de conservas, platos, tazas, etc.), entre otros (García & Gallego, 2015; Guerrero Salazar & Ardila Martínez, 2016; Huang et al., 2012).

El mercado global del BPA se divide principalmente en resinas de policarbonato, resinas epoxi, resinas de poliéster insaturado, retardantes de flama y otros; entre los cuales, la industria de resinas de policarbonato es el principal consumidor y representó casi la mitad del mercado de BPA en 2021, seguido por la industria de las resinas epóxicas (ChemAnalyst, 2023).

Debido a esto, existe una creciente demanda de esta sustancia como material polimerizante, teniendo una Tasa de Crecimiento Anual Compuesta (CAGR, por sus siglas en inglés)<sup>4</sup> de 3.51% de 2022 al 2032. En un análisis de mercado del BPA se encontró que los principales productores de BPA en 2022 fueron Bayer AG, Kumho P&B Chemicals Inc y LG Chem, siendo Asia Pacífico, Europa y Norteamérica las principales regiones que utilizan este compuesto en la industria. En este mismo análisis, se reportó que,

---

<sup>4</sup> Tasa de crecimiento que muestra el incremento anual de una variable (p. ej., una inversión) durante un periodo de tiempo superior a un año (Calvente, 2021).

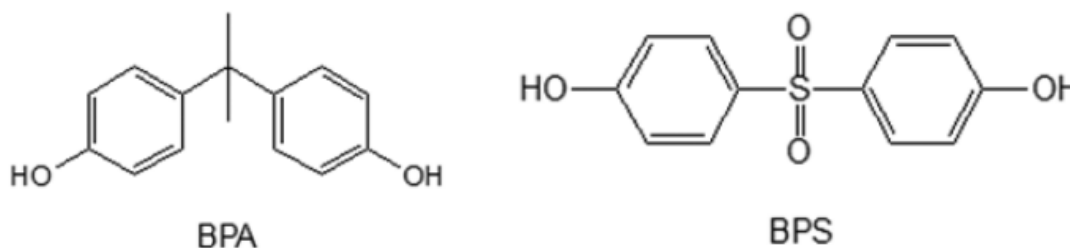
en 2022, el tamaño del mercado<sup>5</sup> de bisfenol A fue de 5,600,000 toneladas, y se estima que la demanda de este compuesto alcance los 8 millones de toneladas en los próximos 10 años (ChemAnalyst, 2023).

#### 2.4.2 Bisfenol S

La preocupación por los efectos adversos del BPA en humanos y animales de laboratorio conllevó a una regulación más estricta de su uso y producción, tanto en Norte América como en la Unión Europea (Chen et al., 2016) (Véase apartado 2.4.4 de la presente tesis).

Para cumplir con restricciones, regulaciones y recomendaciones a nivel mundial sobre el uso de BPA, y para evitar sus efectos negativos sobre la salud, los fabricantes de plástico y sus derivados lo han reemplazado gradualmente con compuestos de naturaleza y estructura química similar (Figura 6), como lo es el bisfenol-S, BPS, o bis(4-hydroxyphenyl)sulfona (Eladak et al., 2015).

El reemplazo de BPA por análogos de bisfenoles, como el BPS, el BPF (4,4'-metilendifenol) o el BPAF (4,4'-(hexafluoroisopropilideno)difenol), se ha dado mayoritariamente en la fabricación de plásticos de policarbonato y resinas epóxicas y, en total, se han documentado 16 análogos de bisfenoles para diversas aplicaciones industriales (Chen et al., 2016).



**Figura 6. Comparación de las estructuras químicas del bisfenol A (BPA) y el bisfenol S (BPS).** Ambos compuestos comparten una estructura similar con dos grupos funcionales hidroxifenilo laterales (Chen et al., 2016).

El BPS es comúnmente usado como intermediario para la fabricación de pegamentos epóxicos, recubrimientos de latas y papeles térmicos para recibos, así como en poli (éter cetona éter sulfona) sulfonada (S-PEKES, SPEEK), los cuales son polímeros con aplicaciones en celdas de combustible y como aditivo en tintes y agentes de bronceados (Chen et al., 2016; Mahimai et al., 2022).

Hay una falta de información general sobre el uso de los análogos del BPA, pero diversos estudios sugieren que la producción y aplicación de algunos análogos del BPA está aumentando a nivel global (Chen et al., 2016; M. Naderi et al., 2014).

---

<sup>5</sup> Representa el valor de las ventas materializadas de un producto y/o servicio, ya sea en porcentajes o valores absolutos, en función del volumen de ventas alcanzadas en un periodo determinado de tiempo. También puede referirse al conjunto de personas y empresas que conforman un espacio para comercializar dichos bienes y/o servicios (Añez, s/f).

La Agencia Europea de Sustancias Químicas (ECHA, por sus siglas en inglés) reporta que la tasa anual de fabricación o importación de BPS es de 10,000 a 100,000 toneladas en el área económica europea, teniendo a empresas como BASF, Brunschwig Chemie, Lanxess, NetSun, entre otros, como principales proveedores de este compuesto en Europa (ECHA, 2023; Geueke, 2014). Por otro lado, en el 2012 la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés), reportó una lista de 8 fabricantes y/o importadores de BPS, registrando un volumen total de BPS de entre 454 y 4,540 toneladas por año (Geueke, 2014).

Investigaciones recientes indican que la fuente dominante de exposición a bisfenoles es mediante la comida. En general, cuando una superficie plástica que está en contacto con alimentos es sometida a calentamiento o está en contacto con alimentos con naturaleza muy ácida o básica, se promueve la hidrólisis de los enlaces éster que unen los monómeros del bisfenol cuando está presente en ella, por lo que se promueve la liberación de estas sustancias al alimento. Las resinas epóxicas fabricadas con BSP son utilizadas como revestimiento de latas metálicas y envases para alimentos, por lo que este compuesto puede filtrarse de estos materiales y contaminar los alimentos durante su almacenamiento (Molangiri et al., 2022; L. H. Wu et al., 2018).

Además, el BPS es uno de los bisfenoles que menos se degrada ambientalmente debido a su alta estabilidad y resistencia. La presencia de sus enlaces únicos irrotacionales del grupo  $O=S=O$  (Figura 6) provoca que este compuesto no se degrade en condiciones aerobias, que sea altamente resistente a la biodegradación y que su liberación al ambiente pueda provenir incluso de los micro plásticos (por la exposición a rayos UV y/o líquidos calientes) y, por consiguiente, es difícil contrarrestar los efectos adversos que el BPS puede provocar sobre la reproducción (Cao et al., 2013; Fang et al., 2020; Ike et al., 2006).

En un estudio reciente, se evaluó la concentración de BPA y BPS (además de BPF y BPAF) en 616 muestras de orina de hombres y mujeres adultos, recolectadas en Estados Unidos durante diferentes periodos entre los años 2000 y 2014. Durante todo el tiempo de estudio, se observaron concentraciones urinarias de BPA de 0.36-2.07  $\mu\text{g}/\text{L}$ , la concentración promedio más alta fue la del año 2010 y la más baja del 2014. Por otro lado, el BPS se observó en concentraciones urinarias de 0.17-0.25  $\mu\text{g}/\text{L}$  a partir del año 2009, la concentración más alta fue la del año 2014 y la más baja en los años 2010 y 2011 (Ye et al., 2015).

Estos resultados reflejan la historia del cambio del uso de BPA por BPS en los Estados Unidos, debido a que, en octubre de 2008, el gobierno de Canadá consideró mundialmente al BPA como un tóxico químico por primera vez y anunció la prohibición de su uso en botellas de bebés. A partir de 2010, Canadá también

restringió su uso en contenedores y empaques de alimentos (Wu et al., 2018), lo cual provocó el cambio progresivo de BPA por BPS en Norte América.

En otro estudio reciente, en varias de las grandes ciudades de China se recolectaron muestras de sangre materna y del cordón umbilical bajo condiciones controladas, y se reportaron concentraciones de BPS de 0.03-0.07 ng/mL y 0.08-0.04 ng/mL en suero materno y del cordón umbilical, respectivamente. Estas concentraciones se detectaron con baja frecuencia (en 4 y 7 de 61 muestras respectivamente). Además, se reportaron concentraciones de metabolitos del BPA, como el sulfato y el glucurónido de BPA, en muestras maternas (de 0.06 y 0.02 ng/mL, respectivamente) y en muestras de cordón umbilical (de 0.08 y 0.04 ng/mL, respectivamente), con una mayor frecuencia respecto al BPS (Liu et al., 2017).

### **2.4.3 Efectos de los bisfenoles A y S sobre la salud reproductiva masculina**

El BPA ha demostrado tener afinidad por los receptores de los estrógenos y, por lo tanto, poseen propiedades estrogénicas y anti-androgénicas. Por esta razón, el BPA es capaz de participar en varias vías endócrinas y afectar el sistema reproductivo, induciendo toxicidad en la proliferación y mantenimiento de varios tipos celulares, incluyendo células germinales testiculares (García & Gallego, 2015; Karmakar et al., 2020).

Además, en las últimas décadas, algunos estudios que exploran el mecanismo fisiológico de la actividad tóxica del BPA, han encontrado una relación directa entre el estrés oxidante<sup>6</sup> y los efectos dañinos del BPA en células y tejidos (in vitro e in vivo), pues se ha visto que, tanto el BPA como el BPS, inducen estrés oxidante en el testículo, al aumentar la cantidad de especies reactivas de oxígeno (EROS), la producción de radicales libres<sup>7</sup> y la peroxidación lipídica, y al disminuir la actividad de enzimas antioxidantes. Esto, a su vez, podría afectar la espermatogénesis en la rata, y por consiguiente la calidad y cantidad espermática (Amjad et al., 2020; Amraoui et al., 2018; Ullah et al., 2016, 2021; Yousaf et al., 2016).

A continuación, se presenta una tabla comparando las dosis probadas, animal de experimentación y efecto sobre la salud reproductiva masculina.

---

<sup>6</sup> Desequilibrio entre los sistemas oxidantes y los antioxidantes, a favor de un daño potencial (Hicks et al., 2006).

<sup>7</sup> Se refiere a cualquier especie capaz de existir de forma independiente y que contiene uno o más electrones desapareados (electrones que ocupan un orbital atómico o molecular por sí mismo) (Díaz Cruz, s/f).

**Tabla 1.** Efectos del bisfenol A (BPA) y el bisfenol S (BPS) sobre la salud reproductiva masculina.

Bisfenol	Referencia	Dosis y vía de administración	Tipo de exposición	Sujeto de estudio, edad al inicio, n por grupo	Duración del tratamiento, día de extracción del tejido de estudio	Efecto sobre la salud reproductiva masculina
BPA	Yousaf et al. (2016)	100 mg/kg pc/d, oral	Directa	Rata albina macho adulto, 6-8 semanas, n=5	15 días, extracción en día 16 (PND 58-72).	<ul style="list-style-type: none"> <li>Disminución de la capacidad antioxidante total testicular, testosterona sérica, índice de Johnsen (IM) de los túbulos seminíferos y número de células de Leydig.</li> <li>Deformación de los túbulos seminíferos y su arquitectura.</li> <li>Interrupción de las etapas de la espermatogénesis.</li> </ul>
	Campos et al. (2019)	0.5 o 5 mg/kg pc/d, subcutánea	Perinatal, dosificación a rata Wistar hembra, PND 90 (F0)	Rata Wistar macho (F1), PND 0, n=6	Del GD 18 de F0 al PND 5 de F1, extracción en PND 90 de F1	<ul style="list-style-type: none"> <li>Alteración en producción diaria de esperma en ambas dosis y morfología espermática alterada solo en dosis alta.</li> <li>Disminución de la altura epitelial de los túbulos seminíferos y aumento del diámetro luminal en ambas dosis.</li> <li>Deformación de los túbulos seminíferos y su arquitectura.</li> </ul>
	Sencar et al. (2021)	50, 100 o 200 mg/kg pc/d, oral	Directa	Rata Wistar macho adulta, ND, n=12	De 14 a 28 días, extracción al final de los días 14 o 28	<ul style="list-style-type: none"> <li>Desorganización del epitelio de los túbulos seminíferos y acumulación de CG inmaduras en el lumen.</li> <li>Aumento del espacio entre CS-CS y CS-CG y alteración o desaparición de las UE.</li> <li>Cambios degenerativos en células de Leydig obvios acorde a la dosis administrada.</li> <li>Disminución de los niveles séricos de T y LH, altura epitelial, diámetro del túbulo seminífero y el IM.</li> </ul>



BPA	de Freitas et al. (2016)	20 $\mu$ M, NA	Directa	Cultivo de CS humanas (HSeC), NA, n=3	De 6 a 48 horas, extracción celular al finalizar las 6 o 48 h.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disrupción de la BHT (disminución de la expresión de Ocl, ZO-1, <math>\beta</math>-catenina) mediante regulación a la baja del RA (véase Figura AIV.3).</li> <li>• Disminución del número de CS y su adhesión celular.</li> </ul>
BPS	Wu et al. (2021)	50 o 100 mg/kg pc/d, oral	Directa	Rata Sprague-Dawley macho adulto, PND 80-90, n=8	30 días, extracción en día 31 (PND 111-121)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Daño en la cantidad y calidad del esperma.</li> <li>• Defectos en la espermatogénesis (etapas IX-XIII del CES principalmente).</li> <li>• Perturbación de la integridad de la BHT (disminución de expresión de Cl-11 y Cx43, aumento de N-cad y <math>\beta</math>-catenina sin deslocalización de estas proteínas).</li> <li>• Desorganización de citoesqueleto de microtúbulos y F-actina en CS (falla en transporte de espermátides y fagosomas a través del epitelio seminífero) y expresión alterada de proteínas de unión a actina.</li> </ul>
	Ullah et al. (2016)	1, 5, 25, 50 $\mu$ g/kg pc/d, oral	Directa	Rata Sprague-Dawley macho adulto, PND 70-80, n=6	28 días, extracción en día 29 (PND 99-109)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disminución de la actividad de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, peroxidasa y catalasa) y aumento de EROS totales en tejido testicular.</li> <li>• Reducción de concentración plasmática de testosterona.</li> <li>• Alteraciones morfológicas de los túbulos seminíferos testiculares.</li> <li>• Disminución de la altura epitelial testicular en las dos dosis más altas (25 y 50 <math>\mu</math>g/kg pc/d).</li> </ul>

BPS	Ullah et al. (2021)	0.5, 5, 50 µg/kg pc/d, oral en botella de agua.	Directa	Ratas Sprague- Dawley macho, PND 22, n=8.	48 semanas (del PND 23 al 359), extracción en PND 359	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reducción de actividad de enzimas antioxidantes y aumento en niveles de lipoperoxidación y EROS.</li> <li>• Disminución de T, LH y FSH en plasma y aumento de estradiol plasmático en dosis altas.</li> <li>• Cambios en la histología testicular, disminución del área cubierta por los túbulos seminíferos, diámetro de túbulos y altura epitelial en la dosis más alta.</li> <li>• Reducción del número de espermatoцитos y espermátides.</li> </ul>
BPA y BPS	Molangiri et al. (2022)	0.4, 4 y 40 µg/kg pc/d, oral.	Perinatal, dosificación a rata Wistar hembra, PND 97 (F0)	Rata Wistar macho (F1), PND 0, n=4	18 días (del GD4 al GD21 de F0), extracción en PND 90 de F1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento de niveles plasmáticos de testosterona por dosis baja de BPS y dosis alta de BPA</li> <li>• Diferencias morfológicas en los túbulos seminíferos en las tres dosis probadas de ambos bisfenoles.</li> <li>• Disminución del diámetro tubular y altura epitelial por BPA y BPS.</li> </ul>

BP: bisfenol; BPA: bisfenol A; BPS: bisfenol S; CES: ciclo del epitelio seminífero; CG: células germinales; CS: células de Sertoli; EROS: especies reactivas de oxígeno; FSH: hormona folículo estimulante; GD: día gestacional; IM: índice de Johnsen; LH, hormona luteinizante; NA: No aplica; ND: No determinado; pc: peso corporal; PND: día postnatal; T: testosterona.

Es importante mencionar que el BPA, y los disruptores endócrinos en general, siguen un comportamiento particular en sus curvas de dosis-efecto, pues a mayores dosis no siempre se obtiene un mayor efecto, e incluso a veces se observa que tienen mayores efectos nocivos con dosis menores; por lo que es de interés, evaluar y analizar los efectos que tienen lugar a concentraciones muy bajas (García & Gallego, 2015; Vandenberg et al., 2012).

#### 2.4.4 Regulación del consumo de los bisfenoles

En los últimos años, los estudios y la preocupación por los efectos del BPA sobre la salud han crecido considerablemente, convirtiendo al BPA en un tema central para la prensa, en muchas publicaciones científicas y en opiniones de autoridades competentes; esto ha provocado que actualmente exista una gran variedad de productos en el mercado con leyendas como “libre de BPA” o “BPA free”, sobre todo en artículos que están destinados a tener algún contacto con alimentos o bebidas (García & Gallego, 2015).

Para lograr una regulación en el uso industrial de disruptores (o probables disruptores) endócrinos, organizaciones como la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés), la Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas (ECHA) y la Agencia de Protección ambiental de Estados Unidos (USEPA), han determinado los niveles máximos de la exposición para evitar la toxicidad de los bisfenoles en la población. En la Tabla 2 se enlistan los límites o dosis máximas recomendadas para la exposición de BPA y BPS por vía oral, establecidos por estas agencias regulatorias.

**Tabla 2.** Límites establecidos o dosis recomendadas para el consumo de bisfenol A y bisfenol S por diversas agencias regulatorias.

Compuesto	Referencia	Límite para la cantidad de BPA permitida.
BPA	EFSA (2015)	IDT: 4 µg/kg pc/d
	ECHA (2011)	Transferencia al alimento de no más de 0.05 mg/kg de materiales en contacto con alimento.
	USEPA (1988)	RfD: 0.05 mg/kg pc/d LOAEL: 50 mg/kg pc/d NOAEL: 5 mg/kg pc/d
BPS	EFSA (2020)	NOAEL: 60 mg/kg pc/d LOAEL: 180 mg/kg pc/d

IDT: Ingesta diaria tolerable<sup>8</sup>; RfD: Dosis oral de referencia<sup>9</sup>; LOAEL: Nivel más bajo de efectos adversos observados; NOAEL: Nivel de efectos adversos no observados.

<sup>8</sup> Estimación de la cantidad de una sustancia en el aire, alimento o agua potable que no se añade deliberadamente (p. ej., contaminantes) y suele ingerirse diariamente a lo largo de la vida sin riesgos visibles a la salud (EFSA, 2020).

<sup>9</sup> Estimado de la exposición diaria a la población humana (incluyendo a los grupos sensibles) que es probable que no tenga un riesgo apreciable o efectos deletéreos durante toda la vida (USEPA, 1988).

Es importante destacar que, si bien existen datos de NOAEL y LOAEL para el bisfenol S (Tabla 2), su uso actualmente no se encuentra restringido en la producción de ningún tipo de artículo plástico, e incluso es considerado como seguro en artículos de uso repetido que entran en contacto con alimentos (FDA, 2023; Geueke, 2014).

Finalmente, a pesar de las evidencias expuestas con respecto a los efectos de los bisfenoles sobre la reproducción, y de las recomendaciones de autoridades médicas en el mundo, es relevante mencionar que, hasta el momento, las comisiones gubernamentales en México no han modificado las Normas Oficiales Mexicanas vigentes, como la NOM-130-SSA1-1995<sup>10</sup>, la NOM-002-SSA1-1993<sup>11</sup>, y la NOM-131-SSA1-2012<sup>12</sup>, las cuales, en general, regulan el tipo de uso y la cantidad de materiales utilizados en la fabricación de productos plásticos y el recubrimiento de latas destinadas al almacenamiento de alimentos.

---

<sup>10</sup> Norma Oficial Mexicana NOM-130-SSA1-1995, Bienes y servicios. Alimentos envasados en recipientes de cierre hermético y sometidos a tratamiento térmico. Disposiciones y especificaciones sanitarias (Diario Oficial de la Federación, 1997).

<sup>11</sup> Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-002-SSA1-1993, Salud ambiental-Bienes y servicios. Envases metálicos para alimentos y bebidas. Especificaciones de la costura. Requisitos sanitarios (Diario Oficial de la Federación, 1993).

<sup>12</sup> Norma Oficial Mexicana NOM-131-SSA1-2012, Productos y servicios. Fórmulas para lactantes, de continuación y para necesidades especiales de nutrición. Alimentos y bebidas no alcohólicas para lactantes y niños de corta edad. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Etiquetado y métodos de prueba (Diario Oficial de la Federación, 2012).

## 2.5 Efecto de antioxidantes como atenuantes de la toxicidad reproductiva

Dados los efectos nocivos producidos por los bisfenoles, se han realizado esfuerzos por contar con alternativas que contrarresten o aminoren las consecuencias de la exposición a este tipo de compuestos. Existen diversos estudios que muestran que los bisfenoles (BPA y BPS) generan estrés oxidante en el testículo, y en otros tejidos como el hígado y los riñones, por lo que se ha evaluado el uso de antioxidantes<sup>13</sup> para disminuir su toxicidad (Amjad et al., 2020; Amraoui et al., 2018; Rahman et al., 2019; Ullah et al., 2016).

En general, los antioxidantes se clasifican en dos grupos: antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Ambos grupos son capaces de regular las reacciones generadas por radicales libres y ROS por diferentes mecanismos. El primer grupo incluye enzimas endógenas como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa, mientras que el segundo grupo incluye, por ejemplo, a las vitaminas E, A y C, glutatión (GSH), los flavonoides, carotenoides, melatonina, entre otros (Amjad et al., 2020).

Se ha observado que antioxidantes no enzimáticos (como el ácido fólico, GSH, melatonina, vitamina C, selenio, vitamina E, entre otros) ayudan a atenuar los efectos nocivos producidos por el BPA (Amjad et al., 2020; Amraoui et al., 2018; Gules et al., 2019; Rahman et al., 2019). Por ejemplo, Haroun et al. (2016) observaron que la vitamina C reduce la hepatotoxicidad y nefortoxicidad causada por el BPA, en ratas tratadas con 25 mg/kg pc/d de BPA y dosis de 60 y 5.5 mg/kg pc/d de vitamina C durante 6 semanas. Srivastava & Gupta (2018) observaron que la vitamina E, en dosis de 4 mg/100 g pc/d, protegió de la apoptosis a las células testiculares y el esperma epididimal en ratas expuestas a 5, 50 y 100 µg/100 g pc/d de BPA, después de una exposición de 3 meses a ambos tratamientos en conjunto. Wu et al. (2013) observaron que la melatonina, en una dosis 10 mg/kg pc/d, reparó el daño al DNA en células germinales al suprimir el estrés oxidante en ratas tratadas con 200 mg/kg pc/d de BPA durante 10 días.

En el presente estudio, nos centramos específicamente en la vitamina E y el ácido fólico dado que son antioxidantes no enzimáticos que pueden suplementarse fácilmente en la dieta, y que han mostrado contrarrestar los efectos adversos del BPA sobre la reproducción masculina como se describe a continuación.

---

<sup>13</sup> Agentes reductores que previenen reacciones celulares de oxidación, contrarrestando en muchas ocasiones el estrés oxidante o la sobreproducción de EROS en células y tejidos (Amjad et al., 2020; Rahman et al., 2019)

### 2.5.1 Vitamina E

Las formas naturales de la vitamina E (VE) son ocho moléculas lipofílicas, de las cuales cuatro son tocoferoles y cuatro son tocotrienoles, siendo el  $\alpha$ -tocoferol la forma predominante de la VE en tejidos. Estas formas naturales son sintetizadas por plantas; el  $\alpha$ -tocoferol está presente en algunas frutas, vegetales y semillas de plantas y los tocoferoles  $\alpha$  y  $\gamma$  también están presentes en muchos aceites comestibles (p. ej., aceites de maíz, soya y cacahuete).

La VE en el cuerpo humano es esencial para la mayoría de los procesos metabólicos que previenen la peroxidación lipídica, y tiene un rol importante en procesos antiinflamatorios, la inhibición de la agregación plaquetaria y el correcto funcionamiento del sistema inmune (Amraoui et al., 2018), por lo que la deficiencia de VE, generalmente causada por una mala absorción o digestión de las grasas, ha mostrado tener graves efectos en la salud; por ejemplo, se ha visto que la deficiencia de esta vitamina puede producir daños a los nervios y músculos, debilitamiento del sistema inmune, fibrosis quística, ataxia<sup>14</sup>, entre otros efectos (Jiang, 2014; NIH, 2021).

Este antioxidante ha demostrado tener efectos protectores frente a los daños causados por el bisfenol A; por ejemplo, Amraoui et al., (2018) observaron que el selenio y la vitamina E en conjunto restauran la toxicidad hepática producida por las EROS generadas por el BPA en ratas después de administrar 0.5 y 100 mg/ kg de dieta de selenio y vitamina E, respectivamente, con 10 mg/kg pc de BPA durante 3 semanas. Así mismo, Rahman et al. (2019) observaron que una exposición durante 6 horas a 100  $\mu$ M de BPA induce una disminución en la movilidad espermática y un elevado estrés oxidante en ratones, y que estos parámetros mostraron niveles normales después de una exposición a 100  $\mu$ M de BPA con 2mM de VE durante 6 horas.

---

<sup>14</sup> Trastorno motor que se caracteriza por dificultar la coordinación de los movimientos voluntarios, alterando su velocidad y precisión (Clínica Mayo, 2022).

### 2.5.2 Ácido Fólico

El ácido fólico (AF), folato o vitamina B9, se refiere a un grupo de compuestos solubles en agua llamados vitámeros. En conjunto, los vitámeros de AF desempeñan funciones importantes en el metabolismo del carbono, incluida su participación en las vías biosintéticas de aminoácidos y ácidos nucleicos, por lo que el AF es un factor clave para la replicación celular y el metabolismo intermediario<sup>15</sup>. Las células animales no poseen la capacidad de sintetizar la estructura fundamental del AF, por lo que dependen de fuentes exógenas de este nutriente, proviniendo principalmente de los alimentos (de vegetales crudos y carnes, principalmente) y del AF sintetizado por la microbiota del intestino grueso (Naderi & House, 2018).

La deficiencia de AF en el cuerpo humano puede producirse por una ingesta inadecuada, por una mala absorción o por el uso de algunos fármacos, y puede causar diarrea, confusión y anemia megaloblástica<sup>16</sup>. Además, la deficiencia de AF durante el embarazo aumenta el riesgo de defectos congénitos del tubo neural y, tal vez, de otros efectos cerebrales en el feto (Johnson, 2022).

Respecto a la capacidad del AF para contrarrestar los efectos adversos del BPA sobre la reproducción masculina, Gules et al. (2019) observaron que el tratamiento con 20 mg/kg pc/d de AF minimiza los efectos tóxicos provocados por la administración de 50 mg/kg pc/d BPA durante 14 días, pues el AF mostró aumentar la altura del epitelio seminífero, reducir el número de células positivas a apoptosis, aumentar los niveles séricos de testosterona y mejoras sobre la viabilidad y motilidad espermática respecto al grupo tratado con BPA.

---

<sup>15</sup> También llamado metabolismo energético, más conocido por rutas metabólicas como la glucólisis, glucogénesis, lipólisis, lipogénesis, entre otros (González et al., 2015).

<sup>16</sup> Tipo de anemia macrocítica que se caracteriza por la escasa producción de glóbulos rojos completamente funcionales debido a la inhibición de la síntesis del ADN (Johnson, 2022).

### **3. Planteamiento del problema**

Si bien el efecto del BPA sobre la reproducción ha sido ampliamente estudiado, los estudios con BPS son limitados. Así mismo, el efecto atenuante de antioxidantes sobre los efectos nocivos producidos por el BPS no ha sido investigado, a pesar de mostrar resultados prometedores respecto a la toxicidad reproductiva del BPA.

El reemplazo progresivo del BPA por el BPS en la industria, la falta de regulación del uso de BPS en productos de uso común, la alta estabilidad y resistencia de este compuesto, así como su casi nula degradación ambiental, en combinación con los reportes de efectos tóxicos reproductivos similares entre el BPS y el BPA, generan la necesidad de garantizar que no se está reemplazando un producto químico peligroso por otro igual de tóxico.

### **4. Hipótesis**

Con base en los efectos documentados que producen el bisfenol A y el bisfenol S (BPS) sobre la morfología testicular y la expresión de proteínas de la barrera hematotesticular (BHT), se piensa que, la exposición de ratas macho a una dosis alta y una dosis baja de BPS provocará alteraciones diferentes en la histoarquitectura de los túbulos seminíferos, en la expresión de proteínas de la BHT y del receptor de andrógenos, y se espera que la administración de vitamina E y ácido fólico atenúe los efectos nocivos producidos por el BPS.

### **5. Preguntas de investigación**

¿La exposición de ratas macho al BPS produce efectos nocivos sobre la expresión de proteínas de la BHT y el receptor de andrógenos y la histoarquitectura de los túbulos seminíferos?

¿El ácido fólico (AF) y la vitamina E (VE) son capaces de atenuar las posibles alteraciones producidas por el BPS sobre los efectos evaluados?



## 6. Objetivo general

Evaluar los efectos de la administración del BPS sobre la morfología testicular y la expresión de proteínas de la BHT y el receptor de andrógenos en ratas macho Wistar adultas y conocer si el suministro de VE o AF contrarresta la posible toxicidad reproductiva inducida por el BPS.

### 6.1. Objetivos particulares

- I. Evaluar si la administración oral de 0.05 ó 100 mg/kg pc/d de BPS a largo plazo:
  - Provoca alteraciones sobre la histoarquitectura de los túbulos seminíferos, al evaluar los índices de maduración e histopatológico, así como el área del epitelio seminífero.
  - Causa alteraciones sobre la expresión de las proteínas de la BHT de uniones estrechas (ZO-1, ZO-2, Cl-3, Cl-11), de especializaciones ectoplásimicas (N-cad), de uniones comunicantes o “gap” (Cx-43) y el receptor de andrógenos mediante la técnica de Western Blot.
- II. Analizar la histoarquitectura del testículo y la expresión de las proteínas de la BHT y el receptor de andrógenos después de administrar 100 mg/kg pc/d de VE ó 20 mg/kg pc/d de AF junto con ambas dosis de BPS y determinar si estos compuestos atenúan los posibles efectos nocivos producidos por el BPS.

## 7. Materiales y métodos.

### 7.1 Animales

El manejo y cuidado de los animales se realizó con base en las directrices de la Ley Mexicana de Protección Animal, con la aprobación del Comité Institucional para el Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México y de acuerdo con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999<sup>17</sup>. Las ratas cepa Wistar macho se alojaron en cajas de policarbonato con viruta de madera (previamente esterilizadas en autoclave), con tarjetas de identificación de acuerdo con el inciso 4.6 (identificación y registro) de la NOM-062-ZOO-1999, con un máximo de dos ratas por caja. Los animales se mantuvieron en un ciclo de luz : oscuridad de 12:12 h con alimento comercial (Tekland Global Rodent Diet) y agua ad libitum. El agua se suministró en botellas de vidrio para evitar la migración de compuestos presentes en botellas de plástico al agua potable.

### 7.2 Diseño del estudio

En el estudio se incluyeron ratas macho cepa Wistar sanas de 21 días de edad con un peso corporal entre 60 y 80 g; se excluyeron aquellos animales que presentaran signos de enfermedad durante el transcurso del proyecto.

Se seleccionaron 27 ratas sanas, las cuales fueron distribuidas aleatoriamente en nueve grupos (n=3) como sigue:

1. Control.
2. Dosis alta de bisfenol S (BPSH).
3. Dosis alta de bisfenol S con ácido fólico (BPSH+AF).
4. Dosis alta de bisfenol S con vitamina E (BPSH+VE).
5. Ácido fólico (AF).
6. Vitamina E (VE).
7. Dosis baja de bisfenol S (BPSL).
8. Dosis baja de bisfenol S con ácido fólico (BPSL+AF).
9. Dosis baja de bisfenol S con vitamina E (BPSL+VE).

Al grupo control se le administraron únicamente los vehículos utilizados para disolver el AF y el BPS (solución salina y aceite de oliva, respectivamente). La dosis alta de bisfenol S (BPSH) corresponde a una dosis de 100 mg/kg pc/d, mientras que la dosis baja (BPSL) corresponde a 0.05 mg/kg pc/d. La dosis de AF fue de 20 mg/kg pc/d y la de VE ( $\alpha$ -tocoferol) fue de 100 mg/kg pc/d.

---

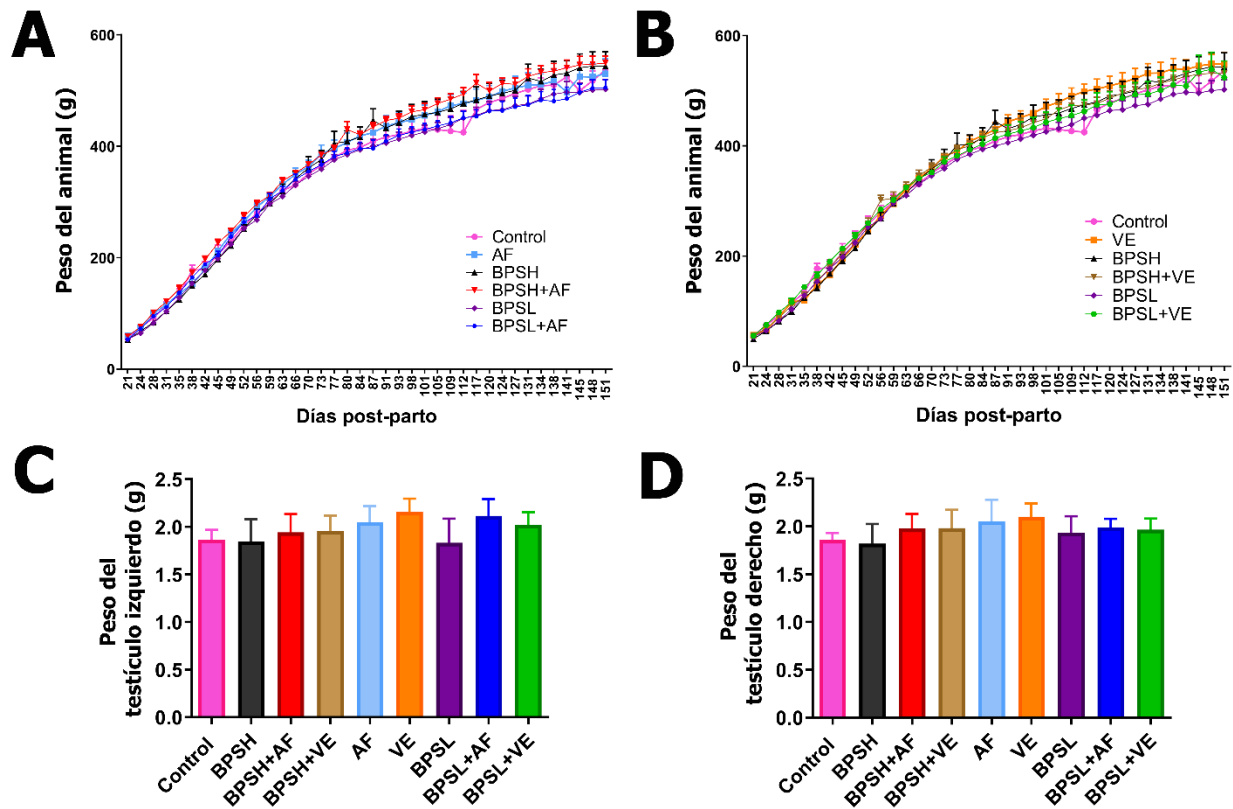
<sup>17</sup> Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio (Diario Oficial de la Federación, 1999).

Todos los grupos fueron dosificados diariamente, durante 4 meses, desde el día postnatal (PND) 21 hasta el día 151, por vía oral. Durante este tiempo, se realizó un monitoreo del peso de cada animal dos veces a la semana para ajustar las dosis del tratamiento, como se muestra en la Figura 7A y B.

Debido a que los disruptores endócrinos tienen un comportamiento particular en sus curvas dosis-efecto (pues a veces se obtienen efectos importantes a partir de dosis muy bajas) se evaluaron dos dosis de BPS: una alta y una baja. La dosis alta de BPS se seleccionó tomando en cuenta el trabajo de Wu et al. (2021), en donde se observaron alteraciones en las proteínas de la BHT con 100 mg/kg pc/d de este mismo compuesto y la dosis baja de BPS (0.05 mg/kg pc/d) se seleccionó de acuerdo con la dosis oral de referencia del BPA señalada en la Tabla 2, dado que actualmente no se cuenta con datos de esta dosis para el BPS. Así mismo, la dosis de VE se seleccionó de acuerdo con lo reportado por Amraoui et al. (2018) y Rahman et al. (2019) en donde se observó que, una dosis de 100 mg/kg pc/d de este compuesto, atenúa los efectos tóxicos reproductivos producidos por BPA. Finalmente, la dosis de AF se eligió con base en el trabajo reportado por Gules et al., (2019), donde se observó que una dosis de 20 mg/kg pc/d de este compuesto atenuó los efectos tóxicos reproductivos producidos por el BPA.

Después del PND 151, los animales se pesaron y fueron sacrificados por decapitación con guillotina y exsanguinación bajo anestesia al administrar por vía intraperitoneal (i.p.) de 32.4 mg/kg pc de pentobarbital sódico, de acuerdo con el inciso 9.5.3.3. de la NOM-062-Z00-1999. A los animales se les disecaron los testículos y ambos fueron pesados (como se muestra en la Figura 7C y D). Un cuarto del testículo derecho de cada animal se fijó en medio Karnovsky modificado al 4% para su posterior inclusión en EPON, con el fin de realizar un entrenamiento de la morfología de los túbulos seminíferos y para determinar el índice de maduración (IM) de éstos. La mitad del testículo izquierdo extraído de cada animal se fijó con paraformaldehído (PFA) al 4%, seguido de su inclusión en parafina para evaluar la morfometría de los túbulos seminíferos mediante la evaluación del índice histopatológico (IHP) y del área del epitelio seminífero (AES). Un cuarto de cada testículo de cada animal se almacenó a -70°C hasta su análisis bioquímico para la cuantificación de las proteínas Cl-11, Cl-3, Cx43, ZO-1, ZO-2, Ocl, N-cad y el receptor de andrógenos (RA) en la barrera hematotesticular (BHT) mediante la técnica de Western-Blot.

No se observaron diferencias significativas en el peso de las ratas mientras se llevaba a cabo la administración de ambas dosis de BPS y/o el AF o VE respecto al grupo control (Figura 7A y B) y tampoco se observaron diferencias en el peso de los testículos de los animales tratados con ambas dosis de BPS y/o el AF o VE, respecto al grupo control, al finalizar el periodo de administración de estos compuestos (Figura 7C y D).



**Figura 7. Monitoreo del peso de los animales de estudio y peso de sus testículos.** (A) peso de las ratas durante el tratamiento con ambas dosis de BPS y el antioxidante AF. (B) peso de los animales durante el tratamiento con ambas dosis de BPS y el antioxidante VE. (C) peso del testículo izquierdo de los animales tratados con ambas dosis de BPS y ambos antioxidantes. (D) peso del testículo derecho de los animales tratados con ambas dosis de BPS y ambos antioxidantes. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  EEM. No se presenta ninguna diferencia significativa en ningún peso evaluado ( $p < 0.05$ ) de acuerdo con el análisis estadístico realizado mediante la prueba de ANOVA de una vía seguida de una comparación múltiple de Tukey.  $n = 3$  animales por tratamiento. AF: Ácido fólico (20 mg/kg pc/d); BPS: Bisfenol S; BPSH: Dosis alta de BPS (100 mg/kg pc/d); BPSL: Dosis baja de BPS (0.05 mg/kg pc/d); VE: Vitamina E (100 mg/kg pc/d).

*Nota:* Resultados obtenidos por la Dra. Sheila Peña y Olga Ruiz para evaluar la relación del efecto de los bisfenoles y antioxidantes con el peso de los animales; así como la localización de las proteínas de la BHT en el testículo de los animales tratados.

### 7.3 Histología del tejido

#### 7.3.1 Inclusión en resina epóxica (EPON 812)

Las muestras de testículo se fijaron durante una noche en medio Karnovsky modificado pH 7.3 (Vigueras-Villaseñor et al., 2009), y posteriormente fueron seccionadas longitudinalmente de tal forma que los túbulos seminíferos quedaran extendidos. A las secciones cortadas se les realizaron cuatro lavados de 30 minutos (min) con amortiguador de cacodilato de sodio 2M, se postfijaron con tetróxido de osmio ( $OsO_4$ ) al 1% durante 1 h y se deshidrataron con soluciones con concentraciones ascendentes de etanol (60, 70, 80, 90, 96 y 100%), realizando 2 lavados de 10 min en cada una.

Después, los tejidos se dejaron en óxido de propileno durante 1 h y se impregnaron gradualmente con diluciones de resina EPON: óxido de propileno 1:2, 1:1 y 2:1 y después en resina pura durante 24 h cada uno. Los tejidos se acomodaron en sus respectivos moldes y se incluyeron en resina fresca a 60°C durante toda la noche (Véase Anexo I. Reactivos preparados para la histología del tejido)

Finalmente, se desmoldaron los bloques, se cortaron transversalmente con 1 µm de espesor con un ultra UCT microtomo (Leica), y se tiñeron con azul de toluidina al 0.5% para su evaluación al microscopio.

Debido a complicaciones en la fijación de tejido (véase Figura 13D y E), las evaluaciones de área del epitelio seminífero e índice histopatológico se tuvieron que realizar con otro método de fijación y tinción como se describe a continuación.

### **7.3.2 Inclusión en parafina**

Los testículos se fijaron por inmersión con PFA al 4% durante 24 h, se lavaron con amortiguador salino de fosfatos (PBS) 1X (Véase Anexo I), realizando cuatro cambios de 30 min cada uno (c/u) y se colocaron en el histoquinet para deshidratarlos con soluciones con concentraciones ascendentes de etanol (EtOH). Los tejidos se aclararon con xilol y se incluyeron en bloques de parafina. Los bloques se cortaron transversalmente con un microtomo (Leica), generando cortes de 5 µm de espesor, los cuales fueron estirados en un baño de flotación con agua destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) a 37°C y recuperados en laminillas gelatinizadas, las cuales se tiñeron con hematoxilina-eosina (H&E) para su evaluación al microscopio.

Para la tinción H&E, las laminillas se desparafinaron durante 30 min en un horno a 60°C, se sumergieron en xilol, en EtOH/xilol (1:1) y en soluciones con concentraciones descendentes de EtOH (100, 96 y 70%) durante 5 min en c/u. Posteriormente, las laminillas se lavaron con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, se dejaron 5 min en hematoxilina, se lavaron con agua de la llave y con H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, se dejaron 5 min en eosina y posteriormente se sumergieron en soluciones con concentraciones ascendentes de EtOH (70, 80, 96 y 100%), en EtOH/xilol (1:1) y en xilol, durante 2 min en c/u. Las laminillas teñidas se montaron con medio Entellan.

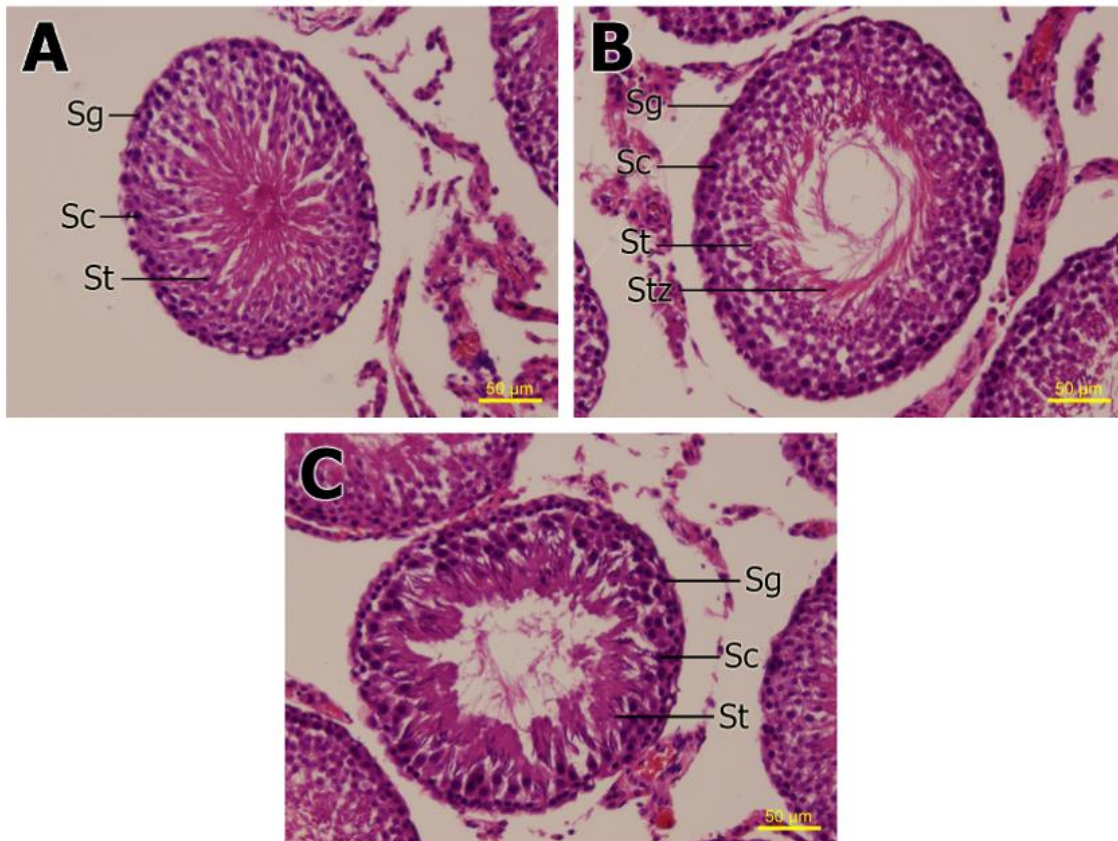
### **7.4 Morfometría de los túbulos seminíferos**

El análisis histológico se realizó usando un microscopio de luz Olympus BX 51 y se analizaron 50 túbulos seminíferos por animal, con n=3 animales por tratamiento. La evaluación se llevó a cabo de forma ciega, de tal forma que el evaluador no conocía el tratamiento que tuvo el animal al momento de llevar a cabo la observación al microscopio.

Los túbulos seminíferos se clasificaron en tres intervalos de acuerdo con las XIV etapas del CES en la rata (Figura 3) como sigue:

- Primer intervalo: Etapa I a VII (Figura 8A).
- Segundo intervalo: Etapa VIII - IX temprana (Figura 8B).
- Tercer intervalo: Etapa IX tardía - XIV (Figura 8C).

En la Figura 8 se muestra una imagen representativa de la arquitectura del epitelio seminífero en cada intervalo establecido en la clasificación por etapas del CES.



**Figura 8.** Clasificación de los túbulos seminíferos de acuerdo con los tres intervalos establecidos de las etapas del CES. Tinción H&E de cortes transversales de 5 µm de espesor del testículo de ratas control. (A) Imagen representativa de las etapas I-VII del CES. (B) Imagen representativa de las etapas VIII-IX\* del CES. (C) Imagen representativa de las etapas IX\*\*-XIV del CES. IX\*: Etapa IX temprana del CES; IX\*\*: Etapa IX tardía del CES; H&E: Hematoxilina-Eosina; Sc: espermatoцитos, Sg: espermatogonias, St: espermátides, Stz: espermatozoides. Barra = 50 µm. Imágenes en 20x.

#### **7.4.1 Determinación del índice de maduración en el epitelio de los túbulos seminíferos**

Se le asignó un valor a cada túbulo seminífero evaluado, de acuerdo con la escala establecida por Johnsen (1970), como se muestra a continuación:

- Valor 1: No hay células en el túbulo seminífero.
- Valor 2: No hay células germinales, sólo están presentes las células de Sertoli.
- Valor 3: Presencia únicamente de espermatogonias.
- Valor 4: Pocos espermatocitos presentes (5 por tubo).
- Valor 5: Gran cantidad de espermatocitos presentes.
- Valor 6: Presencia de pocas espermátides.
- Valor 7: Gran cantidad de espermátides sin ningún tipo de diferenciación.
- Valor 8: No hay espermatozoides maduros, presencia de espermátides maduras en diferenciación.
- Valor 9: Espermatogénesis completa con poca cantidad de espermatozoides.
- Valor 10: Espermatogénesis completa con gran cantidad de espermatozoides.

El valor en la escala del índice de maduración (IM) se determina asignando un valor por túbulo seminífero, siendo el puntaje máximo de 10 y el mínimo de 1 con magnitud adimensional. Un túbulo con valor de 10 está completamente desarrollado (maduro) y un túbulo con valor de 1 no está maduro.

#### **7.4.2 Determinación del área del epitelio seminífero**

Se midieron el área de los túbulos seminíferos (ATS) y el área interna o del lumen de los túbulos seminíferos, con el programa ImageJ (National Institutes of Health; NIH). El área del epitelio seminífero (AES) se expresa en  $\mu\text{m}^2$  y se determinó al restar el área interna al ATS.

#### **7.4.3 Determinación del índice histopatológico en el epitelio de los túbulos seminíferos**

Se le asignó un puntaje a cada túbulo seminífero evaluado, utilizando una escala del 1 al 6, según el daño observado, de acuerdo con lo establecido por Viguera-Villaseñor, et al. (2009) como sigue:

- Valor 1: plegamiento de la lámina basal, descamación celular.
- Valor 2: vacuolización epitelial, células multinucleadas, picnosis.
- Valor 3: túbulos sin espermátides.
- Valor 4: túbulos sin espermatocitos.
- Valor 5: túbulos sin espermatogonias.
- Valor 6: ausencia de todo tipo celular.

El índice histopatológico (IHP) se determina como la suma del puntaje obtenido por túbulo seminífero, con una magnitud adimensional.

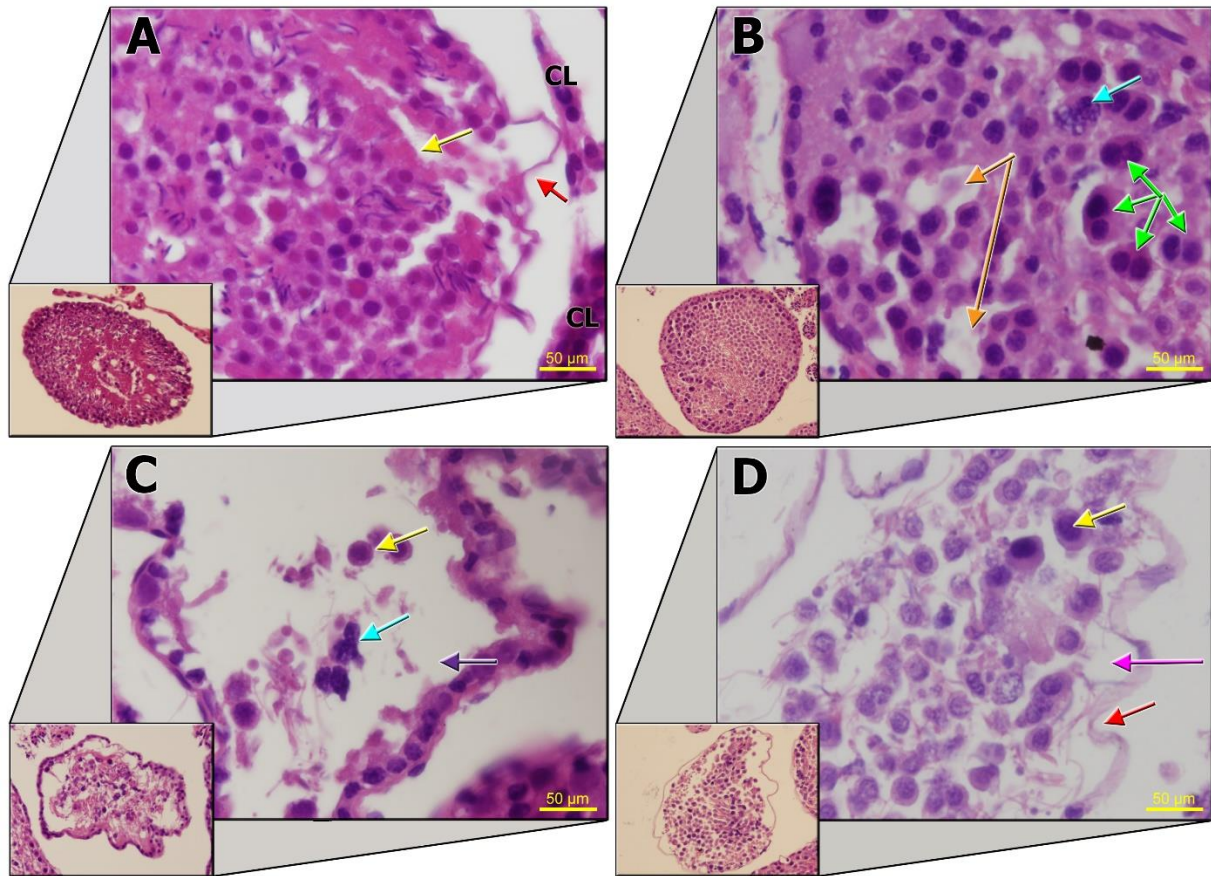
Es importante aclarar que cada característica mencionada tiene un valor individual. Por ejemplo, un túbulo con plegamiento de la lámina basal y descamación celular tiene un puntaje total de 2, mientras que un túbulo con descamación celular, picnosis<sup>18</sup> y células multinucleadas tiene un puntaje de 5. Los puntajes mínimos por obtener son de 0 (cuando un túbulo seminífero no presenta ningún daño), o de 1 (cuando un túbulo seminífero solo presenta plegamiento de la lámina basal o descamación celular), los cuales pueden indicar un deterioro leve del túbulo seminífero. El puntaje máximo por obtener es de 26 (cuando un túbulo seminífero presenta todas las características antes mencionadas), lo cual puede indicar un deterioro grave en la morfología del túbulo seminífero. Este índice siempre debe tener estudios complementarios que ayuden a aclarar si el daño observado sobre la morfología testicular es causado por agentes externos (como son los tóxicos reproductivos), o si es debido a cambios o deterioros fisiológicos inherentes a la salud de cada animal, como la edad, la dieta, ente otros.

En la Figura 9 se ilustran los parámetros evaluados para determinar el IHP, tomando como ejemplos imágenes representativas de túbulos seminíferos tratados con ambas dosis de BPS.

---

<sup>18</sup> Se conoce como picnosis a los cambios visibles en el núcleo celular, caracterizados por condensación de la cromatina y contracción del núcleo en respuesta a un daño celular. En la mayoría de los casos, la picnosis se asocia con la muerte celular, especialmente en casos de apoptosis (Lifeder, 2023).





**Figura 9. Parámetros para la determinación del Índice histopatológico.** Tinción H&E de cortes transversales de 5  $\mu\text{m}$  de espesor del testículo de ratas tratadas con BPSL (A y C) o BPSH (B y D) durante 4 meses. (A) Ampliación de un túbulo seminífero que presenta plegamiento de la lámina basal (flecha roja) y descamación celular (la flecha amarilla señala células en el lumen del túbulo seminífero que fueron desprendidas del epitelio). (B) Ampliación de un túbulo seminífero que presenta vacuolización epitelial (flechas naranjas), células multinucleadas (flechas verdes) y picnosis (flecha azul). (C) Ampliación de un túbulo seminífero que no tiene espermátides (flecha morada), descamación celular (flecha amarilla) y picnosis (flecha azul). (D) Ampliación de un túbulo seminífero que presenta una ausencia de todo tipo celular en el epitelio seminífero (la flecha rosa señala una ausencia de epitelio seminífero pegado a la lámina basal), lámina basal plegada (flecha roja) y descamación celular (flecha amarilla), lo cual indica una previa existencia de epitelio. BPS: bisfenol S; BPSH: Dosis alta de BPS (100 mg/kg pc/d); BPSL: Dosis baja de BPS (0.05 mg/kg pc/d); CL: Célula de Leydig; H&E: Hematoxilina-Eosina. Barra = 50  $\mu\text{m}$ . Imágenes en 20 y 60x.

## 7.5 Cuantificación de las proteínas de la BHT mediante la técnica de Western Blot

### 7.5.1 Extracción de proteína

Se preparó el amortiguador de lisis de radio inmunoprecipitación o “RIPA” (PBS 1X, NP-40 1%, deoxicolato de sodio 0.5%, SDS 0.1%, inhibidor de proteasas 1%) y se colocaron 200  $\mu$ L en cada microtubo para evitar que el tejido se degrade, se pesaron las muestras de testículo congelado y se dejaron descongelando en hielo. Una vez descongelados, los tejidos se colocaron en tubos de ensayo y, de acuerdo con lo reportado por Tian et al. (2018), se les añadió 1 mL de amortiguador de lisis por cada 130 mg de tejido pesado.

Se homogeneizaron las muestras con 3 pulsos de 10 segundos a máxima potencia, limpiando el cabezal del equipo con agua destilada entre cada muestra. Las muestras se centrifugaron a 14,000 g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante fue separado, etiquetado y guardado a -20°C hasta su cuantificación.

### 7.5.2 Cuantificación de proteínas mediante el método de Bradford

#### 7.5.2.1 Curva patrón

Se preparó una solución madre que contenía 10 mg de albúmina de suero bovino (BSA) en 1 mL de agua desionizada ( $H_2O_{dd}$ ), de la cual se tomaron 10  $\mu$ L y se aforaron a 100  $\mu$ L para generar una solución Stock de BSA con una concentración de 1 mg/mL.

Se preparó la siguiente curva patrón:

**Tabla 3.** Curva patrón para la cuantificación de proteínas totales mediante el método de Bradford.

Masa de BSA ( $\mu$ g)	Cantidad de solución Stock de BSA 1mg/mL ( $\mu$ L)	Cantidad de $H_2O_{dd}$ ( $\mu$ L)
0	0	10
0.5	0.5	9.5
1	1	9
2	2	8
3	3	7
4	4	6
5	5	5

BSA: Albúmina de suero bovino;  $H_2O_{dd}$ : Agua desionizada.

Se añadieron las cantidades mencionadas en la Tabla 3 en orden de derecha a izquierda en una placa de 96 micropozos por duplicado.

### 7.5.2.2 Preparación de las muestras

El sobrenadante extraído en la sección 497.5.1 *Extracción de proteína* fue descongelado para hacer una dilución 1:10 con amortiguador de lisis (dilución A). Después, a la dilución A se le realizó una dilución 2:10 con H<sub>2</sub>Odd (dilución B), de la cual se tomaron 10 µL y se colocaron en la placa de 96 micropozos por duplicado.

### 7.5.2.3 Cuantificación

El reactivo de Bradford se preparó al momento, realizando una dilución 1:5 del reactivo concentrado (500-0006, Biorad) con H<sub>2</sub>Odd. El reactivo diluido se mezcló homogéneamente y se filtró con un filtro de 0.22 µm manteniéndolo siempre en hielo.

Se añadieron 200 µL de reactivo de Bradford a cada micropozo de la placa, la cual contenía tanto las muestras de la curva patrón (Tabla 3) como la dilución B de las proteínas extraídas de los testículos. El reactivo se mezcló con la micropipeta en cada pozo, sin introducir burbujas a la placa. La mezcla se dejó incubar durante 5 min y se determinó la absorbancia de las muestras y de la curva patrón en un lector de placas (Epoch, Biotek) a 595 nm.

### 7.5.3 Electroforesis SDS-PAGE

Para la Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) se utilizó el equipo de Mini-PROTEAN® Tetra Cell (165-8006, BioRad), con el fin de separar las proteínas en las muestras del testículo.

Una vez separadas, las proteínas fueron transferidas del gel de poliacrilamida a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF), usando el equipo Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (170-3935, BioRad). Para un esquema general del proceso, véase el Anexo II.

#### 7.5.3.1 Preparación de los geles

Se limpiaron ambos vidrios del equipo con EtOH al 75%; al vidrio corto se le realizó una marca 1 cm por debajo del peine. Se pusieron los vidrios bien alineados en el bastidor y se ajustaron los marcos en el soporte (Figura AII.1a).

En un tubo falcon se preparó el gel separador a concentraciones de 10% (para separar CI-11 y CI-3), 8% (para el RA) o 15% (para separar Ocl, Cx-43, N-cad, ZO-1 y ZO-2), de acuerdo con las cantidades señaladas en el Anexo IIIA: preparación de reactivos para el Western Blot.

La mezcla se depositó entre ambos vidrios hasta la marca del vidrio corto y se añadió una cantidad suficiente de alcohol isopropílico para cubrir la parte superior del gel, con el fin de impedir el contacto con el aire, eliminar posibles burbujas formadas y alinear el gel con la marca en el vidrio.

Se dejó polimerizar el gel durante 15 minutos y, para todas las proteínas, se preparó el gel concentrador al 5% (Anexo IIIA). Cuando el gel separador polimerizó, se retiró el alcohol isopropílico, se enjuagó el gel con H<sub>2</sub>O y se secó cuidadosamente el espacio restante entre ambos vidrios con papel filtro cuidando de no tocar el gel.

Se agregó el gel concentrador sobre el gel separador polimerizado entre los vidrios, hasta llegar a la parte superior del vidrio corto. Inmediatamente después, se colocó el peine de 10 pozos de 1 mm de grosor sobre el gel concentrador. Este último se dejó polimerizar con el peine durante 15 min (Figura AII.1b).

#### **7.5.3.2 Preparación de las muestras**

Se preparó una muestra de cada grupo tratado por cada gel. De acuerdo con la cuantificación de proteína total en las muestras, se tomó lo equivalente a 30 µg de proteína de cada muestra y se colocó en microtubos etiquetados en hielo. Después, se añadió la cantidad correspondiente de amortiguador de carga 5x (Anexo IIIB) en cada tubo, y todos los tubos se mezclaron con el Vortex y se centrifugaron.

Finalmente, se desnaturalizaron las proteínas colocando las muestras en agua hirviendo durante 10 minutos e inmediatamente después se colocaron en hielo durante otros 10 minutos. En caso de observar residuos en las muestras, estas se volvieron a centrifugar antes de cargar el gel.

#### **7.5.3.3 Ensamblaje del módulo de electroforesis y carga de las muestras**

Se colocaron los vidrios en el marco de sujeción, con los vidrios cortos mirando hacia adentro. Se ajustaron los vidrios hasta el tope inferior y se aseguraron con los brazos del marco. El marco con los vidrios se colocó en el tanque, cuidando que coincidiera la marca roja del tanque con la marca roja del marco (Figura AII.1c).

Se llenó el marco de sujeción con amortiguador de corrida 1x (Anexo IIIC), se observó que el marco no tuviera fugas ni burbujas y se llenó el tanque hasta la marca de 2 geles.

Se retiró el peine de los geles y se cargaron 7.5 µL de marcador de peso molecular (1610375, Biorad) en el primer pozo de cada gel con una micropipeta; en los nueve pozos restantes se cargaron las

cantidades equivalentes a 30 µg de proteína de cada muestra, en orden de izquierda a derecha, cambiando de punta entre cada muestra y repetición, siempre manteniendo las muestras en hielo (Figura AII.1d).

Una vez cargados los geles, se colocó la tapa del tanque, de tal forma que los conectores tipo banana del marco de sujeción entraran en los conectores de la tapa. Se conectaron los cables a la fuente de poder y se corrieron los geles a 60 V, hasta que el frente de corrida pasó del gel concentrador al gel separador. Una vez ocurrido lo anterior, se cambió el voltaje a 110V y se continuó el proceso hasta que el frente de corrida llegó al final de gel sin salirse (Figura AII.1e).

Al finalizar la electroforesis, se sacaron los geles cuidadosamente del marco de sujeción, se separaron ambos geles con ayuda de la espátula del equipo y se desechó el gel concentrador (Figura AII.1f). El gel separador se equilibró con amortiguador de transferencia (Anexo IIID), junto con los papeles filtro y las fibras para la transferencia, durante 20 minutos.

#### **7.5.4 Transferencia**

Mientras los papeles filtro, fibras y geles se equilibraban en amortiguador de transferencia, se activaron las membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) con metanol durante 15 segundos (o hasta que se observó un cambio de blanco a traslúcido), después se enjuagaron con H<sub>2</sub>O durante 2 minutos y al final se dejaron al menos 5 minutos en amortiguador de transferencia.

Se montaron los componentes en el cassette, formando el sándwich de transferencia (Figura AII.2a) y el cassette se montó en el módulo de transferencia, cuidando que el lado negro del módulo coincida con el lado oscuro del cassette (Figura AII.2b).

El módulo se colocó en el tanque, cuidando nuevamente que los colores de los conectores tipo banana del módulo coincidieran con los colores de los conectores de la tapa. El tanque se asentó en una parrilla de agitación y se añadieron al tanque una barra de agitación magnética y el módulo de enfriamiento previamente congelado (Figura AII.2c). El tanque se llenó con amortiguador de transferencia frío hasta la marca “blotting” y se puso a agitar el sistema (Figura AII.2d).

Se colocó la tapa del tanque y se conectaron los cables a la fuente de poder, estableciendo una corriente de 110 V durante una hora (Figura AII.2e).

## 7.5.5 Inmunoblot

### 7.5.5.1 Preparación de anticuerpos y membranas

Se colocaron las membranas transferidas en recipientes con solución de bloqueo, la cual consiste en amortiguador tris salino-tween (TBS-T) con leche en polvo descremada al 10% (Anexo III E/F), y se incubaron durante una hora con agitación constante a temperatura ambiente.

Mientras se bloqueaban las membranas, se prepararon las diluciones de anticuerpos primarios con TBS-T para detectar las proteínas de interés, de acuerdo con la Tabla 4, tomando en cuenta un volumen de 7 mL de anticuerpo diluido por membrana.

**Tabla 4. Anticuerpos primarios y diluciones realizadas para la cuantificación de las proteínas de interés.**

Proteína de interés	Peso molecular aproximado (kDa)	Anticuerpo primario	No. de catálogo	Dilución utilizada
Cl-3	22	<u>Claudin 3 Polyclonal Antibody</u> <sup>R</sup>	34-1700*	1: 1,000
Cl-11	22	<u>Claudin 11 Polyclonal Antibody</u> <sup>R</sup>	36-4500*	1: 1,000
Cx-43	43	<u>Connexin 43 Polyclonal Antibody</u> <sup>R</sup>	71-0700*	2: 1,000
Ocl	65	<u>Occludin Monoclonal Antibody (OC-3F10)</u> <sup>M</sup>	33-1500*	1.5: 1,000
RA	110	<u>Androgen Receptor Antibody (441)</u> <sup>M</sup>	sc-7305**	1: 500
N-cad	127	<u>N-cadherin Monoclonal Antibody (3B9)</u> <sup>M</sup>	33-3900*	1: 1,000
ZO-2	160	<u>ZO-2 Polyclonal Antibody</u> <sup>R</sup>	71-1400*	1: 1,000
ZO-1	225	<u>ZO-1 Polyclonal Antibody</u> <sup>R</sup>	61-7300*	0.5: 1,000
GAPDH	37	<u>GAPDH Anticuerpo (FL-335)</u> <sup>R</sup>	sc-25779**	0.25:1,000

<sup>R</sup>: Anticuerpo de conejo (Rabbit). <sup>M</sup>: Anticuerpo de ratón (mouse).

\*Proveedor Invitrogen. \*\*Proveedor Santa Cruz Biotechnology.

Una vez transcurrido el tiempo de bloqueo, a cada membrana se le añadió el anticuerpo primario diluido correspondiente y las membranas se dejaron incubar toda la noche con agitación constante a 4°C.

Al día siguiente, a cada membrana se le realizaron 3 lavados de 10 minutos con TBS-T y se le añadió el anticuerpo secundario correspondiente (mouse anti-rabbit IgG-HRP o goat anti-mouse IgG-HRP sc-2357 o sc-2005, respectivamente de Santa Cruz Biotechnology, según sea el caso de acuerdo con lo indicado en la Tabla 4), a una dilución 1:1000, preparando 7 mL de anticuerpo secundario por membrana. Este anticuerpo se dejó incubar durante una hora, seguido de 3 lavados de 10 minutos con TBS-T.

### 7.5.5.2 Revelado y cuantificación de proteínas.

Una vez lavado el anticuerpo secundario, se preparó la solución reveladora con el sustrato Immobilon quimio luminiscente de peroxidasa de rábano picante (HRP) (WBKLS0500, Merck Millipore), para lo cual se mezclaron cantidades iguales de solución de peroxidasa y del reactivo luminol (1 mL de cada uno por membrana). Después, se tomaron las membranas con unas pinzas y a cada una se le retiró el exceso de TBS-T por capilaridad con un papel absorbente y se cubrió homogéneamente con la solución reveladora preparada, protegiendo el reactivo de la luz en todo momento y dejando actuar el reactivo por lo menos 5 minutos.

Utilizando el escáner para quimioluminiscencia LI-COR C-DiGit y el software Image Studio Digits Ver 5.2, se realizó el revelado de las membranas, colocándolas en la zona de escaneo, sobre una hoja de acetato con la cara que estuvo en contacto directo con el gel hacia abajo. Después, se les puso otra hoja de acetato encima y a cada membrana se le ejerció una leve presión con los dedos, realizando movimientos lentos sobre toda la superficie, con el fin de retirar cualquier burbuja de aire, siempre evitando que las membranas se secan durante el proceso.

Se cerró el equipo y se llevó a cabo el escaneo de cada membrana por separado, con el escáner y software antes mencionados, los cuales al finalizar el escaneo arrojan una imagen con bandas oscuras que representan las proteínas de interés. Las bandas de cada proteína fueron identificadas por su tamaño aproximado con respecto al marcador de peso molecular y, finalmente, fueron cuantificadas por densidad óptica con el mismo programa.

Una vez finalizada la cuantificación de la proteína de interés, las membranas se colocaron con unas pinzas en recipientes, con el lado que estuvo en contacto directo con el gel hacia abajo, y se les eliminaron los restos de solución reveladora al lavarlas 2 veces con TBS-T, durante 10 minutos c/u. Las membranas se bloquearon nuevamente durante 1 hora con la solución de bloqueo y se les colocó el anticuerpo que reconoce la proteína Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), la cual es usada como control de carga, a una dilución de 0.25:1,000 para todas las membranas (Tabla 4). Se repitieron los procesos de lavados, incubación con el anticuerpo secundario (mouse anti-rabbit IgG-HRP, dilución 1:1,000), revelado y cuantificación descritos anteriormente.

## **7.6 Análisis estadístico de los datos.**

Los resultados se presentaron como el promedio  $\pm$  error estándar de la media (EEM) de todos los datos obtenidos de la morfometría de los túbulos seminíferos y de la densidad óptica de las membranas obtenidas por Western Blot.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa GraphPad Prism versión 8.0.2. A los datos se les realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía, seguida de una prueba de comparación múltiple de Tukey, en el caso de los resultados de la morfometría de los túbulos seminíferos, o de Dunnett, en el caso de los resultados de densidad óptica de las membranas obtenidas por western blot, considerando una diferencia estadísticamente significativa con un valor de significancia de  $p < 0.05$ .



## 8. Resultados

### 8.1 Morfometría de los túbulos seminíferos

En la Tabla 5 se presentan los resultados de la cuantificación del índice de maduración (IM) de los túbulos seminíferos. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados respecto al control, por lo que no se detectó un efecto adverso producido por el tratamiento con ninguna de las dos dosis de BPS o con los antioxidantes evaluados durante el CES en este índice.

**Tabla 5. Cuantificación del índice de maduración (IM) o de Johnsen de los túbulos seminíferos.** Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  EEM, ordenados por antioxidante probado y de acuerdo con los rangos de etapas del CES establecidos.

Tratamientos con AF	Etapas del CES		
	I-VII	VIII-IX*	IX**-XIV
<i>Control</i>	8.72 $\pm$ 0.09	9.87 $\pm$ 0.05	8.55 $\pm$ 0.11
<i>AF</i>	8.73 $\pm$ 0.11	9.87 $\pm$ 0.05	8.44 $\pm$ 0.10
<i>BPSH</i>	8.54 $\pm$ 0.11	9.87 $\pm$ 0.04	8.54 $\pm$ 0.12
<i>BPSH+AF</i>	8.68 $\pm$ 0.13	9.69 $\pm$ 0.06	8.31 $\pm$ 0.08
<i>BPSL</i>	8.84 $\pm$ 0.11	9.86 $\pm$ 0.04	8.46 $\pm$ 0.10
<i>BPSL+AF</i>	8.42 $\pm$ 0.10	9.95 $\pm$ 0.03	8.26 $\pm$ 0.08
Tratamientos con VE	Etapas del CES		
	I-VII	VIII-IX*	IX**-XIV
<i>Control</i>	8.72 $\pm$ 0.09	9.87 $\pm$ 0.05	8.55 $\pm$ 0.11
<i>VE</i>	8.63 $\pm$ 0.11	9.81 $\pm$ 0.06	8.38 $\pm$ 0.08
<i>BPSH</i>	8.54 $\pm$ 0.11	9.87 $\pm$ 0.04	8.54 $\pm$ 0.12
<i>BPSH+VE</i>	8.49 $\pm$ 0.13	9.88 $\pm$ 0.05	8.58 $\pm$ 0.11
<i>BPSL</i>	8.84 $\pm$ 0.11	9.86 $\pm$ 0.04	8.46 $\pm$ 0.10
<i>BPSL+VE</i>	8.74 $\pm$ 0.13	9.92 $\pm$ 0.03	8.8 $\pm$ 0.12

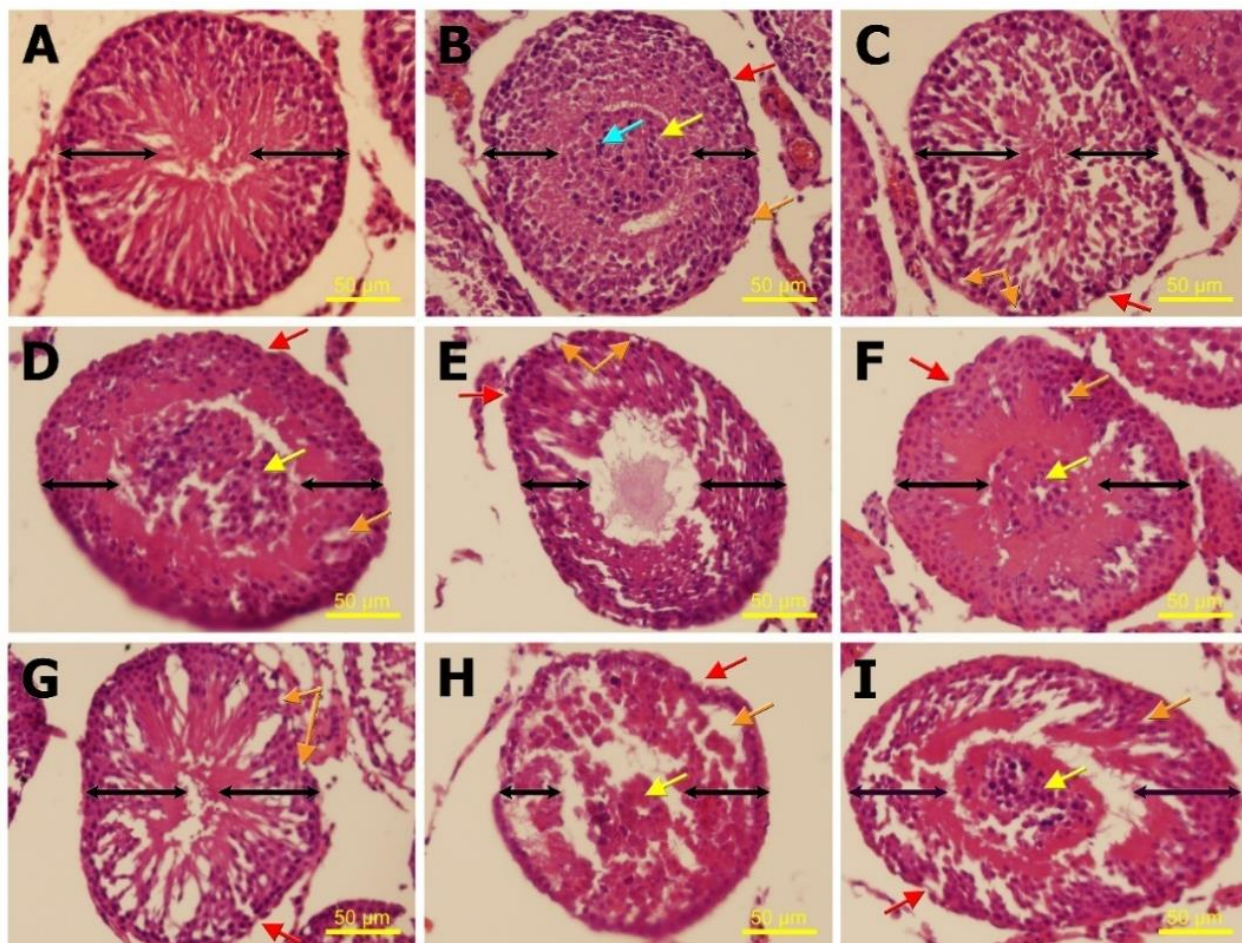
IX\*: Etapa IX temprana del CES; IX\*\* Etapa IX tardía del CES; AF: Ácido fólico (20 mg/kg pc/d); BPS: bisfenol S; BPSH: Dosis alta de BPS (100 mg/kg pc/d); BPSL: Dosis baja de BPS (0.05 mg/kg pc/d); VE: Vitamina E (100 mg/kg pc/d). Se evaluaron 50 túbulos por animal, n= 3 animales por tratamiento.

En las Figuras 10, 11 y 12 se muestran imágenes representativas de los túbulos seminíferos en los rangos de etapas del CES evaluados (I-VII, VIII-IX y IX\*-XIV, respectivamente), de ambas dosis de BPS y ambos antioxidantes administrados en el presente estudio, con el fin de representar tanto los resultados del área del epitelio seminífero (AES), como del índice histopatológico (IHP).

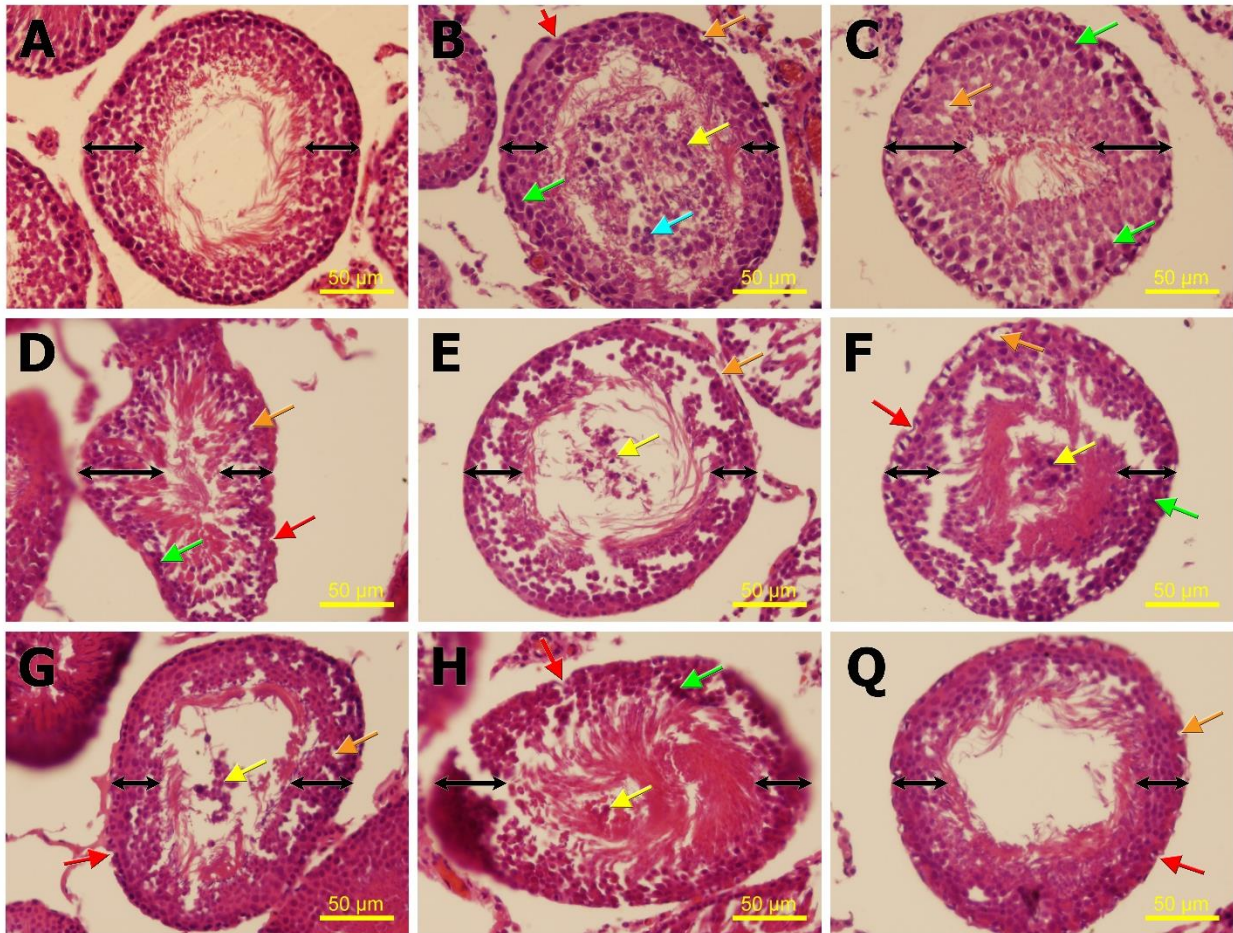
En estas figuras se observó que, en general, los tratamientos con ambas dosis de BPS y ambos antioxidantes, así como sus respectivas combinaciones, reducen el AES en las diferentes etapas del CES, y que las características evaluadas para determinar el IHP varían en cada túbulo seminífero evaluado. Por ejemplo, en el rango de etapas I-VII y VIII-IX\* todos los tratamientos presentaron al menos dos características evaluadas para determinar el IHP respecto al grupo control (Figura 10 y 11 B-I), mientras que, al igual que el grupo control (Figuras 10-12A), en el rango de etapas IX\*\*-XIV el tratamiento con dosis baja de BPS (BPSL) no presentó ningún daño (Figura 12C), aunque en estas etapas el resto de los tratamientos presentaron al menos dos características evaluadas respecto al grupo control.

Si bien en las Figuras 10, 11 y 12 se presentan imágenes que representan lo que ocurría con más frecuencia en cada tratamiento, en general se observó una alta heterogeneidad en los resultados de morfometría, exceptuando el grupo control, pues cada túbulo seminífero evaluado para cada tratamiento presentaba diferencias en el nivel de daño observado y se observaron morfologías epiteliales diferentes después de realizar una comparación entre imágenes del mismo grupo experimental con ambas técnicas de fijación y tinción utilizadas en el presente estudio (véase apartado 7.3 Histología del tejido).

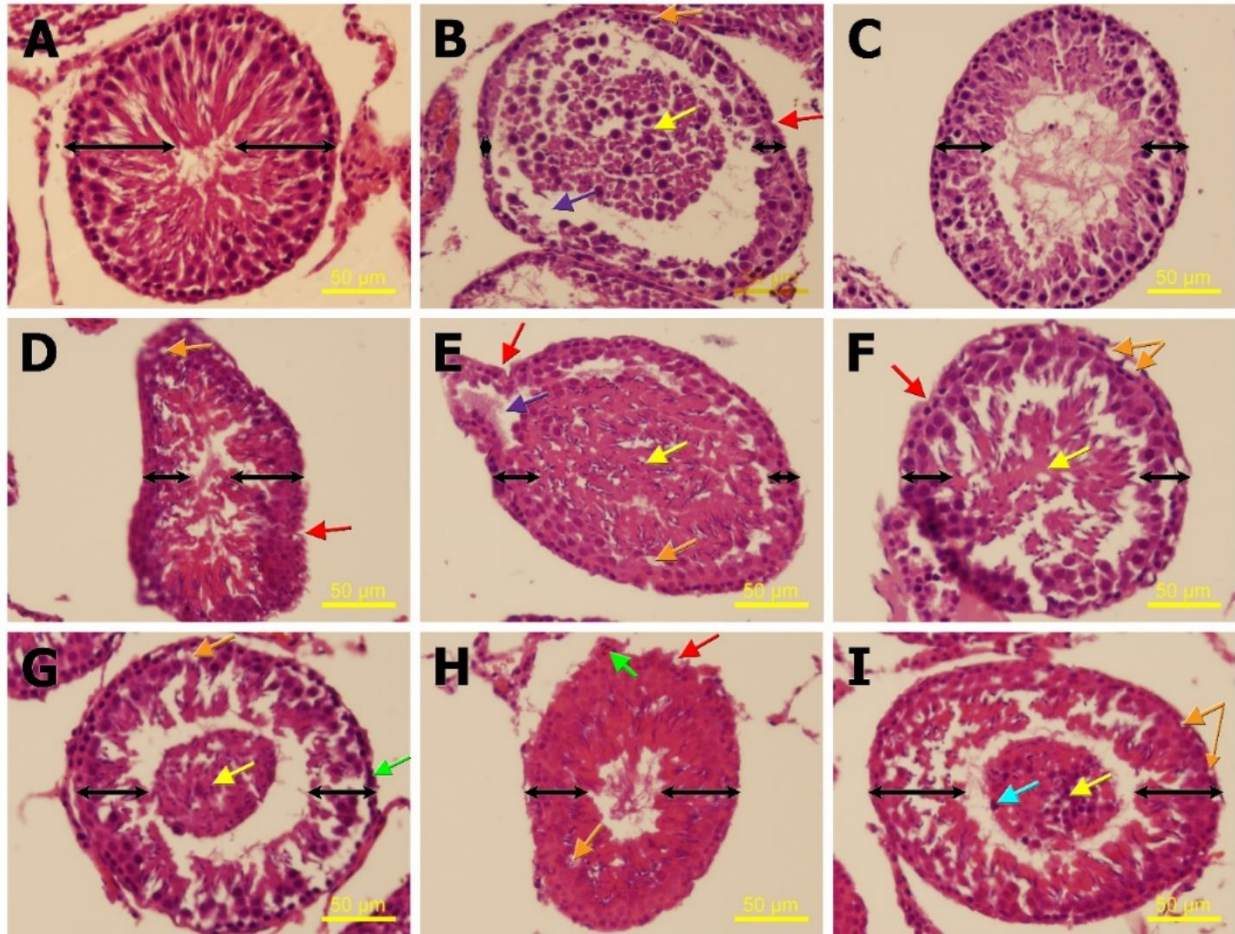
En la Figura 13 se demuestra un poco esta heterogeneidad, pues se observó que, si bien en el grupo control se observó un epitelio similar en ambas tinciones realizadas (Figura 13AI y AII), en los demás tratamientos se apreciaban diferencias en el epitelio de un mismo tratamiento. Por ejemplo, en la Figura 13B (que corresponde al tratamiento con BPSH) se observan diferencias, pues en la Figura 13BI se muestra un epitelio descamado, mientras que en la Figura 13BII el epitelio se ve normal. Esto mismo ocurre con las Figuras 13CI y 13CII. Finalmente, en la Figura 13E se resalta el error en la fijación que causó que en el presente proyecto se tuviera que trabajar con dos técnicas de fijación y tinción diferentes, pues, a diferencia de un tejido bien fijado con la misma técnica (Figura 13D), esta figura presenta burbujas entre la lámina basal y el epitelio del túbulo seminífero mostrado, las cuales pueden interferir al determinar el AES y el IHP.



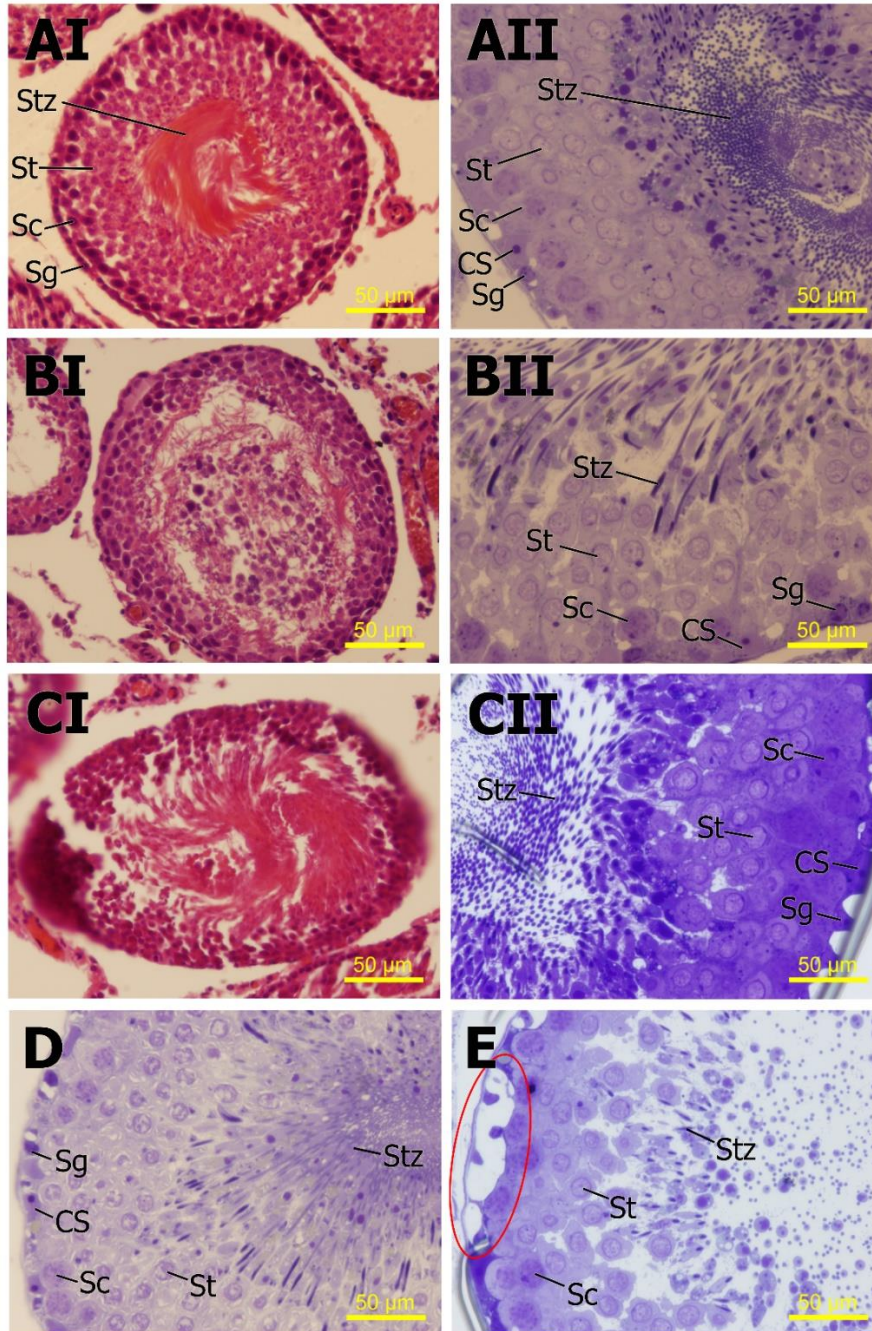
**Figura 10.** Imágenes representativas del AES e IHP de los túbulos seminíferos en el rango de etapas I a VII del CES de los grupos tratados con ambas dosis de BPS y ambos antioxidantes. Tinción H&E de cortes transversales de 5 µm de espesor del testículo de ratas tratadas con BPS y/o AF o VE durante 4 meses. (A) Grupo control; (B) BPSH; (C) BPSL; (D) AF; (E) BPSH+AF; (F) BPSL+AF; (G) VE; (H) BPSH+VE; (I) BPSL+VE. Las flechas negras simbolizan el grosor de los túbulos seminíferos para denotar el AES; las flechas de colores indican las características evaluadas para determinar el IHP como previamente se señaló en la Figura 9 (las flechas amarillas señalan descamación celular, las flechas rojas plegamiento de la membrana basal, las verdes células multinucleadas, las naranjas vacuolización epitelial y la flecha azul picnosis celular). AES: área del epitelio seminífero; AF: Ácido fólico (20 mg/kg pc/d); BPSH: Dosis alta de BPS (100 mg/kg pc/d); BPSL: Dosis baja de BPS (0.05 mg/kg pc/d); CES: ciclo del epitelio seminífero; H&E: Hematoxilina-Eosina; IHP: Índice histopatológico; VE: Vitamina E (100 mg/kg pc/d). Se muestra una imagen de cada tratamiento en 20x. Se evaluaron 50 túbulos por animal, n= 3 animales por tratamiento. Barra = 50 µm.



**Figura 11.** Imágenes representativas del AES e IHP de los túbulos seminíferos en el rango de etapas VIII a IX temprana del CES de los grupos tratados con ambas dosis de BPS y ambos antioxidantes. Tinción H&E de cortes transversales de 5 µm de espesor del testículo de ratas tratadas con BPS y/o AF o VE durante 4 meses. (A) Grupo control; (B) BPSH; (C); BPSL; (D) AF; (E) BPSH+AF; (F) BPSL+AF; (G) VE; (H) BPSH+VE; (I) BPSL+VE. Las flechas negras simbolizan el grosor de los túbulos seminíferos para denotar el AES; las flechas de colores indican las características evaluadas para determinar el IHP como previamente se señaló en la Figura 9 (las flechas amarillas señalan descamación celular, las flechas rojas plegamiento de la membrana basal, las verdes células multinucleadas, las naranjas vacuolización epitelial y la flecha azul picnosis celular). AES: área del epitelio seminífero; AF: Ácido fólico (20 mg/kg pc/d); BPSH: Dosis alta de BPS (100 mg/kg pc/d); BPSL: Dosis baja de BPS (0.05 mg/kg pc/d); CES: ciclo del epitelio seminífero; H&E: Hematoxilina-Eosina; IHP: Índice histopatológico; VE: Vitamina E (100 mg/kg pc/d). Se muestra una imagen de cada tratamiento en 20x. Se evaluaron 50 túbulos por animal, n= 3 animales por tratamiento. Barra = 50 µm.



**Figura 12.** Imágenes representativas del AES e IHP de los túbulos seminíferos en el rango de etapas IX tardía a XIV del CES de los grupos tratados con ambas dosis de BPS y ambos antioxidantes. Tinción H&E de cortes transversales de 5 µm de espesor del testículo de ratas tratadas con BPS y/o AF o VE durante 4 meses. (A) Grupo control; (B) BPSH; (C); BPSL; (D) AF; (E) BPSH+AF; (F) BPSL+AF; (G) VE; (H) BPSH+VE; (I) BPSL+VE. Las flechas negras simbolizan el grosor de los túbulos seminíferos para denotar el AES; las flechas de colores indican las características para determinar el IHP como previamente se señaló en la Figura 9 (las flechas amarillas señalan descamación celular, las flechas rojas plegamiento de la membrana basal, las verdes células multinucleadas, las naranjas vacuolización epitelial y la flecha azul picnosis celular). AF: Ácido fólico (20 mg/kg pc/d); BPSH: Dosis alta de BPS (100 mg/kg pc/d); BPSL: Dosis baja de BPS (0.05 mg/kg pc/d); CES: ciclo del epitelio seminífero; H&E: Hematoxilina-Eosina; VE: Vitamina E (100 mg/kg pc/d). Se muestra una imagen representativa de cada tratamiento en 20x. Se evaluaron 50 túbulos por animal, n= 3 animales por tratamiento. Barra = 50 µm.

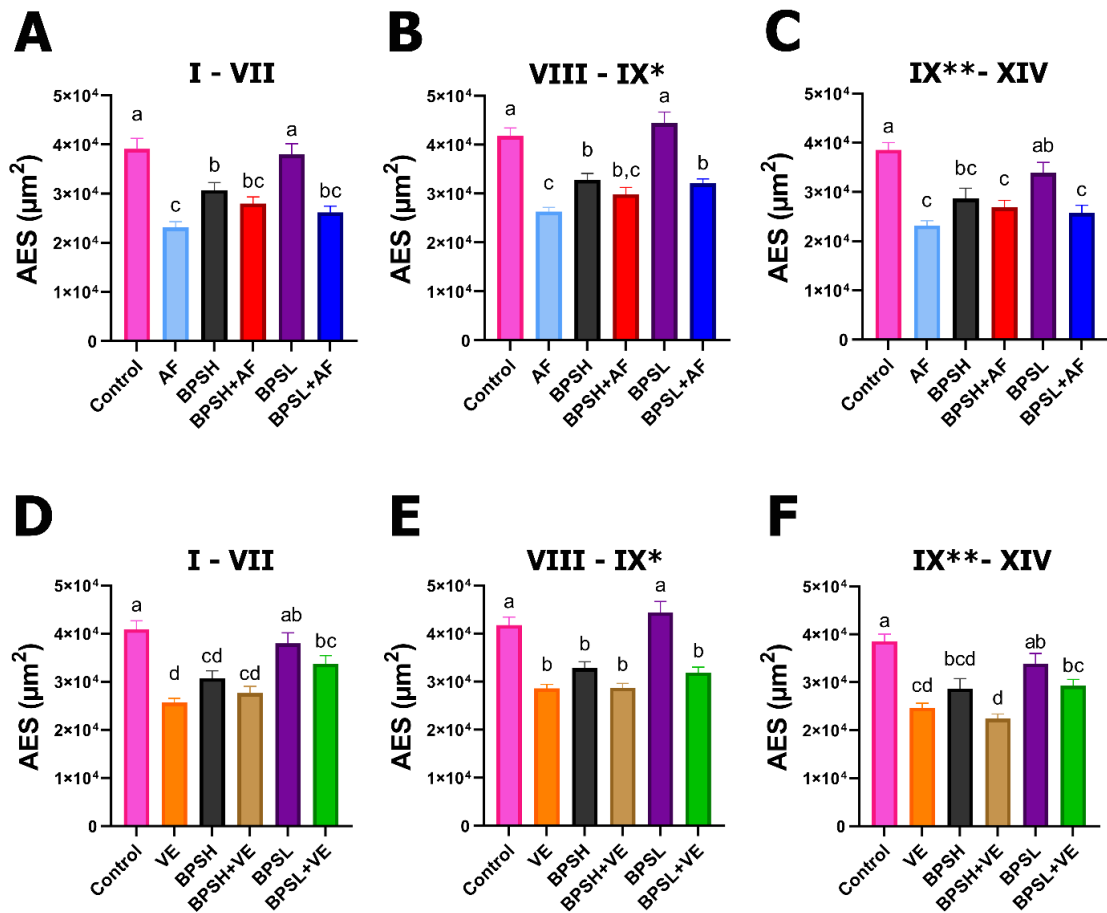


**Figura 13. Imágenes representativas de la heterogeneidad de los resultados presentados y errores en la fijación del tejido.** Tinción H&E (AI, BI y CI) o azul de toluidina 0.5% (AII, BII, CII, D y E) de cortes transversales de 5 y 1 µm de espesor, respectivamente, de los grupos experimentales: control (AI y AII); BPSH (BI y BII); BPSH+VE (CI y CII); AF (D) y BPSL+AF (E). Las imágenes AI y AII muestran un epitelio normal, similar entre ambas tinciones. Las imágenes BI y CI muestran un epitelio descamado, mientras que BII y CII muestran un epitelio normal; La imagen E muestra una mala fijación del tejido (señalado con un círculo rojo) a comparación de un tejido bien fijado (imagen D). En todas las imágenes se observan todos los tipos celulares presentes durante las etapas VIII-IX del CES. AF: ácido fólico (20 mg/kg pc/d); BPS: bisfenol S; BPSH: Dosis alta de BPS (100 mg/kg pc/d); BPSL: Dosis baja de BPS (0.05 mg/kg pc/d); CES: ciclo del epitelio seminífero; CS: célula de Sertoli; H&E: Hematoxilina-Eosina; Sc: espermatoцитos; Sg: espermatoгонias; St: espermátides; Stz: espermatozoides; VE: vitamina E (100 mg/kg pc/d). Barra = 50 µm. Imágenes en 20 y 60x.

Respecto al área del epitelio seminífero (AES), en las Figura 14A, B y C, se observó que la dosis alta de BPS (BPSH) disminuyó el AES respecto al grupo control en todas las etapas del CES. En cambio, la dosis baja de BPS (BPSL) no produjo, por sí sola, un cambio significativo en el AES respecto al grupo control. Ambos antioxidantes evaluados disminuyeron, por sí solos, el AES respecto al grupo control en los tres rangos de etapas estudiados.

En todas las etapas del CES, los animales tratados con la dosis alta de BPS y AF (BPSH +AF) no presentaron una mayor reducción del AES respecto al grupo tratado con BPSH (Figura 14A-C). Este mismo comportamiento se observó en el grupo tratado con BPSH y VE (BPSH+VE) en todas las etapas del CES (Figura 14D-F).

El tratamiento conjunto de BPSL+AF produjo una disminución del AES respecto al grupo control y respecto al grupo tratado con BPSL en todas las etapas del CES (Figura 14A-C). Esto mismo se observó al tratar a los animales con BPSL+VE durante las etapas VIII-IX\* del CES, pues este grupo disminuyó el AES respecto al grupo control y al BPSL (Figura 14E). En cambio, durante las etapas I-VII y IX\*\*-XIV del CES, el tratamiento conjunto de BPSL+VE tuvo el mismo comportamiento que la dosis alta con este antioxidante (BPSH+VE), pues disminuyó el AES respecto al grupo control, más no respecto al grupo BPSL (Figura 14D y F).



**Figura 14.** Cuantificación del AES, en los diferentes rangos de etapas del CES establecidos para la evaluación morfológica de los túbulos seminíferos. (A-C) AES de los animales tratados con ambas dosis de BPS y el antioxidante AF. (D-F) AES de los animales tratados con ambas dosis de BPS y el antioxidante VE. (A y D) Etapas I a VII del CES. (B y E) Etapas VIII a IX temprana del CES. (C y F) Etapas IX tardía a XIV del CES. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  EEM. Las barras que no comparten una misma letra son significativamente diferentes entre ellas ( $p < 0.05$ ), de acuerdo con el análisis estadístico realizado mediante la prueba de ANOVA de una vía seguida de una comparación múltiple de Tukey.  $n = 3$  animales por tratamiento. IX\*: Etapa IX temprana del CES; IX\*\*: Etapa IX tardía del CES. AES: área del epitelio seminífero; AF: Ácido fólico (20 mg/kg pc/d); BPSH: Dosis alta de BPS (100 mg/kg pc/d); BPSL: Dosis baja de BPS (0.05 mg/kg pc/d); CES: Ciclo del epitelio seminífero; VE: Vitamina E (100 mg/kg pc/d).

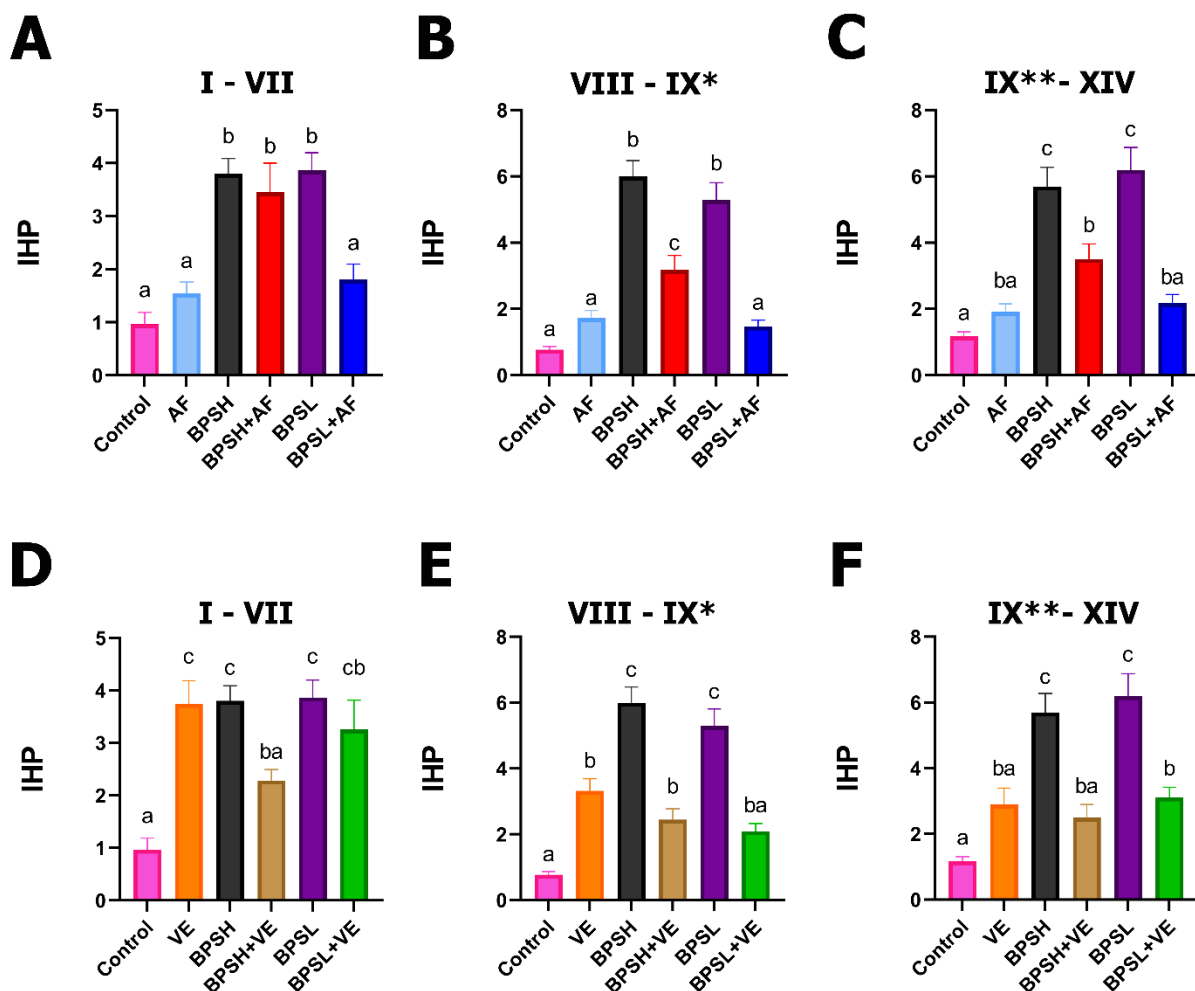


En la Figura 15 se observa que, durante todas las etapas del CES, el tratamiento de los animales con ambas dosis de BPS aumentó el índice histopatológico (IHP) de los túbulos seminíferos respecto al grupo control. Así mismo, durante las etapas I-VII y VIII-IX\* del CES, el antioxidante VE provocó un aumento en el IHP respecto al grupo control (Figura 15D y E). Sin embargo, este grupo presentó valores similares del IHP respecto al grupo control durante las etapas IX\*\*-XIV del CES (Figura 15F). Por el contrario, el tratamiento con AF no provocó cambios en el IHP respecto al grupo control en ninguna etapa del CES (Figura 15A-C).

En el rango de etapas I-VII del CES, el AF promovió un efecto protector en el IHP de los túbulos seminíferos contra los efectos dañinos provocados por la exposición a la dosis baja de BPS, pues el IHP del tratamiento conjunto de BPSL+AF disminuyó respecto al grupo tratado solo con BPSL, llegando a valores similares al grupo control (Figura 15A). En el caso de la dosis alta, el AF no presentó un efecto protector, ya que el grupo tratado conjuntamente con BPSH+AF presentó valores del IHP similares al grupo BPSH (Figura 15A). Por el contrario, la VE solo presentó un efecto protector en el IHP al ser administrado de forma conjunta con la dosis alta del BPS, pues el grupo de BPSH+VE exhibió una disminución significativa respecto al grupo tratado con BPSH, también llegando a valores similares al grupo control, mientras que el grupo de BPSL+VE no mostró diferencias respecto al grupo BPSL (Figura 15D).

En el rango de etapas VIII-IX\* del CES, ambos antioxidantes presentaron un efecto protector en el IHP contra los efectos dañinos provocados por ambas dosis de BPS. Si bien los tratamientos de BPSH+AF y BPSH+VE aumentaron el IHP respecto al grupo control, en ambos casos se observó una disminución respecto al grupo tratado con BPSH (Figura 15B y E). Mientras tanto, los tratamientos con BPSL+AF y BPSL+VE disminuyeron el IHP respecto al grupo tratado con BPSL (Figura 15B y E).

En el rango de etapas IX\*\*-XIV del CES, ambos antioxidantes también presentan un efecto protector sobre el IHP contra los efectos perjudiciales de ambas dosis de BPS. Si bien los tratamientos de BPSH+AF y BPSL+VE aumentaron del IHP respecto al grupo control, ambos tratamientos redujeron el IHP respecto a las dosis de BPS correspondiente (Figura 15C y F). De forma semejante, los tratamientos BPSH+VE y BPSL+AF disminuyeron los valores del IHP respecto a su respectiva de BPS, mostrando valores semejantes a los del grupo control (Figura 15C y F).



**Figura 15. Cuantificación del IHP en los diferentes rangos de etapas del CES establecidos para la evaluación morfológica de los túbulos seminíferos.** (A-C) IHP de los de los animales tratados con ambas dosis de BPS y el antioxidante AF (D-F) IHP de los animales tratados con ambas dosis de BPS y el antioxidante VE. (A y D) Etapas I a VII del CES. (B y E) Etapas VIII a IX temprana del CES. (C y F) Etapas IX tardía a XIV del CES. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  EEM. Las barras que no comparten una misma letra son significativamente diferentes entre ellas ( $p < 0.05$ ), de acuerdo con el análisis estadístico realizado mediante la prueba de ANOVA de una vía seguida de una comparación múltiple de Tukey. Se evaluaron 50 túbulos por animal,  $n = 3$  animales por tratamiento IX\*: Etapa IX temprana del CES; IX\*\*: Etapa IX tardía del CES. AF: Ácido fólico (20 mg/kg pc/d); BPSH: Dosis alta de BPS (100 mg/kg pc/d); BPSL: Dosis baja de BPS (0.05 mg/kg pc/d); CES: ciclo del epitelio seminífero; IHP: índice histopatológico; VE: Vitamina E (100 mg/kg pc/d).

## 8.2 Expresión de las proteínas de la BHT y del receptor de andrógenos

Por medio de la técnica de Western Blot, se evaluó el efecto que tuvo la administración de las dos diferentes dosis de BPS y los antioxidantes estudiados sobre la expresión de las proteínas<sup>19</sup> de la BHT y el receptor de andrógenos (RA) en el testículo de los animales tratados. El análisis se realizó por triplicado, usando en cada ocasión el tejido de un animal diferente de cada tratamiento (n=3). Cada uno de los resultados se cuantificó por medio de la evaluación de la densidad óptica de las bandas obtenidas para cada proteína evaluada, y fue corregida con la densidad óptica del control de carga GAPDH.

Solamente se detectaron cambios estadísticamente significativos sobre la expresión de la proteína ZO-1 en la BHT de los grupos tratados con ambas dosis de BPS y ambos antioxidantes, respecto al grupo control. La mayoría de los tratamientos, con excepción del tratamiento con vitamina E (VE), indujeron una disminución significativa de la expresión de esta proteína respecto al grupo control (Figura 16 y 17). El grupo que presentó la disminución más importante fue el tratado con la dosis alta de BPS (BPSH). La coadministración de BPSH con cualquiera de los dos antioxidantes (BPSH+AF o BPSH+VE) tendió a aumentar la expresión de ZO-1 respecto al grupo BPSH, aunque esto no fue significativo (Figura 16 y 17). En contraste, la coadministración de la dosis baja de BPS (BPSL) con cualquiera de los dos antioxidantes (BPSL+AF o BPSL+VE) no cambió la expresión de ZO-1, respecto al grupo BPSL (Figura 16 y 17).

No se observaron cambios significativos sobre la expresión de las demás proteínas evaluadas, pero se observaron tendencias a aumentar o disminuir su expresión como se indica a continuación.

La expresión de la Cl-3 no cambió demasiado en los animales tratados con ambos antioxidantes respecto a los animales del grupo control (Figura 16 y 17). Los tratamientos con BPS aumentaron la expresión de esta proteína en el testículo respecto al grupo control, aunque este aumento no fue significativo. La dosis alta de BPS aumentó más la expresión de la Cl-3 respecto a la dosis baja (Figura 16 y 17). La administración conjunta de BPS con ácido fólico (AF) provocó un comportamiento diferente dependiente de la dosis de BPS aplicada. Mientras que en el grupo de la dosis alta de BPS (BPSH+AF) se observó un aumento de la expresión de la Cl-3 respecto al grupo BPSH, en el grupo de la dosis baja de BPS (BPSL+AF) se detectó una disminución de la expresión de esta proteína (Figura 16). En el caso de la administración conjunta del BPS con vitamina E (VE), en ambas dosis de BPS se advirtió que la administración de VE indujo un incremento en la expresión de la Cl-3 respecto a los grupos tratados

---

<sup>19</sup> Para la presente tesis, el término “expresión de proteína” hace referencia a la cantidad total de dicha proteína presente en el testículo de rata al momento del sacrificio de los animales.

solamente con BPS (Figura 17). Los cambios observados en la coadministración de ambas dosis de BPS con ambos antioxidantes tampoco fueron significativos.

En el caso de la CI-11, mientras que el ácido fólico (AF) no cambió demasiado la expresión de esta proteína en el testículo (Figura 16), la vitamina E (VE) disminuyó su expresión, aunque no de forma significativa (Figura 17). Ambas dosis de BPS disminuyeron la expresión de esta proteína en el testículo, pero la diferencia no fue significativa. Al llevar a cabo el tratamiento conjunto de BPS con los antioxidantes, se presentó un comportamiento similar al observado en la CI-3. El tratamiento conjunto de ambas dosis de BPS+VE indujo un aumento en la expresión de esta proteína en los testículos, respecto a los grupos tratados solamente con el BPS (Figura 17). Esto mismo se observó en el grupo de la dosis alta de BPS con ácido fólico (BPSH+AF), en el que se presentó un aumento en la expresión de la CI-11 respecto al grupo BPSH, mientras que en el grupo de la dosis baja de BPS con este antioxidante (BPSL+AF) se percibió una disminución de la expresión respecto al grupo BPSL (Figura 16). Sin embargo, ninguno de estos cambios fue significativo.

La expresión de la Cx-43 en el testículo aumentó en todos los grupos tratados respecto al grupo control (Figura 16 y 17), siendo el grupo del AF el que exhibió un aumento más prominente (Figura 16), aunque no lo suficiente para ser significativo.

Los niveles de expresión de Ocl en los grupos tratados fueron semejantes a los detectados en el testículo del grupo control, a excepción de los grupos BPSH+AF, BPSL+AF y BPSL+VE en los que la expresión de esta proteína fue menor, aunque no estadísticamente significativa (Figura 16 y 17).

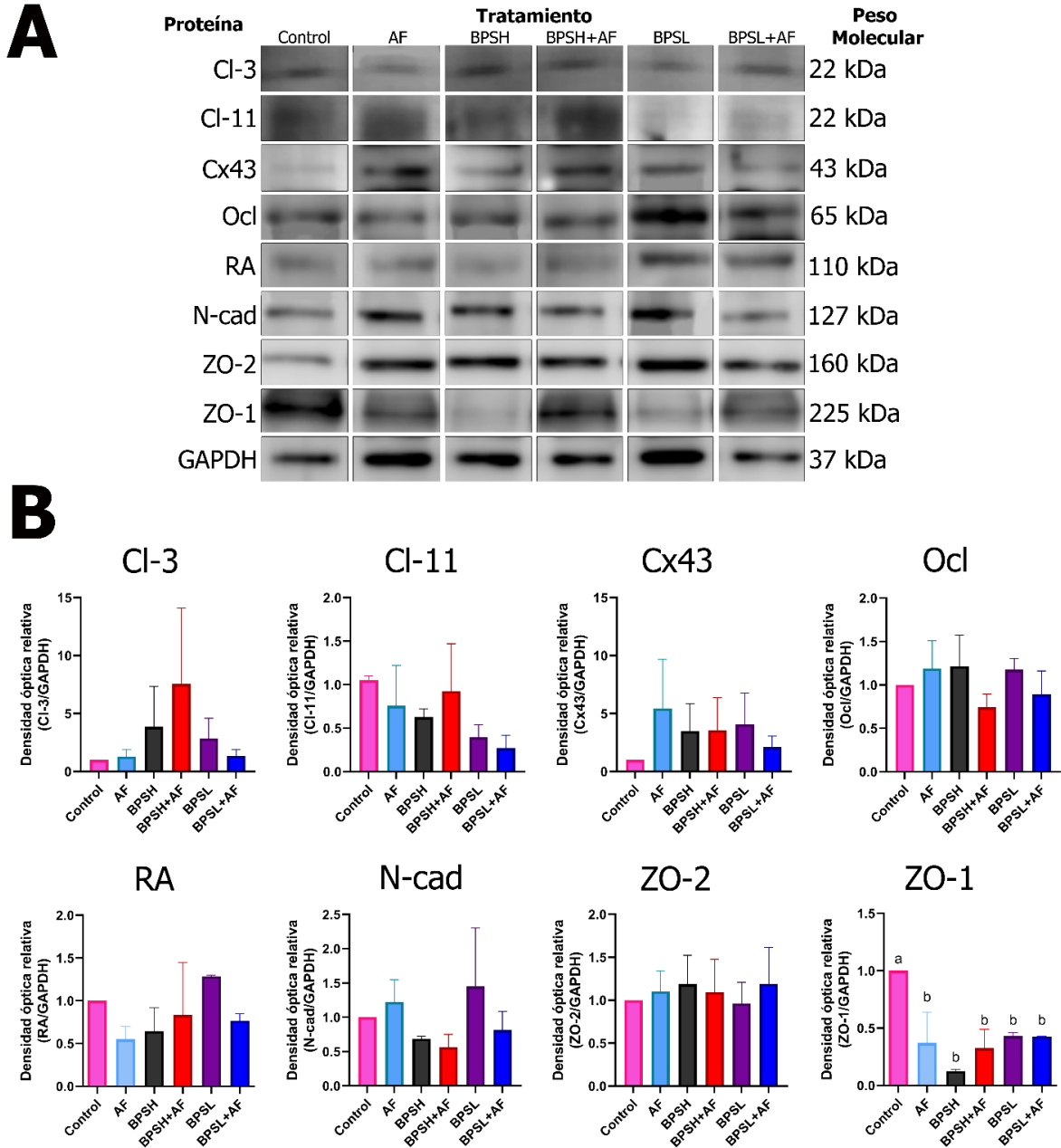
Los dos antioxidantes evaluados (AF y VE) disminuyeron la expresión del receptor de andrógenos (RA) en el testículo respecto al grupo control, aunque esta diferencia no fue significativa (Figura 16 y 17). El tratamiento con la dosis alta de BPS (BPSH) también redujo la expresión de esta proteína respecto al grupo control. La coadministración con BPSH+VE no cambió la expresión del RA, mientras que el tratamiento conjunto con AF produjo un ligero incremento de la expresión, ambas respecto al grupo BPSH (Figura 16 y 17). En contraste, el tratamiento con la dosis baja de BPS (BPSL) produjo un ligero incremento no significativo de la expresión del RA respecto al grupo control. El tratamiento conjunto de BPSL, tanto con el ácido fólico como con la vitamina E, produjo un descenso en la expresión del RA, respecto al grupo BPSL, siendo este descenso más prominente en el co-tratamiento con vitamina E (Figura 16 y 17).

La expresión de la N-cad no presentó gran cambio en los grupos que solo fueron tratados con los antioxidantes (AF o VE) (Figura 16 y 17). Se advirtió una disminución en los niveles de esta proteína en el

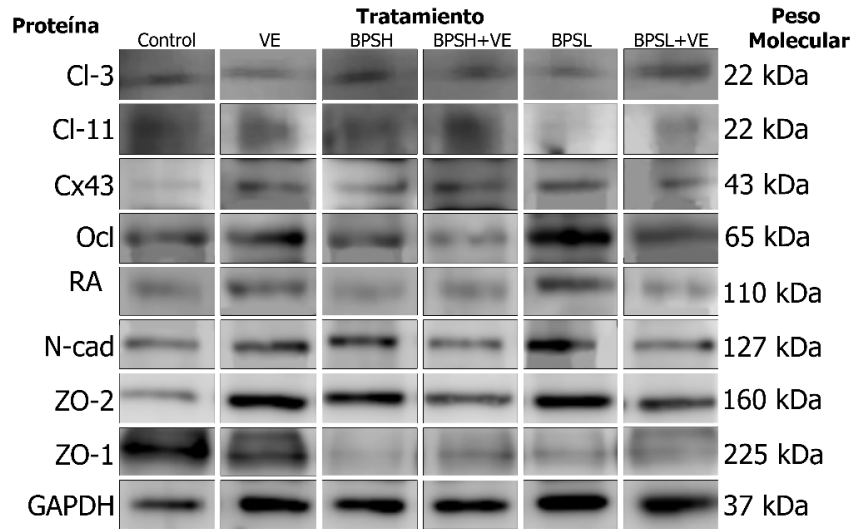
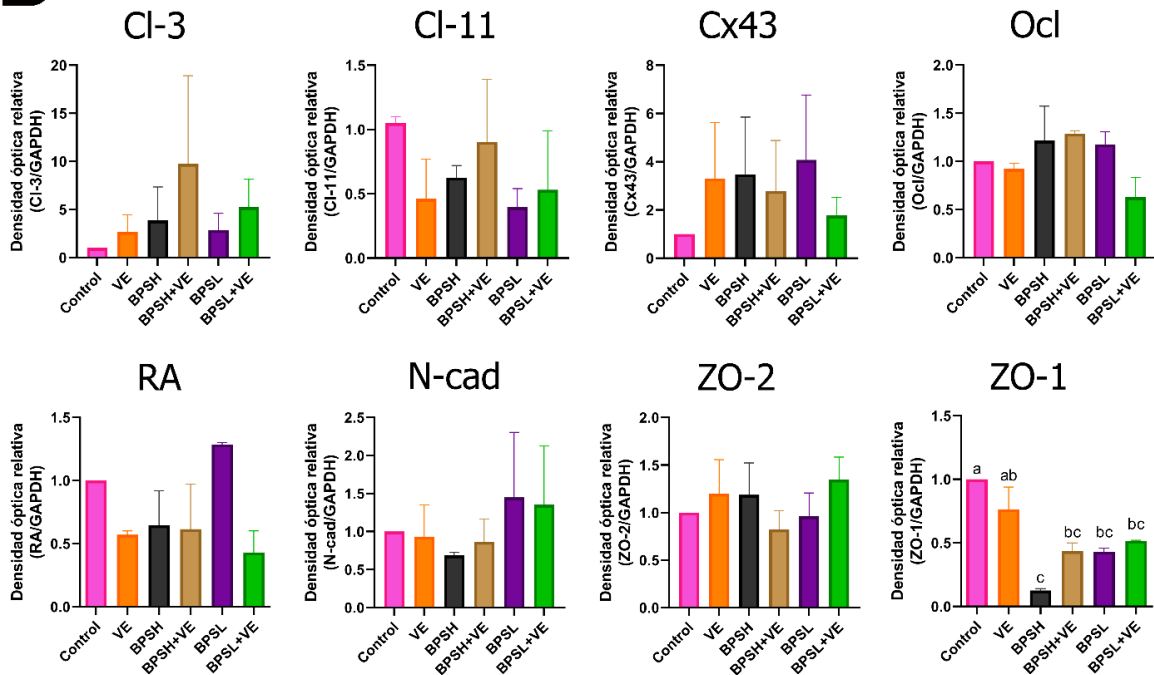
grupo que recibió la dosis alta de BPS (BPSH) respecto al grupo control, pero esta diferencia no fue significativa. El tratamiento conjunto de BPSH y los antioxidantes produjo un efecto inverso. Mientras que el tratamiento conjunto de BPSH+VE aumentó los niveles de N-cad respecto al grupo BPSH (Figura 17), el tratamiento conjunto de BPSH+AF disminuyó aún más la expresión de esta proteína (Figura 16). Contrario a la dosis alta de BPS, el tratamiento con la dosis baja de BPS (BPSL) produjo un ligero incremento de la expresión de esta proteína respecto al grupo control. El ácido fólico (AF) produjo el mismo efecto en la administración conjunta con ambas dosis de BPS, disminuyendo la expresión de la proteína respecto al tratamiento solo con el BPS correspondiente (Figura 16). Por otro lado, el tratamiento conjunto con vitamina E (VE) produjo efectos contrarios con las diferentes dosis de BPS, disminuyendo ligeramente la expresión de N-cad con la dosis baja (BPSL+VE) respecto al grupo BPSL y aumentándola con la dosis alta (BPSH+VE) respecto al grupo BPSH (Figura 17). Ningún cambio aquí mencionado fue significativo.

Los niveles de expresión de la proteína ZO-2 no se vieron muy afectados por el tratamiento con los antioxidantes ácido fólico (AF) y vitamina E (VE), ni con el tratamiento con la dosis alta de BPS (BPSH) (Figura 16). Sin embargo, el tratamiento con la dosis baja de BPS (BPSL) produjo una disminución de los niveles de expresión de esta proteína respecto al grupo control, aunque estas diferencias no son significativas (Figura 16 y 17). El co-tratamiento con BPSH y alguno de los antioxidantes (BPSH+AF y BPSH+VE) provocó la disminución de la expresión de esta proteína en la BHT, respecto al grupo tratado con BPSH y al grupo control. En cambio, el co-tratamiento con BPSL y alguno de los antioxidantes (BPSL+AF Y BPSL+VE) causó un aumento en la expresión de ZO-2 respecto al grupo BPSL, siendo este incremento más importante en el grupo tratado con VE, incluso regresando a niveles semejantes a los presentados por el grupo control, pero sin presentar diferencias significativas (Figura 16 y 17).

Dada la complejidad de los grupos experimentales y tratamientos, en las figuras 16A y 17A se presentaron bandas representativas de los diferentes Western Blot realizados.



**Figura 16. Expresión de las proteínas\* de la BHT y del RA en el testículo de los animales tratados con ambas dosis de BPS y el antioxidante AF.** (A) Bandas representativas de los diferentes Western Blot que se realizaron de las proteínas de uniones estrechas (Cl-3, Cl-11, Ocl), de andamiaje (ZO-1 y ZO-2), unión “gap” (Cx43), especialización ectoplásmica (N-cad) y RA con GAPDH como control de carga; (B) Análisis cuantitativo de la densidad óptica relativa de cada proteína respecto al control de carga (GAPDH) correspondiente para cada tratamiento. Las barras que no comparten una misma letra son significativamente diferentes entre ellas ( $p < 0.05$ ), de acuerdo con el análisis estadístico realizado mediante la prueba de ANOVA de una vía seguida de una comparación múltiple de Dunnett.  $n = 3$  animales por tratamiento. \*hace referencia a la cantidad total de proteína presente en el testículo de rata al momento del sacrificio de los animales. AF: Ácido fólico (20 mg/kg pc/d); BHT: Barrera hematotesticular; BPS: bisfenol S; BPSH: Dosis alta de BPS (100 mg/kg pc/d); BPSL: Dosis baja de BPS (0.05 mg/kg pc/d); Cl-3: Claudina-3; Cl-11: Claudina-11; Cx43: Conexina 43; GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; N-cad: N-cadherina; Ocl: Ocludina; RA: Receptor de andrógenos; VE: Vitamina E (100 mg/kg pc/d); ZO-1: Zonula occludens-1; ZO-2: Zonula occludens-2.

**A****B**

**Figura 17. Expresión de las proteínas\* de la BHT y del RA en el testículo de los animales tratados con ambas dosis de BPS y el antioxidante VE.** (A) Bandas representativas de los diferentes Western Blot que se realizaron de las proteínas de uniones estrechas (Cl-3, Cl-11, Ocl), de andamiaje (ZO-1 y ZO-2), unión “gap” (Cx43), Especialización ectoplásmica (N-cad) y RA con GAPDH como control de carga; (B) Análisis cuantitativo de la densidad óptica relativa de cada proteína respecto al control de carga (GAPDH) correspondiente para cada tratamiento. Las barras que no comparten una misma letra son significativamente diferentes entre ellas ( $p < 0.05$ ), de acuerdo con el análisis estadístico realizado mediante la prueba de ANOVA de una vía seguida de una comparación múltiple de Dunnett.  $n = 3$  animales por tratamiento. \*hace referencia a la cantidad total de proteína presente en el testículo de rata al momento del sacrificio de los animales. BHT: Barrera hematotesticular; BPS: bisfenol S; BPSH: Dosis alta de BPS (100 mg/kg pc/d); BPSL: Dosis baja de BPS (0.05 mg/kg pc/d); Cl-3: Claudina-3; Cl-11: Claudina-11; Cx43: Conexina 43; GAPDH: Glicer aldehído-3-fosfato deshidrogenasa; N-cad: N-cadherina; Ocl: Ocludina; RA: Receptor de andrógenos; VE: Vitamina E (100 mg/kg pc/d); ZO-1 : Zonula occludens-1; ZO-2: Zonula occludens-2.

## 9. Discusión

### 9.1 Morfometría de los túbulos seminíferos

La administración de 100 y 0.05 mg/kg pc/d de BPS no alteró el índice de maduración (IM) en ninguna de las etapas del CES evaluadas, y ningún antioxidante probado mostró diferencias significativas respecto a los grupos correspondientes (Tabla 5). Por el contrario, de acuerdo con Yousaf et al. (2016), el bisfenol A ha mostrado disminuir significativamente el índice de maduración (IM) después de administrar una dosis de 100 mg/kg pc/d durante 15 días en ratas adultas (Tabla 1). Además, en ese mismo estudio, la coadministración del BPA con el extracto de una planta con efectos antioxidantes mostró una restauración del IM, indicando un efecto protector efectivo de la toxicidad testicular inducida por el BPA, por lo que se dice que, a diferencia de lo observado con el BPA, el BPS no tiene efectos sobre el índice de maduración en ratas macho adultas administradas durante 151 días, además, la vitamina E y el ácido fólico tampoco mostraron tener ningún tipo de efecto sobre este índice.

La reducción del área o la “altura epitelial” podría deberse a la presencia de alteraciones en la espermatogénesis, porque no se forman las suficientes células germinales, o en las estructuras encargadas de brindar soporte al epitelio seminífero, como lo son las CS, y por consecuencia la barrera hematotesticular, pues las células germinales no tienen el soporte suficiente para permanecer en el epitelio. En el presente estudio se observó que la dosis alta de BPS (BPSH: 100 mg/kg pc/d) disminuyó el área del epitelio seminífero (AES), respecto al grupo control, en todas las etapas del ciclo del epitelio seminífero (CES), mientras que la dosis baja de BPS (BPSL: 0.05 mg/kg pc/d) no produjo algún cambio significativo en el AES, respecto al grupo control, en ninguna etapa del CES.

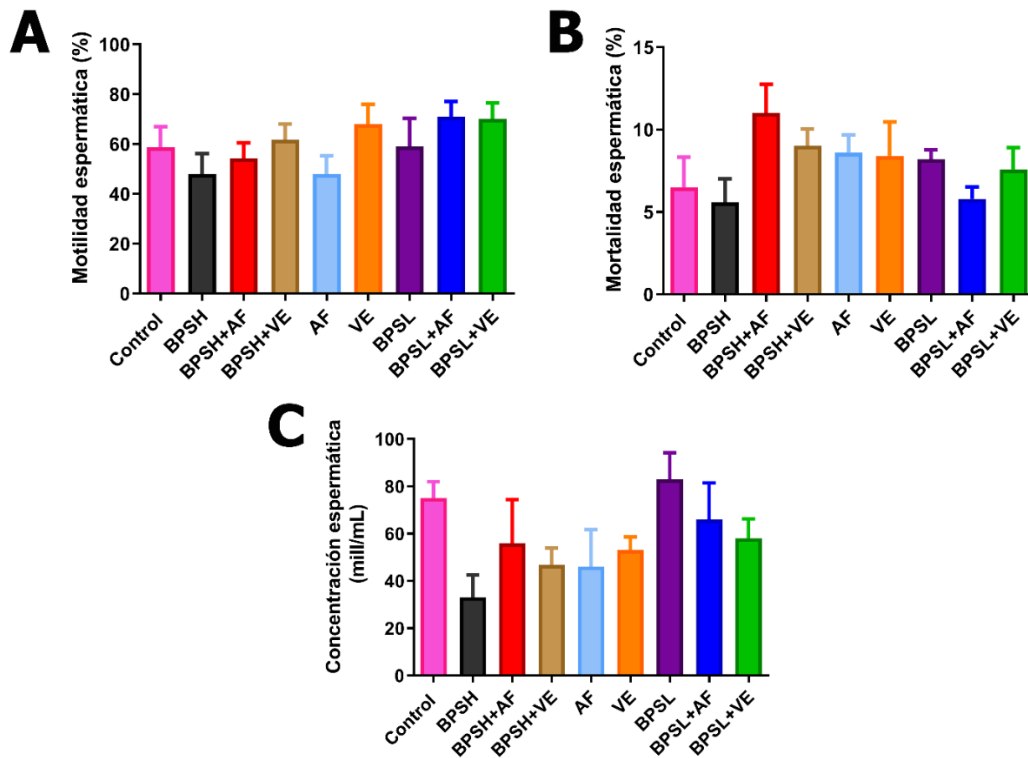
En estudios recientes, Ullah et al. (2016 y 2021) mostraron que el bisfenol S disminuye la altura epitelial, respecto al grupo control, en dosis de 25 y 50 µg/kg pc/d durante 28 días, sin afectar el área total de los túbulos seminíferos (Tabla 1), lo cual podría indicar una reducción del área del epitelio seminífero (AES). Además, se ha observado que esta reducción de la altura epitelial generalmente viene acompañada de un arresto en la meiosis de las espermatogonias y de la pérdida de polaridad de las espermátides redondas, especialmente durante las etapas VIII-IX del CES<sup>20</sup>. Estos efectos en las células germinales conllevan a una disminución en los parámetros de calidad espermáticos, como lo es una baja producción diaria de espermatozoides, una disminución en el número de espermatozoides en el epidídimo, una alteración en

---

<sup>20</sup> Durante estas etapas del ciclo del epitelio seminífero (CES) se da el transporte de espermátides elongadas y fagosomas a través del epitelio y la liberación de los espermatozoides formados durante la espermatogénesis (Ullah et al., 2021; Wu et al., 2021).



la BHT, entre otros efectos (Ullah et al., 2021; Wu et al., 2021). En el presente proyecto, colaboradores de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la UNAM junto con la Dra. Sheila Irais Peña Corona, determinaron los parámetros de calidad espermática (motilidad<sup>21</sup>, mortalidad y concentración) en los animales de estudio y los resultados no mostraron diferencias entre los grupos experimentales (Figura 18), por lo que la reducción del área del epitelio seminífero mostrada por la dosis alta de BPS podría no estar relacionada con la funcionalidad de los espermatozoides.



**Figura 18. Parámetros de calidad espermática de los animales de estudio después del tratamiento con BPS y ácido fólico o vitamina E durante 19 semanas.** (A) Porcentaje de motilidad espermática de los animales tratados con ambas dosis de BPS y ambos antioxidantes. (B) Porcentaje de mortalidad espermática de los animales tratados con ambas dosis de BPS y ambos antioxidantes. (C) Concentración espermática (mil/mL) de los animales tratados con ambas dosis de BPS y ambos antioxidantes. Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  EEM con  $n=3$  muestras por tratamiento. No se presenta ninguna diferencia significativa en ningún parámetro de calidad espermática evaluado ( $p<0.05$ ) de acuerdo con el análisis estadístico realizado mediante la prueba de ANOVA de una vía seguida de una comparación múltiple de Tukey. AF: Ácido fólico (20 mg/kg pc/d); BPS: Bisfenol S; BPSH: Dosis alta de BPS (100 mg/kg pc/d); BPSL: Dosis baja de BPS (0.05 mg/kg pc/d); VE: Vitamina E (100 mg/kg pc/d).

*Nota:* Resultados obtenidos por la Dra. Sheila Peña y colaboradores de la FMVZ de la UNAM, para evaluar el efecto de la administración de ambas dosis de BPS y ambos antioxidantes sobre la calidad espermática de ratas macho.

<sup>21</sup> Aunque la movilidad espermática indica vitalidad, no todos los espermatozoides inmóviles están muertos, pues es posible que la ausencia de movilidad sea debida a un fallo en su maquinaria ciliar. El índice de vitalidad solo se mide en aquellos casos en los que existe más de un 40% de espermatozoides inmóviles (Martínez et al., 2022).

Si bien no se cuenta con estudios del efecto de la coadministración de bisfenol S con antioxidantes, Gules et al. (2019) determinaron que la administración de bisfenol A en una dosis de 50 mg/kg pc/d durante 14 días disminuyó la altura epitelial en las etapas VII-VIII del CES, y que la coadministración de este bisfenol con ácido fólico (BPA+AF) no mostró cambios en la altura epitelial ni en el diámetro de los túbulos seminíferos respecto a los grupos control y AF, por lo que el ácido fólico ha demostrado tener un efecto protector sobre la posible disminución del área del epitelio seminífero (AES) provocada por el BPA. Sin embargo, en el presente estudio no se observó ningún efecto benéfico sobre la disminución del AES causada por la dosis alta de BPS después de administrar ácido fólico o vitamina E (VE), pues ambos antioxidantes disminuyeron el AES, respecto al grupo control, en los tres rangos de etapas del ciclo del epitelio seminífero (CES) y también disminuyeron el AES respecto a ambas dosis de BPS en la mayoría de las etapas del CES. Además, actualmente no hay datos reportados acerca de los efectos de la coadministración de BPA con VE, respecto a la altura o al área epitelial, con los cuales se puedan comparar los resultados aquí obtenidos para este antioxidante.

Hasta el momento, tampoco se cuenta con información reportada por otros autores respecto a los efectos de los bisfenoles sobre el índice histopatológico (IHP) en particular. Sin embargo, como se observa en la Tabla 1, se han reportado diversos cambios y deformaciones morfológicas en los túbulos seminíferos causados por tóxicos reproductivos, por ejemplo, el BPA en diferentes dosis vuelve irregulares los túbulos seminíferos, con grandes espacios entre ellos; además provoca una interrupción en las etapas de la espermatogénesis, separación de las espermatogonias de la membrana, degeneración en la membrana de los túbulos seminíferos, desprendimiento del epitelio germinal (o un epitelio seminífero discontinuo), disminución de esperma maduro, células germinales multinucleadas gigantes, lumen tubular lleno de células descamadas y vacuolización epitelial (Campos et al., 2019; Sencar et al., 2021; Srivastava & Gupta, 2018; Yousaf et al., 2016). Estos cambios están directamente relacionados con un aumento del IHP, pues son las características que se buscan para asignar el puntaje de cada túbulo seminífero que será utilizado para determinar el IHP (Vigueras-Villaseñor et al., 2009).

En el presente estudio, ambas dosis de BPS aumentaron el IHP durante todas las etapas del CES, respecto al grupo control, lo cual concuerda con los reportes previos para el BPA (ya descritos en el párrafo anterior) y con lo reportado por Ullah et al. (2016, 2021), quienes observaron cambios similares a los del BPA en la morfología de los túbulos seminíferos en el testículo y epidídimo de ratas tratadas con BPS. Así mismo, Wu et al. (2018) observaron que estos cambios en la morfología de los túbulos seminíferos son más prominentes durante las etapas VIII-IX del CES, y pueden estar relacionados con que, tanto el BPA

como el BPS, inducen cambios en los citoesqueletos de actina y/o en los citoesqueletos de los microtúbulos a los cuales están ancladas las proteínas UE de la BHT (como se muestra en la Figura AIV.2). Además, el tratamiento con ambos bisfenoles provocó la pérdida de la polaridad de las espermatídes y se demostró que la vía mTOR<sup>22</sup> juega un papel crucial en las uniones de las CS y la polaridad celular, por lo que este podría ser un mecanismo por medio del cual, en el presente estudio, ambas dosis de bisfenol S ejercieron sus efectos negativos sobre el índice histopatológico.

Respecto al efecto de los antioxidantes sobre el índice histopatológico (IHP), si bien no se cuenta con información del efecto específico del ácido fólico (AF) sobre la morfología testicular, en el presente estudio se observó que el AF promovió un efecto protector en el IHP de los túbulos seminíferos contra los efectos dañinos provocados por la exposición a la dosis baja de BPS durante todas las etapas del ciclo del epitelio seminífero (CES). En las etapas VIII a XIV del CES (en los rangos VIII-IX\* y IX\*\*-XIV), el AF también promovió un efecto protector en el IHP contra los efectos dañinos provocados por la exposición a la dosis alta de BPS. Por otro lado, la vitamina E (VE) está presente en las células germinales, es esencial para mantener la espermatogénesis en los mamíferos y altera tanto la proliferación celular como la apoptosis de las células germinales (en particular los espermatocitos en estado de paquiteno durante la meiosis y espermatídes redondas, pues disminuye la peroxidasa de lípidos) y de las células de Sertoli (Srivastava & Gupta, 2018). En el presente estudio, la VE promovió el mismo efecto protector sobre el IHP de los túbulos seminíferos que el AF contra los efectos dañinos provocados por la exposición a ambas dosis de BPS durante las mismas etapas del CES.

Los resultados del ácido fólico (AF) del presente estudio concuerdan con lo previamente observado para el BPA por Gules et al. (2019), en donde se vio que la misma dosis aquí probada de AF (20 mg/kg pc/d), mostró un efecto protector sobre los daños observados después de que se administraron 50 mg/kg pc/d de este bisfenol durante 14 días, pues se menciona que la apariencia testicular fue similar entre los grupos control, AF y AF+BPA en las etapas VII-VIII del CES, mientras que el BPA mostró una disminución de la altura epitelial y una reducción en el número de espermatozoides viables.

---

<sup>22</sup> mTOR: Serina/treonina cinasa atípica presente en los complejos mTORC1 y mTORC2. Una señalización atípica o aberrante en la vía mTOR está relacionada con muchas enfermedades, como el cáncer, la diabetes y enfermedades cardiovasculares (Cell Signaling Technology, 2014).

Además, el AF reportó poseer actividades anti apoptóticas, pues mediante el método de detección TUNEL<sup>23</sup>, se determinó que el tratamiento con AF redujo el número de células germinales positivas a esta técnica, mientras que el BPA presentó un aumento en este número (Gules et al., 2019). Esto puede estar relacionado indirectamente con un aumento del IH, pues uno de los parámetros que se evalúan para determinar este índice es la picnosis, la cual es una condensación de la cromatina y contracción del núcleo de una célula en respuesta a un daño celular que puede estar relacionado a la muerte celular (Lifeder, 2023), lo cual, en el caso de la apoptosis, puede detectarse como un aumento de células positivas a TUNEL.

Así mismo, los resultados de la vitamina E (VE) del presente estudio concuerdan con lo previamente reportado por Srivastava & Gupta (2018), en donde, la administración de BPA en dosis de 0.05, 0.5 y 1 mg/kg pc/d durante 90 días, provocó cambios degenerativos en la capa germinal de los túbulos seminíferos y aumentó el espacio entre los túbulos seminíferos, en comparación con los grupos control y de VE (en dosis de 40 mg/kg pc/d). Además, se menciona que los cambios histológicos observados en los testículos de ratas tratadas con BPA+VE fueron modificados hasta cierto punto, pero no alcanzaron el nivel del control. En el presente estudio, este comportamiento se observó en las etapas I-VII del ciclo del epitelio seminífero (CES) después de administrar, tanto la VE como el AF, con la dosis baja de BPS.

---

<sup>23</sup> El marcado de final de corte de dUTP mediada por “TdT” (TUNEL, por sus siglas en inglés), es usado en secciones de tejidos in situ para detectar núcleos de células apoptóticas mediante una enzima conocida como terminal deoxinucleotidil transferasa (TdT), la cual adiciona nucleótidos marcados en los grupos 3’OH de la cadena de DNA fragmentada que se libera cuando ocurre la apoptosis (Dettmeyer, 2015).

## 9.2 Expresión de proteínas de la BHT y del RA.

### 9.2.1 ZO-1.

De todas las proteínas de la BHT evaluadas, en el presente proyecto solo se detectaron cambios significativos en la expresión de la proteína ZO-1, la cual es una proteína de andamiaje periférica asociada a las UE, que se localiza entre los complejos de unión de células de Sertoli, e interactúa con proteínas de señalización ligadas a la polaridad celular, la maduración de las UE y la remodelación del citoesqueleto y cuya alteración en las CS está asociada con carcinoma testicular *in situ* (Peña-Corona et al., 2023; Salian et al., 2009). Esta proteína presentó una disminución en su expresión en la mayoría de los tratamientos respecto al grupo control, exceptuando el tratamiento con la vitamina E y el grupo de la dosis alta de BPS fue el que presentó una disminución más significativa.

Wu et al. (2021) observaron una tendencia a disminuir esta misma proteína, sin diferencias significativas, después de administrar dosis de 50 y 100 mg/kg pc/d de BPS durante 30 días por vía oral. En otro estudio, Chianese et al. (2018) mostraron que una dosis de 10 µg/kg pc/d de BPA provocó una disminución de la expresión de ZO-1 en el testículo de ratas, respecto al grupo control, en los días post-natal (PND) 45 y 60. Por el contrario, Salian et al. (2009) observaron un aumento de la expresión de esta proteína en el testículo de ratas expuestas a 400 µg/kg pc/d de BPA. Estas diferencias pueden deberse a la duración del tratamiento, al periodo de exposición evaluado, a la dosis seleccionada, a la cepa de rata evaluada y a la vía de administración, pues mientras Chianese et al. (2018) administraron una dosis de 10 µg/kg pc/d en el agua de ratas Wistar durante 38-42 días durante la etapa perinatal, Salian et al. (2009) administraron 400 µg/kg pc/d mediante inyecciones subcutáneas durante 5 días en la etapa neonatal de ratas Holtzman.

En el presente estudio no se vieron cambios significativos después de la administración de ácido fólico (AF) o vitamina E (VE) con ambas dosis de BPS, respecto a los grupos tratados con la dosis de bisfenol S correspondiente. Si bien la coadministración de la dosis alta de BPS (BPSH) con cualquiera de los antioxidantes probados (BPSH+AF o BPSH+VE) pareció aumentar la expresión de ZO-1 respecto al grupo BPSH, este aumento no fue significativo, aunque puede ser indicativo de algún efecto protector de ambos antioxidantes sobre los efectos dañinos provocados por la dosis alta de BPS. En contraste, la administración conjunta de BPSL con cualquier antioxidante (BPSL+AF o BPSL+VE) no modificó la expresión de ZO-1 respecto al grupo BPSL.

A diferencia de lo que se planteó en la hipótesis (pág. 39 de esta tesis), la expresión de las demás proteínas de la barrera hematotesticular (BHT) y del receptor de andrógenos no fue alterada por ninguna dosis de BPS probada; sin embargo, se observaron algunas tendencias a alterar su expresión, lo cual será discutido a continuación.

### 9.2.2 Claudinas.

La **Claudina 3 (Cl-3)** es expresada por las CS y espermatoцитos dependiendo del CES y se considera que esta proteína tiene un papel en la migración de los espermatoцитos a través de la BHT, al regular interacciones célula-célula, por lo que un cambio en la expresión de esta proteína podría provocar un retraso en la espermatogénesis (Chihara et al., 2013). En el presente proyecto, la expresión de la Cl-3 tendió a aumentar con los tratamientos de ambas dosis de BPS respecto al grupo control. En la actualidad no hay reportes de los efectos de bisfenoles sobre la expresión de esta proteína en testículo de rata. Sin embargo, Zhu et al. (2022) evaluaron el efecto de BPA en testículos de peces (*Gobiocypris rarus*) y observaron un aumento en la expresión de la Cl-3 después de 7 y 14 días de exposición a una concentración ambiental de 15 µg/L.

La **Claudina 11 (Cl-11)** se expresa mucho durante las etapas V-VII del CES, etapas que preceden al movimiento de espermatoцитos en preleptoteno/leptoteno a través de la BHT (Peña-Corona et al., 2023). En el presente proyecto, la expresión de Cl-11 disminuyó con los tratamientos de ambas dosis de BPS respecto al grupo control, aunque no de forma significativa. Esto concuerda con lo previamente reportado por Wu et al. (2021), en donde una dosis de 100 mg/kg pc/d de BPS disminuyó significativamente la expresión de esta proteína.

Respecto a el efecto de los antioxidantes sobre los efectos en la expresión de ambas proteínas (Cl-11 y Cl-3), se observó que el ácido fólico (AF) podría tener un efecto protector sobre el efecto de la dosis baja de BPS en la expresión de Cl-3 y sobre el efecto de la dosis alta de BPS en la expresión de Cl-11, ya que el AF provocó que los niveles de estas proteínas se aproximaran a los valores presentados por el grupo control.

La Vitamina E (VE) podría no tener ningún efecto protector sobre ambas dosis de BPS en la expresión de Cl-3, pues la administración de cualquier dosis de BPS+VE aumentó la expresión de Cl-3 respecto a los grupos tratados solo con BPS. Por otro lado, este antioxidante podría tener un efecto protector sobre ambas dosis de BPS en la expresión de Cl-11, dado que la administración de cualquier dosis de BPS+VE aumentó la expresión de Cl-11 respecto a los grupos tratados solo con BPS, aproximando los valores de expresión de esta proteína a los presentados por el grupo control. Es importante recalcar que ninguno de estos cambios fue significativo.

### **9.2.3 Ocludina.**

La ocludina (Ocl), al igual que las claudinas, es una proteína integral de UE que regula la permeabilidad epitelial y constituye los filamentos de UE y la sobreexpresión de esta proteína en células epiteliales de colon y testículo aumenta la RET (Peña-Corona et al., 2023). En el presente proyecto, los niveles de expresión de Ocl en los grupos tratados fueron semejantes a los detectados en el grupo control, lo cual no concuerda con lo reportado por Li et al. (2009), en donde se observó una disminución en la expresión de esta proteína después de administrar 10 y 50 mg/kg pc/d de BPA a ratas durante 5-6 días. De igual forma, Brouard et al. (2016) observaron una disminución en la expresión del gen de la Ocl en ratas tratadas subcutáneamente con 50 µg/kg bw/d de BPA durante 15 días. Estas diferencias se pueden deber a las diferentes vías de administración utilizadas, así como el periodo de exposición al bisfenol correspondiente. En el presente estudio, esta disminución en la expresión de Ocl previamente reportada, solo se observó en grupos tratados con los antioxidantes y el BPS (grupos BPSH+AF, BPSL+AF y BPSL+VE) sin ser estadísticamente significativa, por lo que no se observó ningún posible efecto protector de los antioxidantes sobre la expresión de la Ocl en testículo de rata.

#### 9.2.4 Conexina 43.

La Conexina 43 (Cx43) se encuentra presente en uniones de células de Sertoli (CS) y de células germinales (CG); la conexina 43 presente entre CS-CS controla la proliferación de las CS, mientras que la Cx43 entre CS-CG regula la supervivencia de las células germinales. Durante el desarrollo del testículo, las uniones “gap” de Cx43, presentes en el testículo perinatal, controlan la diferenciación de las células de Sertoli y mantienen el número de células germinales (gonocitos o espermatozonias primitivas). Después, en la etapa adulta del individuo, la Cx43 puede controlar la diferenciación celular, lo cual es esencial para la progresión de espermatozonios meióticos (Peña-Corona et al., 2023).

En el presente proyecto, la expresión de la Cx43 aumentó en todos los grupos tratados respecto al grupo control, aunque no lo suficiente para ser significativo. Esto no concuerda con lo previamente reportado por Wu et al. (2021), en donde dosis de 50 y 100 mg/kg pc/d de BPS disminuyeron significativamente la expresión de Cx43. De igual forma, Salian et. al. (2009) observaron una disminución en la expresión de esta proteína en ratas expuestas perinatalmente a 400 µg/kg pc/d de BPA. Por otro lado, al igual que en el presente estudio, Li et al. (2009) no observaron una alteración significativa en la expresión de Cx43 en ratas adultas después de una exposición de 0.02-50 mg/kg pc/d de BPA durante 5 días. Estas discrepancias también se pueden deber a las diferencias entre las dosis administradas y el periodo de exposición seleccionado.

El ácido fólico (AF) podría tener un posible efecto protector en la expresión de Cx43 solo sobre la dosis baja de BPS, debido a que la administración conjunta de BPSL+AF mostró una reducción de la expresión de Cx43 respecto al BPSL, sin llegar a ser significativa, mientras que, la administración de BPSH+AF no mostró posibles diferencias. La vitamina E (VE) podría ejercer un efecto protector sobre la expresión de esta proteína en ambas dosis de BPS, pues la administración conjunta de ambas dosis de BPS+VE disminuyó la expresión de esta proteína respecto a la dosis de BPS correspondiente, sin embargo, estas diferencias no fueron significativas.



### 9.2.5 N-cadherina

Las cadherinas median contactos celulares y conservan la integridad del epitelio seminífero y la estructura testicular. En testículos adultos, la N-cadherina (N-cad) es responsable de la integridad del epitelio seminífero, la regulación de la producción de espermatozoides y el establecimiento de la BHT. Su expresión y renovación es regulada por hormonas sexuales (Peña-Corona et al., 2023; Piprek et al., 2020). En el presente estudio, la expresión de N-cad presentó una disminución en el grupo de BPSH y un aumento en el grupo de BPSL, sin llegar a ser cambios significativos.

Wu et al. (2021) previamente reportaron que una dosis de 100 mg/kg pc/d de BPS administrada durante 30 días, aumentó significativamente la expresión de N-cad. De igual forma, Salian et. al. (2009) observaron un aumento en la expresión de N-cad después de la administración de 100 mg/kg pc/d de BPA durante 30 días y Brouard et. al (2016) observaron un aumento en la expresión del gen de la N-cad, en ratas tratadas con 50 µg/kg pc/d de BPA durante 15 días. De forma contraria, al igual que en el presente estudio, Li et al. (2009), no observaron diferencia en la expresión de N-cad tras administrar 0.02-50 mg/kg pc/d de BPA durante 5 o 6 días.

El ácido fólico (AF) podría tener un efecto protector sobre la expresión de la N-cad respecto a la dosis baja de BPS, dado que el tratamiento de BPSH+AF disminuyó aún más la expresión de N-cad respecto al BPSH, mientras que el tratamiento BPSL+AF disminuyó los niveles elevados de N-cad provocados por el BPSL, aunque los cambios mencionados no fueron significativos. Se observó un posible efecto protector de la vitamina E (VE) sobre la expresión de esta proteína en ambas dosis de BPS, pues el tratamiento de BPSH+VE aumentó los niveles de N-cad respecto al BPSH y el tratamiento BPSL+VE disminuyó los niveles de N-cad respecto al BPSL, regresando los niveles de N-cad a los que presenta el grupo control, aunque tampoco son cambios significativos.

### 9.2.6 ZO-2

El movimiento de ZO-2 entre el citoplasma y el núcleo es mediado por la localización nuclear, señales de exportación y modificaciones post-traduccionales (Peña-Corona et al., 2023). Se ha reportado la unión de ZO-2 con Cx43 en cultivos de células epiteliales de riñón de rata, y la progresión de cáncer testicular y la exposición a diferentes disruptores endócrinos se ha correlacionado con un estado de deterioro en la diferenciación de las CS, la cual incluye una regulación a la baja de Cx43 (Fink et al., 2006). En el presente estudio los niveles de expresión de la proteína ZO-2 disminuyeron con el tratamiento con BPSL y aumentaron con el tratamiento con BPSH respecto al grupo control, aunque no fue un cambio significativo. En un estudio realizado por Ortega-Olvera et al. (2018), se observó que ZO-2 aumentó su expresión después de un tratamiento con 5 mg/kg pc/d por 4 días con metamidofos (MET), un pesticida organofosforado, el cual también es considerado como disruptor endócrino. Por el momento no se cuentan con datos del efecto de los bisfenoles sobre la expresión de esta proteína.

Se observó un posible efecto protector del ácido fólico (AF) sobre la expresión de ZO-2 en ambas dosis de BPS, pues el tratamiento de BPSH+AF disminuyó los niveles de ZO-2 respecto al BPSH y el tratamiento BPSL+AF aumentó los niveles de esta proteína respecto al BPSL, regresando los niveles de expresión de esta proteína a los niveles que presentaba el grupo control, aunque los cambios mencionados no fueron significativos. Así mismo, la vitamina E (VE) podría no ejercer ningún efecto positivo sobre el efecto de ambas dosis de BPS en la expresión de esta proteína, dado que el tratamiento de BPSH+VE disminuye la expresión de ZO-2 respecto al BPSH y el grupo control, mientras el tratamiento de BPSL+VE aumenta la expresión de esta proteína respecto a BPSL incluso más que el control.

### 9.2.7 Receptor de andrógenos

La ablación del receptor de andrógenos (RA) afecta la maduración de las células de Sertoli, resultando en la formación tardía e incompleta de la BHT y, además, cambia el patrón de expresión de varios genes relacionados con la adhesión de estas mismas células. Después de establecer la barrera hematotesticular (BHT), el RA es necesario para el proceso de apertura de la BHT, por lo que, sin un RA regular, una BHT estructuralmente normal puede no ser funcional, conllevando, a su vez, a la infertilidad (Véase Figura AIV.3) (de Freitas et al., 2016).

En el presente estudio, el tratamiento con la dosis alta de BPS (BPSH) disminuyó la expresión del RA, mientras que la dosis baja (BPSL) aumentó su expresión, sin llegar a ser cambios significativos. En un estudio *in vitro* previo, de Freitas et al. (2016) observaron una disminución en la expresión del RA tras exponer al cultivo de células de Sertoli humanas (HSec) a 20  $\mu$ M de BPA durante 6 y 48h. De igual forma, se ha visto que el BPA puede competir con los andrógenos para unirse al RA como un antagonista e interrumpir la función normal de los andrógenos. A diferencia de los andrógenos, el BPA se une al RA y forma un complejo ligando-receptor incapaz de unirse a elementos de respuesta del receptor de andrógenos, por lo que la transcripción de genes mediada por este complejo no se estimula, lo cual causa una disfunción en la función y el desarrollo reproductivo (Ma et al., 2019).

Los tratamientos conjuntos del BPS con los antioxidantes tuvieron efectos inversos sobre la expresión del RA, pues existe un posible efecto protector del ácido fólico sobre la expresión del RA en ambas dosis de BPS, dado que el tratamiento de BPSH+AF aumentó los niveles de RA respecto al BPSH y el tratamiento BPSL+AF disminuyó los niveles de RA respecto al BPSL, acercando los niveles de expresión de esta proteína a los niveles que presentaba el grupo control, aunque los cambios mencionados no fueron significativos. Así mismo, podría no existir un efecto positivo de la vitamina E sobre la expresión del RA en ambas dosis, pues el tratamiento de BPSH+VE no muestra una diferencia muy marcada respecto a la dosis alta de BPS, mientras el tratamiento de BPSL+VE es el tratamiento que más disminuye el RA.

En resumen: se observaron tendencias a aumentar la expresión de las proteínas claudina 3 y conexina 43 en ambas dosis de BPS, N-cadherina y RA en la dosis baja y ZO-2 en la dosis alta; y a disminuir la expresión de claudina 11 en ambas dosis de BPS, N-cadherina y RA en la dosis alta, ZO-2 en la dosis baja. La ocludina no mostró una tendencia a cambiar su expresión en ninguna dosis de BPS respecto al grupo control.

Dado que las tendencias observadas en la alteración de la expresión de las proteínas de la BHT (Cl-3, Cl-11, Cx43, Ocl, N-cad y ZO-2) y el RA, en su mayoría coincidieron con lo reportado anteriormente por otros autores, se sospecha que la falta de diferencias significativas en la expresión de estas proteínas pueda deberse al bajo número de muestras analizadas (n=3).

El efecto de los bisfenoles sobre el perfil de expresión de las proteínas de la BHT en la fisiología reproductiva masculina aún no ha sido investigado (al menos no a profundidad), por lo que es difícil definir las implicaciones biológicas de un aumento o una disminución de la expresión de cada proteína (Salian et al., 2009). De igual forma, es necesario realizar más estudios respecto a los efectos de los antioxidantes aquí probados para determinar si realmente podrían ejercer efectos protectores sobre la expresión de las proteínas aquí evaluadas y sobre la morfología de los túbulos seminíferos, pues si bien, estos antioxidantes mostraron algunos efectos protectores a lo largo de todo el estudio (especialmente sobre el índice histopatológico), estos efectos no fueron evidentes en todos los parámetros evaluados en el presente trabajo. Además, en algunas ocasiones la administración de los antioxidantes por sí solos provocaron efectos adversos sobre la morfología testicular, pues ambos disminuyeron el área del epitelio seminífero respecto al control, y la vitamina E aumentó el índice histopatológico respecto al grupo control, así como sobre la expresión de proteínas de la barrera hematotesticular, ya que el ácido fólico disminuyó la expresión de ZO-1 respecto al grupo control.

Finalmente recordemos que, en el presente proyecto, los parámetros de calidad espermática no mostraron diferencias entre los grupos experimentales tratados con ambas dosis de BPS y/o los antioxidantes probados (Figura 18), y el peso de los testículos no fue diferente entre los grupos tratados (Figura 7C y D), por lo que se sospecha que los cambios provocados por ambas dosis de BPS en la expresión de proteínas de la BHT (al disminuir la expresión de ZO-1) y en la morfometría de los túbulos seminíferos (al aumentar el índice histopatológico y disminuir el área del epitelio seminífero en diferentes etapas del ciclo del epitelio seminífero) no afectaron la funcionalidad del testículo.

## **10. Conclusión.**

En conclusión, aunque el tratamiento durante 19 semanas con las dosis estudiadas de BPS parece no dañar la función testicular de las ratas, sí se detectaron alteraciones en la histoarquitectura de los túbulos seminíferos y en la expresión de la proteína ZO-1, y estas alteraciones fueron similares con las dosis altas y bajas del bisfenol. Por lo tanto, se demostró que el BPS puede inducir daño en el aparato reproductor masculino, y que el uso de antioxidantes como la vitamina E y el ácido fólico son una alternativa prometedora para atenuar al menos alguno de los efectos nocivos del BPS.

## **11. Perspectivas.**

Debido a que la presente tesis representa una pequeña parte de un gran proyecto de investigación, se sugiere seguir integrando todas las partes evaluadas del proyecto hasta ahora, con el fin de tener un panorama más amplio del verdadero efecto que tuvo la administración de ambas dosis de bisfenol S y ambos antioxidantes probados para decidir si son necesarias más evaluaciones, o incluso, si es necesario abrir más líneas de investigación.

Además, es importante resaltar que se requiere profundizar en el estudio de la toxicidad del bisfenol S, analizando, por ejemplo, otras dosis y buscando sus efectos sobre otros parámetros para poder establecer su peligrosidad con el fin de asegurar que no se está reemplazando un producto peligroso por otro y de mejorar la regulación de su uso a nivel mundial.

Por último, se presentan algunas recomendaciones en caso de que en algún momento se pueda repetir el presente estudio:

- Aumentar el número de animales evaluados, con el fin de reducir las diferencias interindividuales.
- Mejorar la técnica de fijación, pues es probable que el tener dos métodos para estudiar la histología del tejido contribuyera a la alta heterogeneidad de los resultados morfométricos.
- De ser posible, evaluar la expresión de las proteínas de la barrera hematotesticular en un rango de etapas del ciclo del epitelio seminífero definido, pues las proteínas se expresan en diferentes niveles a lo largo del CES.
- Reducir las dosis de ambos antioxidantes aquí probadas a la mitad, bajo las mismas condiciones, pues en el presente trabajo se observó que las dosis de 20 y 100 mg/kg pc/d de ácido fólico y vitamina E, respectivamente, llegaron a producir por sí solas, efectos adversos sobre el testículo. O bien, evaluar el efecto de otros antioxidantes no enzimáticos.

## 12. Referencias

- Adegoke, E. O., Rahman, M. S., & Pang, M. G. (2020). Bisphenols Threaten Male Reproductive Health via Testicular Cells. En *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00624>
- Amjad, S., Rahman, M. S., & Pang, M. G. (2020). Role of antioxidants in alleviating bisphenol a toxicity. En *Biomolecules* (Vol. 10, Número 8, pp. 1–26). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom10081105>
- Amraoui, W., Adjabi, N., Bououza, F., Boumendjel, M., Taibi, F., Boumendjel, A., Abdenmour, C., & Messarah, M. (2018). Modulatory role of selenium and vitamin E, natural antioxidants, against bisphenol A-induced oxidative stress in wistar albinos rats. *Toxicological Research*, 34(3), 231–239. <https://doi.org/10.5487/TR.2018.34.3.231>
- Andersson, A.-M., Edvardsen, K., & Skakkebaek, N. E. (1994). Expression and localization of N- and E-cadherin in the human testis and epididymis. *International Journal of Andrology*, 17(4), 174–180. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1994.tb01239.x>
- Añez, J. (s/f). *Tamaño de mercado*. Economía 360. Diccionario de economía, administración y negocios. Recuperado el 3 de enero de 2024, de <https://www.economia360.org/tamano-de-mercado/>
- Calvente, M. (2021). *¿Qué es la tasa de crecimiento anual compuesta o CAGR (Compound Annual Growth Rate)?* BBVA. Economía, Negocios y Finanzas. <https://www.bbva.com/es/que-es-la-tasa-de-crecimiento-anual-compuesta-o-cagr-compound-annual-growth-rate/>
- Campos, P. De, Oliveira, I. M., Sena de Souza, J., Da Conceição, R. R., Giannocco, G., Chiamolera, M. I., Silva, M. R. D. Da, Romano, M. A., & Romano, R. M. (2019). Maternal bisphenol A exposure disrupts spermatogenesis in adult rat offspring. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues*, 82(3), 163–175. <https://doi.org/10.1080/15287394.2019.1572557>
- Cao, G., He, R., Cai, Z., & Liu, J. (2013). Photolysis of bisphenol S in aqueous solutions and the effects of different surfactants. *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis*, 109(1), 259–271. <https://doi.org/10.1007/s11144-013-0553-6>
- Cell Signaling Technology. (2014, junio). *mTor Signaling*. cellsignal.com. <https://www.cellsignal.com/pathways/mtor-signaling-pathway>
- ChemAnalyst. (2023, agosto). *Bisphenol A Market Analysis: Plant Capacity, Production, Operating Efficiency, Demand & supply, End-user Industries, Sales Channel, Regional Demand, Company Share, Foreign Trade, 2015-2032*. Industry Reports. <https://www.chemanalyst.com/industry-report/bisphenol-a-market-57>
- Chen, D., Kannan, K., Tan, H., Zheng, Z., Feng, Y. L., Wu, Y., & Widelka, M. (2016). Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity - A Review. En *Environmental Science and Technology* (Vol. 50, Número 11, pp. 5438–5453). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b05387>

Chihara, M., Ikebuchi, R., Otsuka, S., Ichii, O., Hashimoto, Y., Suzuki, A., Saga, Y., & Kon, Y. (2013). Mice stage-specific claudin 3 expression regulates progression of meiosis in early stage spermatocytes. *Biology of Reproduction*, 89(1). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.107847>

Clínica Mayo. (2022). *Ataxia*. mayoclinic.org. <https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/ataxia/symptoms-causes/syc-20355652>

de Freitas, A. T. A. G., Ribeiro, M. A., Pinho, C. F., Peixoto, A. R., Domeniconi, R. F., & Scarano, W. R. (2016). Regulatory and junctional proteins of the blood-testis barrier in human Sertoli cells are modified by monobutyl phthalate (MBP) and bisphenol A (BPA) exposure. *Toxicology in Vitro*, 34, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.02.017>

Dettmeyer, R. B. (2015). Histopathology. *Encyclopedia of Forensic and Legal Medicine: Second Edition*, 35–46. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800034-2.00202-0>

Diario Oficial de la Federación. (1993). *PROYECTO de Norma Oficial Mexicana NOM-002-SSA1-1993, Salud ambiental - bienes y servicios. Envases metálicos para alimentos y bebidas. Especificaciones de la costura. Requisitos sanitarios*. Secretaría de Gobernación. [https://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4801373&fecha=11/11/1993#gsc.tab=0](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4801373&fecha=11/11/1993#gsc.tab=0)

Diario Oficial de la Federación. (1997). *NORMA Oficial Mexicana NOM-130-SSA1-1995, Bienes y servicios. Alimentos envasados en recipientes de cierre hermético y sometidos a tratamiento térmico. Disposiciones y especificaciones sanitarias*. Secretaría de Gobernación. [https://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4901457&fecha=21/11/1997#gsc.tab=0](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4901457&fecha=21/11/1997#gsc.tab=0)

Diario Oficial de la Federación. (1999). *PROYECTO de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*. Secretaría de Gobierno. [https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=4957534&fecha=06/12/1999#gsc.tab=0](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=4957534&fecha=06/12/1999#gsc.tab=0)

Diario Oficial de la Federación. (2012). *NORMA Oficial Mexicana NOM-131-SSA1-2012, Productos y servicios. Fórmulas para lactantes, de continuación y para necesidades especiales de nutrición. Alimentos y bebidas no alcohólicas para lactantes y niños de corta edad. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Etiquetado y métodos de prueba*. Secretaría de Gobernación. [https://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5267447&fecha=10/09/2012#gsc.tab=0](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5267447&fecha=10/09/2012#gsc.tab=0)

Díaz Cruz, A. (s/f). *Radicales Libres*. FMVZ, UNAM. Recuperado el 2 de diciembre de 2023, de [https://fmvz.unam.mx/fmvz/p\\_estudios/apuntes\\_bioquimica/Unidad\\_12.pdf](https://fmvz.unam.mx/fmvz/p_estudios/apuntes_bioquimica/Unidad_12.pdf)

ECHA. (2011). *Bisphenols*. Restrictions in food contact materials. <https://www.echa.europa.eu/hot-topics/bisphenols>

ECHA. (2023, marzo 2). *4,4'-sulphonyldiphenol*. Registration Dossier - ECHA . <https://echa.europa.eu/registration-dossier/-/registered-dossier/14986/1/2>

EFSA. (2015, noviembre). *Bisfenol A*. Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. <https://www.efsa.europa.eu/es/topics/topic/bisphenol>

EFSA. (2020). *Assessment of new information on Bisphenol S (BPS) submitted in response to the Decision under REACH Regulation (EC) No 1907/2006*. EFSA Technical Report. <https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/en-1844>

Eladak, S., Grisin, T., Moison, D., Guerquin, M. J., N'Tumba-Byn, T., Pozzi-Gaudin, S., Benachi, A., Livera, G., Rouiller-Fabre, V., & Habert, R. (2015). A new chapter in the bisphenol a story: Bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. En *Fertility and Sterility* (Vol. 103, Número 1, pp. 11–21). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.11.005>

Fang, Z., Gao, Y., Wu, X., Xu, X., Sarmah, A. K., Bolan, N., Gao, B., Shaheen, S. M., Rinklebe, J., Ok, Y. S., Xu, S., & Wang, H. (2020). A critical review on remediation of bisphenol S (BPS) contaminated water: Efficacy and mechanisms. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 50(5), 476–522. <https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1629802>

FDA. (2023). *CFR - Code of Federal Regulations Title 21*. Indirect Food Additives: Polymers Subpart C - Substances for Use Only as Components of Articles Intended for Repeated Use. <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=177.2440>

Fiege, H., Voges, H.-W., Hamamoto, T., Umemura, S., Iwata, T., Miki, H., Fujita, Y., Buysch, H.-J., Garbe, D., & Paulus, W. (2000). Phenol Derivatives. En *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. [https://doi.org/10.1002/14356007.a19\\_313](https://doi.org/10.1002/14356007.a19_313)

Fink, C., Weigel, R., Hembes, T., Lauke-Wettwer, H., Kliesch, S., Bergmann, M., & Brehm, R. H. (2006). Altered expression of ZO-1 and ZO-2 in sertoli cells and loss of blood-testis barrier integrity in testicular carcinoma in situ. *Neoplasia*, 8(12), 1019–1027. <https://doi.org/10.1593/neo.06559>

Fox, S. I. (2011). *Fisiología Humana* (B. P. G. H. R. G. H. J. L. Rivera Muñoz, Ed.; 12a ed.). McGraw Hill.

García J A, & Gallego C. (2015). *Toxicidad del Bisfenol A: Revisión* (Vol. 32).

Geueke, B. (2014). *Dossier - Bisphenol S*. Food Packaging Forum. [https://www.foodpackagingforum.org/fpf-2016/wp-content/uploads/2015/11/FPF\\_Dossier05\\_BPS.pdf](https://www.foodpackagingforum.org/fpf-2016/wp-content/uploads/2015/11/FPF_Dossier05_BPS.pdf)

González, A., Gavilanes, M., Plata, C., Maya, V., Carmona, L., Ponce, I. G., & Nogales, P. (2015). *Compendio de Bioquímica: Proteínas, Membranas y Metabolismo* (2a ed.). <https://bioquimica.quimica.unam.mx/wp-content/uploads/2021/06/1508-Material-docente-Compendio-de-Bioquimica-2a-Edición.pdf>

González-Mariscal, L., Tapia, R., & Chamorro, D. (2008). Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. En *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1778, Número 3, pp. 729–756). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2007.08.018>

Guerrero, W., & Ardila, C. (2016). El Bisfenol A (BPA), análisis de sus efectos en el ser humano. *Revista Matices Tecnológicos. Edición, 8*, 2027–4408.

Gules, O., Yildiz, M., Naseer, Z., & Tatar, M. (2019). Effects of folic acid on testicular toxicity induced by bisphenol-A in male Wistar rats. *Biotechnic and Histochemistry*, 94(1), 26–35. <https://doi.org/10.1080/10520295.2018.1493222>

Hicks, J. J., Juan Hicks, Y. J., & T, Y. D. (2006). *Estrés oxidante. Concepto y clasificación* (Vol. 14).

Huang, Y. Q., Wong, C. K. C., Zheng, J. S., Bouwman, H., Barra, R., Wahlström, B., Neretin, L., & Wong, M. H. (2012). Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environment International*, 42(1), 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.04.010>



Ike, M., Chen, M. Y., Danzl, E., Sei, K., & Fujita, M. (2006). Biodegradation of a variety of bisphenols under aerobic and anaerobic conditions. *Water Science and Technology*, 53(6), 153–159. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.189>

Jewell, T., & Biggers, A. (2023). *Risk Factors of Having High or Low Estrogen Levels in Males*. healthline. <https://www.healthline.com/health/estrogen-in-men>

Jiang, Q. (2014). Natural forms of vitamin E: Metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. En *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 72, pp. 76–90). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.035>

Johnson, L. E. (2022). *Deficiencia de Ácido Fólico*. Manual MSD. <https://www.msdmanuals.com/es/professional/trastornos-nutricionales/deficiencia-dependencia-e-intoxicaci%C3%B3n-vitam%C3%ADnica/deficiencia-de-%C3%A1cido-f%C3%B3lico>

Karmakar, P. C., Ahn, J. S., Kim, Y. H., Jung, S. E., Kim, B. J., Lee, H. S., & Ryu, B. Y. (2020). Gestational exposure to bisphenol A affects testicular morphology, germ cell associations, and functions of spermatogonial stem cells in male offspring. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms21228644>

Leblond, C. P., & Clermont, Y. (1952). Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 55(4), 548–573.

Li, M. W. M., Mruk, D. D., Lee, W. M., & Cheng, C. Y. (2009). Disruption of the blood-testis barrier integrity by bisphenol A in vitro: Is this a suitable model for studying blood-testis barrier dynamics? *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41(11), 2302–2314. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.05.016>

Lifeder. (2023, julio 12). *Picnosis*. <https://www.lifeder.com/picnosis/#picnosis-y-apoptosis>

Liu, J., Li, J., Wu, Y., Zhao, Y., Luo, F., Li, S., Yang, L., Moez, E. K., Dinu, I., & Martin, J. W. (2017). Bisphenol A Metabolites and Bisphenol S in Paired Maternal and Cord Serum. *Environmental Science and Technology*, 51(4), 2456–2463. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05718>

Ma, Y., Liu, H., Wu, J., Yuan, L., Wang, Y., Du, X., Wang, R., Marwa, P. W., Petlulu, P., Chen, X., & Zhang, H. (2019). The adverse health effects of bisphenol A and related toxicity mechanisms. En *Environmental Research* (Vol. 176). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108575>

Maffini, M. V., Rubin, B. S., Sonnenschein, C., & Soto, A. M. (2006). Endocrine disruptors and reproductive health: The case of bisphenol-A. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 254–255, 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2006.04.033>

Martínez, A., Rodrigo, A., Barranquero, M., & Rogel, S. (2022, diciembre 28). *Prueba de vitalidad: espermatozoides inmóviles vivos o muertos*. Reproducción Asistida.org. <https://www.reproduccionasistida.org/analisis-de-la-vitalidad-de-los-espermatozoides/>

Molangiri, A., Varma, S., M, S., Kambham, S., Duttaroy, A. K., & Basak, S. (2022). Prenatal exposure to bisphenol S and bisphenol A differentially affects male reproductive system in the adult offspring. *Food and Chemical Toxicology*, 167. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.113292>

Mruk, D. D., & Cheng, C. Y. (2015). The mammalian blood-testis barrier: Its biology and regulation. En *Endocrine Reviews* (Vol. 36, Número 5, pp. 564–591). Endocrine Society. <https://doi.org/10.1210/er.2014-1101>

Naderi, M., Wong, M. Y. L., & Gholami, F. (2014). Developmental exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults. *Aquatic Toxicology*, *148*, 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.009>

Naderi, N., & House, J. D. (2018). Recent Developments in Folate Nutrition. En *Advances in Food and Nutrition Research* (Vol. 83, pp. 195–213). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2017.12.006>

National Institutes of Health. (2021). *Vitamin E. Fact Sheet for Consumers*. Strengthening Knowledge and Understanding of Dietary Supplements. <https://ods.od.nih.gov/factsheets/VitaminE-Consumer/>

Ni, F. Da, Hao, S. L., & Yang, W. X. (2019). Multiple signaling pathways in Sertoli cells: recent findings in spermatogenesis. En *Cell Death and Disease* (Vol. 10, Número 8). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1782-z>

NIH. (2020, agosto 17). *Knockout Mice Fact Sheet*. National Human Genome Research Institute. <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Knockout-Mice-Fact-Sheet>

Peña-Corona, S. I., Vargas-Estrada, D., Juárez-Rodríguez, I., Retana-Márquez, S., & Mendoza-Rodríguez, C. A. (2023). Bisphenols as promoters of the dysregulation of cellular junction proteins of the blood-testis barrier in experimental animals: A systematic review of the literature. En *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/jbt.23416>

Piprek, R. P., Kloc, M., Mizia, P., & Kubiak, J. Z. (2020). The central role of cadherins in gonad development, reproduction, and fertility. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Número 21, pp. 1–21). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21218264>

Pointis, G., Fiorini, C., Defamie, N., & Segretain, D. (2005). Gap junctional communication in the male reproductive system. En *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* (Vol. 1719, Números 1–2, pp. 102–116). <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2005.09.017>

RAE. (s/f). *Hormona*. Diccionario de la lengua española. Recuperado el 14 de diciembre de 2023, de <https://dle.rae.es/hormona#otras>

Rahman, M. S., Kang, K. H., Arifuzzaman, S., Pang, W. K., Ryu, D. Y., Song, W. H., Park, Y. J., & Pang, M. G. (2019). Effect of antioxidants on BPA-induced stress on sperm function in a mouse model. *Scientific Reports*, *9*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47158-9>

Salian, S., Doshi, T., & Vanage, G. (2009). Neonatal exposure of male rats to Bisphenol A impairs fertility and expression of sertoli cell junctional proteins in the testis. *Toxicology*, *265*(1–2), 56–67. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.09.012>

Sencar, L., Coskun, G., Şaker, D., Sapmaz, T., Tuli, A., Özgür, H., & Polat, S. (2021). Bisphenol A decreases expression of Insulin-like factor 3 and induces histopathological changes in the Testes of Rats. *Toxicology and Industrial Health*, *37*(6), 314–327. <https://doi.org/10.1177/07482337211014097>

Sridharan, S., Brehm, R., Bergmann, M., & Cooke, P. S. (2007). Role of connexin 43 in sertoli cells of testis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1120, 131–143. <https://doi.org/10.1196/annals.1411.004>

Srivastava, S., & Gupta, P. (2018). Alteration in apoptotic rate of testicular cells and sperms following administration of Bisphenol A (BPA) in Wistar albino rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(22), 21635–21643. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2229-2>

Ullah, H., Jahan, S., Ain, Q. U., Shaheen, G., & Ahsan, N. (2016). Effect of bisphenol S exposure on male reproductive system of rats: A histological and biochemical study. *Chemosphere*, 152, 383–391. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.125>

Ullah, H., Ullah, F., Rehman, O., Jahan, S., Afsar, T., Al-Disi, D., Almajwal, A., & Razak, S. (2021). Chronic exposure of bisphenol S (BPS) affect hypothalamic-pituitary-testicular activities in adult male rats: possible in estrogenic mode of action. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 26(1). <https://doi.org/10.1186/s12199-021-00954-0>

USEPA. (1988, septiembre). *Bisphenol A; CASRN 80-05-7*. Integrated Risk Information System (IRIS), Chemical Assessment Summary. [https://iris.epa.gov/static/pdfs/0356\\_summary.pdf](https://iris.epa.gov/static/pdfs/0356_summary.pdf)

Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Lee, D. H., Shioda, T., Soto, A. M., vom Saal, F. S., Welshons, W. V., Zoeller, R. T., & Myers, J. P. (2012). Hormones and endocrine-disrupting chemicals: Low-dose effects and nonmonotonic dose responses. En *Endocrine Reviews* (Vol. 33, Número 3, pp. 378–455). <https://doi.org/10.1210/er.2011-1050>

Vigueras-Villaseñor, R. M., Molina-Ortiz, D., Reyes-Torres, G., del Ángel, D. S., Moreno-Mendoza, N. A., Cruz, M. E. G., Cuevas-Alpuche, O., & Rojas-Castañeda, J. C. (2009). Effect of allopurinol on damage caused by free radicals to cryptorchid testes. *Acta Histochemica*, 111(2), 127–137. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2008.05.004>

Vogl, A. W., Vaid, K. S., & Guttman, J. A. (2008). The Sertoli cell cytoskeleton. *Advances in experimental medicine and biology*, 636, 186–211.

Wu, H., Wei, Y., Zhou, Y., Long, C., Hong, Y., Fu, Y., Zhao, T., Wang, J., Wu, Y., Wu, S., Shen, L., & Wei, G. (2021). Bisphenol S perturbs Sertoli cell junctions in male rats via alterations in cytoskeletal organization mediated by an imbalance between mTORC1 and mTORC2. *Science of the Total Environment*, 762. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144059>

Wu, L. H., Zhang, X. M., Wang, F., Gao, C. J., Chen, D., Palumbo, J. R., Guo, Y., & Zeng, E. Y. (2018). Occurrence of bisphenol S in the environment and implications for human exposure: A short review. En *Science of the Total Environment* (Vol. 615, pp. 87–98). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.194>

Yan Cheng, C., & Mruk, D. D. (2012). The blood-testis barrier and its implications for male contraception. *Pharmacological Reviews*, 64(1), 16–64. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002790>

Yan, H. H. N., Mruk, D. D., Lee, W. M., & Yan Cheng, C. (2008). Blood-testis barrier dynamics are regulated by testosterone and cytokines via their differential effects on the kinetics of protein endocytosis and recycling in Sertoli cells. *The FASEB Journal*, 22(6), 1945–1959. <https://doi.org/10.1096/fj.06-070342>

Ye, X., Wong, L. Y., Kramer, J., Zhou, X., Jia, T., & Calafat, A. M. (2015). Urinary Concentrations of Bisphenol A and Three Other Bisphenols in Convenience Samples of U.S. Adults during 2000-2014.

*Environmental Science and Technology*, 49(19), 11834–11839.  
<https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02135>

Yousaf, B., Amina, Liu, G., Wang, R., Qadir, A., Ali, M. U., Kanwal, Q., Munir, B., Asmatullah, & Abbas, Z. (2016). Bisphenol A exposure and healing effects of *Adiantum capillus-veneris* L. plant extract (APE) in bisphenol A-induced reproductive toxicity in albino rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(12), 11645–11657. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6330-0>

Zavala-Zendejas, V. E. , & Rendón-Huerta, E. P. (2008). Alteración de la integridad de las uniones estrechas en el desarrollo del cáncer. El papel de las claudinas. *Bioquímica*, 33(1), 19–29. [www.medigraphic.com](http://www.medigraphic.com)

## Anexo I. Reactivos preparados para la histología del tejido.

### A. Inclusión en resina epóxica (EPON 812).

#### Fijador de Karnovsky modificado, pH 7.3 (100 mL)

Paraformaldehído 1%	25 mL H <sub>2</sub> O	60-70°C
Amortiguador de cacodilatos 2M	50 mL	
Glutaraldehído 25%	10 mL	
H <sub>2</sub> O	15 mL	
Ajustar pH a 7.3		

#### Amortiguador de cacodilatos 2M, pH 7.4 (500 mL)

Cacodilato de sodio	21.4002 g
H <sub>2</sub> O	500 mL
Ajustar pH a 7.4	

#### Resina EPON (PELCO 1800g).

##### Mezcla A

Embed 812 ó med cast	50 mL
DDSA	81 mL

##### Mezcla B

Embed 812 ó med cast	50 mL
NMA	44 mL

##### Mezcla fina / para incluir

Mezcla A	7 mL
Mezcla B	3 mL
DMP30	0.15 mL

**NOTA:** El EPON se maneja siempre con guantes y se prepara y usa a temperatura ambiente, cerca de una lámpara caliente. Las mezclas preparadas deben guardarse siempre en refrigeración.

### B. Inclusión en parafina

#### Amortiguador salino de fosfatos (PBS) 1X, pH 7.4 (1 L)

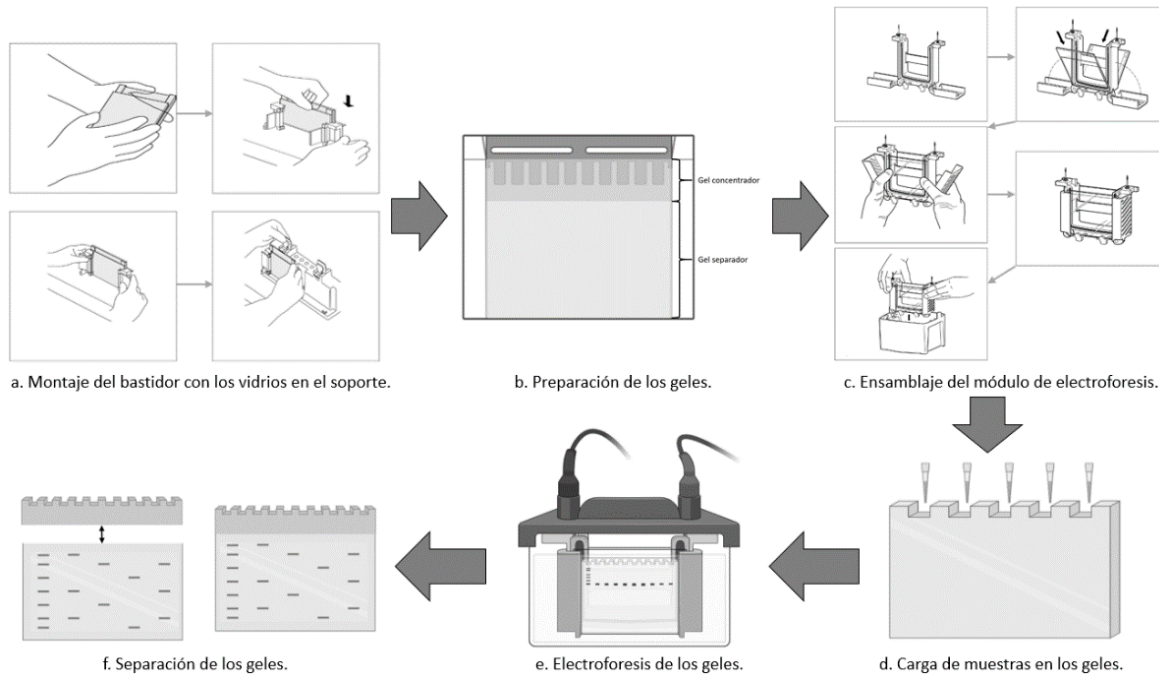
NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 g
Aforar a 1L. Ajustar pH a 7.4	

#### Paraformaldehído (PFA) 4% (100 mL)

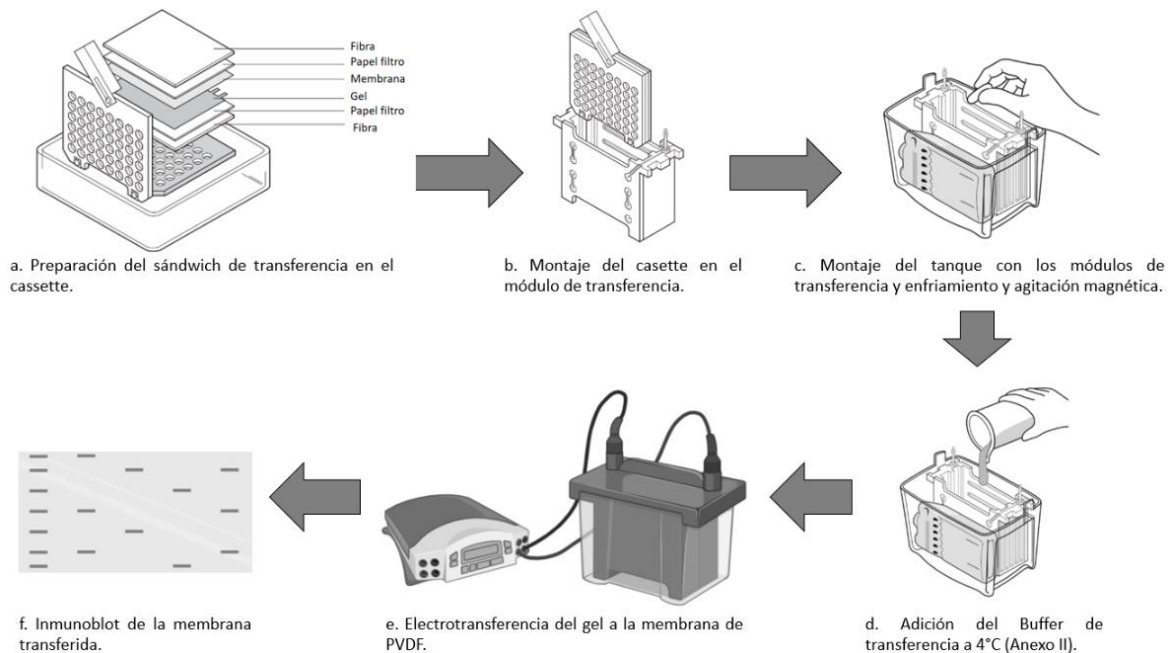
PFA	4 g
PBS 1x	80 mL, 60°C.

Agitar hasta diluir, enfriar, aforar a 100 mL con PBS. Refrigerar hasta su uso.

**Anexo II. Esquemas del proceso de Western Blot realizado para cuantificar las proteínas de la BHT.**



**Figura AII.1. Esquema del proceso de electroforesis utilizando el equipo Mini-PROTEAN® Tetra Cell de BioRad.** Realizado con elementos obtenidos de BioRender, adaptado de las figuras presentes en el Manual de Instrucciones Mini-PROTEAN Tetra Cell de BioRad (Fig. 3 y Fig. 4) disponible en: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10007296D.pdf>



**Figura AII.2. Esquema del proceso de electrotransferencia utilizando el equipo Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell de BioRad.** Realizado con elementos obtenidos de BioRender, adaptado de las figuras presentes en el Manual de Instrucciones Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell de BioRad disponible en: <https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/M1703930.pdf>

### Anexo III. Reactivos preparados para el análisis de Western Blot.

#### A. Preparación de geles

##### Gel separador (5 mL = 1 gel)

	mL para 8%	mL para 10%	mL para 15%
H <sub>2</sub> Odd	2.3	1.9	1.1
Acrilamida 30% (-4°C)	1.3	1.7	2.5
Tris-HCl 1.5M pH 8.8 (-4°C)	1.3	1.3	1.3
SDS 10%	0.05	0.05	0.05
PSA 10% (-20°C)	0.05	0.05	0.05
TEMED (T.A)	0.003	0.002	0.002

##### Gel concentrador (2 mL = 1 gel).

	mL para 5%
H <sub>2</sub> Odd	1.4
Acrilamida 30% (-4°C)	0.33
Tris-HCl 0.5M pH 6.8 (-4°C)	0.25
SDS 10%	0.02
PSA 10% (-20°C)	0.02
TEMED (T.A)	0.002

Los reactivos necesarios para preparar los geles se especifican en los incisos G-K de este apartado.

#### B. Amortiguador de carga 5X (Laemmli), pH 6.8

SDS	10%
β-mercaptoetanol	25%
Glicerol	50%
Azul de bromofenol	0.01%
Tris-HCl 0.5M pH 6.8	0.3125 M

#### C. Amortiguador de corrida

##### Amortiguador de corrida 10X, pH 8.3 (1 L)

Tris Base	30.3 g
Glicina	144 g
SDS	10 g

Disolver en 800 mL de H<sub>2</sub>Odd, aforar a 1.0 L sin ajustar pH, Almacenar a 4°C.

##### Amortiguador de corrida 1x, pH 8.3 (1 L)

Tomar alícuota de 100 mL de amortiguador de corrida 10X, aforar a 1.0 L con H<sub>2</sub>Odd, Almacenar a 4°C.

#### D. Amortiguador de transferencia, pH 8.3 (1 L)

H <sub>2</sub> Odd	700 mL
Metanol	200 mL
Amortiguador de corrida 10X	100 mL

**E. Amortiguador tris salino (TBS) 10mM Tris Base, 150mM NaCl, pH 7.4 (2 L)**

Tris Base 2.4 g  
NaCl 17.5 g

Disolver en 1.5 L de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> o H<sub>2</sub>O<sub>o</sub>, ajustar pH entre 7.4 y 7.5 con HCl, Aforar a 2.0 L, Almacenar a 4°C.

**F. Amortiguador TBS-T, pH 7.4 (1 L)**

Amortiguador TBS pH 7.4 1.0 L  
Tween 20 1 mL

**G. Dodecil sulfato de sodio (SDS) 10% (50 mL)**

SDS 5 g

Disolver en 30 mL de H<sub>2</sub>O<sub>o</sub>, aforar a 50.0 mL

**H. Tris-HCl 0.5M, pH 6.8 (100 mL)**

Tris Base 6 g

Disolver en 80 mL de H<sub>2</sub>O<sub>o</sub>, ajustar pH 6.8 con HCl, aforar a 100.0 mL, Almacenar a 4°C.

**I. Tris-HCl 1.5M pH 8.8 (100 mL)**

Tris Base 18.15 g

Disolver en 80 mL de H<sub>2</sub>O<sub>o</sub>, ajustar pH 8.8 con HCl, aforar a 100.0 mL, Almacenar a 4°C.

**J. Persulfato de amonio (PSA) 10% (1 mL)**

PSA 0.1 g

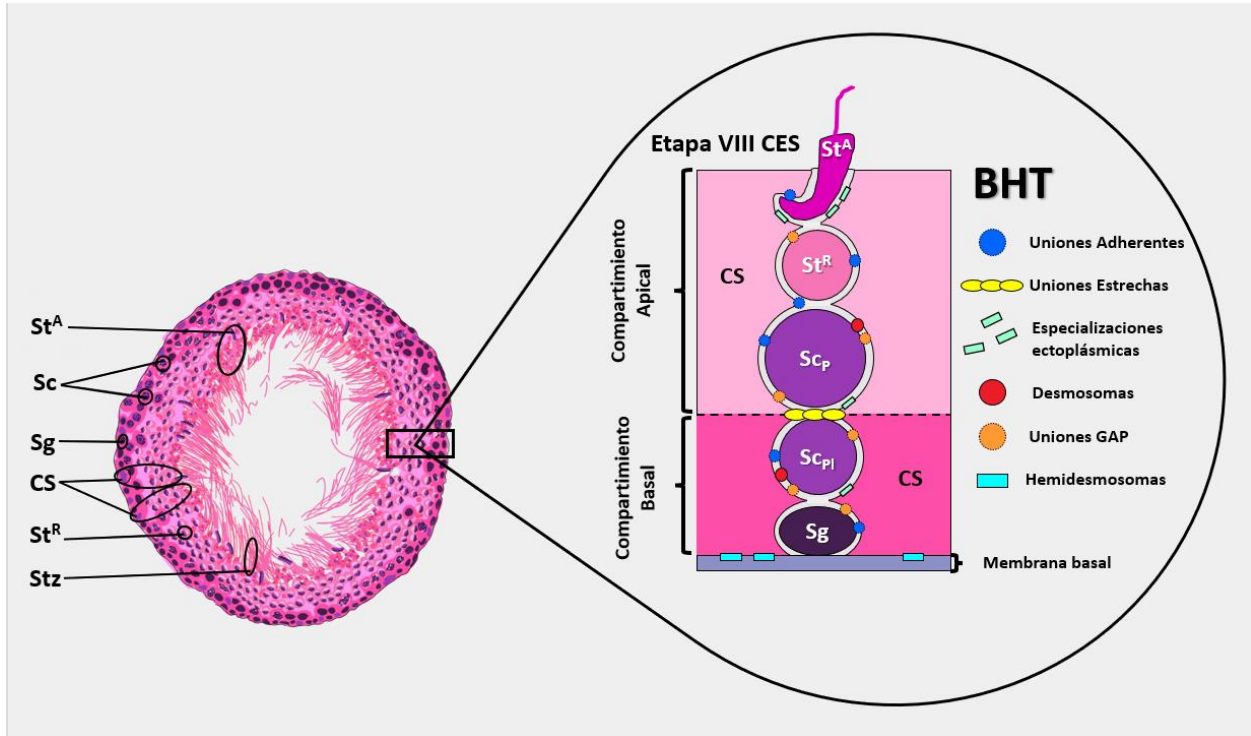
Disolver en 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>o</sub>, Almacenar a -20°C en oscuridad.

**K. Acrilamida 30%**

Se utilizó la solución 30% Acrylamide/Bis, 29:1 de BioRad con número de catálogo 1610156.

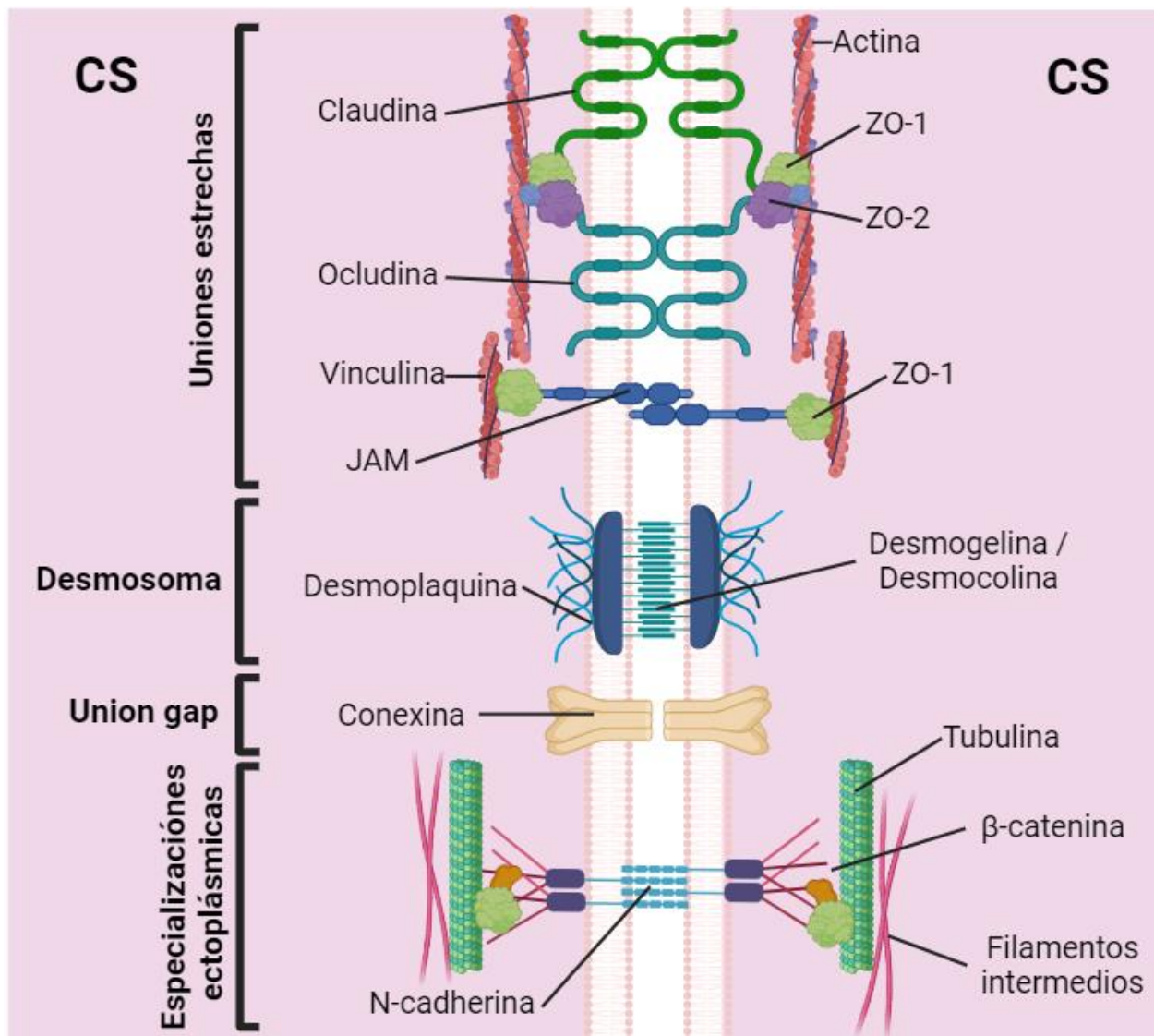


Anexo IV. Figuras complementarias



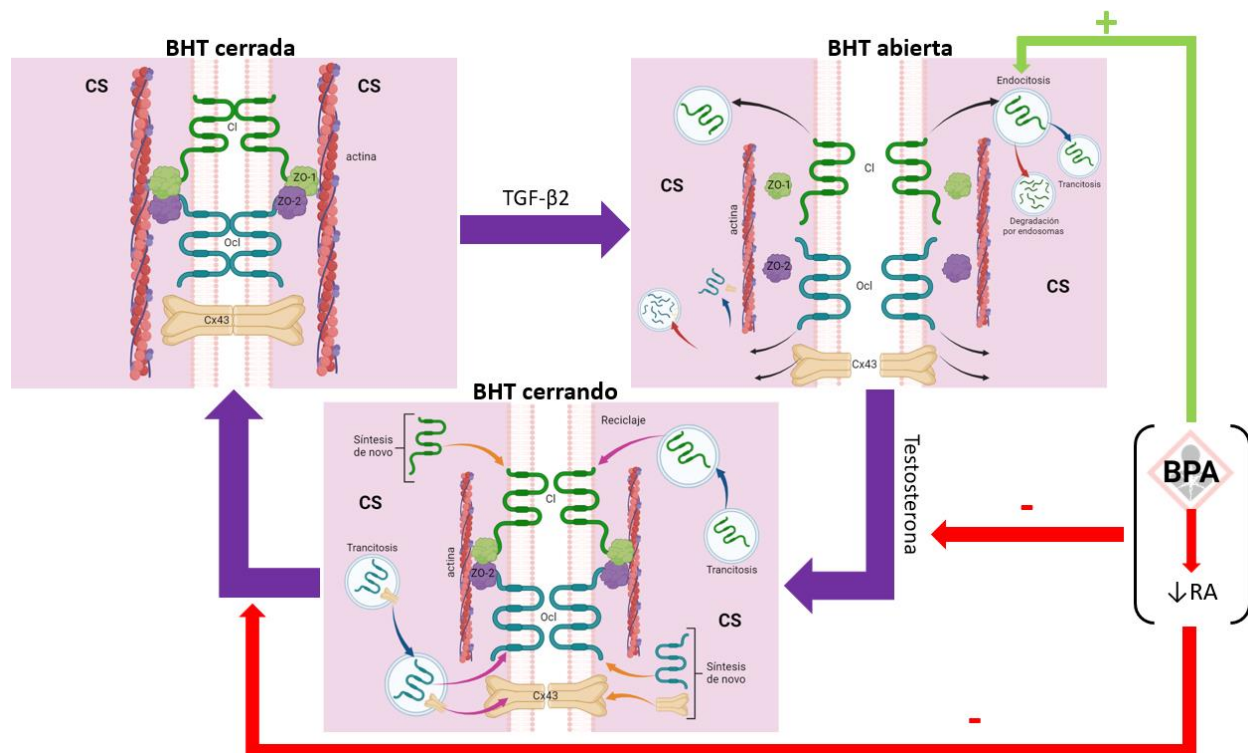
**Figura AIV.1. Dibujo de la conformación de la BHT en rata.** La imagen de la izquierda representa a un túbulo seminífero en la etapa VIII del CES con cada tipo celular señalado por un círculo negro. La imagen de la derecha representa un acercamiento al epitelio seminífero en donde se señalan los diferentes tipos de uniones celulares que conforman la BHT (mencionados en el apartado 2.2.2). BHT: barrera hematotesticular; CES: ciclo del epitelio seminífero; CS: célula de Sertoli; Sc: espermátide redonda; Sc<sub>P</sub>: espermátide en paquiteno; Sc<sub>Pl</sub>: espermátide en preleptoteno; Sg: espermátide redonda; St<sup>A</sup>: espermátide alargada; St<sup>R</sup>: espermátide redonda; Stz: espermátide redonda (espermátides en la etapa 19 de la espermiogénesis).

*Nota.* Dibujo realizado por Carolina Zárate García, adaptado de Fig. 2 Ilustración de los diferentes tipos de uniones celulares en el epitelio seminífero de ratas adultas (Mruk & Cheng, 2015).



**Figura AIV.2.** Dibujo de las proteínas estructurales de la barrera hematotesticular. La imagen representa las proteínas estructurales de la BHT mencionadas en el apartado 2.2.3. CS: Célula de Sertoli; JAM: Moléculas de adhesión de unión; ZO: Zonula occludens.

*Nota.* Dibujo realizado con BioRender por Carolina Zárate García, adaptado de Fig. 5 Ilustración de las principales proteínas de UE, EE, desmosoma y UG en la BHT de testículo de ratas adultas (Mruk & Cheng, 2015) y de Fig. 7 Dibujo esquemático ilustrando la arquitectura molecular de las proteínas constituyentes de la BHT (Cheng & Mruk, 2011).



**Figura AIV.3. Dibujo del efecto del BPA sobre la dinámica de la BHT en ratas adultas.** La imagen superior izquierda representa la conformación de proteínas UE y UG cuando la BHT se encuentra cerrada. La imagen superior derecha representa el proceso de endocitosis de las proteínas TJ y UG para permitir la apertura de la barrera y el paso de espermatozoides en preleptoteno/leptoteno a través de la BHT. La imagen inferior al centro representa el proceso de cierre de la BHT, durante el cual las proteínas endocitadas en etapa de transcitosis son recicladas para formar una nueva BHT o bien, la síntesis de novo de estas proteínas por parte de las CS o CG (proceso mencionado en el apartado 2.2.4). Las flechas rojas representan la inhibición sobre la producción de testosterona por acción del BPA, alterando dinámica de la BHT. La flecha verde representa un aumento en el proceso de endocitosis de las proteínas, produciendo un desequilibrio en la dinámica de la BHT al redistribuir las proteínas de la BHT (mencionado en los apartados 2.4.3 y 9.2.7). BHT: Barrera hematotesticular; BPA: Bisfenol A; Cl: Claudinas; CS: Célula de Sertoli; Cx43: Conexina 43; Ocl: Occludina; TGF- $\beta$ 2: Factor de Crecimiento Transformante Beta 2; RA: Receptor de andrógenos; UE: uniones estrechas; UG: uniones "gap"; ZO: Zonula occludens;

*Nota.* Dibujo realizado con BioRender por Carolina Zárate García, adaptado de Fig. 5 Dibujo esquemático que ilustra las moléculas que interactúan unas con otras para regular la apertura y cierre normal de la BHT y los efectos disruptivos del MBP y el BPA (de Freitas et al., 2016) y del trabajo de Cheng et al. (2011).