



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Efecto de la exposición perinatal del
disruptor endocrino Bisfenol-s sobre la
proliferación celular del útero de roedores”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A

JESICA JIMÉNEZ VIVANCO



CDMX

2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado

Presidente:.....Mtra. Luz Del Carmen Castellanos Román

Vocal:.....Dra. Carmen Adriana Mendoza Rodríguez

Secretario:.....Mtra. Inés Miranda Martínez

1er. Suplente:.....Guillermo Celestino Cardoso Saldaña

2do. Suplente:.....Dr. Ignacio González Sánchez

Experimento llevado a cabo en el laboratorio con número 323 del edificio "F" de la Facultad de Química; Ciudad Universitaria, U.N.A.M.

Asesora:

Dra. Carmen Adriana Mendoza Rodríguez

Sustentante:

Jesica Jiménez Vivanco

Agradecimientos

En primer lugar a mis padres, Miriam Vivanco y Alejandro Jiménez, por todo el apoyo que me brindaron durante toda mi formación académica. Por estar siempre a mi lado en los momentos buenos y malos, y enseñarme todos los valores que me permitieron llegar hasta aquí y sobre todo por siempre creer y confiar en mí. Y todo el cariño y amor.

A todos mis profesores de la Facultad de Química, por toda la formación académica durante estos años de Universidad y todas las enseñanzas que me dieron para poder formarme como una mejor persona académicamente. Sobre todo, a la Dra. Adriana Mendoza Rodríguez, por la confianza y la oportunidad, y permitirme formar parte de esta investigación, también por la paciencia y apoyo que me brindo durante todo el trabajo de mi tesis.

A la M.V.Z. Lucía Macías Rosales y la M. en C. Marisol Rivera Huerta, que me permitieron y brindaron el uso de las instalaciones del bioterio y los animales de experimentación para desarrollar mi investigación.

A mi familia, mis abuelos, tíos y tías, tanto Vivanco como Jiménez. Por acompañarme con su apoyo incondicional durante todo el transcurso de mi vida escolar y personal, por todos los consejos que me ayudaron y permitieron lograr mis objetivos y llegar hasta donde estoy.

A Fabian por estar a mi lado y ayudar a levantarme en los momentos más difíciles, por creer en mí y por todas las enseñanzas. A Elsa y Miguel que durante este poco tiempo me han brindado su cariño, confianza y apoyo.

A mis amigos Toño RG, Eva, Gracie, Erick, Oscar, Luis, Gio, Lalo, Mario ayudándonos siempre mutuamente para salir adelante en las clases, en la carrera y en la vida, y contando siempre con su amistad y apoyo. Y sobre todo a mis mejores amigos Angie, Rafa, Andrea y Lore por todas las enseñanzas, apoyo, la mejor amistad y cariño, durante todos estos largos años.

ÍNDICE

I.	Resumen.....	1
II.	Introducción.....	3
III.	Antecedentes.....	5
	3.1 Ciclo estral de la rata.....	5
	3.1.1 Niveles hormonales.....	6
	3.2 Proliferación celular.....	14
	3.3 Bisfenol-A.....	17
	3.4 Generalidades del BPS.....	18
	3.4.1 Exposición del ser humano al BPS.....	20
	3.4.2 Efectos adversos del BPS.....	24
IV.	Planteamiento del problema.....	31
V.	Hipótesis.....	32
VI.	Objetivos.....	32
	6.1 Objetivo general.....	32
	6.2 Objetivos particulares.....	32
VII.	Metodología.....	33
	7.1 Animales de experimentación.....	34
	7.2 Evaluación diaria del del ciclo estral y apareamiento.....	34
	7.3 Administración de tratamiento farmacológico a ratas Wistar F0.....	35
	7.4 Caracterización fenotípica de crías F1.....	35
	7.5 Evaluación de niveles hormonales séricos.....	36
	7.6 Procesamiento del tejido.....	36
	7.7 Procedimiento de tinción para determinación de proliferación celular	37
	7.8 Cuantificación de células proliferantes y células totales	38
	7.9 Análisis de los datos.....	38
VIII.	Resultados.....	39
	8.1 Dosis de BPS ingerida	39
	8.2 Porcentaje crías hembras y machos por tratamiento	40
	8.3 Peso promedio semanal de ratas F0.....	41

8.4 Efecto del BPS sobre la relación distancia ano-genital/(peso corporal) ^{1/3} en la generación F1.....	41
8.5 Peso corporal de ratas F1.....	43
8.6 Regulación del ciclo estral en ratas F1.....	44
8.7 Niveles de las hormonas estradiol (E2) y progesterona (P4)	45
8.8 Cuantificación de células proliferativas en el epitelio uterino de ratas F1	46
IX. Discusión.....	50
X. Conclusiones.....	60
XI. Referencias.....	62

I. Resumen

Un disruptor endocrino es un agente exógeno al organismo, presentes en el medio ambiente, 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, reproducción y desarrollo. Aunque no se sabe a ciencia cierta su mecanismo de acción de los disruptores endocrinos, se sabe que éstos tienen la capacidad de actuar como una hormona interfiriendo en la unión hormona-receptor, por su capacidad de tener una estructura similar a las hormonas, alterando así su sistema endocrino.

El bisfenol-S (BPS) se empezó a utilizar en la industria alimentaria, como en la elaboración de envases para alimentos, en cartón y recubrimiento para latas, como sustituto del compuesto bisfenol-A (BPA), ya que diversos estudios mostraron que este compuesto presentaba efectos adversos en el ser humano, nombrándolo así como disruptor endocrino. Sin embargo, se observó que el compuesto era capaz de migrar del envase al alimento y, siendo un análogo del BPA, también podría presentar efectos adversos en el desarrollo fisiológico (Ahsan et al., 2018). En la presente investigación, como modelo experimental se utilizó ratas Wistar, y se evaluó el efecto que podría tener la administración perinatal por vía oral de BPS a dos diferentes concentración (dosis baja (BPS-L) 0.05 mg/kg peso corporal (p.c.)/día y dosis alta (BPS-H) 20 mg/kg p.c./día), en la proliferación celular del epitelio uterino de las ratas F1; además se estudió los efectos relacionados con el aumento de peso de madres (F0), porcentaje de crías F1 hembra y macho, peso corporal de crías, regulación de ciclo estral, desarrollo de genitales y niveles hormonales (E2 y P4). Se observaron diferencias significativas en el crecimiento de las crías F1 y en el promedio de la distancia ano-genital (DAG), entre el peso corporal, tanto en hembras como en machos. En machos F1 hubo una disminución significativa del peso en el grupo BPS-L en comparación con el grupo control, y tanto en hembras como en machos una disminución en el promedio de la DAG entre el peso corporal de los animales tratados con BPS-H con respecto al grupo control. Sin embargo, no se observaron diferencia

significativas en la proliferación celular del epitelio uterino entre los grupos estudiados, por lo que se piensa que el BPS no afecta directamente en la multiplicación de células epiteliales uterinas, pero si en el desarrollo fisiológico y sexual.

II. Introducción

Para la fabricación de algunos polímeros usados en la fabricación de biberones, envases de comida, botellas de plástico, recubrimientos para latas, cartones, equipo médico dental y quirúrgico, tickets, etc., se utiliza el compuesto bisfenol-A (BPA), a partir del cual se elaboran plásticos de policarbonato y resinas epoxi; muy importante en productos de consumo e industriales, usados diariamente y en contacto con el ser humano (López-Cervantes *et al.*, 2003). Se ha demostrado la migración de este compuesto desde el envase hacia el alimento (Vom Saal *et al.*, 1998; Yamamoto *et al.*, 1999), y se ha demostrado la presencia de este compuesto en las muestras de orina de diversas poblaciones (Becker *et al.*, 2009; Cantonwine *et al.*, 2010; He *et al.*, 2009; Yamano *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2008 y 2009). Después de muchos estudios realizados, el compuesto se catalogó como un disruptor endocrino ya que los resultados indicaban que el compuesto BPA tenía la capacidad de migrar del polímero al alimento, por lo que las personas consumían directamente el compuesto, afectando el sistema endocrino y reproductivo por acción hormonal (Vom *et al.*, 1998).

Debido a esto se comenzó a remplazar el BPA por un nuevo compuesto llamado bisfenol-S (BPS), el cual es un análogo del BPA, con un grupo sulfonilo adicional a la estructura. Este compuesto se utilizó, de igual forma, para la elaboración de polímeros y resinas epoxi, e igualmente es de origen sintético (Chen *et al.*, 2016).

Sin embargo se empezaron a realizar diversos estudios ya que este compuesto se encontró nuevamente en muestras de orina de diversas poblaciones, por lo que se sabe que el BPS, así como el BPA siendo un análogo del mismo, presentan efectos adversos en el ser humano, como disminución de producción de testosterona (Eladak *et al.*, 2015) y aumento en peso uterino, genera obesidad, afecta en el sistema endocrino y reproductivo en general (Ahsan *et al.*, 2018) y aunque se ha demostrado la toxicidad del compuesto BPS, la FDA permite su uso en polímeros a baja dosis. Sin embargo las investigaciones han demostrado que la exposición diaria a pequeñas dosis también repercute en el sistema endocrino y reproductivo, ya que también es capaz de migrar del contenedor al alimento

teniendo contacto directo con el ser humano (Wu *et al.*, 2017, Vandenberg *et al.*, 2012).

Dicho lo anterior, se ha demostrado que en los últimos años los niveles de BPS encontrados en el ser humano van en aumento. Esto se debe a la substitución del BPA por BPS en la elaboración de diversos polímeros.

El Bisfenol-S actualmente es conocido como un disruptor endocrino, el cual puede afectar el desarrollo fisiológico. Este compuesto se está utilizando para la elaboración de distintos productos que tienen contacto directo diariamente con el ser humano, ya que se puede encontrar en alimentos (frutas, carne, verduras, pescado), en el medio ambiente y en productos que tienen contacto con alimentos como envases de plástico, recubrimientos para latas y biberones (Ahsan *et al.*, 2018; Liao *et al.*, 2012; Lotti *et al.*, 2011).

Debido a la poca información que se encuentra acerca de los efectos de este compuesto sobre el ser humano, el presente estudio se realizó para poder conocer más sobre los efectos adversos que puede provocar el compuesto con respecto a la fisiología, la concentración hormonal y a la proliferación celular del epitelio uterino, para así poder difundir a la sociedad las consecuencias del uso de este compuesto en productos que tienen contacto con el ser humano, y así poder estandarizar su uso, ya que los niveles de BPS pueden aumentar aún más en los próximos años.

III. Antecedentes

3.1 Ciclo estral de la rata

En los mamíferos su ciclo se le conoce como “calor”, “celo” o “estro”, en el cual la hembra permite la copulación. Su ciclo estral es caracterizado por el tiempo que transcurre entre un período de celo y comienza el siguiente. La actividad reproductiva de las ratas presenta un modelo cíclico debido a varios factores externos como la temperatura, alimentación y/o luz, así como también por factores internos como ritmos endógenos y cantidad de vitelo a depositar en los ovocitos; esto quiere decir que está regulada por el sistema endocrino. (Marcondes *et al.*, 2002)

La caracterización de cada fase del ciclo estral se lleva a cabo por medio de la tinción histológica de un frotis vaginal (ésta debe hacerse diariamente a la misma hora para poder distinguir bien las fases).

El ciclo estral de las ratas dura entre 4 a 5 días, el cual se divide en 4 fases: Proestro, estro, metaestro (o diestro I) y diestro (o diestro II). Antes de que la rata comience su ciclo estral el tracto reproductivo se encuentra en modo inactivo, pasados aproximadamente los 30 días de edad ocurre el periodo considerado como anestro en donde se da la liberación de la hormona luteinizante (LH), lo cual conduce en ese momento a la maduración ovárica, por esto se dice que ha iniciado la pubertad. Una vez que sucede la maduración ovárica, de 8 a 9 días ocurre el primer periodo del proestro, seguido del estro y diestro (Westwood, 2008).

Una vez que comienza la madurez sexual, hasta los 12 meses la duración media del ciclo estral es de 4 días. La corta duración del ciclo estral de la rata hace que sea un animal ideal para la investigación del ciclo reproductivo. El ciclo estral está regulado por los cambios hormonales del eje hipotálamo-hipófisis-gónada.

3.1.1 Niveles hormonales

El sistema endocrino incluye ocho glándulas principales distribuidas por todo el cuerpo: Pineal, hipotálamo, hipófisis, tiroides, paratiroides, timo, cápsulas suprarrenales, páncreas, ovarios y testículos. Estas glándulas producen hormonas, las cuales funcionan como mensajeros que viajan a través del torrente sanguíneo hacia los tejidos y órganos. Las hormonas afectan los procesos corporales desde la cabeza hasta los pies. Pueden afectar el crecimiento y el desarrollo, el metabolismo (digestión, eliminación, respiración, circulación sanguínea y mantenimiento de la temperatura corporal), la función sexual, la reproducción y el estado de ánimo (Freeman, 1988).

El ciclo estral, en hembras de mamíferos, es regulado por hormonas del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. Los ovarios responden a las hormonas liberadas de la hipófisis, quien se encuentra bajo control nervioso hipotalámico. A su vez, las hormonas ováricas provocan modificaciones estructurales y funcionales en sus órganos blanco, que son el útero y la vagina. En esta última, dependiendo de la hormona ovárica que prevalezca, serán las modificaciones producidas en el epitelio vaginal, y estas modificaciones son susceptibles de ser monitoreadas mediante frotis vaginales (Brown-Grant *et al.*, 1970).

El hipotálamo, estructura nerviosa diencefálica, es fuente de factores que pasan a través de venas portales a la adenohipófisis, estructura endocrina presente en la base del diencefalo, en la cual regulan la liberación de las hormonas adenohipofisarias, que incluye a las hormonas gonadotrofinas (Freeman, 1988).

GnRH, hormona hipotalámica que actúa sobre la hipófisis, estimula secreción en la adenohipófisis, liberando hormonas gonadotróficas: hormona luteinizante (LH) y hormona estimulante de los folículos (FSH). La LH estimula la ovulación y genera la formación de cuerpo lúteo y la FSH estimula el crecimiento y maduración de los folículos ováricos. Estas dos hormonas, que llegan por vía sanguínea, actúan sobre los ovarios, que secretan estrógenos y progesterona, los cuales por sus niveles circulantes regulan la liberación de LH y FSH. La producción de estrógenos está limitada por la cantidad de receptores a FSH en las células

foliculares. Este ciclo es el responsable de los ciclos reproductores de la hembra. (Brown-Grant *et al.*, 1970, Butcher *et al.*, 1974)

En humanos, el ciclo menstrual se divide en dos fases:

En la fase preovulatoria, también llamada fase folicular o fase proliferativa, aumenta el espesor del endometrio por estimulación de estrógenos hacia hiperplasia del endometrio uterino. En el ovario hay maduración de folículos ováricos en la cual hay extrusión de ovarios al abdomen, transformándose en cuerpo lúteo, y los óvulos ovulados son canalizados hacia el útero por las fimbrias de los oviductos.

En la fase postovulatoria, también llamada fase lútea o fase secretora, hay acumulación de agua y otras sustancias que nutren en el útero, estas sustancias se encuentran bajo la influencia de la progesterona, debido a esta acumulación aumenta el espesor del epitelio uterino. Con respecto a los cambios en el ovario, el cuerpo lúteo degenera en una estructura que se reconoce en los cortes histológicos como masa pálida o cuerpo albicans (Brown-Grant *et al.*, 1970, Butcher *et al.*, 1974; Freeman, 1988). En el ciclo reproductivo, la regulación hormonal está dada por los siguientes sucesos: ocurre una mayor secreción de estrógenos por maduración de folículos ováricos bajo la influencia de la FSH. Estos estrógenos actúan sobre la adenohipófisis generando un aumento de FSH y LH. Estas dos hormonas ayudan a la ovulación por lo que el folículo se transforma en cuerpo lúteo, el cual secreta la progesterona. Los estrógenos y la progesterona, secretados anteriormente y que se encuentran en bajas concentraciones, actúan negativamente disminuyendo los niveles de las hormonas adenohipofisiarias, esto con ayuda de la hormona inhibina. Debido a la degeneración del cuerpo lúteo mencionada anteriormente en la fase postovulatoria, la relación de la progesterona y estrógenos con la hormona adenohipófisis se rompe, por lo que se inicia un nuevo ciclo por la maduración de folículos ováricos bajo la influencia de la FSH (Brown-Grant *et al.*, 1970).

Como se mencionó anteriormente, la duración del ciclo estral es de 4 días, y el cambio de cada fase depende de los cambios hormonales que se presentan

durante cada etapa. El estradiol es secretado por los folículos De Graaf; durante el estro, los niveles de estradiol en plasma periférico permanecen bajos (<10 pg/ml) (Brown-Grant *et al.*, 1970; Butcher *et al.*, 1974; Freeman, 1988). Estos empiezan a subir durante la tarde del metaestro hasta el diestro llegando a su máximo nivel (45 pg/ml) en la mañana del proestro, aproximadamente a las 9:00 a.m. Durante la tarde del proestro estos niveles de estradiol empiezan a disminuir hasta llegar nuevamente a los niveles más bajos en la madrugada del estro, entre la 1 y las 6 a.m. (*Figura 1*) (Butcher *et al.*, 1974; Freeman, 1988).

La LH y FSH van a ser secretadas por la GnRH por la hipófisis; los niveles de la LH se encuentran basales durante la etapa del estro hasta metaestro y diestro (0.5 ng/ml). Estos empiezan a aumentar en la tarde del proestro, entre la 1 y 3 p.m., alcanzando rápidamente su máximo nivel más tarde, alrededor de las 5 p.m. (37 ng/ml). Esto mismo provoca la ruptura folicular ocurriendo así la ovulación en la madrugada del estro, por lo que en la noche del proestro nuevamente ocurre la disminución de los niveles de LH hasta la etapa del diestro (*Figura 1*) (Brown-Grant *et al.*, 1970; Butcher *et al.*, 1974; Freeman, 1988).

Los niveles de progesterona aumentan durante dos etapas: de origen lúteo, aproximadamente a las 12 p.m. ocurre un incremento de progesterona, casi hasta 24 ng/ml, éste dura hasta la madrugada del diestro y posteriormente disminuyen a niveles basales en la mañana del diestro (6 a.m.), permaneciendo así hasta la tarde del proestro (aproximadamente a la 1 p.m.) donde hay el segundo aumento en los niveles de progesterona, alcanzando su máxima concentración de 46 ng/ml alrededor de las 6:00 p.m. (*Figura 1*) Este último incremento es secretado por células de granulosa del folículo preovulatorio (Butcher *et al.*, 1974; Freeman, 1988).

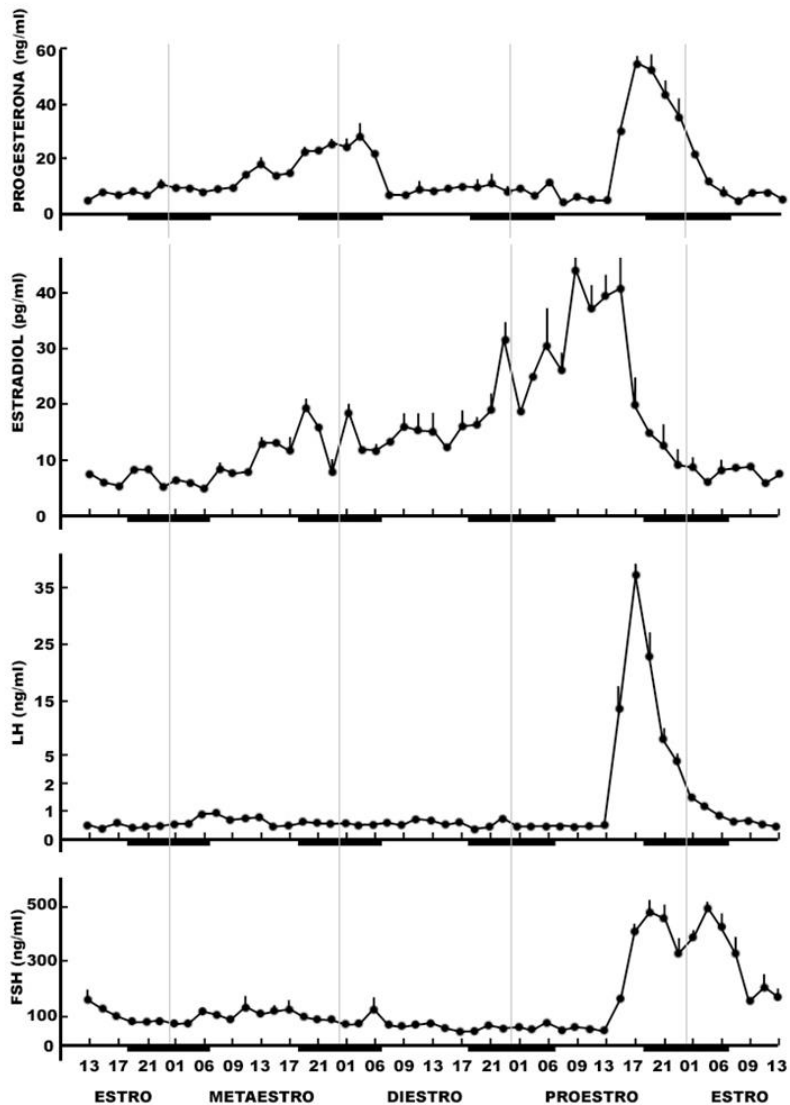


Figura 1. Niveles hormonales a lo largo del ciclo estral de la rata (tomando en cuenta la duración del ciclo estral de 4 días). Entre la etapa del proestro y el estro, ocurre el momento en que ocurre la ovulación, inducida por los niveles altos de la hormona luteinizante (LH). (Freeman, 1988)

La caracterización de cada fase del ciclo estral se basa en el análisis de las células presentes en un frotis vaginal: células descamadas, células nucleadas y leucocitos. Los principales cambios ocurren a nivel del ovario, útero, vagina y conducta (Freeman, 1988) como se observa en la *tabla 1* (De la Cruz y Pásaro, 1998).

- Proestro.

Durante esta etapa, la hembra no permite la cópula. Este es el día anterior a que ocurra la ovulación, dura entre 12 y 18 horas. En el frotis vaginal, se presentan mayormente células nucleadas de gran tamaño, aisladas o en capas (*Figura 2*) (De la Cruz y Pásaro, 1998).

El inicio de esta etapa se ve marcada por la formación de células aplanadas (estrato granuloso) sobre el estrato germinativo del epitelio vaginal, en donde también existe mitosis que va disminuyendo a lo largo de la fase. Así mismo, se va desarrollando en el estrato granuloso la capa de mucosa superficial de células ovoides con mucina y un estrato córneo de células densas y cornificadas (Westwood, 2008).

En el ovario, hay crecimiento y maduración de los folículos. En el útero, existe engrosamiento del endometrio por desarrollo glandular y vascular. El epitelio uterino pasa de cuboidal a columnar, y hay mitosis en células epiteliales y poca infiltración de células inflamatorias. En los ovarios, el cuerpo lúteo degenera, hay presencia de vacuolas citoplasmáticas y proliferación del tejido fibroso en la cavidad central (De la Cruz y Pásaro, 1998; Westwood, 2008).

En las características morfológicas, existen ovarios grandes y vascularizados y útero más contráctil y de tamaño grande. Hay labios ligeramente hinchados y vagina seca (De la Cruz y Pásaro, 1998).

Al final de esta etapa el epitelio vaginal muestra una capa de mucosa superficial que presenta descamación de células mucoides y hay dilatación en útero (Westwood, 2008).

- Estro.

Solamente en esta etapa la hembra permite la copulación, su comportamiento puede ser temblor en las orejas y arqueado del lomo al aproximarse al macho. En este día ocurre la ovulación, ocurre periodo de celo y dura aproximadamente 12 horas. Las células presentes en la capa superficial de la mucosa vaginal son mayormente células descamadas y cornificadas anucleadas sin forma (*Figura 2*);

éstas vienen de la descamación del epitelio superficial de la vagina (esto solo ocurre en la medianoche y en las primeras horas del día) (Westwood, 2008).

El inicio de la etapa se ve marcada por la degeneración de células epiteliales (empezando por las glandulares) en el útero. También hay menor actividad mitótica, infiltración de leucocitos y dilatación (Westwood, 2008).

En las características fisiológicas, hay madurez en los folículos ováricos por lo que se produce la ovulación. En los ovarios también hay degeneración de cuerpos lúteos pequeños y la cavidad central se encuentra llena de líquido sin tejido fibroso (De la Cruz y Pásaro, 1998; Westwood, 2008).

Para las características morfológicas, el tamaño del útero aumenta por una acumulación de líquido luminal y ovario hemorrágico. Hay labios hinchados y engrosados, y vagina seca. Además, en la vagina hay menor mitosis y desprendimiento de capas cornificadas y de mucosa superficial, y hay disminución de tamaño del epitelio. También hay infiltración de leucocitos (De la Cruz y Pásaro, 1998; Westwood, 2008).

Al final de esta etapa existe el desprendimiento total del epitelio cornificado de la vagina (Westwood, 2008).

- Metaestro.

Durante el metaestro la hembra ya no permite la copulación, ocurre después de la ovulación y dura aproximadamente de 10 a 14 horas. En el frotis vaginal, hay gran cantidad de leucocitos y pocas células cornificadas anucleadas (los leucocitos se identifican por ser células de forma circular y de tamaño muy pequeño) (*Figura 2*). Hay labios ligeramente hinchados y mucosa vaginal espesa (De la Cruz y Pásaro, 1998).

En el inicio de esta etapa ocurre un desprendimiento completo del epitelio cornificado en la vagina, con pérdida de estrato granuloso y germinativo superior. También hay infiltración de leucocitos.

En el útero hay una degeneración vacuolar pero aumento en la actividad mitótica.

El cuerpo lúteo del ovario es más pequeño que en la etapa del diestro, pero contiene líquido en cavidad central proveniente del tejido fibroso (Westwood, 2008).

- Diestro.

La hembra no permite cópula durante el diestro. Esta es la etapa más larga del ciclo estral y dura entre 2-3 días. Hay presencia de células epiteliales nucleadas, leucocitos y descamadas en la misma proporción en el frotis vaginal (*Figura 2*). Cuanto más avanzada esté la etapa más proporción de células epiteliales nucleadas. Hay labios normales (no hinchados o engrosados), mucosa vaginal delgada y húmeda.

Al comienzo de esta etapa el epitelio vaginal se encuentra en el nivel más bajo de grosor, con aproximadamente de 3 a 7 células de grosor. Existe también la característica de una infiltración variable de leucocitos (Westwood, 2008).

Con base en las características fisiológicas, hay inactivación ovárica relativa y regeneración de epitelio uterino. Los folículos ováricos crecen por la baja cantidad de FSH y LH, las cuales se preparan para el próximo ciclo (De la Cruz y Pásaro, 1998).

El útero se presenta pequeño e inactivo, anémico y poco contráctil, en donde los cuernos muestran un lumen en forma de hendidura y están cubiertos por un epitelio cuboidal en donde se encuentran células degeneradas. Además, existe un aumento en la mitosis (Westwood, 2008).

Los ovarios son pequeños, pero con grandes cuerpos lúteos en donde hay presencia de vacuolas en el centro de las células de los mismos, y existe la formación de tejido fibroso en la cavidad central (De la Cruz y Pásaro, 1998; Westwood, 2008).

Al final de la etapa, a nivel vagina, se produce una disminución en la infiltración de leucocitos y una mayor proliferación de células epiteliales por lo que ocurre el engrosamiento del epitelio y la formación de un estrato granuloso. En el útero aparece edema del estroma (Westwood, 2008).

Tabla 1. Características presentes en frotis vaginal, en el ovario y el útero en las diferentes etapas del ciclo estral en la rata.

Fase	Duración	Frotis vaginal	Ovario	Útero
Estro	12 hrs	Gran cantidad de células epiteliales descamadas	Maduración de folículos. Ovulación.	Máxima distensión. Inicio de degeneración vacuolar del epitelio uterino.
Metaestro	10-14 hrs	Gran cantidad de leucocitos y pocas células epiteliales.	Formación de cuerpos lúteos.	Alguna degeneración vacuolar, pero también regeneración.
Diestro	60-70 hrs	Mayoría leucocitos y pocas células epiteliales y nucleadas.	Crecimiento de los cuerpos lúteos. Folículos de distintos tamaños.	Regeneración del epitelio uterino.
Proestro	12 hrs	Gran cantidad de células epiteliales nucleadas.	Crecimiento de folículos. Degeneración de los cuerpos lúteos del ciclo previo.	Útero distendido con fluido aumentando su tamaño.

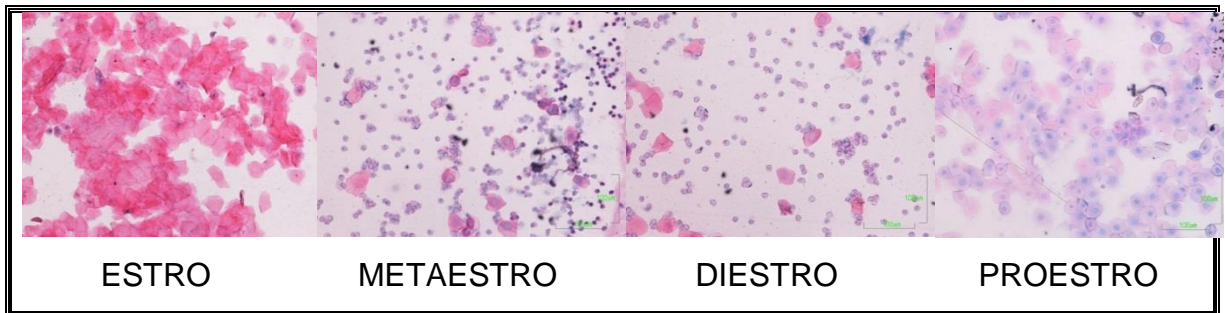


Figura 2. Frotis vaginal de las etapas del ciclo estral de la rata.

3.2 Proliferación celular

La proliferación celular se define como el aumento del número de células debido a la multiplicación de las mismas por división celular, ocurre en todas las células presentes en el cuerpo y es primordial para el buen funcionamiento del organismo. Esta es más activa cuando se está desarrollando un nuevo organismo, durante la embriogénesis o cuando se encuentra un tejido dañado. En el útero también ocurre la proliferación celular, y ésta sucede por la multiplicación de las células del epitelio luminal y glandular (Draetta, 1990; Freeman y Donoghue, 1991; Glotzer *et al.*, 1991). El útero presenta cambios en su estructura y en sus funciones, dependiendo de las concentraciones de los esteroides en las fases del ciclo estral. Está compuesto por miometrio (músculo de la pared uterina) y endometrio. El miometrio contiene dos capas: una capa gruesa interna circular y otra capa delgada externa longitudinal. El endometrio contiene un epitelio columnar simple bajo, el cual se le llama también epitelio luminal, y alrededor hay extensiones a las glandulares las cuales se les llaman epitelio glandular que penetra el estroma (Hafez, 1970).

En roedores, dependiendo la etapa del ciclo estral en la que se encuentre, va a ocurrir la proliferación de las células del útero; estas etapas se pueden observar mediante la citología vaginal exfoliativa a lo largo del ciclo estral.

Los estrógenos desempeñan un papel muy importante en la proliferación celular en el epitelio uterino. Su función la llevan a cabo al unirse al receptor de estrógeno

1 (α o ESR1), el cual es el receptor principal presente en el útero y el receptor de estrógeno 2 (β o ESR2) que posee efectos anti-proliferativos, entre otras funciones limitadas. Los estrógenos son los responsables de que los procesos de proliferación celular en el útero de los mamíferos ocurran, por cambios en la expresión de los genes y los receptores de estrógeno (ER) y progesterona (PR). Pero en diversos estudios se ha demostrado que la proliferación celular en útero inmaduro de rata es diferente a ratas adultas. Todas las células del útero de ratas inmaduras proliferan en respuesta al 17β -estradiol, mientras que en ratas maduras sólo las células del epitelio glandular (GE) y luminal (LE) proliferan.

También el estradiol (E_2) forma parte importante de la proliferación celular. Es conocido como el mejor inductor mitótico de la proliferación celular uterino (Cerbón *et al.*, 2018), ya que activa genes que originan el crecimiento uterino como el *c-fos*, *c-jun* y *c-myc*, los cuales ayudan a la ampliación de la señal hormonal E_2 y a la transcripción de la proteína activadora 1 (AP1) que ayuda a la proliferación celular. También se ha observado que la expresión de estos genes es diferente en animales ovariectomizados tratados con estrógenos que en animales intactos en el ciclo estral debido a que responden de manera diferente a hormonas esteroides. En el útero de las ratas adultas ovariectomizadas la proliferación en el epitelio luminal y glandular se da por efecto del estradiol, el cual induce la expresión temprana de proto-oncogenes (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2013).

Diversos estudios han observado que la proliferación celular en el ciclo estral comienza en las primeras horas del metaestro, continua durante el diestro y termina durante el proestro (*Tabla 2*) (Marcus, 1974). En los dos epitelios, glandular y luminal se lleva a cabo la proliferación celular (*Figura 3*). Sin embargo, se ha observado que se presenta de forma diferente en las diferentes fases del ciclo estral; en el epitelio luminal la proliferación celular se presenta en los días de metaestro, diestro y proestro, mientras que en el epitelio glandular la proliferación celular se presenta sólo en los días de metaestro y diestro (*Figura 3*); sólo en el estro y proestro se detectó proliferación en el estroma (Bertalanffy and Lau, 1963;

Leroy et al., 1969; Marcus, 1974; Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2013; Burroughs *et al.*, 2000).

Tabla 2. Actividad mitótica uterina durante el ciclo estral (Marcus, 1974).

		Mitosis		
		Epitelio		
Día del ciclo/Tiempo		Lumen	Glándulas	Estroma
Proestro	a.m.	40.4 ± 4.1	3.2 ± 1.4	19.0 ± 4.9
	p.m.	15.3 ± 3.0	1.7 ± 0.5	3.2 ± 0.9
Estro	a.m.	3.2 ± 1.4	0.4 ± 0.2	1.2 ± 0.4
	p.m.	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.2	0.8 ± 0.4
Metaestro	a.m.	18.0 ± 2.4	15.0 ± 4.0	0.8 ± 0.4
	p.m.	11.6 ± 2.1	20.2 ± 3.0	1.8 ± 0.3
Diestro	a.m.	8.5 ± 1.7	1.7 ± 0.9	2.2 ± 0.6
	p.m.	35.4 ± 3.5	1.6 ± 0.7	35.6 ± 5.3

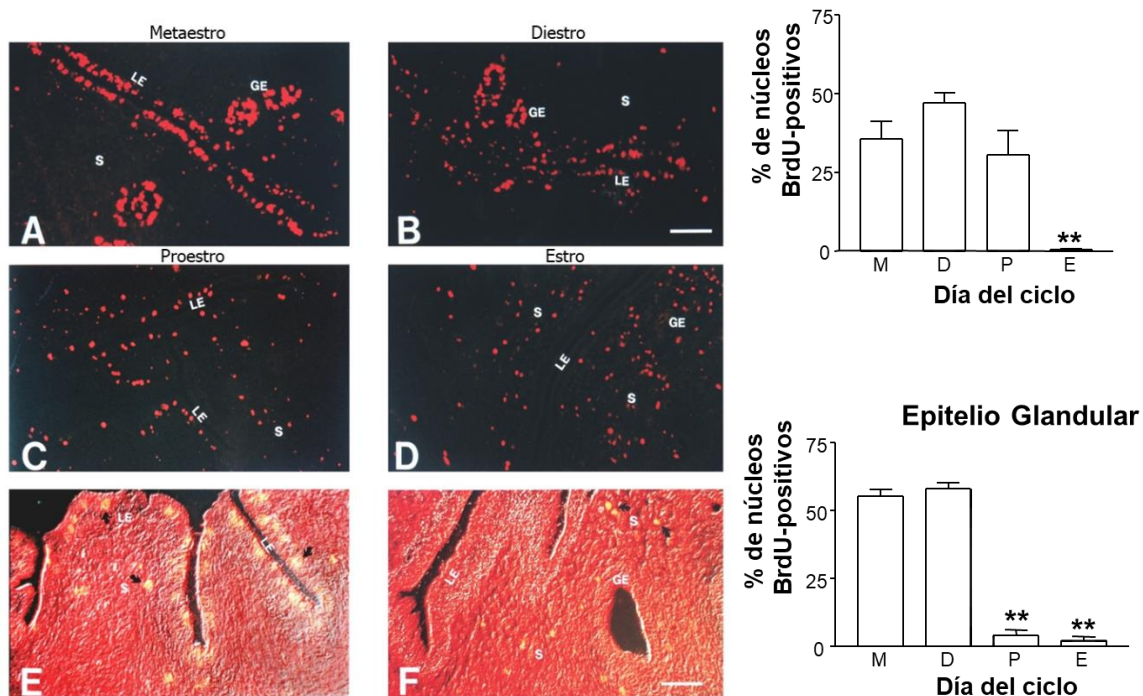


Figura 3. Proliferación celular en ciclo estral y porcentaje de núcleos BrdU-positivos en el epitelio luminal y epitelio glandular (Mendoza-Rodríguez, 2003).

La proliferación celular principal es del epitelio luminal; las células epiteliales secretan fluido que contiene enzimas proteolíticas, durante el estro y el metaestro aumenta la excitabilidad y la contractibilidad del endometrio, que está controlado por la progesterona. Aquí mismo, el epitelio luminal se convierte a columnar alto haciendo que las glándulas crezcan a su máximo y secreten fluido. La progesterona causa crecimiento de número de células en el miometrio y disminuye la musculatura uterina. Al término de la fase lútea, en el diestro, el epitelio que secretaba fluido se colapsa y el endometrio se reabsorbe, siendo reemplazado por capa de estroma cubierta con tejido epitelial (Hafez, 1970).

Debido a que la proliferación de los epitelios uterinos responde a los cambios hormonales que se dan durante el ciclo estral, este comportamiento nos ayuda a evaluar los efectos que tienen compuestos contaminantes presentes en el ambiente que interfieren con el sistema endocrino-reproductivo.

3.3 Bisfenol-A

El bisfenol-A (BPA), 4,4'-(propano-2,2-diil)difenol (*Figura 3*) inicialmente se sintetizó como un estrógeno, posteriormente se comenzó a utilizar para la elaboración de resinas de policarbonato, poliestireno, y epóxidos, los cuales son parte de la fabricación de polímeros usados en la elaboración de botellas y envolturas para alimentos y bebidas, cartones para bebidas, recubrimientos de latas, material dental y tickets, entre otros.

Debido a su gran uso en diversos productos se han realizado investigaciones acerca del compuesto, esto debido a que se ha observado su presencia en muestras de orina de muchas poblaciones. Como resultado se descubrió que el BPA es el principal compuesto estrogénico que se libera del polímero al alimento o bebida (Vom Saal *et al.*, 2007), misma vía principal de contacto humano, y esta capacidad aumenta con una exposición constante y a altas temperaturas (Takao *et al.*, 2002; Yamamoto *et al.* 1999; Yoshida *et al.*, 2001).

Debido al uso y a la exposición constante del compuesto se supo que no sólo era capaz de migrar del contenedor al alimento, sino que también puede presentar efectos adversos en el organismo, no sólo al organismo que lo ingiere directamente, sino también a su descendencia; ya que se ha observado que puede atravesar la barrera placentaria y se ha detectado en leche materna, cordón umbilical, líquido amniótico, plasma materno y fetal, y en tejido placentario(Ikezuki *et al.*, 2002; Padmanabhan *et al.*, 2008; Schonfelder *et al.*, 2002; Tsutsumi *et al.*, 2005; Vandenberg *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2006).

Algunos de los efectos adversos que provoca el BPA son: incremento en cáncer de mama, infertilidad, afecta el crecimiento y la salud reproductiva, anomalías en conducta, afectación en niveles hormonales, incremento de proliferación celular y decremento en muerte celular en útero. Y aunque algunos de estos efectos, si la exposición cesa, pueden ser reversibles en etapa adulta, la exposición al BPA seguirá siendo constante por medio del medio ambiente. Por las razones anteriores se le ha clasificado como un disruptor endocrino. (Caserta *et al.*, 2013; Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2011; Mok-Lin *et al.*, 2010; Nava *et al.*, 2008; Newbold *et al.*, 2009).

Debido a los efectos adversos provocados por el BPA, éste ha sido prohibido en la producción de botellas de policarbonato para bebés en Canadá (2009), Estados Unidos (2010) y en la Unión Europea (2011). Su uso también se ha prohibido en empaques de alimento y bebidas en Canadá desde 2010 y en Francia desde el 2015 (Cano-Nicolau *et al.*, 2016).

Debido a todo lo dicho anteriormente se sintetizó el compuesto bisfenol- S (BPS), con el propósito de poder sustituir al BPA en la elaboración de polímeros y poder disminuir su consumo, y por consiguiente disminuir los efectos negativos presentes en los organismos.

3.4 Generalidades del BPS

El bisfenol-S (BPS), (Figura 5), a diferencia del BPA (Figura 4) que tiene dos grupos metil en su estructura, se compone por dos grupos hidroxifenol unidos por un grupo sulfonilo, su nombre común es 4,4'-sulfonildifenol. Generalmente el BPS es sólido de color blanco a temperatura ambiente, soluble en etanol, alcohol isopropílico, acetonitrilo y acetona, y ligeramente soluble en hidrocarburos aromáticos.

El coeficiente de partición caracteriza la capacidad para migrar y distribuirse en el medio ambiente, un valor alto refleja solubilidad en lípidos y un valor bajo se considera como hidrófilo, por lo cual tiene alta solubilidad en agua. El BPS tiene un valor de coeficiente de partición de 1.65, esto quiere decir que es más soluble en compuestos orgánicos que en agua, ya que su valor es mayor de 1 (Chen *et al.*, 2016) (Tabla 3).

Su coeficiente de adsorción y degradación son dependiendo el medio en donde se encuentre, se degrada más rápido en el agua ($t_{1/2}$ =15 días) y en el suelo ($t_{1/2}$ =30 días) que en sedimento ($t_{1/2}$ =135 días) (Chen *et al.*, 2016)

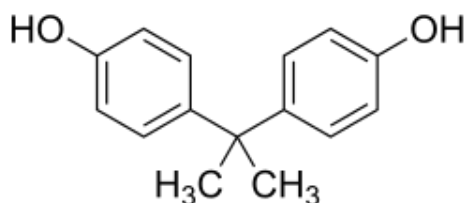


Figura 4. Estructura química de compuesto BPA

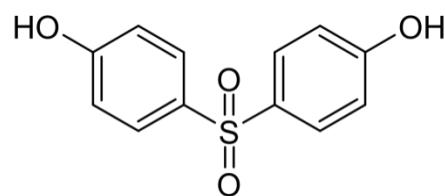


Figura 5. Estructura química de compuesto BPS

En la Tabla 3 se observan algunos otros parámetros fisicoquímicos del compuesto.

Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos del BPS (Chen *et al.*, 2016)

PARÁMETRO	VALOR
Peso molecular	250.27 g/mol
Fórmula	C ₁₂ H ₁₀ O ₄ S

Punto de ebullición	240-241 °C
Punto de fusión	245-250 °C
pKa	8
Densidad	1.366
Solubilidad del agua	1100 mg/L (a 20 °C)
pH	6.6-7.0
Coefficiente de partición	1.65

Debido a un mayor uso del BPS, sustituyendo al BPA, se ha encontrado que en estudios realizados en muestras de orina de adultos en Estados Unidos, los niveles de detección presentes de BPA han disminuido de un 97% a 74%, del año 2000 al 2014 respectivamente. En cambio, los niveles de BPS han aumentado de un 25% a 74% de detección de los mismos años (Ye *et al.*, 2015). Esto quiere decir que para la fabricación de diversos polímeros se ha disminuido el uso del BPA, encontrándose en menor proporción en el organismo, en cambio la detección del BPS en el organismo ha aumentado debido a que ha subido la producción de polímeros fabricados con dicho compuesto.

3.4.1 Exposición del ser humano al BPS

El BPS es un compuesto el cual es usado en la elaboración de polímeros sintéticos tales como polietersulfona (PES) y polisulfona (PSU), así como en resinas epoxi, los cuales se usan para fabricar diversos productos plásticos de uso diario, tales como biberones para bebés, equipos médicos, papeles térmicos, tickets, boletos de avión, papel o cartón reciclado para alimentos, recubrimiento para latas, papel de envases de alimentos e instrumentos dentales (Ahsan *et al.*, 2018; Liao *et al.*, 2012; Lotti *et al.*, 2011). Este compuesto se empezó a utilizar como sustituto del bisfenol-A, ya que diversas investigaciones en las cuales se ha evaluado la exposición a bajas concentraciones de BPA han demostrado que produce efectos adversos a la salud y a la fisiología reproductiva (Ahsan *et al.*, 2018). Sin embargo, se ha reportado que el BPS también tiene la capacidad de migrar del polímero al alimento o bebida, exponiendo la salud humana; ya que se

ha detectado la presencia de este compuesto en muestras de orina y en órganos (Cesen *et al.*, 2016; Liao y Kannan, 2013; Wong *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2014b).

No solamente se ha encontrado BPS en polímeros o en productos para alimentos, sino que también se ha encontrado en el medio ambiente, como ríos y lagos, así como también en muestras de polvo y en los alimentos directamente (Jin y Zhu, 2016; Wang *et al.*, 2015; Yamazaki *et al.*, 2015).

Con respecto al medio ambiente, se detectó que en las muestras de polvo recolectadas de casas, laboratorios, oficinas y otros lugares públicos hay una concentración significativa de BPS en diversos países, por lo que los niveles de contaminación del compuesto son a nivel mundial. Los países en donde más se ha encontrado el compuesto en el polvo de casa son China, EUA, Rumania, Arabia Saudita, Japón y Corea, en una concentración de más de 100 ng/g, mientras que en Colombia, India, Pakistan y Vietnam se encontró en una concentración menor a 50 ng/g, estos niveles fueron aumentando del 2010 al 2014 (Wang *et al.*, 2015).

También se ha encontrado la presencia de BPS en aguas superficiales, sedimentos y plantas de tratamiento de aguas residuales en los países de India (máximo 7200 ng/L), China, Japón, Corea y EUA, afectando gravemente ríos y lagos como el Río Pearl y el Lago Taihu en China, debido a las descargas industriales y el material biológico, lo cual ocurren diariamente, por lo que los niveles de BPS en el agua van aumentando (Jin y Zhu, 2016; Yamazaki *et al.*, 2015).

Existe una dosis de BPA la cual es permitida en la fabricación de los polímeros, esta dosis fue establecida por la Agencia de Protección al Medio Ambiente (EPA) y la Agencia de Alimentos y Drogas (FDA) de los Estados Unidos y sugiere que es una dosis a la cual no se presentan efectos adversos en el organismo. La dosis sugerida es de 50 µg BPA/kg p.c. /día. Aun no se determina una dosis permitida para el BPS, sin embargo se espera que la dosis a usar para la fabricación de polímeros con BPS sea igual o menor que la dosis del BPA.

El BPS se ha encontrado en diversos productos, y en donde mayor concentración se ha detectado es en tickets o recibos térmicos (6 µg/g), seguido de envolturas, boletos de avión, tarjetas de equipaje, periódicos, y aunque no sea en gran concentración pero es de gran importancia, en cartones de comida y papeles que tienen contacto con alimentos (>0.5 ng/g) (Liao, 2012). Esta concentración tan alta de BPS en los tickets es de igual manera a nivel mundial, por lo que en más de un país cuenta con un alto nivel de concentración en el papel térmico. Entre los países en los que han encontrado mayor concentración están EUA (9 mg/g), Japón (6 mg/g), Corea y Vietnam. (Liao, 2012)

Con respecto al BPA, en estudios realizados se ha detectado que al 93% de los estadounidenses se les ha encontrado el compuesto presente en su cuerpo (Calafat *et al.*, 2005 y 2008), y estos niveles se pueden relacionar con el gran consumo de alimentos enlatados como frutas, vegetales o frijoles (López-Cervantes *et al.*, 2003).

Se sabe que la dieta es la principal fuente de exposición del compuesto BPS, por lo que también los alimentos contienen el compuesto debido al medio ambiente o al contacto con recipientes elaborados con el mismo, ya que éste puede filtrarse de los materiales de embalaje y contaminar los alimentos. En Estados Unidos y China se realizó un estudio entre los años 2008-2012 en el cual el BPS fue detectado en el 21% de 267 alimentos (bebidas, vegetales, carne, cereal) en una concentración de 0.13-0.005 ng/g (peso fresco); en el alimento que más se encontró el compuesto fue en la carne con una frecuencia de detección del 43% (Wu *et al.*, 2017). También hay investigaciones que dan a conocer más alimentos de China, EUA y algunos países de Europa, en los cuales está presente el compuesto, como comida enlatada, cereal y productos de cereal, carne y productos de carne, pescado y otros mariscos, huevos, leche y productos lácteos, vegetales, frutas y bebidas (Cesen *et al.*, 2016; Liao and Kannan, 2013; Wong *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2014b).

Para productos líquidos, encontraron en la miel de Eslovenia contenida en envase de plástico (302 ng/mL), en la salmuera de los vegetales (70.1 ng/mL), pero más

específico en zanahorias y chícharos (175 ng/mL) de España (Cesen et al., 2016; Vinas *et al.*, 2010). Pero en donde más se ha encontrado es en los productos enlatados, que aunque sea menor la concentración que se ha encontrado (2.4 ng/mL) los productos enlatados son los más consumidos, por lo que sugiere que es la mayor fuente de contaminación, vía oral para el ser humano (Regueiro y Wenzl, 2015).

El compuesto también se ha detectado en el cuerpo; un estudio realizado en el 2011 en Estados Unidos y en 7 países asiáticos reveló que en el 81% de las muestras de orina de mujeres y hombres de entre 2 y 84 años (n=315) se encontró BPS a diferentes concentraciones; la media geométrica de la concentración más alta se presentó en Japón (1.18 ng/mL), seguida de Estados Unidos (0.299 ng/mL), China (0.266 ng/mL), Kuwait (0.172 ng/mL), Vietnam (0.160 ng/mL), India (0.072 ng/mL) y Korea (0.030 ng/mL). El BPS fue encontrado en un 100 % en las muestras de Japón y Vietnam, seguidos de Estados Unidos (97%), China (82%), India (76%) y Malasia (76%). Estas altas concentraciones se deben a su alta exposición a BPS por la sustitución del BPA en diversos productos como recibos o tickets en estos países los últimos años (Liao *et al.*, 2012).

Se sabe también que tanto el BPA como el BPS está presente en el organismo desde la etapa de gestación ya que su exposición a estos compuestos es muy alta, sin embargo, para el BPS no hay estudios suficientes que lo comprueben. El BPA se puede encontrar en leche materna, cordón umbilical, tejido placentario, plasma materno y fetal, y en fluido amniótico (Ikezuki *et al.*, 2002; Padmanabhan *et al.*, 2008; Schonfelder *et al.*, 2002; Tsutsumi *et al.*, 2005; Vandenberg *et al.*, 2007; Ye *et al.*, 2006). Se ha comprobado que esta exposición en las etapas fetales ocurre debido a que el BPA cruza la placenta, ya que no se une a la alfa-fetoproteína la cual une a los estrógenos (Ikezuki *et al.*, 2002; Padmanabhan *et al.*, 2008; Schonfelder *et al.*, 2002; Vandenberg *et al.*, 2007). Esto es de gran importancia; en etapa de gestación apenas se está desarrollando el organismo, lo cual puede provocar que el efecto del BPA sea irreversible y provoque un mal desarrollo reproductivo, fisiológico y hormonal (Richter *et al.*, 2007). Para el BPS,

un estudio realizado en 2015 en Valencia, España mostro que de las 91 muestras de leche materna sólo en una se detectó el compuesto (0.37 ng/mL) (Dualde *et al.*, 2019). Otro estudio realizado en China entre los años 2012 y 2014 a mujeres embarazadas, detectó que en el 93.7% de las muestras de orina (n=985) se encontraba el compuesto BPS a una concentración de 0.16-0.17 µg/L. En las mujeres que tuvieron un embarazo de más de 41 semanas se encontró una concentración mayor de BPS que en las mujeres de embarazo de menos de 41 semanas; por último, el BPS se encontró en menor concentración en madres que dieron a luz a un niño varón que en las madres que dieron a luz a una niña (Wan *et al.*, 2018).

Ya que no hay suficiente información sobre el BPS, se puede pensar que esta detección en etapa de gestación se debe a la misma razón por la que el BPA está presente en el organismo en infantes, quiere decir que su mecanismo de acción por el cual atraviesa la placenta o por el cual se encuentra en el líquido amniótico es el mismo, afectando de la misma manera a los infantes.

3.4.2 Efectos adversos del BPS

Ya que se ha observado que se tiene una constante interacción con el BPS por el medio ambiente, los alimentos y bebidas o por transmisión vía materna, se espera que esto tenga consecuencias en el organismo presentando múltiples efectos adversos.

De acuerdo con la European Chemicals Agency (ECHA), se ha llevado a cabo un estudio con documentación limitada sobre la toxicidad reproductiva y en el desarrollo. Dicho estudio refiere unos Niveles Sin Efecto Adverso Observado (NOAEL) de BPS de 60 mg/kg de peso corporal/día para la toxicidad reproductiva (European Chemicals Agency), mientras que para el BPA es de 5 mg/kg de peso corporal/día.

Aunque sean en dosis bajas las que se usen para la fabricación de polímeros, si el consumo o el uso es constante puede traer a la larga efectos negativos en el desarrollo fisiológico y en el sistema endocrino.

En cuanto a las propiedades de alteración endocrina, se considera que el BPS tiene una potencia estrogénica comparable al BPA, ya que muestra una afinidad de unión a receptores de estrógenos mucho menor que el estradiol. Análisis *in vitro* indicaron que el BPS es un activador de ambos receptores de estrógeno (ER) humanos y un antagonista débil del receptor de andrógenos (AR) (Grignard *et al.*, 2012). Sin embargo, en otro estudio *in vitro* han reportado que es poco activo como ligando para receptor de estrógenos e induce daños en ADN en células HepG2 a 0.1 μ M (Moreman *et al.*, 2017). En algunos casos, no todos, pero los disruptores endocrinos como el BPS o el BPA tienen afinidad de unión por el receptor de estrógenos (ER) α y ER β (Kato *et al.*, 2003).

El análogo BPS tiene un gran potencial de alteración endocrina: se han observado diferentes efectos, por ejemplo, que ocasiona disminución de producción de testosterona y aumento en peso uterino por disminución de muerte celular o por aumento en la proliferación celular en el útero, y además interfiere con la lipólisis y la lipogénesis dando como resultados el almacenamiento de triglicéridos en grandes cantidades, generando obesidad, también altera el desarrollo sexual y fisiológico, y altera los niveles hormonales. Esto quiere decir que también genera efectos negativos en el aparato reproductivo tanto femenino como masculino, y en la salud (Ahsan *et al.*, 2018).

En roedores, que tuvieron una exposición perinatal al BPS, desde niveles de dosis mínimas recomendada para humanos (50 mg/kg peso corporal/día, tomando como referencia el LOAEL del BPA), se han observado efectos en la salud como sobrepeso, alteraciones metabólicas en machos adultos y alteración en comportamiento de las mamás (Goodrich *et al.*, 2019).

Como ya se había mencionado anteriormente, el BPA también es causante de diversos efectos adversos en el organismo. Algunos de estos son similares al

BPS, y se piensa que es debido a que son análogos por lo que pueden actuar de igual manera alterando el sistema endocrino.

Con respecto al aspecto reproductivo, se ha reportado, en ratas tratadas neonatalmente por vía subcutánea del día 1 al 8 de gestación con BPA (10 mg BPA/ kg p.c/día), una disminución en el número de crías (Tachibana *et al.*, 2007). También se observó que a una exposición perinatal de dosis de 0.25 ng, 250 ng y 25 µg BPA/kg p.c. del día 8 de gestación al día 16 de lactancia, fue menor el número de hembras preñadas (Cabaton *et al.*, 2011). Sin embargo, en otro estudio, en el que se trataron ratas del día 6 de gestación al periodo de lactancia, no se observaron cambios en el número de crías en ninguno de los dos tratamientos (1 y 10 mg/L) (Rubin, 2001). Para el BPS no se han realizado estudios que determinen si hay o no un cambio en el número de crías por la exposición de dicho compuesto.

Para evaluar el desarrollo sexual se toma en cuenta la DAG, en donde han encontrado que la exposición perinatal del BPS, del día de gestación 8 al día de lactancia 2, no genera diferencia significativa entre ninguno de los 4 tratamientos (control, 2 µg, 200 µg y 2000 µg BPS/kg/ día), al igual que para el BPA en exposición del día 6 de gestación al periodo de lactancia, no se observaron cambios en la distancia en ninguno de los dos tratamientos (1 y 10 mg/L). (Kolla y Vandenberg, 2019; Rubin, 2001). Sin embargo hay estudios en donde sí se ha observado cambios significativos en la DAG; en un estudio realizado por Honma *et al.*, (2002) en el cual se administró vía subcutánea dosis de 2 y 20 µg/kg de BPA del día 11- 17 de gestación, se observaron cambios significativos tanto en hembras como en machos en donde hubo un incremento en el DAG en ambas dosis. Tyl *et al.*, (2002) administrando dosis de 0.001, 0.02, 0.3, 5, 50, y 500 mg/kg/día de BPA por dieta *ad libitum*, observo de igual manera un incremento en la DAG solamente en las hembras F2 en las dosis de 0.001, 0.02, 0.3 y 50 mg/kg/día.

Con respecto a los cambios de peso, se realizó un estudio a exposición perinatal del BPA en donde se administró vía oral a dosis baja (1 mg/L) y a dosis alta (10

mg/L) del día 6 de gestación hasta el día del destete de las crías. Se observó que del día 4 al día 11 postnatal las ratas tratadas a dosis alta y baja pesaban más que las ratas control. A partir del día 11 al 22 ya las ratas de dosis baja pesaban más que las ratas de dosis alta y control. Sin embargo, del día 28 al 110 se observó una diferencia significativa entre los pesos de las ratas hembra de dosis baja y dosis alta respecto al control, pero no en los machos (Rubin *et al.*, 2001). De igual manera, en exposición perinatal en una dosis de 50 µg/kg/día se observó un cambio significativo en el aumento de peso a partir de los 6 meses. (Wang *et al.*, 2014). En otro estudio, al 93.7% de las mujeres embarazadas se les detectó BPS en la orina; una vez dando a luz, no se observaron cambios significativos en los pesos de los bebés recién nacidos (Wan *et al.*, 2018).

Para BPS, a exposición vía subcutánea del PND 1 al PND 10, en dosis de 0.5, 5 y 50 mg/kg BPS, se observó que las crías, desde el día 30 post-natal, aumentaron de peso significativamente con respecto al grupo control sólo en la dosis más alta (Ahsan *et al.*, 2018).

Así mismo, para BPS no hay reportes acerca de efectos en el ciclo estral de las ratas, sin embargo para BPA se ha observado que el ciclo estral si es afectado por la exposición en útero, en donde del día de gestación 11 hasta el nacimiento, a dosis bajas de BPA (0.5 µg/kg/día), pero no por la exposición a dosis altas (50 µg/kg/día) (Moore *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2014). En otro estudio, se observó que a partir de los 4 meses más hembras tratadas con dosis alta (10 mg/L) presentan una irregularidad en el ciclo estral, en comparación con las tratadas en dosis baja (1 mg/L) y control (Rubin *et al.*, 2001).

En exposición neonatal por inyección subcutánea del día post-natal 0 al 9, en dosis de 1 y 4 mg BPA se presentó irregularidad en el ciclo estral en el 75 % de las ratas, en donde la duración del ciclo estral variaba de 3 a 13 días (Kato *et al.*, 2003).

La exposición al BPA también es capaz de alterar los niveles hormonales circulantes. La exposición perinatal a BPA, del día 6 de gestación al periodo de lactancia, en dosis alta (10 mg/L) provocó una disminución significativa en los

niveles de la hormona luteinizante (LH) en el plasma ya cuando se encontraban en etapa adulta (Rubin, 2001). En otro estudio, se administró BPA a concentración de 10 mg/L del día 6 al 21 de lactancia por vía oral en donde se determinó los niveles de E₂ y P₄, sin embargo en ninguno de los dos se observó diferencia significativa con respecto al control (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2011).

Uno de los efectos más importantes y más conocidos de los disruptores endocrinos, es el cáncer: se sabe que los disruptores endocrinos son uno de los muchos factores de riesgo para el desarrollo del cáncer, y existen investigaciones las cuales indican que están relacionados con el desarrollo de cáncer de mama, de próstata, de ovario, de testículo, de tiroides, de pulmón, de páncreas, riñón, de cerebro en general. Esto debido a la alta exposición de estrógenos, por contacto de estos disruptores, que influyen al desarrollo de la enfermedad tumoral (Arvelo *et al.*, 2016).

El más importante y preocupante es el cáncer de mama, ya que la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reportado que es el cáncer más diagnosticado en mujeres, presentándose en un 16% de todas las mujeres (Arvelo *et al.*, 2016).

Se piensa que uno de los muchos compuestos involucrados en el desarrollo del cáncer de mama, son los disruptores endocrinos, tanto el BPA como el BPS. Un estudio reveló que existen genes con un gran potencial de ser regulada su transcripción por el BPA, los cuales pueden ser importantes para el desarrollo del cáncer de mama. Entre ellos AREG, CYP19A1, ESR2, FOS, IGF1, KRAS, NCOA1, NCOR1, PGR y STC2, estos genes se dice que son sensibles a estrógenos. Los receptores de estrógenos α (ER α) y β (ER β), y el receptor de estrógeno 1 acoplado a la proteína G, son los receptores que medían la respuesta estrogénica en el tejido mamario, por lo que sugieren que hay un mayor riesgo de cáncer de mama debido a la alteración en la regulación de los genes sensibles a estrógenos a través de los receptores de estrógenos (Morgan *et al.*, 2017).

La exposición perinatal de BPA, del día 6 de gestación al periodo de lactancia, provocó un aumento en el desarrollo de tumores mamarios en las ratas descendientes F1 (al 10% de control, 20% dosis bajas (1 mg/L) y 28% dosis alta

(10 mg/L)), aunque esta diferencia no fue significativa. Aun así, existe el riesgo y la posibilidad de que una exposición al compuesto o el incremento de estrógeno estén relacionados con el cáncer de mama (Rubin, 2001).

Para el BPS, se ha observado que la exposición perinatal del día 8 de gestación al día 2 de lactancia, a dosis bajas de 2 µg BPS/kg/día provoca una disminución significativa en el área ductal de la glándula mamaria, respecto al grupo control. También hay efecto en el gen *Esr1* (gen que codifica receptor de estrógeno α), en donde a dosis de 200 µg BPS/kg/día, hay un aumento de la expresión del mismo, respecto al control (Kolla y Vandenberg, 2019).

Otro de los efectos adversos del BPS es la reducción de la secreción de la testosterona; un estudio realizado en testículos de ratones y humanos (los testículos de humano fueron tomados de fetos legalmente abortados durante el primer trimestre de embarazo, aproximadamente de 6 a 11 semanas de gestación) dieron como resultado una disminución de la secreción de testosterona durante los 3 días usando el tratamiento FeTA en una dosis de 100 nmol/L, lo cual indica que el BPS presenta efectos antiandrogénicos, por lo cual el compuesto puede ser dañino para la función fisiológica tanto en humanos como en roedores (Eladak *et al.*, 2015).

En el pez cebra, una exposición de 0.5 µg BPS/L ha demostrado cambios negativos en reproducción e índice gonadosomático, reducción de testosterona en machos (50 µg/L) y aumento en concentraciones plasmáticas de 17 β -estradiol (E_2) en machos y hembras (0.5 y 50 µg/L). Fisiológicamente, se observaron efectos adversos como edema cardíaco, anormalidad cráneo-facial y malformación en desarrollo de la cola (dosis de 20, 50, 100 y 200 mg/L), hemorragia craneal (dosis 200 mg/L) y deformidad del saco vitelino (20 mg/L) (Moreman *et al.*, 2017).

Los disruptores endocrinos también pueden tener efectos sobre la proliferación y la muerte celular uterina. En el caso de la proliferación celular, se han realizado estudios con ratas, de 7-8 semanas de edad, tratadas con BPA (18.75, 37.5, 75, 150 y 200 mg/kg) en donde se observó un incremento de la proliferación celular uterina y vaginal, la cual fue dosis dependiente (Steinmetz *et al.*, 1998)

Así mismo, se ha observado que la exposición perinatal a BPA causa cambios en la fisiología uterina cuando estos animales llegan a etapa adulta. Se les implantó a ratones F0, bombas osmóticas con dosis de 25 ó 250 ng BPA/ kg p.c./día por 14 días, comenzando en el día 9 de gestación. En los animales F1, al llegar a etapa adulta (3 meses de edad) se observó un decremento en el peso tanto uterino como vaginal en ambas dosis respecto al grupos control; sin embargo, sólo fue este decremento significativo para el peso vaginal a dosis de 250 ng BPA/kg p.c./día. En el mismo estudio, se realizó la cuantificación de número de células proliferativas en donde se observó que con el aumento de dosis, había un aumento en el número de células proliferativas tanto en el epitelio glandular como en el luminal uterino; sin embargo, sólo fue esta diferencia significativa en el epitelio glandular a dosis de 250 ng BPA/kg p.c./día (Markey *et al.*, 2005).

La proliferación celular uterina también se puede ver reflejada en el peso uterino, como en el caso anterior, este parámetro nos puede indicar si el aumento o la disminución del peso se pueden deber por un aumento en la proliferación celular y/o una disminución de la muerte celular, o viceversa.

Para exposición neonatal también se han encontrado estudios en donde por inyección subcutánea del día postnatal 0 al 9, se observó que en una dosis de 4 mg de BPA el peso del útero disminuyó con respecto al grupo control, esto se evaluó en etapa adulta (día 97 post-natal) (Kato *et al.*, 2003). Sin embargo, en otro estudio a ratones ovariectomizados, de edad de entre 35 y 60 días, por administración vía subcutánea de BPA por 4 días se observó lo contrario, es decir se observó un incremento en el peso uterino con respecto al control desde dosis de 0.8 a 8 mg/día (Papaconstantinou *et al.*, 2000).

Para el BPS no se han realizado los suficientes estudios con respecto a algunos efectos adversos que anteriormente se mencionaron, sin embargo como es un análogo del BPA se piensa que puede tener un efecto similar y hasta menor dado que este se está sustituyendo en diversos productos con la intención de mejorar la salud humana. Por lo tanto, es importante conocer el efecto que provoca el BPS sobre un órgano que es hormono regulado, como lo es el útero.

IV. Planteamiento del problema

Los disruptores endocrinos son agentes externos al organismo que alteran la síntesis, liberación, transporte, metabolismo, enlace, acción o eliminación de las hormonas. Estructuralmente se unen a receptores hormonales del organismo y presentan toxicidad si se tiene contacto constante con ellos.

En tiempos actuales, se sabe que el disruptor endocrino BPS tiene la capacidad de migrar del envase al alimento, por lo que se ha dado a conocer como compuesto dañino que se ha encontrado en orina de diversas poblaciones, tantos en hombres como en mujeres, y se ha observado que este puede afectar al aparato reproductor, pudiendo ser una de las muchas causas de la infertilidad y desarrollo de cáncer. Su consumo y uso se ha incrementado por el reemplazo del BPA, sin embargo se ha observado en diversos estudios que el contacto diario también da origen a efectos adversos a la salud, aún si se usa en dosis pequeñas. Debido a que el BPS está siendo usado como sustituto del BPA, se está presentando en mayor cantidad y los niveles presentes en la industria han aumentado, por lo que es importante estudiar qué efectos adversos puede tener en el organismo, tanto en lo hormonal, como en lo fisiológico.

En la actualidad, no se encuentran muchas información acerca del compuesto BPS y sus efectos en la salud, por lo que en la presente investigación se estudia los efectos adversos que puede presentar el compuesto BPS en el desarrollo fisiológico y reproductor, y qué repercusiones puede tener en la proliferación celular uterina que se da en el epitelio luminal y en el epitelio glandular, ya que es muy importante en el organismo un buen desarrollo celular en el aparato reproductor; todo esto con el propósito de hacer conciencia en la sociedad acerca de su uso diario y sus consecuencias.

V. Hipótesis

El Bisfenol-S se le conoce como un disruptor endocrino, por lo tanto, se espera que la exposición a este compuesto durante la etapa perinatal tenga efectos adversos en los animales de experimentación, tanto en su crecimiento y desarrollo del sistema reproductivo, así como en la división y multiplicación de las células uterinas en el epitelio luminal y glandular.

VI. Objetivos

6.1 Objetivo general

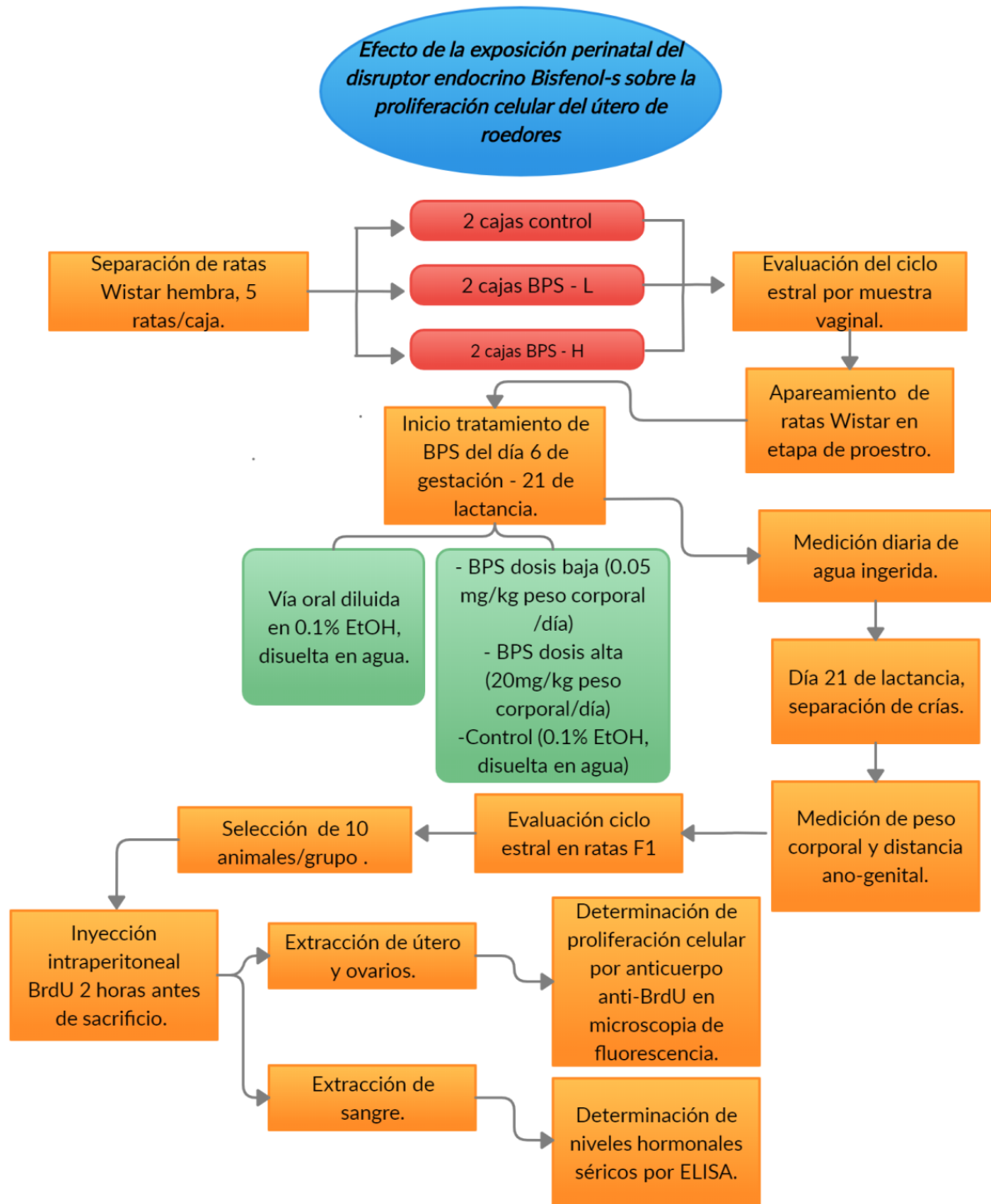
Evaluar los efectos de la administración perinatal de dosis bajas o altas de BPS sobre el desarrollo del sistema reproductivo, concentración hormonal y proliferación celular del endometrio uterino en ratas hembra.

6.2 Objetivos particulares

- Evaluar los efectos de la administración de dosis baja (0.05 mg/kg pc/día) o alta (20 mg/kg pc/día) de BPS en las ratas Wistar (F0) del DG 6 al DP 21 sobre el porcentaje de crías hembra y macho nacidas, y en el control del peso después del periodo de lactancia.

- Evaluar los efectos de la administración perinatal de dosis baja o alta de BPS en las crías de ratas Wistar (F1) sobre:
 - desarrollo del sistema reproductivo:
 - distancia ano-genital
 - regularidad del ciclo estral
 - control de peso por semana después del periodo de lactancia
 - niveles hormonales
 - proliferación celular de los epitelios uterinos

VII. Metodología



7.1 Animales de experimentación

Se usaron ratas hembra Wistar adultas de peso entre 160-180g (F0); n= 30 ratas, bajo estrictos controles de periodos luz: oscuridad 12h: 12h, con agua y comida ad libitum. Se obtuvo muestra vaginal diaria para evaluar el ciclo estral.

7.2 Evaluación diaria del ciclo estral y apareamiento

Para la evaluación del ciclo estral se utilizó asa bacteriológica, la cual previamente se esterilizó al rojo vivo y seguido se enfrió con agua. Se realizó la toma del fluido vaginal y se tomó, con la misma asa, una gota de agua para poder facilitar la expansión de la muestra en el portaobjetos. El procedimiento se repitió diariamente por aproximadamente un mes hasta que hubiera regularidad en el ciclo, debido a que se recibió a las ratas jóvenes, para comenzar a aparearlas.

Una vez conseguidas las muestras y fijadas en el portaobjetos se realizó la tinción del frotis: Se colocó el colorante hematoxilina directamente en el portaobjetos y se dejó por 7 minutos, pasado el tiempo se enjuagó con agua destilada; posteriormente se colocó en solución saturada de carbonato de litio por 5 segundos para virar el colorante anterior, y se enjuagó nuevamente con agua destilada, seguido se dejó secar. El siguiente colorante que se le aplicó fue eosina que se dejó por 10 minutos; pasado el tiempo se enjuagó con etanol al 70%, finalmente se dejó secar para posteriormente poder observar en microscopio.

Una vez que se observó en microscopio se analizó el tipo de células que había en la muestra tomada y se definió en qué etapa del ciclo estral se encontraba la rata. Ya que se observó una regularidad en el ciclo estral de la rata se pusieron a aparear en la tarde de la etapa del proestro con ratas macho Wistar de peso entre 225-250g.

El día posterior de que se dejaron en apareamiento, se corroboró por medio del tapón de esperma y/o por la presencia de esperma en frotis vaginal, que la rata quedó gestante, tomando ese día como primer día de gestación (DG1).

7.3 Administración de tratamiento farmacológico a ratas Wistar F0

El día 6 de gestación se hicieron 3 grupos de 10 ratas cada uno: Control, BPS dosis alta y BPS dosis baja y se inició tratamiento, el cual se administró hasta el día 21 de lactancia. Se administró el BPS (Sigma-Aldrich) por vía oral diluido en etanol al 0.1% y disuelta en agua potable; la preparación de las dosis se empiezan por pesar el compuesto BPS en balanza analítica, se disuelve en el etanol utilizando tubo de microfuga y vortex para la disolución completa, y se coloca en el agua (En el caso del grupo control, sólo se administró agua con etanol al 0.1%). El agua se colocó en botellas de vidrio para evitar la contaminación de disruptores endocrinos presentes en botellas de policarbonato. Las dosis de BPS usadas fueron: dosis baja (concentración 0.05 mg/kg peso corporal/día) y dosis alta (concentración 20 mg/kg peso corporal/día). Para la preparación de estas dosis se tomó en cuenta el peso de cada rata para poder ajustar las dosis.

Las concentraciones de las dosis administradas se decidieron con base en las concentraciones permitidas por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (U.S. EPA) del compuesto BPA.

Se usaron estos dos tipos de dosis para poder comparar el efecto adverso que pudiera tener en la proliferación celular y en el desarrollo del aparato reproductor. El protocolo de investigación cuenta con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química, UNAM.

Se pesaron las ratas cada semana y se midió la cantidad de agua ingerida todos los días para calcular la cantidad en mg de BPS ingerido por día de cada rata.

7.4 Caracterización fenotípica de crías F1

Las crías obtenidas (F1) se separaron de la madre (destete) al día 21 de lactancia, por lo cual estuvieron expuestas al BPS a través de la madre desde el día 6 de la gestación hasta el día 21 de la lactancia. A partir de ese momento, las crías F1 tomaron agua libre de BPS. El día del destete se sexaron las crías y se separaron

hembras de machos colocándolas en jaulas diferentes. Se evaluó el peso corporal por medio de la balanza electrónica, y la DAG con vernier. La DAG nos ayudó en gran parte a poder caracterizar a las ratas por hembra y macho, y se midió en mm, dividido entre la raíz cubica del peso corporal en gramos para poder observar su desarrollo de genitales. Las crías previamente separadas, tanto hembras como machos, se marcaron y se les colocó agua libre de BPS y comida ad libitum. Se monitorearon cotidianamente hasta observar apertura vaginal. Una vez que los animales F1 alcanzaron la etapa adulta se evaluó el ciclo estral; se seleccionaron al azar animales de cada grupo (9 de control, 7 dosis alta y 9 de dosis baja) los cuales se sacrificaron alrededor de las 12:00 h en la etapa del metaestro. En el sacrificio se les extrajo útero, ovarios y sangre.

7.5 Evaluación de niveles hormonales séricos

Una vez que se extrajo la sangre se colocaron las muestras en la centrífuga, seguido se obtuvo la separación del coágulo y el suero, el cual por medio de pipeta pasteur se extrajo y se colocó en tubos de microfuga. Los tubos se guardaron a temperatura de -70°C.

La obtención de los niveles séricos de progesterona (P4) y estradiol (E2) fue por medio del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (DRG Instruments GmbH, Marburg, Alemania). La sensibilidad de los ensayos fue de 0.4 pg/mL para E2 y 0.1 ng/mL para P4, y los coeficientes de variación intra e interensayo fueron 7.84% y 7.01% respectivamente para E2, y 8.01% y 7.56% para P4.

7.6 Procesamiento del tejido

Una vez extraídos los úteros se cortaron en pequeños trozos de aproximadamente 1 cm y fueron fijados en paraformaldehído al 4% por 2h. Los tejidos se lavaron en PBS a pH=7.4 (0.13M NaCl, 0.002M KCl, 0.01M Na₂HPO₄ y 0.0018M KH₂PO₄). Posteriormente los tejidos se procesaron en el histoquinete Microm, se deshidrataron de manera que fueron sumergidas durante 15 minutos en

disoluciones de concentraciones crecientes de etanol (50, 60, 70, 80, 90, 96 & 100 % v/v) y posteriormente 1 hora en dos recipientes de xilol, para finalmente ser parafinadas durante 2 horas, finalmente se incluyeron en parafina haciendo bloques que contenían muestras de 3-5 ratas por cada tratamiento. En total se obtuvieron 6 bloques.

Un vez que se tuvieron los bloques se hicieron cortes de 5 μm de grosor en un microtomo Leica modelo RM2145 y se montaron 3 cortes por cada laminillas previamente tratadas con poli-L-lisina (Sigma- Aldrich): los portaobjetos fueron limpiados con etanol al 96 % y sumergidos durante treinta minutos en una solución de poli-L lisina (50 μg de poli-L lisina/mL de tris-HCl 10 mM, pH 8.0), se secaron y se repitió el procedimiento hasta obtener las laminillas suficientes para colocar los cortes.

7.7 Procedimiento de tinción para determinación de proliferación celular

Para determinación de proliferación celular, se cuantificó la cantidad de núcleos BrdU positivos en el epitelio luminal y glandular uterinos. Para esto, primeramente, se inyectó por vía intraperitoneal a las ratas, 2 horas antes del sacrificio con bromodeoxiuridina (BrdU) (Roche) (50 mg/ kg peso corporal). Las células proliferando se detectaron con un anticuerpo anti-BrdU (Roche), las cuales se observaron por microscopio de fluorescencia. Brevemente, las laminillas se desparafinaron a 60°C por 30 minutos, seguido de lavados en xilol (J. T. Baker) (100%), xilol-etanol (50% - 50%). Los tejidos se rehidrataron en soluciones de concentraciones decrecientes de etanol (J. T. Baker) (100%, 96%, 90%, 80%, 70% y 50%) por 5 minutos cada uno hasta un último lavado en PBS. Se llevó a cabo la recuperación de antígenos calentando en solución Citrato de sodio (Sigma-Aldrich) 10 mM pH 6, dos veces por 10 minutos en microondas a ebullición. Los cortes se lavaron con PBS dos veces por 5 minutos, se permeabilizaron con 0.5% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) disuelto en PBS por 10 minutos, se lavaron en PBS dos veces por 5 minutos, y se bloquearon con 5% de albúmina sérica bovina (BSA)

(Jackson InmunoResearch) disuelta en PBS por 30 minutos. Los cortes se incubaron con anticuerpo α -BrdU (Roche) dilución 1:20 en buffer de incubación por 60 minutos a 37°C (al control negativo no se le pone el anticuerpo). Se realizaron 2 lavados de PBS por 5 minutos y se incubó con anticuerpo secundario rabbit α -mouse marcado con FITC (Roche) a una dilución 1:20 en PBS por 2 horas a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con PBS por 5 minutos (en oscuridad total) y finalmente se montaron con medio de montaje para fluorescencia con DAPI para observar en microscopio.

7.8 Cuantificación de células proliferantes y células totales

Para la cuantificación de las células se utiliza microscopia de fluorescencia. Cada núcleo del epitelio luminal y epitelio glandular marcado con el anticuerpo anti-BrdU se observó en fluorescencia.

La toma de imágenes fue por medio de la cámara del microscopio, se hizo la captura de las imágenes usando el objetivo de 40x. Se cuantifico células totales y células en proliferación de forma manual. El conteo de cada laminilla fue ciego (Sin saber a qué grupo pertenecía).

7.9 Análisis de datos

El análisis de datos y la obtención de gráficas se realizó con ayuda de los programas Prism[®], Microsoft Excel[®] y Adobe Photoshop[®].

Para los resultados del porcentaje de crías machos y hembras, peso semanal de ratas F0, y relación DAG/(peso corporal)^{1/3}, peso semanal, regularidad de ciclo estral y cuantificación de células proliferativas de las ratas F1, se realizó un análisis de varianza seguida con una prueba de Tukey para conocer si había diferencia estadística significativa ($p < 0.05$) entre los dos tratamientos con respecto al grupo control.

VIII. Resultados

8.1 Dosis de BPS ingerida

Se evaluó la cantidad de agua ingerida por cada hembra gestante F0 durante todo el tiempo de tratamiento (del día 6 de la gestación al día 21 de la lactancia) y de esta forma se determinó la dosis de BPS ingerida por cada animal (*Tabla 4*).

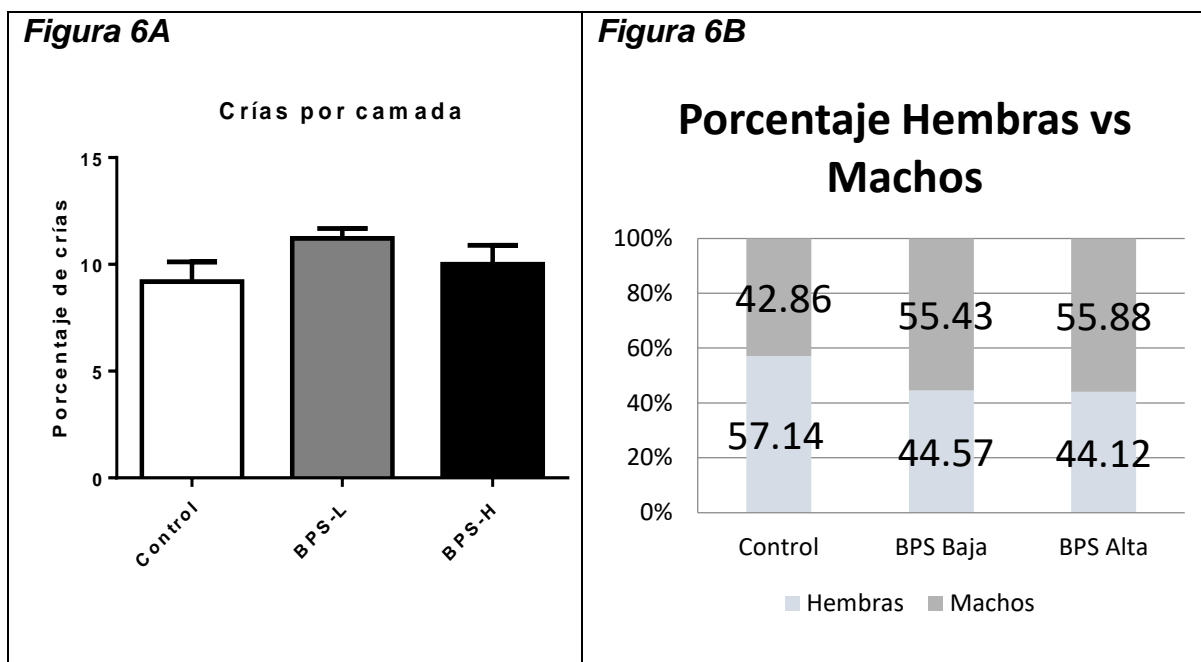
Como se observa en la *Tabla 4*, el promedio de las dosis ingeridas por día difiere un poco del establecido, ya que para BPS dosis alta la dosis era de 20 mg/Kg peso corporal/día y para BPS dosis baja la dosis establecida era de 0.05 mg/Kg peso corporal/día. Sin embargo, no afectaría al estudio ya que entre ellas no exceden de 10 mg, sólo en la rata C5,3 se observa una gran diferencia de 0.21 mg/Kg peso corporal/día a 0.05 mg/Kg peso corporal/día. Estas diferencias son debidas a la cantidad de agua ingerida por día de cada rata en el periodo de gestación y de lactancia.

Tabla 4. mg de BPS ingeridos/Kg peso corporal/día de cada uno de los animales tratados. De derecha a izquierda: BPS Dosis baja, BPS Dosis alta.

Animal tratado con BPS Dosis alta (BPS-H)	mg BPS/Kg peso corporal/día	Animal tratado con BPS Dosis baja (BPS-L)	mg BPS/Kg peso corporal/día
C3,1	23.40	C5,1	0.07
C3,2	30.81	C5,2	0.07
C3,3	29.45	C5,3	0.21
C3,4	25.45	C5,4	0.06
C3,5	21.05	C5,5	0.05
C4,1	33.35	C6,1	0.07
C4,2	30.82	C6,2	0.08
C4,3	22.35	C6,3	0.08
C4,4	30.36	C6,4	0.06
C4,5	29.05	C6,5	0.05

8.2 Porcentaje de crías hembras y machos por tratamiento

De cada tratamiento se pusieron a aparear 10 hembras F0. Del grupo control, las 10 hembras tuvieron crías, mientras que de las hembras tratadas con BPS-L tuvieron 9 y las de BPS-H fueron 7 las hembras que tuvieron crías. El promedio de la duración de la gestación fue igual en los tres grupos (C: 22 ± 0.15 ; BPS-L: 21.67 ± 0.17 ; BPS-H: 22.14 ± 0.14). El número de crías por camada se presenta en la *figura 6A*, en la que se observó que el número de crías por camada no presentó cambios entre los diferentes tratamientos. En la *figura 6B* se observa el porcentaje de machos y hembras nacidas por tratamiento. A pesar de que se observa una disminución en el número de hembras nacidas de los animales tratados con BPS, el análisis estadístico indica que no existe una diferencia significativa entre el porcentaje de crías macho y hembra entre el grupo Control y los tratados con BPS. Esto quiere decir que la exposición y la cantidad ingerida del compuesto BPS, tanto en dosis alta como en dosis baja, no afecta en el número de hembras y machos nacidas por cada rata F0.



Figuras 6. 6A) Porcentaje de crías por camada. 6B) Porcentaje crías hembras y machos por tratamiento. $n=10$ camadas de control, 9 camadas de BPS-L y 7 camadas de BPS-H.

8.3 Peso promedio semanal de ratas F0

En la *figura 7*, se observa el cambio de los pesos semanal de las ratas F0 después del día 21 de lactancia, una vez que se retiró el tratamiento de BPS y se destetó a las crías. Con base a la prueba ANOVA con prueba post hoc de Tukey (diferencia significativa $p < 0.05$) se determinó que no existe diferencia significativa en el peso corporal entre los animales tratados con BPS y los animales Control. Lo anterior indica que el compuesto BPS no interfiere en el peso después de interrumpir el tratamiento el día 21 del periodo de lactancia aun si la exposición del compuesto fue directa (vía oral).

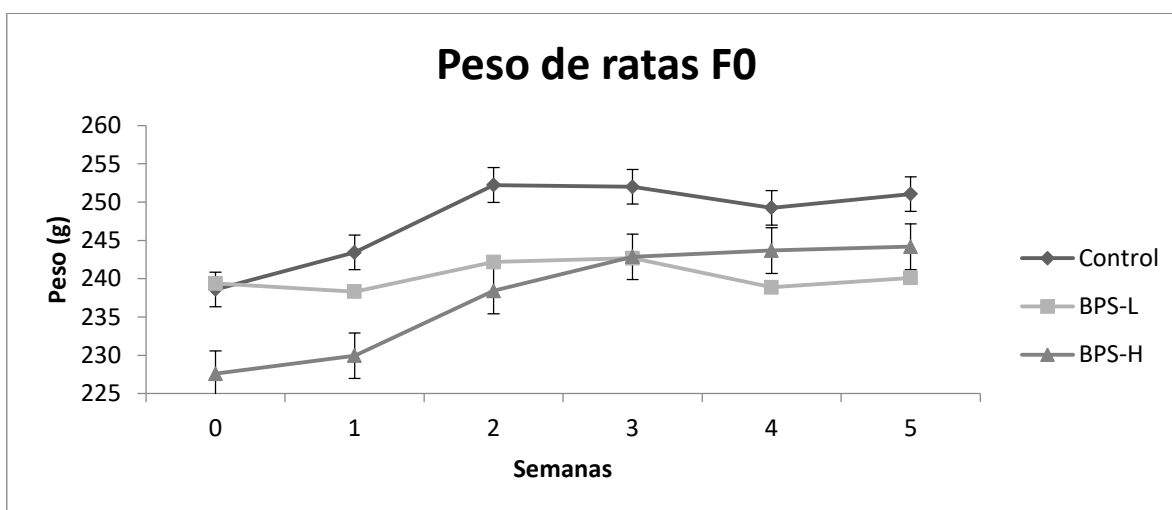


Figura 7. Peso semanal de ratas F0 después de periodo de lactancia. Se muestra el valor promedio \pm el ESM. $n=10$ animales del grupo control, 9 del grupo BPS-L y 7 de BPS-H.

8.4 Efecto del BPS sobre la relación distancia ano-genital/(peso corporal)^{1/3} en la generación F1

Al día 21 del periodo de lactancia se les determinó peso y DAG a las crías F1. La DAG es un biomarcador sensible al medio ambiente hormonal durante la etapa fetal y una medida de la toxicidad reproductiva en modelos animales. En las *figuras 8 y 9* se observa el promedio de la relación de estas dos determinaciones tanto en hembras como en machos. Los animales tratados con la dosis alta de

BPS (BPS-H) presentaron una disminución significativa de la relación de la DAG/peso^{1/3} respecto a los animales control, y tanto en hembras como en machos F1. Esto sugiere que hubo una alteración en el desarrollo genital y en el crecimiento de las crías, presentándose una disminución en el promedio para los animales que se trataron con BPS dosis alta.

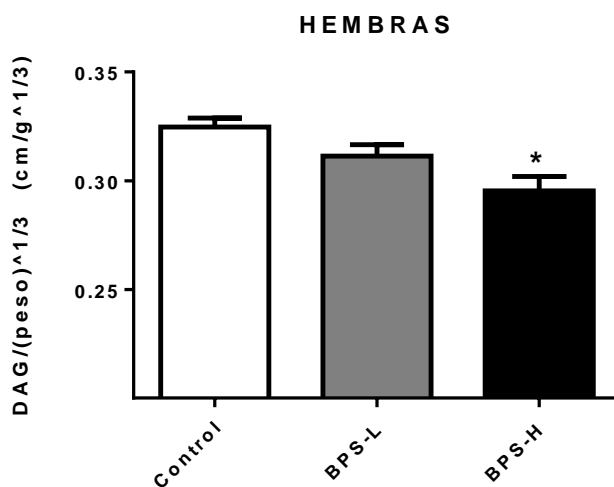


Figura 8. Relación de la distancia anogenital/peso^{1/3} al día 21 de lactancia en hembras. Se muestra el valor promedio \pm el ESM. * $p < 0.05$ Control vs BPS-H. $n = 49$ C, 41 BPS-L, 30 BPS-H animales por tratamiento.

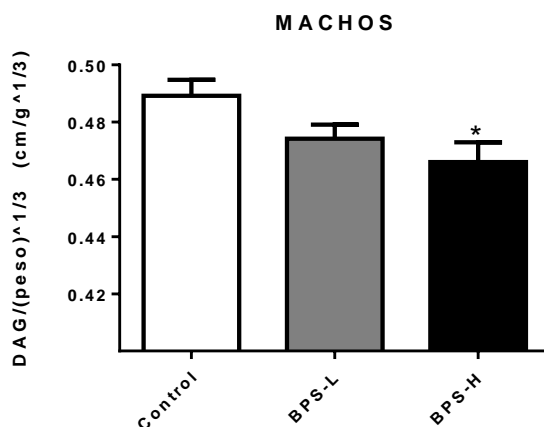


Figura 9. Relación de la distancia ano-genital/peso^{1/3} al día 21 de lactancia en machos. Se muestra el valor promedio \pm el ESM. * $p < 0.05$ Control vs BPS-H. $n = 35$ C, 51 BPS-L, 38 BPS-H animales por tratamiento.

8.5 Peso corporal de ratas F1

En las *figuras 10 y 11* se observa el peso semanal de las ratas F1 hembras y machos del día 21 hasta el día 91 postnatal. En ambas se realizó análisis estadístico ANOVA de una vía con prueba post hoc de Tukey (con diferencia significativa $p < 0.05$), el cual determinó que los animales machos tratados con BPS-L, presentaron una disminución significativa en el peso, con respecto al grupo control. En el caso de las hembras, el grupo BPS-L presentó una disminución significativa del peso, respecto al control, en los días 21 y 77 postnatal, mientras que los animales del grupo BPS-H presentaron un aumento significativo del peso, respecto al grupo control, en los días 63, 77 y 84 postnatal.

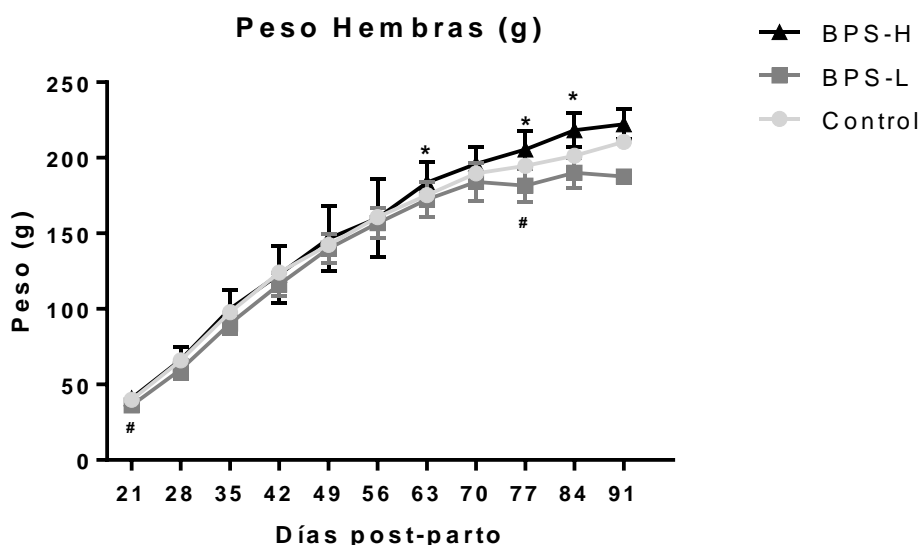


Figura 10. *Peso de ratas F1 hembras. Se muestra el valor promedio \pm el ESM. # $p < 0.05$ BPS-L vs Control y BPS-L en el día 21 postnatal. * $p < 0.05$ BPS-H vs Control y BPS-L en los días 63, 77 y 84 postnatal. # $p < 0.05$ entre los 3 grupos en el día 77 postnatal. $n = 49$ C, 41 BPS-L, 30 BPS-H animales por tratamiento.*

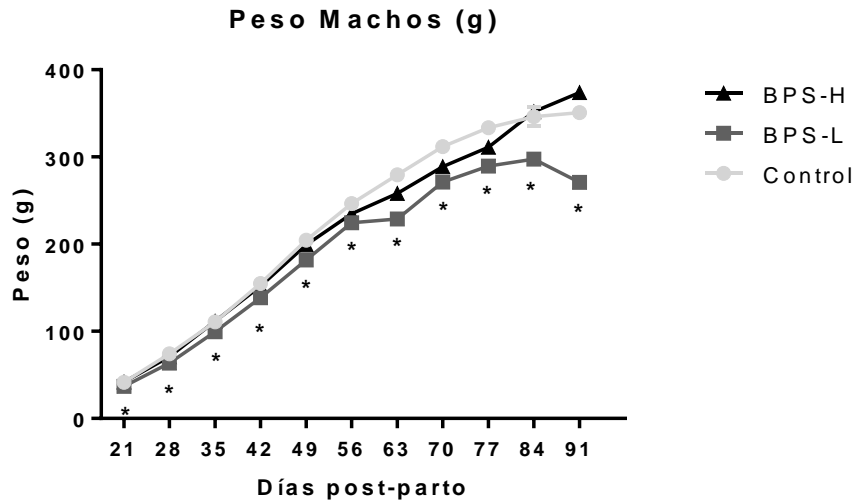


Figura 11. Peso de ratas F1 machos. Se muestra el valor promedio \pm el ESM * $p < 0.05$ BPS-L vs Control y BPS-H en los días 21, 28, 35, 42, 49, 63, 77 y 84 postnatal. * $p < 0.05$ Control vs BPS-L en los días 56 y 70 postnatal. $n = 35$ C, 51 BPS-L, 38 BPS-H animales por tratamiento.

8.6 Regulación del ciclo estral en ratas F1

Una vez iniciada la pubertad se tomó muestra vaginal para monitorear la regulación del ciclo estral de las ratas F1. En la *figura 12* se observa la gráfica la cual indica cuántos días estuvieron en cada etapa del ciclo estral durante un ciclo de 20 días (estro, metaestro, diestro y proestro), comparando los diferentes tratamientos del BPS-L y BPS-H vs el grupo control. Como se observa no existe diferencias significativas en la regulación del ciclo estral.

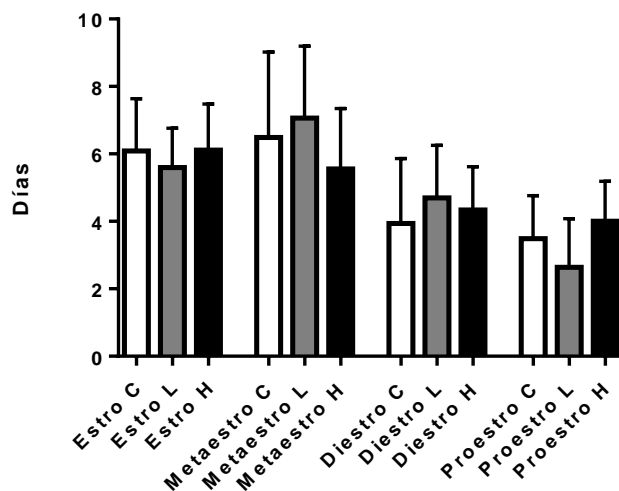


Figura 12. Días que estuvieron los animales F1 en cada fase del ciclo estral. Se muestra el valor promedio \pm el ESM. $n= 33$ C, 30 BPS-L, 18 BPS-H animales por tratamiento.

8.7 Niveles de las hormonas estradiol (E₂) y progesterona (P₄)

Del suero obtenido de la sangre de las ratas hembra F1 en etapa adulta se obtuvo la concentración de las hormonas estradiol y progesterona por cada una de las muestras y por tratamiento se les realizó análisis estadístico ANOVA de una vía con prueba post hoc de Tukey (con diferencia significativa $p < 0.05$), el cual determinó que entre las ratas F1 hembras no existe una diferencia significativa entre los tratamientos de Control, BPS dosis baja y BPS dosis alta (*Figuras 13 y 14*). Por lo cual la administración perinatal del BPS no afectó la concentración de E₂ y P₄ circulante.

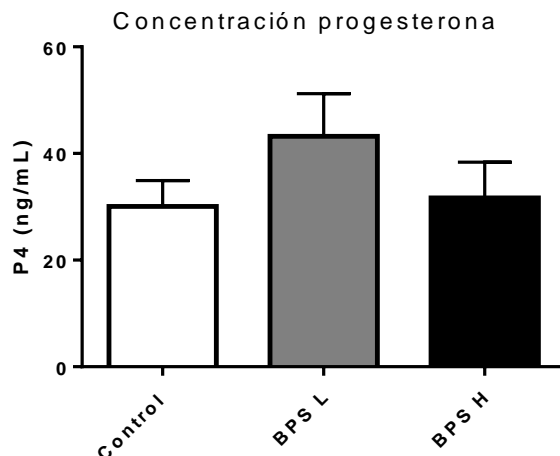


Figura 13. Concentración de progesterona (ng/mL) en suero de crías F1. Se muestra el valor promedio \pm el ESM. $n= 7$ C, 9 BPS-L, 7 BPS-H animales por tratamiento.

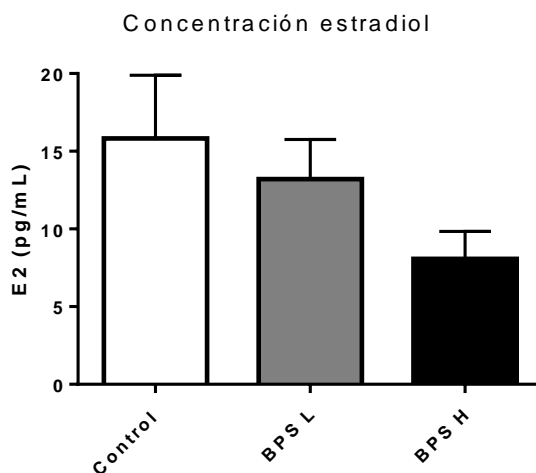


Figura 14. Concentración de estradiol (pg/mL) en suero de crías F1. Se muestra el valor promedio \pm el ESM. $n= 7$ C, 9 BPS-L, 7 BPS-H animales por tratamiento.

8.8 Cuantificación de células proliferativas en el epitelio uterino de ratas F1

Uno de los tejidos que presenta un constante recambio, en respuesta a los cambios en los niveles hormonales durante el ciclo estral, es el epitelio uterino. Es por ello que decidimos evaluar el efecto que pudiera tener la exposición perinatal a

BPS sobre la proliferación de ambos epitelios uterinos en la etapa del metaestro del ciclo estral (*Figuras 15, 16 y 17*).

En la *Figura 15* se muestran diferentes imágenes de cada grupo tomadas en microscopia de fluorescencia a objetivo 10x, esto con el propósito de observar a simple vista que no existe diferencia en la proliferación celular entre el Control y los grupos tratados con el compuesto BPS. En el color azul se muestra los núcleos de todas las células teñidas con DAPI, y el color verde detecta a las células que se encontraban proliferando en etapa de metaestro. Al control negativo no se le puso el anticuerpo primario α -BrdU, por lo cual la imagen sólo se percibe de color azul.

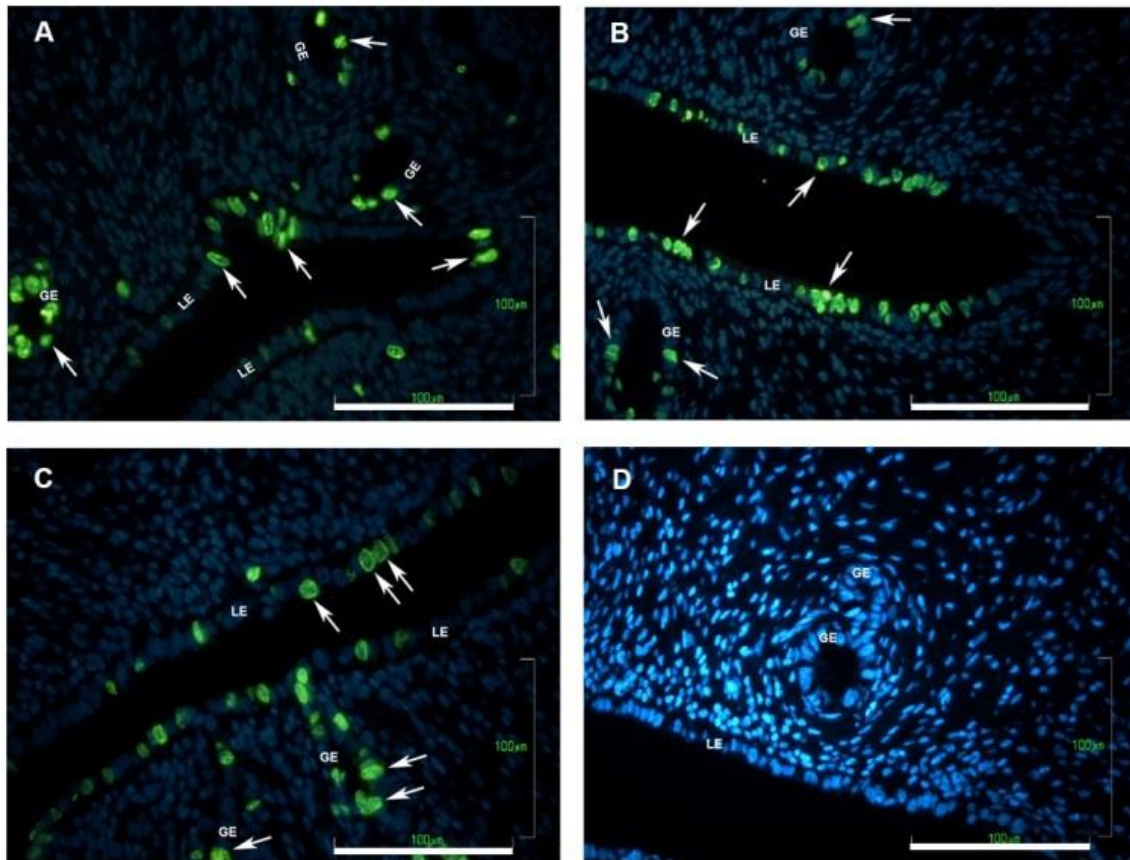


Figura 15. Detección de la proliferación; A: Control, B: BPS L, C: BPS H y D: Control negativo. LE: epitelio luminal; GE: epitelio glandular. Las flechas señalan células proliferando marcadas con BrdU. Imágenes a 40X. Barra= 100 μ m.

Con el objetivo de obtener resultados cuantitativos para respaldar las imágenes tomadas en el microscopio, se contaron todos los núcleos de los epitelios luminales y glandulares y se contaron aquellos núcleos que presentaban proliferación. Se realizó análisis estadístico ANOVA (*Figura 16 y 17*) de una vía con prueba post hoc de Tukey (con diferencia significativa $p < 0.05$), en las cuales se observa que no hay diferencia significativa entre grupos. El análisis estadístico determinó que en las ratas F1 hembras no existe una diferencia significativa entre los tratamientos de Control, BPS dosis baja y BPS dosis alta en cuanto a la proliferación celular en el epitelio luminal y el epitelio glandular uterino, por lo que el compuesto BPS no interfiere en dicho proceso en el útero.

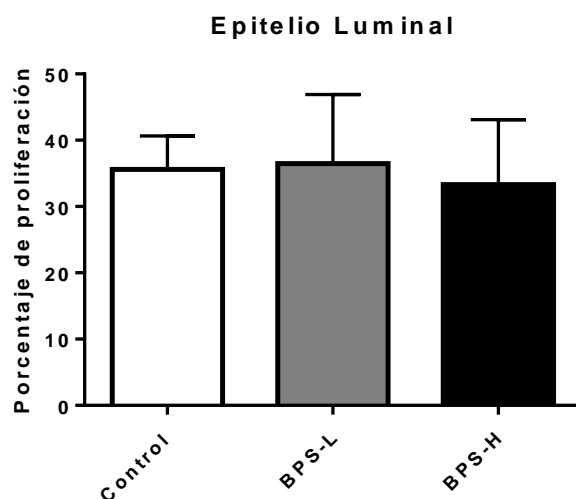


Figura 16. Porcentaje de proliferación celular en el epitelio luminal uterino en los diferentes grupos de tratamiento. Se muestra el valor promedio \pm el ESM. $n= 9$ C, 9 BPS-L, 7 BPS-H animales por tratamiento.

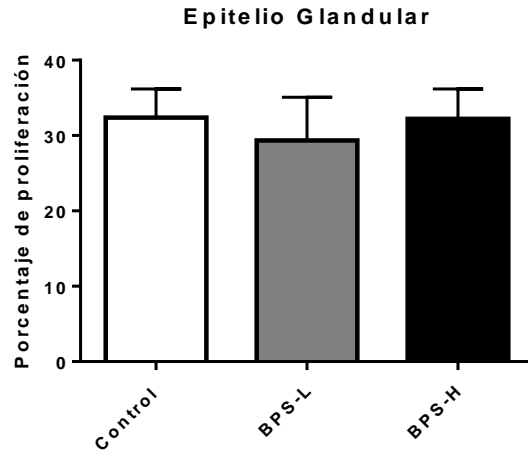


Figura 17. Porcentaje de proliferación celular en el epitelio glandular uterino en los diferentes grupos de tratamiento. Se muestra el valor promedio \pm el ESM. $n=9$ C, 9 BPS-L, 7 BPS-H animales por tratamiento.

IX. Discusión

Para el análisis de los resultados, debido a que todavía no existen suficientes estudios del BPS y sus efectos adversos en el organismo, se tomaron como referencia los estudios realizados anteriormente del BPA, puesto que a este compuesto se le conoce como su análogo y por esta razón se piensa que pueden tener las mismas consecuencias en el organismo pero a menor impacto.

En la presente investigación se estudió del compuesto BPS, sus generalidades y los posibles efectos que puede ocasionar en el organismo. Este tratamiento se administró en dos dosis diferentes (dosis baja (0.05mg/kg/día) y dosis alta (20 mg/kg/día)), con el objetivo de poder conocer y comparar los diferentes efectos adversos con respecto a un grupo control y al análogo BPA. Respecto al BPS, el único dato con que se cuenta hasta el momento es la dosis en la cual no se presentan efectos adversos (NOAEL) que es de 10-60 mg/kg de peso/día establecida por el Programa Nacional Toxicológico de los Estados Unidos (NTP) (National Toxicology Program, 2014). Ya que aún no se han establecido la dosis en la que se presenta efectos adversos observables (LOAEL) y la ingesta diaria admisible (IDA) para el BPS, se usaron los datos del análogo BPA, los cuales ya han sido establecidos. La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (U. S. EPA) ha establecido que la dosis menor de efectos adversos observada (LOAEL) en ratas por exposición oral al BPA es de 50 mg/kg peso corporal/día (U.S. Environmental Protection Agency, 2010). Así mismo, el Programa Nacional Toxicológico (NTP) indica una dosis de 5 mg/kg peso corporal/día para la clasificación de efectos a dosis baja (National Toxicology Program, 2014), por lo que la dosis baja usada en el presente trabajo es 2.5 veces menor que el LOAEL y 100 veces menor que la dosis de corte baja permitida por la NTP (también corresponde a la IDA (ingesta diaria admisible) de BPA) y la dosis alta es 4 veces mayor que la dosis de corte baja permitida por la NTP para observar los efectos adversos. Sin embargo, también se determinaron las concentraciones por medio de investigaciones encontradas en las cuales se estudiaron los efectos adversos que puede ocasionar el contacto diario con el compuesto BPA, en las cuales las

concentraciones más usadas y estudiadas en ratas para dos dosis diferentes variaban de entre 0.5 a 50 mg/kg/día, y en las cuales se observaban cambios notables (Goodrich *et al.*, 2019; Kato *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2015; Papaconstantinou *et al.*, 2000; Rubin, 2001; Steinmetz *et al.*, 1998; Tachibana *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2014).

En la *Tabla 4* se observa el promedio de la cantidad ingerida del compuesto por cada rata F0, la medición de agua que ingerían los animales diariamente fue con el propósito de conocer la cantidad de compuesto de BPS que ingerían por día y así poder ajustar la dosis en caso de que no estuvieran consumiendo la misma cantidad del compuesto. Como se observa, aunque no fue la concentración exacta de compuesto que se ingirió por rata, no hay diferencia de la cual interfiera en los cambios que pudieran ocurrir en los animales, ya que las dosis siguen siendo bajas y altas con respecto a la diferencia de la cantidad ingerida durante el periodo de tratamiento, por lo que los efectos adversos ocurridos en las madres F0 no se deben de ver afectados o interferidos.

Como se ha mencionado anteriormente, el tratamiento se empezó a administrar desde el día 6 de gestación; esto es debido a que el compuesto puede afectar a nivel gestacional, por lo que puede ocurrir que no haya implantación de óvulo fecundado o que el óvulo fecundado se despegue del útero y por consiguiente no haya animal de experimentación (Berger *et al.*, 2007; Berger *et al.*, 2010; Varayoud *et al.*, 2011; Murphy, 1993; Xiao *et al.*, 2011).

En la *Figura 6A* tenemos una gráfica en donde se observa el porcentaje de crías por camada, y en la *Figura 6B* tenemos una gráfica que contiene el porcentaje de crías hembras y machos por tratamiento. En el análisis estadístico se observó que no existe ninguna diferencia significativa entre los 3 grupos, por lo que la administración del compuesto BPS no afectó en el número de ratas nacidas por cada sexo. Estos datos concuerdan con los publicados por Rubin *et al.*, (2001), el cual reportó que la administración de BPA (0.1 y 1.2 mg/kg p.c./día) del día 6 de la

gestación al día 21 de lactancia no afectó el número de crías por camada ni la relación de crías por sexo por camada, para ninguno de los dos tratamientos. Sin embargo, en los estudios realizados por Tachibana *et al.*, (2007) la administración subcutánea del BPA en dosis de 10 mg BPA/kg p.c./día del día 0 al 7 de la gestación, si indujo una disminución en el número de crías. La diferencia en estos resultados nos permite observar el efecto que tiene la administración del disruptor antes de la implantación del blastocisto, que provoca la disminución significativa del número de crías mientras que la administración del disruptor después de la implantación del blastocisto no induce cambios en el número de crías, ni en la proporción de hembras y machos. Una de las posibles razones de lo dicho anteriormente es debido a que del día 0 al 6 de gestación se da el proceso de implantación o adhesión del blastocisto en el epitelio luminal y el día 7 el blastocisto atraviesa el epitelio luminal hasta el estroma materno, por lo tanto, si se administra el disruptor endocrino dentro de este periodo de tiempo puede llegar a alterar el transporte del blastocisto por el oviducto al útero o alterar los niveles de hormonas esteroides, afectando la proliferación celular, lo cual podrá originar a cambios en la morfología del útero, reduciendo así la tasa de implantación (Berger *et al.*, 2010; Murphy, 1993). Por lo que, si el disruptor se administra fuera del periodo de implantación, no podrá alterar tal proceso (Berger *et al.*, 2010). Respecto al tratamiento con BPS, éste es el primer estudio que reporta el efecto del BPS sobre el número de crías y el número de crías por sexo, observando resultados similares a los obtenidos con el BPA. Será interesante estudiar si el BPS, al igual que el BPA, puede producir una disminución en el número de crías si es administrado antes del periodo de implantación. Posterior al destete, se monitoreó el peso de las ratas F0, y con base en los resultados (*Figura 7*) se puede decir que el compuesto BPS no afectó la ganancia de peso de las ratas madre F0, ya que no se observó un cambio en el peso post-parto con respecto al grupo control. Sin embargo sí se ha reportado que el compuesto BPS es capaz de tener un efecto en las generaciones posteriores y generar cambios en el organismo, como en el tracto reproductor, por alteraciones epigenéticas o en la

actividad estrogénica (Shi *et al.*, 2019) por lo que se realizaron los estudios posteriores para poder corroborar lo antes dicho.

En lo estudiado en las crías F1 se presentan efectos adversos en el crecimiento de las crías y en la razón de la DAG/ (peso corporal)^{1/3}, por lo que se puede pensar que el compuesto si afecta en el desarrollo fisiológico y sexual. La DAG es un biomarcador sensible del ambiente hormonal durante la etapa fetal y mide la toxicidad reproductiva en modelos animales. Una alteración en la DAG de las crías al momento de nacimiento indica que hubo afectaciones en las señales endocrinas durante la etapa fetal, las cuales son necesarias para el desarrollo normal del sistema reproductivo (Bowman *et al.*, 2003; Hotchkiss *et al.*, 2004). Tal programación alterada, puede tener consecuencias adversas en las funciones reproductivas en la vida adulta del organismo (Hotchkiss *et al.*, 2004; Christiansen *et al.*, 2008; Welsh *et al.*, 2008). En la *Figuras 8 y 9* se observa que en las ratas F1 tratadas a dosis alta, tanto en las hembras como en los machos, se presentó una disminución en la relación de la DAG/(peso corporal)^{1/3}, con respecto al grupo control. La DAG se ha evaluado en diversos modelos animales expuestos perinatalmente a BPA, obteniéndose resultados contradictorios, ya que algunos estudios se ha reportado un incremento de la DAG tanto en machos como en hembras (Honma *et al.*, 2002), otros han reportado incremento en la DAG en hembras (Tyl *et al.*, 2002; Tyl *et al.*, 2008), decremento en la DAG en machos (Talsness *et al.*, 2000) o que no hubo cambio en la DAG (Tinwell *et al.*, 2002); Rubin *et al.*, 2001). Respecto a la exposición con BPS, Kolla y Vandenberg (2019), han reportado que la administración de 2µg BPS/ kg/ día, del día de gestación 8 al día postnatal 2, no produjo cambios en la DAG. En nuestro estudio, sólo los animales tratados con dosis alta de BPS (20 mg/kg pc/día) presentaron cambios en la DAG. Las diferencias con el estudio de Kolla y Vandenberg se pueden deber a que la concentración de BPS que administraron era menor respecto a la que se administró en el presente estudio, teniendo un efecto diferente a dosis mayores en donde ya alcanza a afectar al organismo a nivel sexual y reproductivo. Una menor DAG indica una menor exposición a andrógenos durante el periodo fetal. Se ha

reportado que el BPS presenta funciones anti-androgénicas (Park *et al.*, 2020) que podrían explicar este decremento en la DAG reportada en el presente trabajo.

Así mismo para el desarrollo fisiológico, en la *Figuras 10 y 11* se observa que las ratas F1 tratadas a dosis baja de BPS, tanto en hembras como en machos, presentaron una disminución en el peso corporal a partir del día 21 post-natal. La mayoría de los estudios han destacado el efecto obesogénico del BPA y el BPS, sin embargo, se ha reportado que la exposición a BPA o BPS durante el periodo perinatal incrementa el peso corporal de los animales (Ashby *et al.*, 1999; Ahsan, *et al.*, 2018; Ivry Del Moral *et al.*, 2016; Markey *et al.*, 2003; Miyawaki *et al.*, 2007; Newbold *et al.*, 2007; Nikaido *et al.*, 2004; Patisaul *et al.*, 2006; Rubin *et al.*, 2001; Somm *et al.*, 2009). Sin embargo, otros estudios han detectado el efecto contrario, la administración perinatal de BPA (Kato *et al.*, 2003) o BPS (Kim *et al.*, 2015; Naderi *et al.*, 2014) induce un decremento en el peso corporal en rata (Kato *et al.*, 2003), ratón (Kim *et al.*, 2015) y en el pez cebra (Naderi *et al.*, 2014). El incremento en el peso inducido por BPA o BPS se ha relacionado con la acumulación de lípidos en el tejido de preadipositario y en adipocitos, el incremento a nivel de proteína de marcadores adipogénicos, hiperleptinemia, hiperinsulinemia, acumulación de triglicéridos, resistencia a la insulina y diabetes mellitus gestacional (Ahmed *et al.*, 2016; Boucher *et al.*, 2016; Ivry Del Moral *et al.*, 2016; Kataria *et al.*, 2017; Pu *et al.*, 2017; Wang, *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2019). Respecto al decremento del peso, los estudios que los reportaron no mencionan por cual mecanismo se pudiera llevar a cabo este efecto y es actualmente estudiado en nuestro laboratorio.

Otro de los parámetros que se evaluó en el estudio fue la regulación del ciclo estral, en donde en la *figura 12* se observa que entre los 2 tratamientos y el grupo control no hay diferencia significativa en el ciclo estral. Esto quiere decir que los días que pasa cada animal en cada etapa del ciclo, tuvieron la misma duración para los 3 grupos, sin que ninguna fase tuviera una duración más larga que los otros grupos en comparación. Esta regulación del ciclo estral viene de la mano con los cambios en los niveles hormonales, en donde en las *figuras 13 y 14*, se

observan que en los niveles tanto de estradiol como de progesterona no hay diferencia significativa entre los 3 grupos. Estos resultados fueron consistentes, ya que las concentraciones séricas de las hormonas estradiol, progesterona, FSH, LH y GnRH son los que controlan los cambios en las fases del ciclo estral, por lo que si no hay un cambio en las concentraciones del estradiol y progesterona, no hay cambios en la regulación del ciclo estral. Sin embargo, es necesario realizar los estudios correspondientes para obtener los niveles de concentración de las hormonas restantes (FSH, LH y GnRH) para poder confirmar lo antes dicho. En un estudio previo realizado en nuestro grupo de investigación (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2011) en el cual se le suministro BPA a hembras gestantes F0 una dosis de 1.2 mg/kg PC/día durante la gestación y la lactancia, tampoco observamos cambios significativos en los niveles circulantes de E2 y P4 en las crías F1. Sin embargo, otros estudios han reportado que la administración de BPA (por vía oral o subcutánea) si causan alteraciones en los niveles hormonales y en la regularidad del ciclo estral. Se ha reportado que los niveles de LH disminuyeron (Rubin, 2001) y hay una prolongación en los días del ciclo estral (Kato *et al.*, 2003; Moore *et al.*, 2015; Rubin *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2014). Así mismo, un estudio en ratón reportó que la administración del BPS (0.5, 20, o 50 µg/kg/día) a la F0, del día de gestación 11 al nacimiento, provocó cambios en la regularidad del ciclo estral de las hembras de la generación F1, presentándose etapas de estró o diestros prolongados (Shi *et al.*, 2019). Sin embargo, no hubo cambios en los niveles de estradiol y testosterona a los 3 meses de edad. Las diferencias observadas entre nuestro estudio y el de Shi *et al.*, (2019) se podrían deber a la diferente susceptibilidad que presentan las ratas y ratones a los disruptores endocrinos, las cuales han sido previamente observada (Johnson *et al.*, 2012; Stouder y Paoloni-Giacobino, 2010). Incluso, hay diferentes sensibilidades entre diferentes cepas de una misma especie (Steinmetz *et al.*, 1998; Spearow y Barkley, 2001). Ya que actualmente existen pocos estudios de los efectos del BPS sobre el sistema reproductivo, es de importancia el presente estudio ya que amplía los datos previamente publicados.

Finalmente se determinó la proliferación celular uterina administrando 2 horas antes del sacrificio del animal BrdU intraperitoneal, esto fue debido a que este compuesto se le considera como un análogo de la timidina que permite la sustitución de este nucleótido en las células en fase de síntesis de la mitosis, incorporándose en el ADN durante la replicación, pudiendo así con un anticuerpo anti-BrdU y la tinción de fluorescencia detectar las células que en ese momento se encontraban proliferando.

Como se observa en las *figuras 15, 16 y 17* no se presentaron cambios en el patrón de proliferación en ninguno de los dos epitelios uterinos, con respecto al grupo control, por lo que se puede decir que la exposición perinatal a BPS no provocó afectaciones en la proliferación celular de las células epiteliales. En el caso del BPA, se ha reportado que este compuesto puede inducir la proliferación del epitelio uterino, tanto en ratas ovariectomizadas (tratados con una inyección intraperitoneal, desde una dosis de 37.5 mg/kg hasta una dosis de 150 mg/kg) (Steinmetz *et al.*, 1998), así como en ratones F1 tratados durante el periodo perinatal (del día de gestación 9 al día postnatal 4, por implante de bombas osmóticas a las madres F0 a una dosis de 250 ng BPA /kg p.c. /día) (Markey *et al.*, 2005). Esto es debido a que el compuesto BPA puede afectar la expresión de los genes ER α y *c-fos*, los cuales se sabe que regulan la proliferación del epitelio uterino, induciendo el incremento en el número de células en el útero (Steinmetz *et al.*, 1998; Markey *et al.*, 2005). Respecto al BPS, no existen estudios que evalúen el efecto de la exposición perinatal de este compuesto sobre la proliferación celular del epitelio uterino durante el ciclo estral; sin embargo, existe un estudio que evalúa la respuesta de este epitelio, que fue expuesto durante el periodo perinatal a BPS (del día de gestación 8 al postnatal 19 con una dosis de 200 μ g/kg/día), en la etapa pre-puber y ante un estímulo estrogénico con etinil estradiol al día postnatal 21 (Hill *et al.*, 2017). En la etapa pre-puber, no se observaron diferencias en el número de células proliferativas, ni muertas, en el epitelio y estroma uterinos entre los animales tratados peri-natalmente con BPS y los control. A estos ratones pre-puberes se les dio el reto con etinil estradiol para imitar el comienzo de la pubertad, y aunque si se observó un incremento en el

tamaño de las células epiteliales y el número de células proliferativas en el estroma, no se observaron cambios en el número de células proliferando, ni muriendo, en el epitelio uterino, entre ambos grupos. Nuestros resultados concuerdan con el estudio de Hill *et al.*, (2017), ya que al evaluar la proliferación uterina en la edad adulta en la etapa del metaestro, no observamos diferencias significativas al comparar con el grupo control. Además, estos resultados de proliferación se relacionan también con los niveles de las hormonas esteroides, los cuales modifican la proliferación celular. Como se observó, si no hay alteraciones en los niveles hormonales es consistente que tampoco haya un cambio en la proliferación celular del epitelio luminal ni glandular (Steinmetz *et al.*, 1998; Markey *et al.*, 2005). Es importante saber si existen cambios significativos en los grupos de BPS-L y BPS-H con respecto al grupo control, ya que la proliferación celular juega un papel muy importante en el ciclo reproductivo, ya que en este, el epitelio uterino sufre cambios cíclicos influenciados por los estrógenos y la progesterona. De modo que el aumento en los niveles circulantes de estradiol inducen la proliferación celular del epitelio uterino que se prepara para recibir al óvulo fecundado. Por lo que se puede decir que la proliferación celular del epitelio uterino es una característica de la respuesta estrogénica, por lo cual ha sido ampliamente usado para evaluar los efectos de diversos disruptores endocrinos (Steinmetz *et al.*, 1998).

Tomando en cuenta lo anterior, se puede observar que existen diversos efectos adversos a consecuencia tanto del BPA como del BPS, sin embargo el BPA tiene un mayor potencial de efecto en el organismo, ya que en un estudio realizado por Kato *et al.*, (2003), comparando el BPA con el 17β -estradiol (E_2), se obtuvo como resultado que el E_2 tiene una actividad estrogénica 10,000 veces mayor que el BPA, por lo que se puede pensar que usando al BPS como sustituto puede haber una actividad estrogénica mucho menor presentando menores efectos en el organismo, como se observa en el presente estudio. Sin embargo, no podemos asegurar aun un mecanismo de acción por el cual el disruptor endocrino afecte al organismo, ni podemos decir que el compuesto afecta de manera dosis-respuesta, por lo que solo podemos tomar en cuenta que los efectos dependerán de la

especie, la dosis, las condiciones en las que se trabajó, la edad del animal de experimentación, la alimentación y vía de administración, en general.

Hiyama *et al.*, (2011) menciona que una de las posibles causas del porqué el BPA afecta al ser humano es por efectos epigenéticos, por una metilación o desmetilación en el ADN, afectando así en la expresión de los genes del crecimiento y desarrollo, ya que la metilación regula esta misma. Esto mismo puede considerarse para el BPS del porqué afecta en el crecimiento y desarrollo reproductivo, incluyendo también que genera obesidad. Así mismo, otra alteración epigenética que se considera es la estimulación de la expresión del gen *c-fos* en la proliferación celular (Steinmetz *et al.*, 1998).

Se ha reportado que el BPS, al igual que el BPA, puede tener actividad estrogénica en tejidos sensibles a estrógeno, que dependen de hormonas, y aunque se desconoce su mecanismo de acción, se considera que los receptores de estrógeno (ER) pueden estar involucrados en el mecanismo molecular por medio del cual se llevan a cabo los efectos del BPS, ya que este químico se une tanto a ER α como a ER β . Por lo que se piensa que también los cambios reproductivos se pueden deber a una desregularización en la expresión de ER α y por una acción estrogénica en el mismo tracto reproductivo (Markey *et al.*, 2005; Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2011; Steinmetz *et al.*, 1998). Dicho lo anterior se puede pensar que, la inducción de la actividad estrogénica puede provocar alteraciones en el organismo como disminución de peso, poco crecimiento y alteración en el desarrollo sexual, así como también puede provocar irregularidad en el ADN, afectando la expresión genética, presentándose así, en otros casos un aumento en el número de células en algunas partes del cuerpo, como en el caso de la proliferación celular; sin embargo como se ha observado, no se ve afectado por dicho compuesto en el presente estudio,

Como se mencionó anteriormente, para el análisis se utilizó como referencia investigaciones anteriores del BPA, ya que para el compuesto BPS no existen aún suficientes estudios acerca de los efectos que pueden generar en el organismo. Sin embargo, como el BPA está siendo sustituido por su análogo BPS en la

fabricación de algunos polímeros, es indispensable llevar a cabo más estudios en los que se evalúe el potencial daño que pudiera provocar este compuesto en el organismo.

En el presente estudio, se observó que como el BPA, el BPS también tiene repercusión en el organismo una vez que es ingerido con frecuencia, por lo que también se le puede conocer como un disruptor endocrino, y aunque se mencionan alteraciones epigenéticas como probables mecanismos de acción, es necesario realizar las investigaciones correspondientes que corroboren lo dicho anteriormente, además que se necesitan realizar más estudios para conocer más acerca de los efectos adversos que puede desarrollar el BPS con el objetivo de poder concientizar y establecer límites acerca de su uso, ya que existe poca información acerca del compuesto.

X. Conclusiones

- Existen muy pocos estudios acerca del BPS, por lo que se tiene que comparar con otros estudios realizados acerca de los efectos adversos que se han presentado por causa del BPA, con el objetivo de conocer el porqué afecta de manera hormonal al organismo.
- En el presente estudio se observó que el compuesto BPS no afectó el peso de las ratas F0 en su etapa después de la gestación y lactancia.
- La exposición perinatal al compuesto BPS no presentó efectos adversos en el número total de crías por camada, ni en la proporción de crías hembras y machos por camada con respecto al grupo control, por lo que no afectó la fertilidad de las ratas F0.
- Sin embargo, el peso de las crías, tanto machos como hembras, si presentó una afectación significativa en los grupos tratados respecto al grupo control.
- La exposición al disruptor endocrino en el útero de las ratas F1 no afectó en los niveles hormonales de estradiol y progesterona, por lo que no se ve afectado el ciclo ovulatorio obteniendo así que el ciclo estral sea regular.
- El compuesto BPS no afectó la multiplicación de las células epiteliales uterinas (proliferación celular de las células epiteliales luminales ni glandulares), en las crías F1, por lo que se sugiere que no afecta a nivel de actividad estrogénica ni genética en este proceso.

- El BPS tiene un menor potencial de acción que el BPA, presentando menores consecuencias en la salud de los organismos. Sin embargo, una constante ingesta del compuesto puede provocar efectos adversos graves al organismo.
- Aunque aún se desconoce el mecanismo de acción del BPS, se puede decir que los efectos observados en diferentes investigación dependerán de diversos factores, como la edad del animal de experimentación al inicio del estudio, la edad al tiempo de su sacrificio, el tiempo de exposición, la especie y cepa, la dosis ingerida, vía de administración, en general.
- El BPS es capaz de unirse a los receptores de estrógenos y llevar a cabo una actividad estrogénica. Sin embargo, también se piensa que se ve implicado en alteraciones epigenéticas, por lo que se necesitan realizar más estudios acerca de los efectos del compuesto a nivel genético para conocer si tiene consecuencias en el organismo en la expresión de genes.

XI. Referencias

- Ahmed, S. y Atlas, E. (2016). Bisphenol S- and bisphenol A-induced adipogenesis of murine preadipocytes occurs through direct peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation. *Int J Obes*, 40(10), 1566-1573.
- Ahsan, N., Ullah, H., Ullah, W. y Jahan, S. (2018). Comparative effects of Bisphenol S and Bisphenol A on the development of female reproductive system in rats; a neonatal exposure study. *Chemosphere*, 197, 336-343.
- Arvelo, F., Sojo, F. y Cotte, C. (2016). Contaminación disruptores endocrinos y cáncer. *Invest Clin*, 57(1), 77-92.
- Ashby, J., Tinwell, H. y Haseman, J. (1999). Lack of effects for low dose levels of bisphenol A and diethylstilbestrol on the prostate gland of CF1 mice exposed in utero. *Regul Toxicol Pharmacol*, 30(2 pt 1), 156-166.
- Becker, K., Göen, T., Seiwert, M., Conrad, A., Pick-Fuss, H., Müller, J., Wittassek, M., Schulz, C. y Kolossa-Gehring, M. (2009). Ger ES IV: phthalate metabolites and bisphenol A in urine of German children. *Int J Hyg Environ Health*, 212(6), 685-692.
- Berger, R. G., Hancock, T. y deCatanzaro, D. (2007). Influence of oral and subcutaneous bisphenol-A on intrauterine implantation of fertilized ova in inseminated female mice. *Reprod Toxicol*, 23(2), 138-44.
- Berger, R. G., Foster, W.G. y deCatanzaro, D. (2010). Bisphenol-A exposure during the period of blastocyst implantation alters uterine morphology and perturbs measures of estrogen and progesterone receptor expression in mice. *Reprod Toxicol*, 30(3), 393–400.
- Bertalanffy, F. D. y Lau, C. (1963). Mitotic rates, renewal times, and cytodynamics of the female genital tract epithelia in the rat. *Acta Anat*, 54, 39–81.

- Bowman, C. J., Barlow, N. J., Turner, K. J., Wallace, D. G. y Foster, P. M. (2003). Effects of in utero exposure to finasteride on androgen-dependent reproductive development in the male rat. *Toxicol Sci*, 74(2), 393-406.
- Boucher, J. G., Ahmed, S. y Atlas, E. (2016). Bisphenol S Induces Adipogenesis in Primary Human Preadipocytes From Female Donors. *Endocrinology*, 157(4), 1397-1407.
- Burroughs, K. D., Fuchs-Young, R., Davis, B. y Walker, C. L. (2000). Altered hormonal responsiveness of proliferation and apoptosis during myometrial maturation and the development on uterine leiomyomas in the rat. *Biol Rep*, 63(5), 1322–1330.
- Butcher, R. L., Collins, W. E. y Fugo, N. W. (1974). Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 β throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology*, 94(6), 1704-1708.
- Brown-Grant, K., Exley, D. y Naftolin, F. (1970) Peripheral plasma oestradiol and luteinizing hormone concentrations during the oestrus cycle of the rat. *J Endocrinol*, 48(2), 295-296.
- Cabaton, N. J., Wadia, P. R., Rubin, B. S., Zalko, D., Schaeberle, C. M., Askenase, M. H., Gadbois, J. L., Tharp, A. P., Whitt, G. S., Sonnenschein, C. y Soto, A. M. (2011). Perinatal exposure to environmentally relevant levels of bisphenol A decreases fertility and fecundity in CD-1 mice. *Environ Health Perspect*, 119(4), 547-52.
- Calafat, A. M., Kuklennyik, Z., Reidy, J. A., Caudill, S. P., Ekong, J. y Needham, L. L. (2005) Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect*, 113(4), 391–395.
- Calafat, A. M., Ye, X., Wong, L. Y., Reidy, J. A. y Needham, L.L. (2008). Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003–2004. *Environ Health Perspect*, 116(1), 39–44.
- Cano-Nicolau, J., Vaillant, C., Pellegrini, E., Charlier, T. D., Kah, O. y Coumailleau, P. (2016). Estrogenic Effects of Several BPA Analogs in the Developing Zebrafish Brain. *Front Neurosci*. 10(112).

- Caserta, D., Bordi, G., Ciardo, F., Marci, R., La Rocca, C., Tait, S., Bergamasco, B., Stecca, L., Mantovani, A., Guerranti, C., Fanello, E. L., Perra, G., Borghini, F., Focardi, S. E. y Moscarini, M. (2013). The influence of endocrine disruptors in a selected population of infertile women. *Gynecol Endocrinol*, 29(5): 444-447.
- Cesen, M., Lambropoulou, D., Laimou-Geraniou, M., Kosjek, T., Blaznik, U., Heath, D. y Heath, E. (2016). Determination of bisphenols and related compounds in honey and their migration from selected food contact materials. *J. Agric. Food Chem.* 64 (46), 8866–8875.
- Cerbón J., Baranda A. N., Falcón, M. A., Camacho, A. I. y Cerbón, M. (2018). Sphingolipid synthesis and role in uterine epithelia proliferation. *Reproduction*, 156(2), 173-183.
- Chen, D., Kannan, K., Tan, H.L., Zheng, Z.G., Feng, Y.L., Wu, Y. y Widelka, M. (2016). Bisphenol analogues other than BPA: environmental occurrence, human exposure, and toxicity-a review. *Environ. Sci. Technol.* 50(11), 5438–5453.
- Christiansen, S., Scholze, M., Axelstad, M., Boberg, J., Kortenamp, A. y Hass, U. (2008). Combined exposure to anti-androgens causes markedly increased frequencies of hypospadias in the rat. *Int J Androl*, 31(2), 241-248.
- De la Cruz, R. R. y Pásaro, R. (1998). Control endocrino del ciclo reproductivo en la rata: una experiencia docente utilizando un método de caracterización citológico. *Revista de Enseñanza Universitaria Extraordinario*, 545-554.
- Draetta, G. (1990). Cell cycle control in eukaryotes: molecular mechanisms of cdc2 activation. *Trends Biochem Sci*, 15(10), 378-383.
- Dualde, P., Pardo, O., Burgos, F. C., Kuligowski, J., Gormaz, M., Vento, M., Pastor, A. y Yusà, V. (2019). Biomonitoring of bisphenols A, F, S in human milk and probabilistic risk assessment for breastfed infants. *Sci Total Environ*, 668, 797-805.

- Eladak, S., Grisin, T., Moison, D., Guerquin, M. J., Byn, T. N. T., Gaudin, S. P., Benachi, A., Livera, G., Fabre, V. R. y Habert, R. (2015). A new chapter in the bisphenol A story: bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertil Steril*, 103 (1), 11-21.
- Freeman, M. E., 1988, *The ovarian cycle of the rat*. In: E. Knobil & J. Neil (eds.), *Physiology of reproduction*. Raven Press Ltd., New York, pp. 1893-1928.
- Freeman, R. S. y Donoghue, D. J. (1991). Protein kinases and protooncogenes: Biochemical regulators of the eukaryotic cell cycle. *Biochemistry*, 30(9), 2293-2302.
- Glotzer, M., Murray, A. W. y Kirschner, M. W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature*, 349(6305), 132-138.
- Goodrich, J. M., Ingle, M. E., Domino, S. E., Treadwell, M. C., Dolinoy, D. C., Burant, C., Meeker, J. D., y Padmanabhan, V. (2019). First trimester maternal exposures to endocrine disrupting chemicals and metals and fetal size in the Michigan Mother–Infant Pairs study. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 10 (4), 447-458.
- Grignard, E., Lapenna, S. y Bremer, S. (2012). Weak estrogenic transcriptional activities of Bisphenol A and Bisphenol S. *Toxicol In Vitro* 26(5). 727-731.
- Hafez ESE (1970) Female reproductive organs. En: Reproduction and breeding techniques for laboratory animals, Hafez ESE, (ed). Editorial Lea y Febiger. Philadelphia, USA, pp. 74
- He, Y., Miao, M., Herrinton, L. J., Wu, C., Yuan, W., Zhou, Z. y Li, DK. (2009). Bisphenol A levels in blood and urine in a Chinese population and the personal factors affecting the levels. *Environ Res*, 109(5), 629-633.
- Hill, C. E., Sapouckey, S. A., Suvorov, A. y Vandenberg, L. N. (2017). Developmental exposures to bisphenol S, a BPA replacement, alter estrogen-responsiveness of the female reproductive tract: a pilot study. *Cogent Med*, 4(1).

- Hiyama, M., Choi, E.K., Wakitani, S., Tachibana, T., Khan, H., Kusakabe, K. T. y Kiso, T. (2011). Bisphenol-A (BPA) affects reproductive formation across generations in mice. *J Vet Med Sci.* 73(9): 1211-1215.
- Honma, S., Suzuki, A., Buchanan, D. L., Katsu, Y., Watanabe, H. y Iguchi, T. (2002). Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reprod Toxicol*, 16(2), 117-122.
- Hotchkiss, A. K., Parks-Saldutti, L. G., Ostby, J. S., Lambright, C., Furr, J., Vandenberg, J. G. y Gray, L. E. Jr. (2004). A mixture of the "antiandrogens" linuron and butyl benzyl phthalate alters sexual differentiation of the male rat in a cumulative fashion. *Bio Reprod*, 71(6), 1852-1861.
- Ikezuki, Y., Tsutsumi, O., Takai, Y., Kamei, Y. y Taketani, Y. (2002). Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum Reprod*, 17(11), 2839–2841.
- Ivry Del Moral, L., Le Corre, L., Poirier, H., Niot, I., Truntzer, T., Merlin, J. F., Rouimi, P., Besnard, P., Rahmani, R. y Chagnon, M. C. (2016). Obesogen effects after perinatal exposure of 4,4'-sulfonyldiphenol (Bisphenol S) in C57BL/6 mice. *Toxicology*, 357-358, 11-20.
- Jin, H. y Zhu, L. (2016). Occurrence and partitioning of bisphenol analogues in water and sediment from Liaohu River Basin and Taihu Lake, China. *Water Res*, 103, 343–351.
- Johnson, K. J., Heger, N. E. y Boekelheide, K. (2012). Of mice and men (and rats): phthalate-induced fetal testis endocrine disruption is species-dependent. *Toxicol Sci*, 129(2), 235-248.
- Kaltofen, T., Haase, M., Thome, U.H. y Laube, M. (2015). Male Sex is Associated with a Reduced Alveolar Epithelial Sodium Transport. *PloS One*, 10 (8), 1-18.
- Kataria, A., Levine, D., Wertenteil, S., Vento, S., Xue, J., Rajendiran, K., Kannan, K., Thurman, J. M., Morrison, D., Brody, R., Urbina, E., Attina, T.,

- Trasande, L. y Trachtman, H. (2017). Exposure to bisphenols and phthalates and association with oxidant stress, insulin resistance, and endothelial dysfunction in children. *Pediatr Res*, 81(6), 857-864.
- Kato, H., Ota, T., Furuhashi, T., Ohta, Y. y Iguchi, T. (2003). Changes in reproductive organs of female rats treated with bisphenol A during the neonatal period. *Reproductive Toxicology*, 17(3), 283-288.
 - Kim, B., Colon, E., Chawla, S., Vandenberg, L. N. y Suvorov, A.. (2015). Endocrine disruptors alter social behaviors and indirectly influence social hierarchies via changes in body weight. *Environ Health*, 14, 64.
 - Kolla, S. D. D. y Vandenberg L. N. (2019). Data describing effects of perinatal exposure to bisphenol S on a peripubertal estrogen challenge in intact female CD-1 mice. *Data Brief*, 25, 1-6.
 - Leroy, F., Galand, P. y Chrétien, J. (1969). The mitogenic action of ovarian hormones on the uterine and the vaginal epithelium during the oestrous cycle in the rat: A radioautographic study. *J Endocrinol* 45(3), 441–447.
 - Liao, C., Liu, F., Alomirah, H., Loi, V. D., Mohd, M. A., Moon, H. B., Nakata, H., y Kannan, K. (2012). Bisphenol S in Urine from the United States and Seven Asian Countries: Occurrence and Human Exposures. *Environmental Science & Technology*, 46 (12), 6860-6863.
 - Liao, C., Kannan, K. (2013). Concentrations and profiles of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from the United States and their implications for human exposure. *J. Agric. Food Chem.* 61 (19), 4655–4662.
 - López-Cervantes, J. y Paseiro-Losada, P. (2003). Determination of Bisphenol A and its migration from, PVC stretch film used for food packaging. *Food Addit Contam*, 20(6), 596-606.
 - Lotti, N., Colonna, M., Fiorini, M., Finelli, L. y Berti, C. (2011). Poly (butylene terephthalate) modified with ethoxylated bisphenol S with increased glass transition temperature and improved thermal stability. *Polymer*, 52(4), 904-911.

- Marcondes, F. K., Bianchi, F. J. y Tanno, A. P. (2002). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology*, 62 (4), 609-614.
- Marcus, G. J. (1974). Mitosis in the rat uterus during the estrous cycle, early pregnancy, and early pseudopregnancy. *Biol Reprod* 10, 447–452.
- Markey, C. M., Wadia, P. R., Rubin, B. S., Sonnenschein, C. y Soto, A. M. (2005). Long-term effects of fetal exposure to low doses of the xenoestrogen bisphenol-A in the female mouse genital tract. *Biology of Reproduction*, 72, 1344-1351.
- Mendoza-Rodríguez, C. A., García-Guzmán, M., Baranda-Avila, N., Morimoto, S., Perrot-Appianat, M. y Cerbón M. (2011). Administration of bisphenol A to dams during perinatal period modifies molecular and morphological reproductive parameters of the offspring. *Reprod Toxicol*, 31(2), 177-183.
- Mendoza-Rodríguez, C. A., Merchant, L. H., Segura, V. M. L., Moreno, M. N., Cruz, M. E., Arteaga, L. P., Camacho, A. I., Domínguez, R y Cerbón, M. (2013). c-fos and Estrogen Receptor Gene Expression Pattern in the Rat Uterine Epithelium During the Estrous Cycle. *Mol Reprod Dev*, 64(4), 379, 388.
- Miyawaki J1, Sakayama K, Kato H, Yamamoto H, Masuno H. (2007). Perinatal and postnatal exposure to bisphenol a increases adipose tissue mass and serum cholesterol level in mice. *J Atheroscler Thromb*, 14(5), 245-252.
- Mok-Lin, E., Ehrlich, S., Williams, P. L., Petrozza, J., Wright, D. L., Calafat, A. M., Ye, X. y Hauser, R. (2010). Urinary bisphenol A concentrations and ovarian response among women undergoing IVF. *Int J Androl*, 33(2), 385-393.
- Moore-Ambriz, T. R., Acuña-Hernández, D. G., Ramos-Robles, B., Sánchez-Gutiérrez, M., Sierra-Santoyo, A., Piña-Guzmán, B., Shibayama, M. y Hernández-Ochoa, I. (2015). Exposure to bisphenol A in young adult

mice does not alter ovulation but does alter the fertilization ability of oocytes. *Toxicol Appl Pharmacol*, 289(3), 507-514.

- Moreman, J., Lee, O., Trznadel, M., David, A., Kudoh, T., y Tyler, C. R. (2017). Acute Toxicity, Teratogenic, and Estrogenic Effects of Bisphenol A and Its Alternative Replacements Bisphenol S, Bisphenol F, and Bisphenol AF in Zebrafish Embryo-Larvae. *Environ Sci Technol*, 51 (21), 12796-12805.
- Morgan, M., Deoraj, A., Felty, Q., y Roy, D. (2017) Environmental estrogen-like endocrine disrupting chemicals and breast cáncer. *Mol Cell Endocrinol*, 457, 89-102.
- Murphy, C. R. (1993). The plasma membrane of uterine epithelial cells: structure and histochemistry. *Prog Histochem Cytochem*, 27(3), 1-66.
- Naderi, M., Wong, M. Y. y Gholami, F. (2014). Developmental exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to bisphenol-S impairs subsequent reproduction potential and hormonal balance in adults. *Aquat Toxicol*, 148, 195-203.
- National Toxicology Program, (2014). Nomination Summary for Bisphenol S (BPS) compounds (N21404). Recuperado de <https://ntp.niehs.nih.gov/getinvolved/nominate/summary/nm-n21404.html>
- Nava, K., Mendoza-Rodríguez, C. A. Romano-Riquer, P. y Cerbón, M. (2008). Impacto endocrino de sustancias químicas de uso común. *Educ Quím*, 19(1), 27-33.
- Newbold RR1, Jefferson WN, Padilla-Banks E. (2007). Long-term adverse effects of neonatal exposure to bisphenol A on the murine female reproductive tract. *Reprod Toxicol*, 24(2), 253-258.
- Newbold, R. R., Jefferson, N. W. y Padilla-Banks, E. (2009). Prenatal exposure to bisphenol A at environmentally relevant doses adversely affects the murine female reproductive tract later in life. *Environ Health Perspect*, 117(6), 879–885.
- Nikaido, Y., Yoshizawa, K., Danbara, N., Tsujita-Kyutoku, M., Yuri, T., Uehara, N. y Tsubura, A. (2004). Effects of maternal xenoestrogen exposure on development of the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 mouse offspring. *Reprod Toxicol*, 18(6), 803-811.

- Padmanabhan, V., Siefert, K., Johnson, T., Pinkerton, T., Anderson, L., Tao, L. y Kannan, K. (2008). Maternal bisphenol-A levels at delivery: a looming problem?. *J Perinatol*, 28(4), 258–263.
- Papaconstantinou, A. D., Umbreit, T. H., Fisher, B. R., Goering, P. L., Lappas, N. T. y Brown, K. M. (2000). Bisphenol A-induced increase in uterine weight and alterations in uterine morphology in ovariectomized B6C3F1 mice: role of the estrogen receptor. *Toxicol Sci*, 56(2), 332-339.
- Park, C., Song, H., Choi, J., Sim, S., Kojima, H., Park, J., Iida, M. y Lee, Y. (2020). The mixture effects of bisphenol derivatives on estrogen receptor and androgen receptor. *Environ Pollut*, 260.
- Patisaul, H. B., Fortino, A. E. y Polston, E. K. (2006). Neonatal genistein or bisphenol-A exposure alters sexual differentiation of the AVPV. *Neurotoxicol Teratol*, 28(1), 111-118.
- Pu, Y., Gingrich, J. D., Steibel, J. P. y Veiga-Lopez, A. (2017). Sex-Specific Modulation of Fetal Adipogenesis by Gestational Bisphenol A and Bisphenol S Exposure. *Endocrinology*, 158(11), 3844-3858.
- Regueiro, J. y Wenzl, T. (2015). Development and validation of a stable-isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of bisphenols in ready-made meals. *J. Chromatogr. A*, 1414, 110–121.
- Richter, A. C., Birnbaum, S. L., Farabollini, F., Newbold, R. R., Rubin, S. B., Talsness, E. C., Vandenberg, G. J., Walser-Kurtz, R. D. y Voom Saal, S. F. (2007). In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol*, 24(2), 199–224.
- Rubin, B., S., Murray, M., K., Damassa, D., A., King, J., C. y Soto, A., M. (2001). Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environment Health Perspectives*, 109 (7), 675-680.
- Schönfelder, G., Wittfoht, W., Hopp, H., Talsness, E. C., Paul, M. y Chahoud, I. (2002). Parent bisphenol A accumulation in the human

maternal–fetal–placental unit. *Environ Health Perspect*, 110(11), A703–A707.

- Shi, M., Sekulovski, N., MacLean, J. A., Whorton, A. y Hayashi, K. (2019). Prenatal Exposure to Bisphenol A Analogues on Female Reproductive Functions in Mice. *Toxicol Sci*, 168(2), 561-571.
- Shi, M., Whorton, A. E., Sekulovski, N., MacLean, J. A., y Hayashi, K. (2019). Prenatal Exposure to Bisphenol A, E, and S Induces Transgenerational Effects on Female Reproductive Functions in Mice. *Toxicol Sci*, 170(2), 320-329.
- Somm E1, Schwitzgebel VM, Toulotte A, Cederroth CR, Combescure C, Nef S, Aubert ML, Hüppi PS. (2009). Perinatal exposure to bisphenol a alters early adipogenesis in the rat. *Environ Health Perspect*, 117(10), 1549-1555.
- Spearow, J. L. y Barkley, M. (2001). Reassessment of models used to test xenobiotics for oestrogenic potency is overdue. *Hum Reprod*, 16(5), 1027-1029.
- Steinmetz, R., Mitchner, N. A., Grant, A., Allen, D. L., Bigsby, R. M. y Ben-Jonathan, N. (1998). The xenoestrogen bisphenol A induces growth, differentiation, and c-fos gene expression in the female reproductive tract. *Endocrinology*, 139 (6). 2741-2747.
- Stouder, C. y Paoloni-Giacobino, A. (2010). Transgenerational effects of the endocrine disruptor vinclozolin on the methylation pattern of imprinted genes in the mouse sperm. *Reproduction*, 139(2), 373-379.
- Tachibana, T., Wakimoto, Y., Nakamuta, N., Phichitraslip, T., Wakitani, S., Kusakabe, K., Hondo, E. y Kiso, Y. (2007). Effects of bisphenol A (BPA) on placentation and survival of the neonates in mice. *J Reprod Dev*, 53(3), 509-14.
- Takao, Y., Lee, C. H., Kohra, S. y Arizono, K. (2002). Release of BPA from food can lining upon heating. *J Health Sci*, 48(4),331-334.
- Talsness, C., Fialkowski, O., Gericke, C., Merker, H-J. y Chahoud, I. (2000). The effects of low and high doses of bisphenol A on the reproductive system of female and male rat offspring. *Congenit Anom Kyoto* 40, S94–S107.

- Tinwell, H., Haseman, J., Lefevre, P. A., Wallis, N. y Ashby, J. (2002). Normal sexual development of two strains of rat exposed in utero to low doses of bisphenol A. *Toxicol Sci*, 68(2), 339-348.
- Tsutsumi, O. (2005). Assessment of human contamination of estrogenic endocrine disrupting chemicals and their risk for human reproduction. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 93(2-5), 325–330.
- Tyl, R. W., Myers, C. B., Marr, M. C., Thomas, B. F., Keimowitz, A. R., Brine, D. R., Veselica, M. M., Fail, P. A., Chang, T. Y., Seely, J. C., Joiner, R. L., Butala, J. H., Dimond, S. S., Cagen, S. Z., Shiotsuka, R. N., Stropp, G. D. y Waechter, J. M. (2002). Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci*, 68(1), 121-146.
- Tyl, R. W., Myers, C. B., Marr, M. C., Sloan, C. S., Castillo, N. P., Veselica, M. M., Seely, J. C., Dimond, S. S., Van Miller, J. P., Shiotsuka, R. N., Beyer, D., Hentges, S. G. y Waechter, J. M. Jr. (2008). Two-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD-1 (Swiss) mice. *Toxicol Sci*, 104(2), 362-384.
- U.S. Environmental Protection Agency. (2010). Bisphenol A (BPA) Summary. Recuperado de <https://www.epa.gov/assessing-and-managing-chemicals-under-tsca/bisphenol-bpa-summary>.
- Vandenberg, N. L., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N. y Welshons, V. W. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod Toxicol*, 24(2), 139–177.
- Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Lee, D. H., Shioda, T., Soto, A. M., Saal, F. S., Welshons, W. V., Zoeller, R. T., y Myers, J. P. (2012). Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocrine Reviews*, 33(3), 378-406.
- Varayoud, J., Ramos, J. G., Bosquiazzo, V. L., Lower, M., Muñoz-de-Toro, M. y Luque, E. H. (2011). Neonatal exposure to bisphenol A alters rat

uterine implantation-associated gene expression and reduces the number of implantation sites. *Endocrinology*, 152(3), 1101-1111.

- Vinas, P., Campillo, N., Martinez-Castillo, N. y Hernandez-Cordoba, M. (2010). Comparison of two derivatization-based methods for solid-phase microextraction-gas chromatography- mass spectrometric determination of bisphenol A, bisphenol S and biphenol migrated from food cans. *Anal. Bioanal. Chem*, 397(1), 115–125.
- Vom Saal, F. S., Cooke, P. S., Buchanan, D. L., Palanza, P., Thayer, K. A., Nagel, S. C., Parmigiani, S., y Welshons, W. V. (1998). A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol Ind Health*, 14(1-2), 239–260.
- Vom Saal, F.S., et al. (2007). Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reprod. Toxicol*, 24(2), 131–138.
- Wan, Y., Huo, W., Xu, S., Zheng, T., Zhang, B., Li, Y., Zhou, A., Zhang, Y., Hu, J., Zhu, Y., Chen, Z., Lu, S., Wu, C., Jiang, M., Jiang, Y., Liu, H., Yang, X. y Xia, W. (2018). Relationship between maternal exposure to bisphenol S and pregnancy duration. *Environmental Pollution*, 238, 717-724.
- Wang, R. Y., Abbott, R. D., Zieba, A., Borowsky, F. E. y Kaplan, D.L. (2017). Development of a Three-Dimensional Adipose Tissue Model for Studying Embryonic Exposures to Obesogenic Chemicals. *Ann Biomed Eng*, 45(7), 1807-1818.
- Wang, W., Abualnaja, K.O., Asimakopoulos, A.G., Covaci, A., Gevao, B., Johnson-Restrepo, B., Kumosani, T.A., Malarvannan, G., Minh, T.B., Moon, H.B., Nakata, H., Sinha, K. R. y Kannan, K. (2015). A comparative assessment of human exposure to tetrabromobisphenol A and eight bisphenols including bisphenol A via indoor dust ingestion in twelve countries. *Environ. Int.* 83, 183–191.

- Wang, W., Hafner, K. S. y Flaws, J. A., (2014). In utero bisphenol A exposure disrupts germ cell nest breakdown and reduces fertility with age in the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 276(2), 157–164.
- Welsh, M., Saunders, P. T., Fiskens, M., Scott, H. M., Hutchison, G. R., Smith, L. B. y Sharpe, R. M. (2008). Identification in rats of a programming window for reproductive tract masculinization, disruption of which leads to hypospadias and cryptorchidism. *J Clin Invest*, 118(4), 1479-1490.
- Wessels, J. M., Felker, A. M., Dupont, H. A. y Kaushic C. (2018). The relationship between sex hormones, the vaginal microbiome and immunity in HIV-1 susceptibility in women. *Dis Model Mech*, 11 (9).
- Westwood, F., R., (2008). The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicol Pathol.* 36(3), 375-384.
- Wong, Y., Li, R., Lee, C., Wan, H. y Wong, C.K. (2017). The measurement of bisphenol A and its analogues, perfluorinated compounds in twenty species of freshwater and marine fishes, a time-trend comparison and human health based assessment. *Mar. Pollut. Bull.* 124(2), 743–752.
- Wu, L. H., Zhang, X. M., Wang, F., Gao, C. J., Chen, D., Palumbo, J. R., Guo, Y. y Zeng, E. Y. (2017). Occurrence of bisphenol S in the environment and implications for human exposure: A short review. *Sci Total Environ*, 615, 88-93.
- Xiao, S., Diao, H., Smith, M. A., Song, X. y Ye, X. (2011). Preimplantation exposure to bisphenol A (BPA) affects embryo transport, preimplantation embryo development, and uterine receptivity in mice. *Reprod Toxicol*, 32(4), 434-41.
- Yamano, Y., Miyakawa, S., Iizumi, K., Itoh, H., Iwasaki, M., Tsugane, S., Kagawa, J. y Nakadate, T. (2008). Long-term study of urinary bisphenol A in elementary school children. *Environ Health Prev Med*, 13(6), 332-337.
- Yamamoto, T. y Yasuhara, A. (1999). Quantities of BPA leached from plastic waste samples. *Chemosphere*, 38, 2569- 2576.
- Yamazaki, E., Yamashita, N., Taniyasu, S., Lam, J., Lam, P.K., Moon, H.-B., Jeong, Y., Kannan, P., Achyuthan, H. y Munuswamy, N. (2015). Bisphenol

A and other bisphenol analogues including BPS and BPF in surface water samples from Japan, China, Korea and India. *Ecotoxicol Environ Saf*, 122, 565–572.

- Yang, Y., Yu, J., Yin, J., Shao, B. y Zhang, J. (2014). Molecularly imprinted solid-phase extraction for selective extraction of bisphenol analogues in beverages and canned food. *J Agric Food Chem*, 62(46), 11130–11137.
- Ye, X., Kuklennyik, Z., Needham, L. L. y Calafat, M. A. (2006). Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 831(1–2):110–115.
- Ye, X., Pierik, H. F., Hauser, R., Duty, S., Angerer, J., Park, M. M., Burdorf, A., Hofman, A., Jaddoe, W. V. V., Mackenbach, P. J., Steegers, A. P. E., Tiemeier, H. y Longnecker, P. M. (2008). Urinary metabolite concentrations of organophosphorous pesticides, bisphenol A, and phthalates among pregnant women in Rotterdam, the Netherlands: the Generation R study. *Environ Res*, 108(2), 260-267.
- Ye, X., Pierik, H. F., Angerer, J., Meltzer, M. H., Jaddoe, W. V. V., Tiemeier, H., Hoppin, A. J. y Longnecker, P. M. (2009). Levels of metabolites of organophosphate pesticides, phthalates, and bisphenol A in pooled urine specimens from pregnant women participating in the Norwegian Mother and Child Cohort Study (MoBa). *Int J Hyg Environ Health*, 212(5), 481-491.
- Ye, X., Wong, LY., Kramer, J., Zhou, X., Jia, T. y Calafat, M. A. (2015). Urinary concentrations of Bisphenol A and three other bisphenols in convenience samples of U.S. adults during 2000-2014. *Environ Sci Technol*, 49, 11834-11839.
- Yoshida, T., Horie, M., Hoshino, Y. y Nakazawa, N. (2001). Determination of Bisphenol A in canned vegetables and fruit by high performance liquid chromatography. *Food Addit. Contam*, 18(1), 69– 75.
- Zhang, W., Xia, W., Liu, W., Li, X., Hu, J., Zhang, B., Xu, S., Zhou, Y., Li, J., Cai, Z. y Li, Y. (2019). Exposure to Bisphenol a Substitutes and Gestational

Diabetes Mellitus: A Prospective Cohort Study in China. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 10:262.