

# UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

## FACULTAD DE VETERINARIA

### DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y MEDICINA LEGAL Y FORENSE

Programa de Doctorado: Biociencias y Ciencias Agroalimentarias



### TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL BISFENOL A COMO  
DISRUPTOR ENDOCRINO EN LA REGULACIÓN IÓNICA  
EN ZEBRAFISH (*Danio rerio*), A TRAVÉS DEL ESTUDIO  
DE CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS Y BRANQUIALES.

**MARÍA ISABEL BARASONA CARMONA**  
**CÓRDOBA, Noviembre 2017**

*DIRECTORAS: PROF.<sup>a</sup> D.<sup>a</sup> M.<sup>a</sup> ROSARIO MOYANO SALVAGO  
PROF.<sup>a</sup> D.<sup>a</sup> ANA M.<sup>a</sup> MOLINA LÓPEZ*

TITULO: *Estudio de los efectos del bisfenol A como disruptor endocrino en la regulación iónica en zebrafish (Danio rerio), a través del estudio de células adenohipofisarias y branquiales*

AUTOR: *María Isabel Barasona Carmona*

---

© Edita: UCOPress. 2018  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[www.uco.es/publicaciones](http://www.uco.es/publicaciones)  
[publicaciones@uco.es](mailto:publicaciones@uco.es)

---



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA  
FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA, TOXICOLOGÍA Y  
MEDICINA LEGAL Y FORENSE



TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DE LOS EFECTOS DEL BISFENOL A COMO DISRUPTOR  
ENDOCRINO EN LA REGULACIÓN IÓNICA EN ZEBRAFISH  
(*Danio rerio*), A TRAVÉS DEL ESTUDIO DE CÉLULAS  
ADENOHIPOFISARIAS Y BRANQUIALES.

Tesis Doctoral presentada por la Licenciada en Veterinaria  
**D<sup>a</sup>. María Isabel Barasona Carmona**, para optar al Grado de Doctora por la  
Universidad de Córdoba.

CÓRDOBA, 2017  
V<sup>o</sup>. B<sup>o</sup>.  
Las Directoras

Prof.ª D.ª M.ª. Rosario Moyano Salvago

Prof.ª D.ª Ana M.ª Molina López





## **TÍTULO DE LA TESIS:**

**Estudio de los efectos del bisfenol A como disruptor endocrino en la regulación iónica en zebrafish (*Danio rerio*), a través del estudio de células adenohipofisarias y branquiales.**

**DOCTORANDA: María Isabel Barasona Carmona**

## **INFORME RAZONADO DE LAS DIRECTORAS DE LA TESIS**

En primer lugar, la doctoranda ha realizado la fase experimental en pez cebra como modelo en el Servicio de Animales de Experimentación de la Universidad de Córdoba, cumpliendo en todo momento con la actual normativa (RD 53/2013). Durante el proceso de exposición, controló en todo momento las condiciones ambientales de los animales, garantizando la estabilidad de la concentración del BPA a la que se encontraban los peces en cada grupo experimental.

Tras el sacrificio, procedió al análisis toxicológico mediante las técnicas de LC/MS-MS en el laboratorio del área de Toxicología, del Dpto. de Farmacología, Toxicología y Medicina legal y Forense.

Para los estudios histopatológicos de la hipófisis y branquias empleó el microscopio óptico, el de transmisión y el de barrido, haciendo uso de las técnicas habituales, y cuantificando la doctoranda las modificaciones encontradas mediante los correspondientes programas estadísticos.

Las conclusiones obtenidas como resultado de la Tesis cumplen con los objetivos planteados al inicio del estudio.

La publicación relacionada con esta Tesis Doctoral está recogida en la revista Acta Adriatica con el título: Assessment of the effects of bisphenol-A as a disruptor on ionic regulation in *Danio rerio* zebrafish through a study of their chloride and prolactin cell. ACTA ADRIAT., 58(1): 105 - 116, 2017. ISSN: 0001-5113



Consideramos que el trabajo contiene todos los elementos de una investigación, con una metodología completa, obteniéndose unos resultados significativos que pudieron plasmarse en el artículo publicado.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 16 de octubre de 2017

Firma de las directoras



Fdo.: Mª Rosario Moyano Salvago



Fdo.: Ana Mª Molina López





***Este trabajo ha sido realizado en el marco del proyecto de investigación P09-AGR-514, financiado mediante un Proyecto de Excelencia I+D+i de la Junta de Andalucía.***



*A mis padres*



## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a mis directores, por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis, así como permitirme el privilegio de trabajar junto a ellos, investigadores de reconocido prestigio y amplísima experiencia. Al Prof. Dr. Alfonso Blanco Rodríguez, por su inestimable ayuda en la elaboración de este trabajo de investigación, así como por su implicación incondicional en el mismo, la Prof.<sup>a</sup> Dra. M<sup>a</sup>. Rosario Moyano Salvago, por darme la primera oportunidad y llevarme de la mano en todo momento durante todos estos años de trabajo a su lado y a la Prof.<sup>a</sup> Dra. Ana María Molina López, por su constancia y dedicación en la dirección de esta tesis, así como sus inestimables aportaciones a la misma. Gracias a los tres por el apoyo recibido y por el afecto mostrado durante todos estos años.

A los miembros del departamento de “Farmacología, Toxicología y Medicina Legal y Forense” y de “Anatomía Patológica Comparada” de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba, especialmente a Antonio y a Nahúm, por su colaboración en el desarrollo de este trabajo, así como por los conocimientos aportados.

Al Servicio de Animales de Experimentación (SAEX) de la Universidad de Córdoba, por permitirme crecer, aprender y disfrutar de esta profesión durante todos estos años de dedicación y trabajo en el Animalario, así como por haberme facilitado sus instalaciones para el desarrollo de este trabajo. Especialmente quisiera agradecer a su directora Ana y a su antigua directora Rosario, por todo el apoyo prestado y las oportunidades brindadas, y a mis compañeros, especialmente a Paqui y Lydia por toda la comprensión

y ayuda mostradas durante estos años de tesis. No hay palabras para agradecer todo lo que me habéis facilitado el trabajo durante estos años.

Al Área de Microscopía del Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba, por haberme facilitado los medios e instalaciones necesarias y al Dr. Esteban Monserrate por su colaboración.

A mis padres y a mi tía Cris porque sin ellos nada de esto hubiera sido posible. Por su cariño y apoyo incondicional, por estar siempre ahí cuando el camino se hacía cuesta arriba, por tener una palabra de aliento siempre que ha sido necesaria y por apoyarme en todas las decisiones tomadas sin cuestionarlas.

A mi gente, mis amigas María, Ana, Bárbara y Belén, por saber cuándo y cómo preguntar por la tesis y apoyarme justo cuando ha sido necesario. Al Prof. Dr. Antonio Martín Pardo (Antonio a secas para mí) por aguantar largas conversaciones acerca de un único tema, la tesis, así como por toda la ayuda prestada y la experiencia compartida. A mi prima Rocío porque siempre está ahí y nunca falla, y a todas aquellas personas que de una manera u otra han contribuido a hacerme el camino más ameno durante estos años complicados.

Y como no podía ser de otra manera, gracias a vosotros, mis fieles compañeros peludos, que, aunque no habléis, habéis sabido siempre sacarme una sonrisa cuando la he necesitado.

A todos vosotros, GRACIAS.

# Índice

1.- Introducción .....	1
2.- Revisión bibliográfica .....	13
2.1 Propiedades Físico-Químicas del Bisfenol A.....	14
2.2 Usos industriales y relación con el medio ambiente.....	18
2.2.1 Usos industriales .....	18
2.2.1.1 Policarbonato .....	24
2.2.1.2 Resina epoxi .....	25
2.2.2 Relación con el medio ambiente .....	26
2.2.2.1 Contaminación acuática .....	27
2.2.2.2 Contaminación atmosférica. ....	29
2.2.2.3 Contaminación en el suelo/sedimento .....	30
2.3 Distintas fuentes de exposición .....	33
2.3.1 Exposición al BPA por migración al alimento .....	40
2.3.1.1 Migración del BPA de las superficies de recubrimiento de las latas .....	41
2.3.1.2 Migración del BPA de los plásticos.....	43
2.3.2 Exposición ocupacional.....	45
2.4 Efectos del BPA.....	46
2.4.1 Efectos del BPA en la vida salvaje .....	46
2.4.1.1 Determinación del sexo.....	47
2.4.1.2 Alteración de la función gonadal y características sexuales secundarias.....	50
2.4.1.3 Alteraciones en el desarrollo.....	53
2.4.1.4 Producción de Vitelogenina (VTG) .....	54
2.4.1.5 Efectos sobre la función tiroidea.....	57
2.4.1.6 Efectos sobre el metabolismo .....	57
2.4.1.7 Efectos sobre la función inmunitaria y estrés oxidativo .....	58



2.4.2 Efectos sobre la salud humana.....	59
2.4.2.1 Efectos sobre la reproducción humana .....	59
2.4.2.2 Efectos sobre el páncreas endocrino .....	62
2.4.2.3 Acción sobre la hormona tiroidea .....	66
2.4.2.4 Efectos sobre el sistema inmune .....	67
2.4.2.5 Efectos sobre el tejido adiposo .....	68
2.4.2.6 Otros efectos .....	69
2.5 El uso del pez cebra como organismo modelo.....	70
2.5.1 El pez cebra ( <i>Danio rerio</i> ) .....	72
2.5.2 La regulación iónica.....	77
3.- Material y métodos .....	85
3.1 Animales utilizados.....	85
3.2 Protocolo diseño experimental.....	87
3.3 Determinación de BPA .....	90
3.3.1 Determinación de BPA en las muestras de peces.....	90
3.3.2 Determinación de BPA en las muestras de agua.....	96
3.4 Estudio histopatológico estructural y ultraestructural .....	97
3.4.1 Microscopio óptico.....	98
3.4.2 Microscopio electrónico de transmisión (MET) y de barrido (MEB).....	99
3.5 Procedimientos morfométricos y estereológicos. ....	101
3.6 Análisis estadístico .....	103
4.- Resultados.....	107
4.1 Niveles de BPA.....	107
4.2 Estudio histopatológico cualitativo .....	108
4.2.1 Grupo control .....	108
4.2.1.1 Estudio de las células PRL.....	108
4.2.1.2 Estudio de las branquias y las células de Cloro. ....	110
4.2.2 Grupo 1 µg/l .....	114
4.2.2.1 Estudio de las células PRL.....	114
4.2.2.2 Estudio de las branquias y las células de Cloro .....	115

4.2.3 Grupo 10 µg/l .....	116
4.2.3.1 Estudio de las células PRL.....	116
4.2.3.2 Estudio de las branquias y las células de Cloro .....	117
4.2.4 Grupo 100 µg/l .....	119
4.2.4.1 Estudio de las células PRL.....	120
4.2.4.2 Estudio de las branquias y de las células de Cloro .....	121
4.2.5 Grupo 1000 µg/l .....	123
4.2.5.1 Estudio de las células PRL.....	124
4.2.5.2 Estudio de las branquias de las células de Cloro .....	125
4.3 Estudio morfométrico y estereológico.....	127
5.- Discusión .....	131
6.- Conclusiones .....	147
7.- Resumen .....	153
8.- Abstract.....	159
9. - Referencias Bibliográficas .....	165
9.- Normativa .....	219
10. Anexo.....	223





# 1. Introducción



## **1.- Introducción**

La contaminación ambiental consecuencia del desarrollo industrial de las últimas décadas, así como la producción de grandes cantidades de contaminantes por parte de la industria, tiene consecuencias destructivas para nuestros ecosistemas desencadenando efectos negativos sobre la salud humana y animal (Zhuang et al., 2016; Xue et al., 2017).

Entre estos efectos destacan los producidos sobre la salud humana que van desde patologías a distintos niveles orgánicos hasta alteraciones genéticas debidas a procesos mutagénicos causados por estos contaminantes, los mismos que causarían desequilibrios en los ecosistemas alterando funciones fundamentales para el correcto desarrollo y

supervivencia de la flora y la fauna (Canesi y Fabbri, 2015; Konieczna et al., 2015).

Existen distintas vías de exposición a los contaminantes que se encuentran en el medio ambiente siendo la vía inhalatoria y la gastrointestinal, dos de las más estudiadas. Parte de estos compuestos que participan activamente en la contaminación ambiental pueden actuar como disruptores endocrinos sobre los organismos vivos (Zhuang et al., 2016; Kan et al., 2017; Leyssens et al., 2017; Liu et al., 2017; Xue et al., 2017).

El término disruptor endocrino, puede definirse como todo agente exógeno (químico o físico) capaz de inducir efectos adversos para la salud de un organismo intacto o su descendencia, como consecuencia de cambios en la función endocrina. (Diamanti-Kandarakis et al., 2009; Yeung et al., 2011). Para ello el disruptor hormonal interfiere con la síntesis, secreción, transporte, unión, o metabolismo de las hormonas, que el organismo sintetiza fisiológicamente, y que son responsables del mantenimiento de la homeostasis y de la regulación de la reproducción, del desarrollo, y/o del comportamiento. Incluye a cualquier agente que induzca alteraciones sobre cualquier aspecto de la actividad y desarrollo del sistema endocrinológico (Kiyama y Wada-Kiyama., 2015; Kabir et al., 2015)

Bajo este término se engloba un gran número de compuestos químicos (plaguicidas, metales pesados, polímeros sintéticos y plásticos, derivados industriales) y de agentes físicos, como son las radiaciones de baja

frecuencia, por tanto, el catálogo de perturbadores endocrinos es muy amplio, comprendiendo desde sustancias que se encuentran de forma natural en el medio ambiente y/o en los alimentos, hasta productos químicos, resultado de la acción antropogénica (Olea-Serrano, 2006).

La ingesta alimentaria es la vía de exposición más importante a los compuestos con actividad de disrupción endocrina (Connolly., 2009). Muchos de estos compuestos, se encuentran presentes en el medio ambiente, entran en la cadena alimentaria y constituyen un riesgo potencial para la salud del consumidor. Otros pueden estar presentes en alimentos debido a su utilización durante el procesado de los mismos o bien debido a los envases como plásticos, latas y materiales impermeables a las grasas. El origen de los disruptores endocrinos que más tarde aparecen en la cadena alimentaria, ya sea debido a causas naturales, prácticas agrícolas y aplicaciones industriales o bien, por deposición atmosférica, podemos encontrarlos en productos de origen animal, vegetal, pescados y mariscos o en agua de bebida (Kawamura et al., 1999, Takao et al., 2002; Kang et al., 2006)

Como principales disruptores endocrinos de interés en seguridad alimentaria podemos destacar: plaguicidas; dioxinas; bifenilos policlorados y compuestos bromados retardantes de llama; polímeros sintéticos y plásticos; bisfenol; alquifenoles; phtalatos; metales pesados; fitoestrógenos, fitoesteroles, micoestrógenos y productos farmacéuticos.



A pesar de que algunos de ellos son bien metabolizados por los organismos vivos (como los fitoestrógenos), otros sufren acumulación en los distintos elementos de los ecosistemas y biomagnificación a lo largo de la cadena alimentaria (como el DDT), y la presencia simultánea de diversos disruptores endocrinos a concentraciones bajas podría conllevar una actividad biológica sobre el sistema neuroendocrino debido a un efecto aditivo de los mismos.

Existen evidencias crecientes de que la exposición de la fauna a los compuestos con actividad estrogénica puede provocar modificaciones en la función reproductiva de vertebrados (Hassanin et al., 2002; Chichizola., 2003; Rodriguez-Mozaz et al., 2004), estando entre las principales repercusiones la disfunción tiroidea en aves y peces; la disminución de la fertilidad en aves, peces, crustáceos y mamíferos; la disminución del éxito de la incubación en aves, peces y tortugas; graves deformidades de nacimiento en aves, peces y tortugas; anormalidades metabólicas en aves, peces y mamíferos; anormalidades de comportamiento en aves; masculinización y feminización de peces, aves y mamíferos machos; feminización y masculinización de peces y aves hembras; y peligro para los sistemas inmunitarios en aves y mamíferos (Flint et al., 2012; Bhandari et al., 2015). Entre las principales patologías asociadas a la exposición en humanos, cabe destacar las alteraciones en la salud sexual y reproductiva, enfermedades de elevado índice epidemiológico como la diabetes, obesidad y cáncer de órganos regulados hormonalmente, patologías psiquiátricas y procesos neuroinmunológicos.

Los disruptores endocrinos interfieren en el funcionamiento del sistema hormonal mediante alguno de estos tres mecanismos: suplantando a las hormonas naturales, bloqueando su acción o aumentando o disminuyendo sus niveles. Los mecanismos de acción de los disruptores endocrinos son muy variados, de hecho, un mismo xenobiótico puede actuar de diferente modo según sea la glándula que altera. Así estos compuestos pueden mimetizar, estimular o inhibir la acción de las hormonas, y frecuentemente pueden actuar como sustancias hipertróficas y/o promotores tumorales (Andrade-Ribeiro et al., 2006).

Como se ha mencionado anteriormente, los compuestos químicos implicados en la disrupción endocrina incluyen los biocidas, compuestos industriales, surfactantes y plastificantes incluido el Bisfenol A (BPA) (Flint et al., 2012).

El BPA es un compuesto, de entre otros, plásticos y contenedores de alimentos, y es uno de los productos químicos producidos en mayor volumen en el mundo (Lang et al., 2008), alcanzando unos niveles de producción mundial muy elevados, produciéndose en 2006, 3.8 millones de toneladas del mismo (Fitzgerald y Wilks., 2014) y ascendiendo esta producción anual en el año 2009 de 5.16 millones de toneladas (Chemical Weekly, 2009). Debido a la similitud estructural que tiene con las hormonas esteroideas, posee una actividad endocrina que lo hace capaz de provocar, en las células diana, una

respuesta parecida a la de las hormonas endógenas o bien inhibir dicha respuesta ejerciendo un efecto antagónico (Lora et al., 2013).

Se ha demostrado que existe migración de BPA desde los envases al alimento entrando en nuestro organismo por vía digestiva, siendo una de las principales fuentes de exposición en los humanos (Lyons., 2000; Brede et al., 2003). Cambios en el pH, abrasiones mecánicas y el calor, pueden acelerar la hidrólisis del enlace éster que une las moléculas de BPA en los plásticos de policarbonato, y el lavado continuado de los productos de policarbonato provoca la fácil separación del BPA de estos productos y su distribución en el medio ambiente, incluso a temperatura ambiente (Howdeshell et al., 2003), motivo por el que se encuentra presente como contaminante ambiental en ríos y agua de bebida. Niveles de BPA de hasta 56 µg/l han sido detectados en ríos y costas (Rocha et al., 2013; Corrales et al., 2015), siendo estos niveles superiores en aguas residuales de plantas tratadoras o de vertederos, alcanzando niveles medios de 269 µg/l (Kang et al., 2007).

La importancia del BPA como contaminante ambiental y el riesgo que implica, debido a su baja tasa de biodegradabilidad y a su bioacumulación en la cadena trófica, ha provocado que el Parlamento Europeo lo haya incluido como una de las sustancias cuya toxicidad debe ser evaluada.

La Comisión Europea y los Estados Miembros decidieron restringir el uso de BPA en la fabricación de biberones de plástico para lactantes (Directiva 2011/8/UE) a partir del 1 de marzo de 2011, prohibiéndose tanto la comercialización como la importación de los mismos a partir del 1 de junio del mismo año (Reglamento de Ejecución (UE) 321/2011). Francia y Dinamarca de forma unilateral, ya prohibieron la fabricación y la comercialización de biberones que contuvieran BPA. Además, el uso de BPA en materiales en contacto con alimentación infantil de entre 0 y 3 años, está prohibido en Canadá, Australia y en varios estados de Estados Unidos. Por otra parte, desde el año 2015, ha quedado prohibido en Francia el uso de BPA en materiales que entren en contacto con cualquier tipo de alimento.

La utilización del BPA en envases en contacto con los alimentos está permitida en el resto de la Unión Europea mediante el Reglamento Europeo (UE) 10/2011 de la Comisión de 14 de enero, relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los productos alimenticios, en el cual se establece un límite máximo de migración para esta sustancia de 0,6 mg/kg. El valor de la Ingesta Diaria Tolerable (IDT) del BPA ha sido modificado en el último informe realizado por la EFSA en el 2015, y ha pasado de 50 µg/kg pc/día a 4 µg/kg pc/día (EFSA, 2015). En referencia al análisis de la exposición del BPA realizado por la EFSA, éste concluye que la exposición dietética no supera el valor de IDT para ningún grupo de edad, ya que los niveles calculados se encuentran 34 veces por debajo del valor de IDT. Pero, por otro lado, también se hace referencia y se apunta a que la evaluación de la exposición de fuentes no dietéticas presenta cierta

incertidumbre y debe ser estudiada (EFSA, 2015). La IDT se ha hecho temporal para dar cuenta de la incertidumbre sobre los posibles efectos del BPA en la glándula mamaria, sistema reproductivo, neurológico, sistemas inmunológicos y metabólicos en animales de laboratorio.

En diciembre de 2016, la Comisión Europea decidió restringir el uso de BPA en el papel térmico en la Unión Europea. Esta prohibición será efectiva en el año 2020, habiéndose establecido como alternativa el uso de Bisfenol S (BPS).

En junio de 2017, el BPA ha sido incluido por la Unión Europea (ECHA) dentro de la lista de químicos altamente preocupantes debido a sus propiedades, y a que causa serios efectos en la salud humana, se ha establecido que todos los fabricantes, importadores y suministradores de BPA deben clasificar y etiquetar todas las mezclas que contengan BPA como tóxico para la reproducción, categoría 1B para el 1 de marzo de 2018.

Actualmente, el límite de migración permitido en juguetes para niños es de 0.1 mg/l de BPA.

En mayo de 2017, la Comisión Europea publicó una directiva (Directiva 2017/898) para disminuir ese límite a 0.04mg/l. Este nuevo límite debe establecerse en 2018.

Por otra parte, en abril del 2008 el Programa Nacional de Toxicología de los EEUU publicó un informe preliminar sobre el BPA en el que consideró prudente aumentar el margen de seguridad y establecer nuevos estudios

sobre la evaluación del riesgo. La EFSA revisará su IDT después de evaluar todas las evidencias científicas-toxicológicas publicadas desde el 2012, y se estima que comience en 2017, cuando un estudio de dos años llevado a cabo por el Programa Nacional de Toxicología de Estados Unidos esté disponible.

Entre las principales acciones del BPA destaca la actividad estrogénica débil del mismo, que provoca efectos importantes en el aparato reproductor masculino, principalmente en testículos, con una disminución significativa del esperma (Bhandari et al., 2015; Wisniewski et al., 2015; Lora et al., 2016). Se sabe que el BPA actúa sobre la hipófisis anterior, estimulando la producción de prolactina (PRL) hasta un 50% más de la respuesta máxima obtenida tras estimular las células prolactínicas con  $17 \beta$ -estradiol (E2) en adulto, provocando una proliferación lactotropa (Stoker et al., 1999, Ramos et al., 2003; Velasco-Marinero et al., 2011).

Más allá de este efecto, se ha descrito que el BPA provoca modificaciones en las branquias, y altera de manera severa las células cloro (Mohamed et al., 2013; Faheem et al., 2016). Las células prolactínicas regulan el balance osmótico, estimulando los procesos relacionados con la adaptación a agua dulce en las branquias, riñón e intestino (Pierce et al., 2007) por lo que estos tipos de alteraciones en las células prolactínicas podrían verse reflejadas en los cambios producidos en las células cloro. Distintos trabajos de investigación han descrito la participación de las células prolactínicas en la regulación iónica que tiene lugar en las branquias (Bartels et al., 2015; Inokuchi et al., 2015).

Con la finalidad de investigar en profundidad la toxicidad del BPA como contaminante acuático, nuestro objetivo fue el de evaluar los posibles efectos del BPA en la regulación iónica mediante el estudio de las branquias y las células cloro y su posible relación con la adenohipófisis mediante la evaluación de las células prolactínicas a través de una evaluación histológica de ambos tejidos en zebrafish (pez cebra), tras una exposición de 14 días a BPA.



## 2. Revisión Bibliográfica





## **2.- Revisión bibliográfica**

Los disruptores endocrinos son todos aquellos compuestos químicos que tienen la capacidad de alterar el equilibrio hormonal del sistema endocrino de los organismos. Dicho desequilibrio del sistema endocrino puede tener consecuencias neurológicas o reproductivas en los seres vivos, ya que las hormonas están implicadas en el control de la reproducción, la diferenciación sexual, la coordinación de órganos, la organización del cerebro, y el metabolismo, entre otras, representando un especial peligro durante la fase de gestación y en las etapas iniciales de la vida.

En la sociedad actual, una gran parte de los productos que utilizamos habitualmente contienen en diversas proporciones sustancias que

potencialmente son disruptores endocrinos tales como productos cosméticos, insecticidas, latas de conserva, plástico de biberones, etc. La relación de la dosis y respuesta no es muy conocida ya que los disruptores no presentan una relación unívoca dosis-respuesta y, además, dichas consecuencias pueden aparecer tras periodos de latencia de varios años.

## 2.1 PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DEL BISFENOL A.

El 2,2-bis (4-hidroxifenil) propano o bisfenol A (BPA) posee un número de identificación registrado (CAS): 80-05-07, su estructura química consiste en 2 núcleos fenólicos (Fig. 1), que le dan unas características físicas propias a este compuesto: una sustancia sólida, incolora e inodora a temperatura ambiente (Buysch., 1999).

La pureza del BPA suele ser del 99-99,8% (European Union Risk Assessment, 2003), según el fabricante y éstas impurezas incluyen fenol (<0,06%), orto y para isómeros de BPA (<0,2%) y agua (<0,2%).

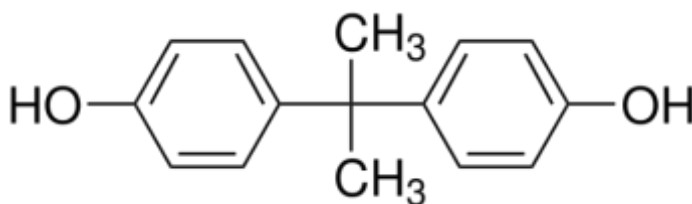


Figura 1. Fórmula química del BPA.

La clasificación y etiquetado del BPA fue elaborada por la European Union Risk Assessment en el año 2003 y actualizada en el año 2008, donde quedó descrita la clasificación del mismo como la siguiente:

**Clasificación: Reproducción categoría 3; R62; Xi; R37- 41, R43**

**R62:** posible riesgo para la fertilidad

**Categoría 3:** sustancias que causan preocupación en relación a la fertilidad humana en base a apropiados estudios animales.

**Xi:** irritante   **R37:** irritante para el sistema respiratorio   **R41:** riesgo de serio daño para los ojos   **R43:** puede causar sensibilización por contacto con la piel.

El BPA es uno de los productos químicos producidos en mayor volumen en todo el mundo. Es preparado por la condensación de la acetona, de ahí el sufijo “-A” con dos equivalentes de fenol (Fig. 2). La reacción es catalizada por un ácido fuerte o una resina de poliestireno sulfonado, utilizándose una gran cantidad de fenol para asegurar su completa condensación.

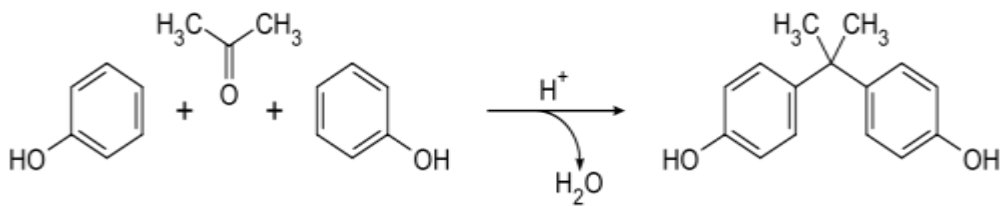


Figura 2. Reacción de condensación del BPA (Uglea y Negulescu., 2005).

Un gran número de cetonas sufren reacciones análogas de condensación. Este método es eficiente y el único producto derivado es el agua (Fiegue et al., 2002).

En cuanto a los embalajes, existen siete tipos de plásticos usados para embalar. Algunos plásticos del tipo 7, como el policarbonato (algunas veces identificado con las letras 'PC' al lado del símbolo de reciclaje) y las resinas epoxi, están hechos de BPA (Fiegue et al., 2002; Biello, 2008). Los plásticos tipo 3 (PVC) también pueden contener BPA como antioxidante en plastificantes (Fiegue et al., 2002).

Con respecto a las principales propiedades físico-químicas del BPA y sus valores están presentes en la tabla 1.

PARÁMETRO	VALOR
<b>Peso molecular:</b>	228.29
<b>Fórmula molecular:</b>	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>
<b>Solubilidad en agua:</b>	300 mg/l
<b>Punto de fusión:</b>	155-157°C, dependiendo del proceso de fabricación
<b>Punto de ebullición:</b>	360°C a 101.3 kPa (también puede ocurrir descomposición)
<b>Presión de vapor:</b>	5,3x10 <sup>-9</sup> kPa
<b>Densidad relativa:</b>	1.1-1.2 kg/m <sup>3</sup>
<b>Límite de explosividad:</b>	La mínima concentración explosiva es 0.012 g/l con una concentración de oxígeno > 5%
<b>Propiedades oxidantes</b>	No es un agente oxidante
<b>Log KOW</b>	3,40
<b>Constante de la ley de Henry</b>	4,03x10 <sup>-6</sup> Pa.m <sup>3</sup> /mol <sup>1</sup>
<b>Log KAW</b>	-9,01 <sup>2</sup>
<b>Log KOA</b>	12,41 <sup>3</sup>
<b>pKA</b>	9,59-11,30

**Tabla 1. Propiedades físico-químicas del BPA a 25°C (Cousins et al., 2002, DLEP 60,2011).**

<sup>1</sup> Calculado como el ratio del vapor de presión (Pa) y la solubilidad en agua (mol/m<sup>3</sup>).

<sup>2</sup> Calculado de la constante de la ley de Henry (H), i.e.,  $K_{AW}=H/RT$ , donde R es la constante de los gases (J/mol/K) y T es la temperatura absoluta (K).

<sup>3</sup> Calculado del ratio  $K_{OW}/K_{AW}$ .

## 2.2 USOS INDUSTRIALES Y RELACIÓN CON EL MEDIO AMBIENTE.

### 2.2.1 Usos industriales

El BPA se utiliza como un elemento y/o componente destinado principalmente a la fabricación de plásticos de policarbonato y resinas epoxi (Mileva et al., 2014). El policarbonato y las resinas son materiales dirigidos a la producción de objetos y recipientes destinados a entrar en contacto con los alimentos y bebidas, como pueden ser envases, recubrimientos de conservas, platos, tazas, platos de microondas, botellas de plástico, copas, latas, etc. Los plásticos producidos con BPA también tienen otras aplicaciones como son la fabricación de CDs o DVDs, papel térmico, dispositivos médicos, gafas de sol, etc. (Vandenberg et al., 2007).

USO	Tm/año	Consumo en la UE (en %)
<b>Producción de policarbonato</b>	486,880	71.1
<b>Producción de resinas epoxi</b>	171,095	25.0
<b>Resinas fenoplásticas</b>	8,800	1.3
<b>Producción de resinas de poliéster insaturado</b>	3,000	0.4
<b>Revestimiento de latas de conserva</b>	2,460	0.4
<b>Producción y proceso de PVC</b>	2,250	0.3
<b>Fabricación de bisfenol A alquiloilado</b>	2,020	0.3
<b>Producción de papel térmico</b>	1,400	0.2
<b>Fabricación de polioles / poliuretano</b>	950	0.1
<b>Producción de poliamida modificada</b>	150	<0.1
<b>Fabricación de ruedas</b>	110	<0.1
<b>Líquido de frenos</b>	45	<0.1
<b>Otros usos menores</b>	5,990	0.9

Tabla 2. Usos y consumos en la UE (EU RAR, 2002)

El BPA también se ha encontrado en el cloruro de polivinilo comercial (PVC) utilizado en películas y bolsas de plástico para alimentos, siendo posible su migración a estos (López-Cervantes y Paseiro-Losada, 2003; López-Cervantes et al., 2003). A raíz de su utilización para la fabricación de bolsas de plástico, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) pidió a la Asociación de Fabricantes de Plásticos en Europa investigar el uso



del BPA en PVC. Tras esta investigación se dejó de aplicar el BPA en el proceso de polimerización del PVC por algunos fabricantes en la Unión Europea (UE), al igual que se investigó su uso como estabilizador/antioxidante en PVC.

Según algunos autores, el caucho natural o silicona que se usa para producir tetinas y chupetes de bebé podría contener BPA. Sin embargo, la Asociación Mundial de Fabricantes de biberones y tetinas afirmó que el BPA no es y nunca ha sido utilizado en la fabricación de los mismos (Thomas y Dong, 2006).

El primero que publicó la síntesis del BPA fue Thomas Zincke de la universidad de Marburgo, Alemania ([www.bisphenol-a.org](http://www.bisphenol-a.org)). La información de la síntesis del BPA y de un número de compuestos relacionados fue publicada por primera vez en 1952. A pesar de que Zincke divulgó las características físicas predominantes del BPA (como la composición, punto de fusión o la solubilidad molecular en solventes comunes), no señaló ningún uso industrial. Sin embargo, ya en 1953, el Dr. Hermann Schnell, de la empresa Bayer en Alemania y el Dr. Dan Fox de General Electric en los Estados Unidos desarrollaron procesos de fabricación para un nuevo material plástico, el policarbonato, usando el BPA como materia prima. Este plástico de policarbonato tendría una serie de características muy útiles, particularmente claridad óptica, alta resistencia a temperaturas extremas ( $-40^{\circ}\text{C}$  y cerca de  $145^{\circ}\text{C}$ ) y a los golpes, que harían que éste policarbonato formara parte importante de la vida cotidiana con una gran variedad de usos. Su comercialización se inició en 1957 en los Estados Unidos y en 1958 en Europa, y al mismo tiempo, las resinas epoxi fueron desarrolladas para

resolver una amplia gama de necesidades industriales ([www.bisphenol-a.org](http://www.bisphenol-a.org)).

Debido a sus extensos usos, el BPA se estimó en 2008 en una producción mundial anual de más de 5.16 millones de toneladas, y de forma muy extendida, según datos de la Chemical Weekly del 1 de septiembre de 2009 (Chemical Weekly, 2009), siendo Asia el principal productor de BPA, seguido por Europa (Tabla 3).

REGIÓN	CAPACIDAD	DEMANDA
<i>Kilotoneladas por año</i>		
America	1226	972
Europa	1438	1040
<b><u>Asia</u></b>		
China	261	651
Japón	615	415
Korea	345	336
Taiwan	645	341
Otras ciudades	480	550
<b>Total Asia</b>	<b>2346</b>	<b>2293</b>
Otros	150	74
<b>TOTAL</b>	<b>5160</b>	<b>4379</b>

Tabla 3. Producción y demanda global de BPA durante el año 2008

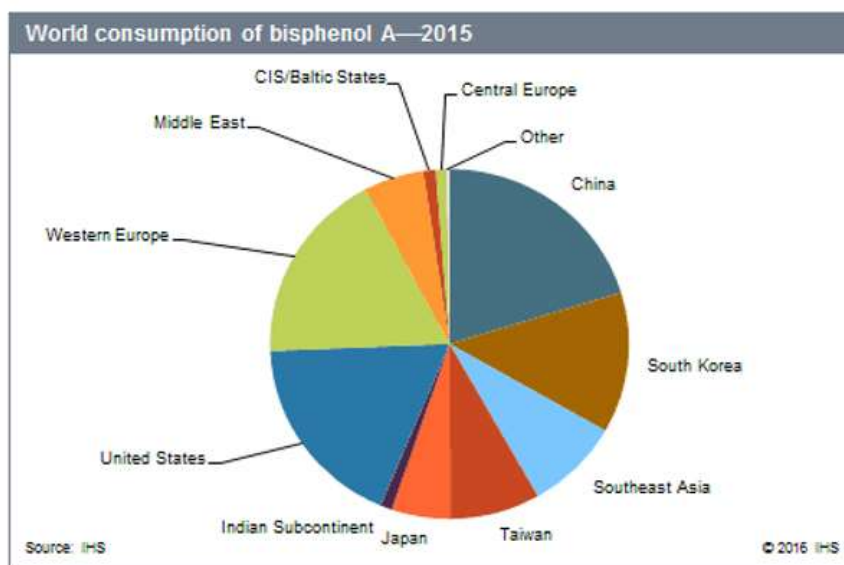
(Chemical Weekly 2009)

En 2010 la estimación de la producción anual mundial de BPA ascendió a 8 millones de toneladas, y aproximadamente 100 toneladas pudieron ser liberadas a la atmósfera (Vandenberg et al., 2010).

Cerca del 70% del BPA producido en la industria se utiliza para fabricar policarbonatos y aproximadamente un 25% se utiliza en la producción de resinas epoxi (Kamrin, 2004). El 5% restante se utiliza en una amplia variedad de productos, incluyendo resinas fenólicas, resinas no saturadas de poliéster, recubrimiento de latas, como antioxidante e inhibidor final de la polimerización en la fabricación de polivinilos (cloruro de vinilo) plásticos, como intermediario en la fabricación de papel térmico (Kamrin, 2004), fabricación de neumáticos de coche o retardadores de llama (European Union Risk Assessment Report, 2003).

Tal y como representa la Fig. 1, durante el año 2015, Asia consumió el 56% del total de BPA generado en el mundo, consumiendo entre Norte América y Europa occidental un 36% adicional, lo que supone un total entre estas tres regiones mayoritarias de alrededor del 92% del BPA producido.

Se espera que el consumo mundial de BPA crezca una media anual del 3% hasta el año 2020, siendo este crecimiento esperado del 5% anual en el norte de Asia, donde el crecimiento será mayor (IHS 2016).



**Figura. 1. Distribución del consumo mundial de BPA durante el año 2015**  
**IHS-CEH (IHS Markit- Chemical economics handbook)**

En muchos casos, el nivel de producción de BPA de los distintos países no se corresponde de manera proporcional con el nivel de consumo del mismo, tal y como muestra la Fig. 2, siendo Inglaterra o Francia países con un elevado consumo del mismo a pesar de tener una producción mínima o nula. España se encuentra dentro de los 4 principales productores de BPA a nivel europeo a pesar de tener un consumo reducido respecto a otros países europeos como Alemania, Francia o Reino Unido.

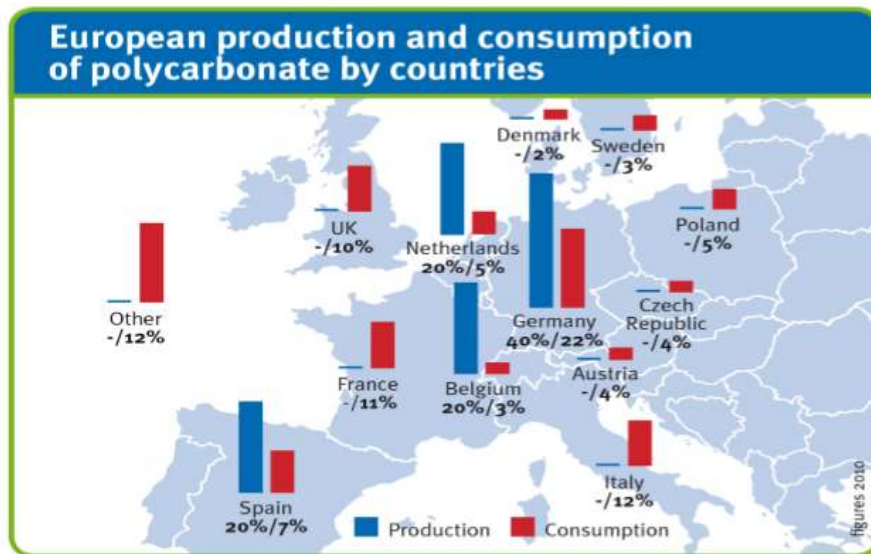


Fig. 2. Comparativa entre los niveles de producción y uso de policarbonato en Europa (IHS-CEH)

### 2.2.1.1 Policarbonato

El policarbonato comercialmente más importante, es el BPA policarbonato, que se produce convencionalmente por policondensación del BPA con fosgeno. Sin embargo, el fosgeno es un producto químico muy tóxico. Por ello, a mediados de los años 90, fue desarrollado comercialmente un nuevo proceso, en el que el BPA reacciona con el difenilcarbonato, para producir el policarbonato sin la necesidad del fosgeno como materia de base (Bishop., 2000). Debido a las características únicas del policarbonato de BPA, como su dureza extrema, la resistencia al impacto, una transparencia excepcional, la compatibilidad excelente con varios polímeros, y la resistencia a la distorsión a temperaturas altas (Serini., 2001), se ha utilizado

extensamente en una variedad de productos de consumo, incluyendo un gran número de productos que entran en el contacto con el alimento, tales como envases de bebidas retornables o botes de alimentación infantil. Además, se utiliza en bienes de consumo no alimenticios, tales como lentes de gafas, equipos eléctricos, electrodomésticos, y equipos de seguridad deportiva, CDs y DVDs, papel térmico, dispositivos médicos, gafas de sol etc (Kamrin., 2004; Vandenberg et al., 2007)

#### 2.2.1.2 Resina epoxi

Las resinas epoxi son prepolímeros que contienen grupos epóxido. Éstas se forman generalmente por reacción de bisfenol A diglicidiléter (BADGE) con BPA (Runyon et al, 2002). Industrialmente, la reacción de estas resinas con una variedad de agentes endurecedores (como anhídridos, aminas alifáticas, o poliamidas) produce plásticos reticulados o termoendurecibles. Debido a su dureza, resistencia química, y características adhesivas y eléctricas, las resinas epoxi y las resinas epoxi modificadas se utilizan actualmente en recubrimiento y usos estructurales. La resina epoxi también tienen un número de usos que implican el contacto con el alimento. Particularmente, estas resinas son parte de las envolturas protectoras usadas en las latas de alimento y de bebida, y se pueden también utilizar en el campo de los transformados alimenticios, por ejemplo, en las capas aplicadas a las superficies interiores de algunas cubas usadas en la elaboración del vino (Kamrin., 2004).

En usos estructurales pueden cubrir una variedad de productos tales como fibras reforzadas, laminados eléctricos, bastidores, herramientas, y pegamentos. Otros usos incluyen pinturas, suelos, pegamentos, tarjetas de circuitos impresos y sellantes dentales (Kamrin., 2004; Wen-Tien., 2006).

### 2.2.2 Relación con el medio ambiente

La presencia del BPA en el ambiente es consecuencia de actividades antropogénicas. Inevitablemente, en numerosas ocasiones restos de BPA son emitidos al medio ambiente desde distintas fuentes, que pueden clasificarse como previas y posteriores al consumo.

Dentro de las fuentes previas al consumo, se engloban las relacionadas con la fabricación del BPA y productos que lo contienen, donde la principal fuente es la descarga de efluentes de las plantas de fabricación del mismo (Staples et al., 1998; Klecka et al., 2009), siendo el transporte y los productos que lo contienen en su composición fuentes adicionales a esta (Staples et al., 1998; Flint et al., 2012).

Entre las fuentes posteriores al consumo podemos incluir las relacionadas con los vertidos procedentes de las plantas tratadoras de agua residual, lixiviación desde vertederos, combustión de basura doméstica y degradación de plásticos en el medio ambiente (Teuten et al., 2009; Fu y Kawamura, 2010; Flint et al., 2012).

De la cantidad emitida, de las características físicas (especialmente la solubilidad de agua, la presión de vapor, la constante de Henry, y el coeficiente de partición del octanol-agua) del riesgo ambiental y de la biodegradabilidad del BPA dependerá la distribución de éste en el medioambiente (Wen-Tien, 2006).

### 2.2.2.1 Contaminación acuática

Aunque el BPA sea un material parcialmente biodegradable y altamente tratable en depuradoras de aguas residuales bien diseñadas, se detecta en efluentes de muchas aguas residuales industriales (Wen-Tien, 2006) debido a que no es eliminado totalmente durante el tratamiento. Estas aguas residuales que contienen BPA pueden ser una fuente de contaminación del ambiente acuático (Staples et al., 1998; Furhacker, 2000). Lee y Peart (2000) demostraron que el BPA en aguas residuales se redujo tras su paso por plantas de tratamiento de un 37 a un 94%.

Otra fuente significativa de la liberación de BPA en el medio acuático incluye las aguas subterráneas procedentes de lixiviados de vertederos comunes. De hecho, prácticamente todos los lixiviados procedentes de vertederos testados en una encuesta nacional a lo largo de los Estados Unidos contenían BPA (95%), con concentraciones que alcanzaban los mg/l (Masoner et al., 2014).

El BPA contribuye hasta en un 84% en la estrogenicidad de estos lixiviados, sugiriendo que la presencia relativa en agua es generalmente



dependiente de la fuente (Kawagoshi et al., 2003). Las concentraciones en agua superficial han sido establecidas en torno a 3-30 ng/l para el BPA (Belfroid et al., 1999, Kuch y Ballschmiter, 2001; Murk et al., 2002; Cargouet et al., 2004), habiéndose identificado altos niveles de BPA en los residuos de vertederos (Yamada et al., 1999; Behnisch et al., 2001; Yamamoto et al., 2001; Filho et al., 2003), con niveles de BPA en estos peligrosos efluentes de 1,3 a 17.200 ng/ml (con una media de 269 ng/ml). Yamada et al. (1999) encontraron en cuatro vertederos unos niveles de BPA de 15 a 5.400 ng/ml y observaron que tras el tratamiento en diversas plantas depuradoras se pasó a niveles de 0,5 a 5,1 ng/ml. A pesar de los esfuerzos realizados para introducir diferentes estrategias para el tratamiento de estas aguas residuales, el BPA (y otros contaminantes) aún se detecta en este tipo de efluentes (Deblonde et al., 2011; Corrales et al., 2015) siendo por tanto una importante fuente de contaminación del medio acuático (Yamada et al., 1999; Behnisch et al., 2001; Yamamoto et al., 2001; Filho et al., 2003)

El BPA en aguas fluviales puede degradarse bajo condiciones aerobias (Ike et al., 2000; Klecka et al., 2001; Kang y Kondo, 2002a), pero no bajo condiciones anaerobias (Kang y Kondo, 2002b). Kang y Kondo (2002a) encontraron que la mayoría de las bacterias (10 de 11 bacterias) aisladas a partir de 3 aguas fluviales podían biodegradar el BPA, pero con diferencias en el ratio de eliminación del BPA (18-91%) y, solamente dos cepas de *Pseudomonas* demostraron alta biodegradabilidad del BPA (cerca del 90% de eliminación del BPA).

El BPA puede persistir más tiempo en agua de mar que en agua fluvial sin ninguna degradación (cerca de 30 días) y la posibilidad de contaminación con BPA en un mamífero marino puede ser más alta que en un organismo de agua dulce (Ying y Kookana, 2003; Kang y Kondo, 2005).

Según el informe de la EFSA (EFSA, 2013), los pescados y mariscos, una parte importante de la dieta humana, presentan una de las mayores contaminaciones de BPA. Debido a la capacidad del BPA de lixiviar del plástico en los océanos, este puede causar una contaminación directa de los peces. Los desechos plásticos pueden ser la principal fuente de BPA en los mariscos habiendo sido medidas las tasas de bioacumulación en tejidos de pescado y mariscos por distintos autores (Gatidou et al., 2010, Liu et al., 2012, Yang et al., 2014). En un estudio realizado por Basheer et al. (2004) se detectó la concentración de BPA en mariscos (gamba, cangrejo, berberecho, almeja blanca, calamar y pescado) de un supermercado de Singapur, y se observó que oscilaba entre 13,3 y 213,1 ng/g. Por lo tanto, el consumo de peces de agua dulce o mariscos contaminados por BPA podría ser una ruta importante de exposición para el consumidor.

#### 2.2.2.2 Contaminación atmosférica.

En la bibliografía existente hay pocos estudios sobre las concentraciones del BPA en aire atmosférico. Existen concentraciones que van de 0,1 a 29 ng/m<sup>3</sup> en aire interior y desde <0,1 a 4,72 ng/m<sup>3</sup> en aire exterior (Wilson et al., 2001a, b).

Las concentraciones de BPA en el aire interior son perceptiblemente más altas que al aire libre, apoyado en que las fuentes potenciales de emisión del BPA podrían proceder de electrodomésticos del hogar y de materiales de equipamiento de oficina (Wen-Tien, 2006).

Debido a que el BPA no es un compuesto que se sintetice de manera natural en el medio ambiente, es de esperar que las mayores concentraciones en aire exterior se localicen en grandes áreas urbanas, pero el BPA se encuentra presente también en las zonas más deshabitadas de la tierra (Corrales et al., 2015).

La cantidad y la tasa en la que el BPA atmosférico se deposita en el agua está aún por determinar. Por otra parte, el potencial de transporte del BPA en el aire es mucho menor ( $<0,0001$ ) que en el agua (sobre el 30%) (Staples et al., 1998). Generalmente la posibilidad de inhalar altos niveles de BPA del aire es muy baja (Kang et al., 2006).

### 2.2.2.3 Contaminación en el suelo/sedimento

Los valores del coeficiente de absorción del suelo ( $K_{oc}$ ) del BPA van de 314 a 1.524, estos valores significan que el BPA liberado a la tierra o a las aguas superficiales puede ser absorbido por el suelo o los sedimentos. Fent et al. (2003) sugirieron que la vida media del BPA en el suelo es de 3 días y puede estar correlacionada positivamente con la densidad humana ya que existe un incremento en las concentraciones de BPA en zonas de residuos humanos, ya sean residuos domésticos o industriales (Kawahata et al., 2004),

por lo que parece que estos residuos humanos son la principal fuente de contaminación del suelo con BPA (Kang et al., 2006). Las concentraciones de BPA (con un máximo de 36,7 µg/g) en lodos de aguas residuales son generalmente más altas que en sedimentos de mares y ríos (Wen-Tien, 2006).

La ionización del BPA es posible en suelos con un pH cercano a su pKa (Zeng et al., 2006), lo que puede desembocar en una lixiviación mayor a aguas subterráneas. La biodisponibilidad del anión bisfenolato y de los residuos de BPA localizados en la fracción no extraíble del suelo no han sido aun ampliamente investigados (Fent et al., 2003; Huang et al., 2014)

Como hemos comentado anteriormente, la biodegradación aerobia es el principal proceso de pérdida de BPA en todos los medios excepto en la atmósfera, donde éste es probablemente susceptible a una reacción rápida con radicales hidroxilo (Staples et al., 1998). Basándonos en la presión de vapor y la constante de Henry, se ha concluido que el BPA tiene baja volatilidad y no es probable que sea eliminado del agua a través de la volatilización (Staples et al., 1998; European Union Risk Assessment, 2003).

En la mayoría de estudios revisados por la Unión Europea se vio que la biodegradación del BPA en agua era rápida y fue reafirmado por Staples (1998) quién concluyó que ésta biodegradación en agua se producía en un período de 2,5-4 días, en un estudio realizado en aguas superficiales cerca de corrientes receptoras de aguas situadas en zonas donde se fabricaba el BPA.

Un estudio realizado sobre aguas fluviales (Klecka et al., 2001) y otro sobre la degradación del suelo (Möndel, 2001b) han proporcionado datos sobre la vida media de degradación del BPA en el medioambiente. En el estudio de Klecka en el que se empleó el agua superficial recogida a partir de siete ríos diferentes de los E.E.U.U. y de Europa se observó que el BPA fue degradado en un período de 3 a 6 días (Klecka et al., 2001). En los estudios de Mondel sobre la degradación del BPA en cuatro tipos diferentes de suelo, se demostró una rápida pérdida del BPA, con períodos para la desaparición del compuesto original de menos de 3 días (Möndel, 2001b). Aunque fue detectada una pequeña fracción de metabolitos, estos se degradaron rápidamente. El principal responsable de la pérdida del BPA en el suelo es probablemente la biodegradación por medio de bacterias aerobias, aunque algo de BPA se puede incorporar a la materia orgánica del suelo. El proceso de pérdida, ya sea por degradación aeróbica o por incorporación a la materia orgánica del suelo, hace improbable que el BPA esté biodisponible para el transporte (por ejemplo, lixiviación o volatilización), así que parece que el BPA se pierde con eficacia de la biosfera. Sin embargo, solamente los sedimentos suspendidos y la capa superior de los sedimentos de las aguas superficiales son probablemente aerobios. En sedimentos anaerobios, la degradación microbiana del BPA se espera que sea mucho más lenta que en sedimentos aerobios (Cousins et al., 2002).

En la tabla 4 se muestran períodos de degradación del BPA en el medioambiente.

<b>MEDIO</b>	<b>VIDA MEDIA</b>
<b>Aire</b>	0.2 días
<b>Agua</b>	38 días
<b>Suelo</b>	75 días
<b>Sedimento</b>	340 días

**Tabla 4. Vida media del BPA en diferentes medios (Corrales et al., 2015).**

## 2.3 DISTINTAS FUENTES DE EXPOSICIÓN

Cada año, se utilizan más de 2 millones de toneladas de BPA en la fabricación de una gran variedad de productos domésticos (Lee et al., 2008; Vandenberg et al., 2009). El BPA está presente en los envases de alimento de policarbonato plástico y de bebida, en los biberones, así como en el recubrimiento de las latas de bebida y de alimento, o en los sellantes dentales utilizados en odontología (Vom Saal y Myers, 2008).

La exposición humana al BPA es extensa como se ha comprobado en el análisis de muestras de orina humana (Matsumoto et al., 2003; Yang et

al., 2003; Calafat et al., 2005; Kawaguchi et al., 2005; Liu et al., 2005; Ye et al., 2005, Bushnik et al., 2010; Covaci et al., 2015). Bushnik et al. (2010) detectaron BPA en el 91% de las muestras de orina recogidas a diferentes individuos de distintas edades residentes en Canadá, con una concentración media de 1.16 µg/l, presentando los niños entre 6 y 11 años una concentración de BPA en orina superior a grupos de otros rangos de edades; por otra parte Covaci et al. (2015) muestrearon 674 parejas de madres e hijos en 6 países Europeos obteniendo valores medios de BPA en orina de 2.04 µg/l en las madres y 1.88 µg/l en los niños, siendo el consumo de comida enlatada y la clase social (representada por un mayor nivel académico de la familia) los principales parámetros predictivos de los niveles de BPA en orina en las madres y sus hijos, estando estrechamente correlacionado el nivel de BPA entre ellos ( $r=0.265$ ,  $p<0.001$ ), lo que sugiere la presencia de un factor común que influencia este biomarcador en ambos.

Aunque el consumo diario de BPA en humanos puede ser considerablemente menor que las referencias de ingesta diaria tolerable, o los niveles de migración del BPA menores que los límites fijados por las diferentes agencias y países, varios estudios han sugerido un efecto endocrino adverso para el BPA a dosis de sólo 0,02-0,20 µg/kg/día tales como disminución de la producción diaria de esperma e infertilidad en varones a dosis de 0,2 µg/kg/día (Vom Saal et al., 1998; Chitra et al., 2003), estímulo del desarrollo de la glándula mamaria a dosis de 0,025 µg/kg/día (Markey et al., 2001), una disminución de enzimas antioxidantes a 0,2 µg/kg/día (Chitra et al., 2003) y alteraciones persistentes en el desarrollo peripuberal de la

glándula mamaria a dosis de 0,025-0,25  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  (Muñoz de Toro et al., 2005).

Las rutas posibles de exposición para los miembros de la población en general se pueden dividir en (1) la exposición ambiental directa e indirecta debido a la liberación de BPA durante su producción, uso y disposición; (2) exposición a través de los envases al alimento; y (3) el contacto con o la inhalación de productos de consumo no en contacto con el alimento.

Según el Programa Nacional de Toxicología, la exposición al BPA es probablemente casi exclusiva a través del alimento (National Toxicology Program, 2007). Por ejemplo, Wilson et al. (2007) examinaron la exposición al BPA y a otros fenoles en 275 niños de 1,5-5 años de edad, concluyendo que el 99% de la exposición al BPA era dietética basándose en medidas de los niveles de BPA de una variedad de fuentes tales como el alimento, el aire, y el polvo de sus hogares. Miyamoto y Kotake (2006) concluyeron que el 95% del BPA en el varón adulto era procedente del alimento y de la bebida, exceptuando el agua.

Las medidas y el conocimiento ambiental de las características del BPA sugieren que las fuentes ambientales de exposición de BPA no contribuyen perceptiblemente a la exposición de la población total (European Union Risk Assessment, 2003). Así, la mayor preocupación está puesta sobre la exposición a través del alimento (National Toxicology Program, 2007) particularmente en los niños que pueden ser expuestos por migración del



BPA a la leche en los biberones de policarbonato y la migración del BPA en fórmulas alimenticias infantiles a través de las capas de resina epoxi de los envases que contienen el alimento (Kamrin, 2004). En fórmulas infantiles consumidas por los niños (listas para utilizar, en concentrado o en polvo), Environment Canada apoya la conclusión de que la migración del BPA es significativa sólo para las fórmulas infantiles líquidas (Environment Canada, 2008). El BPA fue detectado y cuantificado en todas las muestras, con unas concentraciones de 2,27 a 10,2 ppb (Cao et al., 2008).

Además de fuentes comerciales de alimento, los niños consumen la leche materna. Nakao et al. (2015) analizaron muestras de leche materna de 19 madres Japonesas determinando unos niveles de BPA que oscilaban entre los 1,4 y 380 ng/g con un valor medio de 36 ng/g, Zimmers et al. (2013) detectaron BPA libre en el 62% de las muestras de leche materna obtenidas de 21 mujeres lactantes de EEUU obteniendo unos resultados que oscilaban entre 0,22 y 10,80 ng/ml con un valor medio de 3,13 ng/ml, encontrando además diferencias significativas entre razas, que fueron atribuidas a diferencias en el estilo de vida y el metabolismo. Mendoca et al. (2014) también midieron concentración de BPA libre en muestras de leche de 27 madres, así como los niveles de BPA en la orina de 31 niños lactantes siendo positivas a BPA el 75% de las muestras de leche y el 93% de las muestras de orina y obteniendo unos niveles medios de 0,4-1,4 ng/ml en leche y de 1,2 a 4,4 ng/ml en orina.

Como hemos comentado, hasta hace poco tiempo, la mayor parte de la exposición al BPA se pensaba que se producía a través de la dieta y que el organismo lo metabolizaba y eliminaba rápidamente. Sin embargo, en el estudio de Stahlhut et al. (2009), utilizando 1469 personas, se comprobó que el período de eliminación del BPA en la mayoría de la población era mucho mayor que el esperado, basado en estudios publicados de exposición aguda, incluso en personas que habían ayunado durante horas, demostrándose una larga vida media del BPA en el organismo humano. Esto sugiere la posibilidad de una importante exposición no alimenticia y requiere la necesidad de investigar esas fuentes de exposición no alimenticias como los cosméticos, el polvo y el aire de los hogares, los juguetes, chupetes, el agua superficial de las piscinas o los sellantes dentales, que presentan unas concentraciones de BPA más bajas pero que se recogen dentro de las fuentes de exposición tanto orales como dérmicas (Von Goetz et al., 2017). De igual modo, el BPA está presente en la fabricación de tuberías, botellas, tetinas, equipamiento médico, equipos electrónicos y CDs y DVDs (Huang et al., 2012). El BPA también se utiliza como estabilizante y antioxidante en la producción del cloruro vinílico (Nam et al., 2010) y en la producción de papel térmico, que presenta una alta concentración de BPA y que supone una fuente dérmica de exposición importante (Von Goetz et al., 2017). El papel térmico se produce en cantidades masivas ya que se utiliza en los tickets de compra, libros, faxes y etiquetas, así como tras su reciclado, en folletos, sobres de correo, periódicos, rollos de cocina, papel higiénico y cajas de comida (Nam et al., 2010; Liao et al., 2012).

En productos de papel reciclado usados para la transformación de los alimentos el BPA se ha encontrado en concentraciones 10 veces más altas que las encontradas en los productos de papel no reciclado. Las concentraciones de BPA en el papel eran de hasta 26 µg/g (EFSA, 2006). Otro estudio reciente indicó que los niveles de BPA encontrados en orina de niños de la Unidad de Cuidados Intensivos en Neonatología, que requería la utilización de equipos médicos era entre 16 y 32 veces superior a los niveles encontrados en la población general (Duty et al., 2013). Observándose que el BPA está presente en una gran variedad de productos médicos (bolsas que contienen fluidos intravenosos, en la nutrición parenteral total y tubos asociados con su administración; tubos de mantenimiento nasogástrico, máscaras respiratorias, tubos endotraqueales y catéteres umbilicales) con lo que sería otra vía de exposición a tener en cuenta en recién nacidos (Calafat et al., 2009; Duty et al., 2013).

Otra fuente de exposición es el empleo del BPA en la fabricación de materiales sellantes o compuestos dentales (European Union Risk Assessment, 2003). El BPA puede presentarse potencialmente como impureza o liberarse durante la degradación de los materiales dentales. Durante los procedimientos dentales, las mezclas de resina se aplican como monómeros líquidos y son polimerizados *in situ* por la luz ultravioleta. Según la Unión Europea (European Union Risk Assessment, 2003), los pacientes pueden ser expuestos al BPA durante la etapa de la polimerización.

En un estudio sobre 20 individuos con al menos 6 piezas rellenas con material sellante a base de polímero con BPA y 20 individuos control sin ningún tipo de sellante dental aplicado se recogieron muestras de saliva para ser analizadas. Tras el tratamiento de las mismas se encontraron cantidades variables de BPA en ambos grupos, apareciendo niveles apreciables de BPA en 8 de las 20 muestras del grupo test y en 3 de las 20 muestras del grupo control, siendo significativamente mayores en el grupo donde se aplicó el sellante dental (Berge et al.,2017).

Recientemente se han realizado numerosos estudios sobre el papel térmico como fuente de exposición, debido a su alto contenido en BPA y a su gran cantidad de aplicaciones en la vida cotidiana. En un estudio realizado con 6 voluntarios que simularon el trabajo de un cajero y la manipulación de los tickets de papel térmicos durante el periodo de ensayo , se analizaron muestras de orina mediante cromatografía obteniendo concentraciones urinarias de BPA 3 veces superiores a las obtenidas antes del periodo experimental y se observó que tras 48 horas del final del periodo experimental, los niveles en orina de BPA no descendieron, sugiriendo que el periodo de excreción del BPA tras la entrada vía dérmica es superior a 48 horas ( Lv et al., 2017).

Ndaw et al. (2016), determinaron el nivel de BPA en muestras de orina de 90 cajeros expuestos diariamente al contacto directo con el BPA presente en el papel térmico, analizando a su vez 44 controles para hacer posible la comparación. Los valores medios obtenidos tras el análisis van

desde 3,54 µg/l en los individuos control a 8,92 µg/l en los individuos expuestos lo que supone un aumento significativo en la concentración total de BPA en orina de los cajeros que manipulan diariamente papel térmico. Estos resultados indican que la cantidad de BPA transferida a la piel tras la manipulación del papel térmico no debe ser infravalorada, particularmente para los cajeros.

Aun así, la mayor preocupación está puesta sobre la exposición a través del alimento, particularmente en los niños, ya que son más susceptibles a cualquier efecto nocivo del BPA. Pueden ser expuestos por la migración de éste en la leche de las botellas de policarbonato y de fórmulas de alimentos infantiles conservados en envases de alimento recubiertos por resinas epoxi (Kamrin, 2004). Por ello nos vamos centrar en 1) la exposición por migración al alimento y 2) la exposición ocupacional.

### 2.3.1 Exposición al BPA por migración al alimento

La mayor parte de la contaminación en el alimento es causada por la migración de los envases que contienen BPA. Las resinas epoxi producidas con BPA se utilizan para recubrir las superficies metálicas de envases que están en contacto con los alimentos y las bebidas, mientras que los plásticos de policarbonato se utilizan en los envases de los alimentos y las bebidas. Varios estudios han divulgado datos disponibles sobre la migración del BPA de recubrimientos o de plásticos en contacto con los alimentos y los líquidos (Kang et al., 2006).

### 2.3.1.1 Migración del BPA de las superficies de recubrimiento de las latas

El BPA se ha detectado en los vegetales en conserva, bebidas en latas, productos conservados de pescado y carne, productos lácteos conservados y fórmulas infantiles (Kang et al., 2006).

Los principales factores que influyen en la migración del BPA de los envases a los alimentos son el tiempo de almacenamiento y la temperatura de calentamiento utilizados en el proceso de fabricación (Kawamura et al., 1999, 2001; Munguía-López y Soto-Valdez, 2001; Goodson et al., 2002; Takao et al., 2002; Kang et al., 2003; Munguía-López et al., 2005). Munguía-López y Soto-Valdez (2001) en México, encontraron BPA en las latas de atún y de jalapeño a la pimienta en supermercados a concentraciones de 82 y 2 ng/g, respectivamente, a temperatura y tiempo similar (90 minutos a 121 °C el atún y 90 minutos a 100 °C el jalapeño).

Kawamura también encontró niveles de migración del BPA dentro del líquido de latas de 2 empresas diferentes tras el calentamiento a 120 °C durante 10 y 60 minutos (64 y 87 ng/ml respectivamente para las latas de una empresa y 99 y 166 ng/ml, respectivamente, para las latas de otra empresa) (Kawamura et al., 2001).

Fattore et al. (2015) monitorizaron los niveles de BPA mediante cromatografía líquida en 33 muestras de conserva de atún en aceite o en agua de supermercados italianos. Los niveles detectados de BPA se encontraron en un rango que iba desde 19.1 a 187.0 ng/g en las muestras de atún y de 6.3 a 66.9 ng/mL en el aceite.

En otros estudios (Kang et al., 2006) sobre muestras de agua, observaron que la temperatura tenía más efecto sobre la migración del BPA de las latas que el tiempo de calentamiento. Los niveles de migración del BPA para el agua fueron de 1 ng/ml tras el calentamiento a 105 °C durante 30 minutos y 5 ng/ml después de calentar a 121 °C durante 30 minutos. Sin embargo, para latas calentadas a 121 °C, el nivel de migración del BPA (6 ng/ml) tras 60 minutos de calentamiento era similar a los 5 ng/ml de migración alcanzados tras calentar esas latas durante 15 y 30 minutos a 121°C.

La migración del BPA también puede verse afectada por el tiempo de almacenamiento (Munguía-López y Soto-Valdez, 2001; Yoshida et al., 2001; Munguía-López et al., 2002, 2005), aumentando ésta la migración. Sin embargo, otros autores sugirieron que el nivel de BPA no cambia en tiempos de almacenamientos largos (hasta 9 meses) (Goodson et al., 2004). También se observó que cuando las latas eran calentadas a 121 °C en presencia de cloruro sódico al 5-10% o en presencia de aceites, la migración del BPA en las latas aumentó enormemente (> 10 ng/ml) (Kang et al., 2003).

### 2.3.1.2 Migración del BPA de los plásticos

Estudios de laboratorio han demostrado que el BPA biológicamente activo es liberado por las botellas de policarbonato después de un uso normal (Brede et al., 2003; Le et al., 2008). La migración de pequeñas cantidades del BPA a través del uso repetido de los envases de policarbonato tales como biberones, botellas de consumo o jarras pueden contribuir a la exposición oral (Environment Canada, 2008). Se han publicado numerosos estudios sobre la migración del BPA de las botellas de policarbonato bajo diversas condiciones (Mountfort et al., 1997; Takao et al., 1999; Brede et al., 2003; Howdeshell et al., 2003; Miyamoto y Kotake, 2006; Cao y Corriveau, 2008; Ehlert et al., 2008; Le et al., 2008; Maragou et al., 2008).

Los resultados de las investigaciones han demostrado que el BPA puede migrar de los policarbonatos durante la difusión y la hidrólisis de los polímeros. Los resultados publicados por Mercea (2009) mostraron que la disminución del pH de una solución se asoció con un aumento en la migración de BPA de policarbonatos al agua, mientras que la presencia de cationes en una solución a temperatura ambiente no afectó significativamente la hidrólisis de estos.

También se demostró que el BPA emigró más rápido de las botellas de policarbonato (usadas como recipientes de agua), las cuales se reutilizaban durante un periodo amplio de tiempo y estaban expuestas a altas temperaturas. Además, se encontró que la relación entre la migración de BPA de las botellas de policarbonato a otras soluciones variaba dependiendo de



sus propiedades químicas. En mezcla de etanol-agua, se observó una liberación más rápida de BPA (en comparación con agua), mientras que en aceite de aceitunas (que no afectaba a la hidrólisis de PC) se observó una liberación despreciable de BPA. Los resultados obtenidos por Nam et al. (2010) evaluaron la tasa de migración de BPA en biberones de policarbonato para lactantes nuevos y reutilizados. Mostraron que el aumento de la temperatura y el uso de los biberones durante un tiempo particularmente prolongado potenciaron la hidrólisis del polímero, causando una migración más intensa de BPA al agua. Se demostró que el BPA se liberó en biberones nuevos en concentraciones de 0,03 y 0,13 g/dm<sup>3</sup> a 40 y 95°C, respectivamente. Después de 6 meses de uso de los biberones, las concentraciones de BPA en agua aumentaron a niveles de 0,18 g/dm<sup>3</sup> y 18,47 g/dm<sup>3</sup> a 40 y 95°C, respectivamente.

Los altos niveles de migración del BPA de los envases utilizados de policarbonato comparados con envases nuevos, se debe a la degradación del polímero. Los acoplamientos del carbonato son estables, pero el calentamiento y el contacto con compuestos ácidos o básicos acelera la hidrólisis del enlace éster que une las moléculas de BPA en el policarbonato plástico y las resinas epoxi (Vom Saal y Hugues, 2005). El calor, tal como ocurre en la pasteurización, en la esterilización o el calentamiento al microondas, así como el proceso de lavado y cepillado o el almacenamiento de los envases, da lugar a una migración creciente del BPA desde los envases al alimento (Erlar y Novak., 2010).

### 2.3.2 Exposición ocupacional.

La exposición ocupacional al BPA podría ocurrir potencialmente durante su fabricación, en la producción de plásticos de policarbonato, y durante la fabricación o el uso de las resinas epoxi, pinturas o lacas (European Union Risk Assessment, 2003) o por el simple contacto continuado con productos que contienen BPA como el papel térmico (Ndaw et al., 2016). Según la Unión Europea, el BPA generalmente está disponible como gránulos, escamas, o bolitas, reduciendo de esa forma el potencial de exposición. El BPA se fabrica en sistemas cerrados, pero la exposición es posible durante el manejo, el rellenado de los envases y el mantenimiento de la planta. En la fabricación de policarbonato, el BPA entra en la planta y permanece en un sistema cerrado, aunque es posible la exposición al BPA residual a través del polvo ( $\leq 100$  ppm).

La Unión Europea resumió los datos de la exposición ocupacional para el BPA en Europa y en E.E.U.U indicando que las exposiciones al BPA estaban por debajo de  $5 \text{ mg/m}^3$ . Las exposiciones diarias más elevadas fueron observadas en la fabricación del BPA. Hay información limitada sobre la exposición al BPA a corto plazo. En la fabricación del BPA se han publicado exposiciones a corto plazo a partir de  $0,13\text{-}9,5 \text{ mg/m}^3$  (European Union Risk Assessment, 2003).

En un estudio realizado sobre trabajadores de distintas fábricas de BPA de Estados Unidos se detectaron unos niveles de BPA en orina 70 veces superiores a los encontrados en el resto de la población, alcanzando niveles

medios de 88  $\mu\text{g/g}$  siendo los niveles medios encontrados en el resto de la población de 1,27 $\mu\text{g/g}$  (Hines et al., 2017), de lo que se deduce que la exposición directa a BPA multiplica la concentración del mismo en la población.

En relación a la exposición por contacto con el BPA, el principal peligro para la salud son las dermatitis alérgicas de contacto (ACD), a través de un mecanismo aún desconocido (Tarvainen y Kanerva, 1999). La mayoría de las ACD ocurren en trabajadores que tratan con productos basados en el BPA, tales como trabajadores de productos plásticos, expuestos a cintas adhesivas epoxi... (Jolanki et al., 1995; Kanerva et al., 2000, 2002). Los síntomas en la piel por las ACD ocupacionales causadas por el BPA o productos relacionados suelen aparecer en las manos, aunque también en otras áreas de la piel expuestas, tales como las piernas y la cara. La ACD puede ser más severa si la exposición al agente causante es duradera (Jolanki et al., 1995; Tarvainen y Kanerva, 1999; Kanerva et al., 2000, 2002).

## 2.4 EFECTOS DEL BPA

### 2.4.1 Efectos del BPA en la vida salvaje

El motivo de la realización de múltiples estudios en la fauna salvaje, con el objetivo de evaluar el impacto ecológico del BPA en el medioambiente, se debe a que el BPA es liberado en grandes cantidades al medio ambiente durante los distintos procesos de fabricación, manejo y transporte del BPA,

alcanzando niveles de hasta 100 toneladas/año en 2010 (Vanderber et al., 2010).

Debido a la contaminación ambiental, los ríos y los lagos son fuente de exposición importante de BPA, por lo que la mayoría de los estudios del impacto del BPA en la vida salvaje proceden de estudios sobre vertebrados acuáticos, peces en particular y, en menor medida, anfibios, existiendo menos información disponible en reptiles y aves (Canesi y Fabbri, 2015).

Los efectos como disruptor endocrino del BPA identificados en la fauna incluyen (1) la alteración de la determinación del sexo en la exposición durante la organogénesis gonadal, (2) alteración de la función gonadal, durante y después de la organogénesis gonadal, (3) alteraciones en el desarrollo, (4) inducción de la producción hepática de vitelogenina (VTG) (5, 6 y 7) Efectos sobre la función tiroidea, metabolismo, sistema inmunitario y estrés oxidativo (Crain et al., 2007; Canesi y Fabbri., 2015).

#### 2.4.1.1 Determinación del sexo

En animales cuya diferenciación sexual puede verse influenciada por la temperatura (TSD), esta determinación del sexo es particularmente susceptible a diferentes perturbaciones ambientales que puedan ocasionar cambios en la temperatura. Por ello, los contaminantes con potencial disruptor endocrino han influido en la determinación del sexo en especies TSD desde la Revolución Industrial (Crain et al., 1998).

La diferenciación del sexo se puede modificar en distintas especies de peces expuestos a BPA durante el período de desarrollo embrionario asociado a la ontogenia gonadal. Ambientalmente, unos niveles relevantes situados por encima de 500 mg de BPA/kg pueden contribuir a una reversión del sexo (Drastichova et al., 2005).

En estudios realizados sobre peces cebra, se encontraron relaciones anormales en la determinación de sexo (hasta 11 hembras: 1 macho) en individuos alimentados con alimentos que contenían BPA, a una dosis de 2000 mg/kg, dosis que no suele encontrarse a nivel medioambiental, no observándose efectos por debajo de 500 mg de BPA/kg (Drastichova et al., 2005). En un estudio realizado en barbos pescados río abajo de una fuente de contaminación de BPA se observó que tenían una elevada incidencia de intersexualidad (30-50%), mientras que éstos mismos barbos intersexuales no se encontraron corriente abajo en un afluente de este río contaminado (Vigano et al., 2006). Estos peces feminizados presentaban gónadas que contenían sobre todo oogonias primarias y oocitos previtelogénicos, pero también incluían espermatogonias, espermatocitos, y espermátidas.

Los efectos de la BPA a dosis bajas se observaron en el desarrollo de los peces vivíparos, donde la exposición a 7 µg/l de BPA durante 60 días redujo la longitud de la cola (Kwak et al., 2001).

En estudios realizados sobre anfibios se determinó que el tratamiento con 22,8 µg/l de BPA inducía aproximadamente al desarrollo de un 62%-70% de hembras en *Xenopus laevis* en tratamientos de distinta duración (Kloas et al., 1999, Levy et al., 2004). Por el contrario, un tratamiento de 90 días en el rango de 0,81 a 4,971 µg/l de BPA no afectó la proporción de sexo de las ranas (Pickford et al., 2003). La inhibición de la metamorfosis se observó en la rana *Silurana tropicalis* después de 9 días de exposición a 2,3 µg/l de BPA (Kashiwagi et al., 2008).

También existen datos de ejemplos de trastornos sexuales por BPA en reptiles acuáticos, ya que, en algunas especies, el sexo está determinado por la temperatura de la incubación de huevos durante una ventana crítica de desarrollo (Warner y Sine, 2008; Pen et al., 2010).

La exposición del huevo a BPA en los cocodriloideos *Caiman latirostris* a concentraciones de 140 ppm durante el momento crítico de la determinación del género (etapa 20 de la embriogénesis), hizo que todos los cocodrilos descendientes fuesen hembras sin importar la temperatura de incubación. Todos los embriones de caimán expuestos al BPA eran feminizados, presentando ovarios aparentemente normales (Stoker et al., 2003).

Otros investigadores como Durando et al. (2013) indicaron que después de la exposición *in ovo* a concentraciones más bajas de BPA (aproximadamente 90 µg/huevo) a 33 °C, todos los individuos incubados eran

machos; sin embargo, sus testículos mostraron túbulos seminíferos interrumpidos.

En un estudio realizado en aves expuestas a BPA, se observaron concentraciones de 200 ppm de BPA en la yema de huevo, que provocaron anomalías en el conducto de Müller en codornices hembras, mientras que la misma concentración en la yema de huevo causó feminización del testículo izquierdo en embriones de pollo machos (Berg et al., 2001).

#### 2.4.1.2 Alteración de la función gonadal y características sexuales secundarias

Considerando que altas concentraciones de BPA causan una determinación anormal del sexo en algunos peces, anfibios, reptiles y pájaros, concentraciones más bajas causan alteraciones en la función gonadal en un variado número de vertebrados. Por ejemplo, concentraciones de BPA encontradas comúnmente en el medioambiente, tienen el potencial para alterar la estructura y la función testicular en los peces. Existen varios informes que apoyan la capacidad del BPA para afectar la funcionalidad de las gónadas a concentraciones ambientalmente relevantes ( $<12 \mu\text{g} / \text{L}$ ). Una exposición de alrededor de  $1 \mu\text{g}/\text{l}$  de BPA mostró una menor densidad espermática y movilidad en la trucha marrón (*Salmo trutta*) (Lahnsteiner et al., 2005) y una reducción en la producción de espermatozoides con un incremento del número de espermatozoides inmaduros en fathead minnow (*Pimephales promelas*) (Sohoni et al., 2001). De forma semejante, el

recuento de espermatozoides se redujo perceptiblemente en guppies (*Poecilia reticulata*) machos expuestos a 274 µg/l de BPA durante 21 días, aunque la cantidad de esperma no se vio afectada (Haubruge et al., 2000).

En un estudio en el que se expuso durante tres meses a peces a 2 y 5 µg/l de BPA se observó una ovulación retardada y anovulación, respectivamente (Lahnsteiner et al., 2005). En el ensayo realizado por Lora et al. (2013) observaron un incremento de atresia folicular a medida que se incrementó la concentración de exposición al BPA acompañado de una activación de las células gonadotropas hipofisarias, con un aumento de gránulos de secreción, mientras que en los grupos sometidos a dosis más altas estas células mostraron signos de degeneración apareciendo células de castración.

En la carpa (*C. carpio*), una exposición de 2 semanas a 1 µg/l causó alteraciones en la estructura de la gónada masculina y ovocitos atrésicos en las hembras (Mandich et al., 2007).

Lora et al. (2016) observaron distintas alteraciones en los testículos de peces cebras expuestos a distintas concentraciones de BPA, que incluyeron una importante degeneración en todos los componentes celulares, un aumento de las células de Sertoli, así como una disminución marcada en el porcentaje de células germinales en los animales expuestos a concentraciones más altas.



Los cambios en la actividad endocrina de las gónadas se atribuyen a la reducción de las hormonas sexuales en el plasma después de una exposición de los peces al BPA. Mandich et al. (2007) en su estudio utilizó carpas las cuales fueron expuestas a diferentes concentraciones de BPA (1, 10, 100 y 1000 µg/l). En las carpas macho el BPA causó severas alteraciones de los testículos desde la concentración más baja, con pérdida de la típica estructura lobular, con espermatozoides libres degenerados dentro de la luz de los conductos espermatogénicos. En las hembras se pudo ver atresia de oocitos desde la concentración de 1 µg/l, llegando a estar presente en el 57,1% de las hembras en la concentración de 1000 µg/l. A esta misma concentración, el 27% de las hembras mostraron intersexualidad, de igual modo, la exposición a 1 - 10 µg/l de BPA redujo fuertemente los niveles plasmáticos de E2 en los machos, que volvieron a los niveles basales a 100 µg/l y aumentaron a 1000 µg/l. Por el contrario, los niveles plasmáticos de testosterona se incrementaron con respecto a los controles a 1 µg/l y se redujeron a mayores concentraciones. En las hembras, se observó una fuerte disminución de los niveles plasmáticos de E2 entre 1 y 100 µg/l, seguido de una recuperación a 1000 µg/l. En cambio, los niveles de testosterona aumentaron a 1 µg/l y disminuyeron a 100 y 1000 µg/l (Mandich et al., 2007).

En el estudio realizado por Molina et al. (2013), después de una exposición de 14 días a 10, 100 y 1000 µg/l de BPA, las gónadas de pez cebra tenían un aspecto externo normal; Sin embargo, se indujeron alteraciones múltiples en los ovarios con degeneración de los componentes celulares y un aumento significativo en los folículos atrésicos a 100 y 1000

µg/l de BPA (Molina et al., 2013). Estos datos se corresponden con los obtenidos por Mandich et al. (2007) y ponen de relieve que una exposición a BPA durante 2 semanas puede ser suficiente para afectar la función gonadal en el pez cebra, aunque las concentraciones activas están por encima de los niveles ambientales promedio.

#### 2.4.1.3 Alteraciones en el desarrollo

La exposición aguda de los huevos de trucha arco iris a 30 y 100 µg/l de BPA durante 3 horas antes de la fecundación, para imitar la acumulación del compuesto por transferencia materna, no modificó la tasa de fertilización, pero retrasó la eclosión, reabsorción de yema, crecimiento de larvas y el momento de la primera ingesta en las larvas de aproximadamente 7 días en comparación con los controles (Aluru et al., 2010). Se detectaron cantidades de 32 y 420 ng de BPA/oozito después de una exposición de 3 días y se redujeron al menos en un 90% después de 13 días tras la fertilización. Aunque el BPA fue eliminado de los embriones dentro de los 31 días posteriores a la fertilización, la supresión del crecimiento persistió en los peces juveniles. Por otra parte, los adultos desarrollados a partir de óvulos expuestos a BPA mostraron un perfil alterado de cortisol y glucosa en plasma en respuesta a los factores estresantes, lo que sugiere la disrupción del eje hipotálamo-hipófisis-interrenal y las disfunciones metabólicas durante la embriogénesis temprana (Aluru et al., 2010).

En un estudio realizado en anfibios se observó como el BPA mostró efectos severos en la metamorfosis de los mismos. El tiempo de desarrollo se retrasó, y la longitud corporal y el peso se redujeron en renacuajos de *Rana chensinensis*, continuamente expuestos a 10  $\mu\text{mol/l}$  de BPA hasta la metamorfosis. En otros ensayos realizados en *Rhinella arenarum* expuestos a BPA en el intervalo de 1,25 y 40  $\text{ml/l}$ , se observó un desarrollo retardado o detenido, un tamaño corporal reducido, un tapón de yema persistente, microcefalia, branquias subdesarrolladas, malformaciones de boca (Wolkowicz et al., 2014).

#### 2.4.1.4 Producción de Vitelogenina (VTG)

La VTG es una proteína precursora de la formación del huevo y es común para todas las hembras ovíparas vertebradas. Esta fosfoglicoproteína es producida por el hígado en respuesta a estrógenos circulantes y liberada a la sangre.

La producción de VTG normalmente se restringe a las hembras maduras, y en muy pocos casos se detecta en machos o hembras sexualmente inmaduras. Sin embargo, la exposición a compuestos estrogénicos puede desencadenar su expresión en machos, ya que llevan el gen VTG (Sumpter y Jobling, 1995). Para fines de monitoreo, la VTG puede medirse en el hígado, la sangre y el moco de peces machos y hembras, así como en cultivos de hepatocitos primarios (Navas y Segner, 2006). La

presencia de VTG en la sangre ha sido usada ampliamente como biomarcador para la exposición a tóxicos estrogénicos (Crain et al., 2007).

## PECES

Numerosos estudios han demostrado que peces machos capturados río abajo de depuradoras de aguas residuales tenían elevadas concentraciones de VTG en el suero (Folmar et al., 1996; Vermeirssen et al., 2005; Bjerregaard et al., 2006). Estas elevaciones no sólo se atribuyen al BPA sino también a otros compuestos como el etinilestradiol y nonilfenol presentes en los efluentes de estas aguas residuales. Son numerosos los estudios en los que se ha evaluado como el BPA induce la síntesis de VTG en múltiples especies de peces y anfibios en concentraciones que oscilaban entre 10 y 2000 µg/l (Kloas et al., 1999; Arukwe et al., 2000; Sohoni et al., 2001; Gye y Kim, 2005; Hatef et al., 2012).

Varias especies de peces (fathead minnow, medaka, trucha arco iris y pez cebra) se han expuesto solamente al BPA en condiciones controladas de laboratorio encontrándose un incremento de las cantidades de VTG, aunque a concentraciones mayores que las medidas en las aguas superficiales. En un estudio con carpas, se observó un incremento significativo de las concentraciones de VTG plasmáticas en las hembras a dosis de 1000 µg/l. Además, a dosis ambientales de BPA de 1 y 10 µg/l, un creciente número de machos mostraron sensibilidad a la VTG (Mandich et al., 2007).

En otro estudio, se expusieron peces cebra y trucha arco iris a dosis de 40, 200 y 1000  $\mu\text{g/l}$  de BPA, encontrando un incremento significativo de las concentraciones de VTG plasmática en respuesta a la exposición a 1000  $\mu\text{g/l}$  de BPA (Van den Belt et al., 2003). Las curvas dosis-respuesta de BPA sobre la expresión de VTG están disponibles para feathered minnow (*Pimephales promelas*) y el pez cebra (Villeneuve et al., 2012). Los peces fueron expuestos a niveles de BPA de 0, 0,01, 0,1, 1, 10, o 100  $\mu\text{g/l}$  durante 96 horas, y en todos los casos aumentó significativamente las concentraciones de VTG en plasma tanto en machos como en hembras. Además, las concentraciones de E2 disminuyeron significativamente en el plasma de las hembras, mientras que los niveles de testosterona circulantes se redujeron significativamente en los machos, de forma consistente, con una respuesta de retroalimentación negativa a una señal estrogénica creciente. El pez cebra parecía menos sensible a la BPA, y los aumentos de VTG se observaron sólo en los machos (a 10 y 100  $\mu\text{g/l}$  de BPA), aunque en menor medida que los feathered minnow (Villeneuve et al., 2012).

## INVERTEBRADOS

Los moluscos son usados generalmente como centinelas de ambientes acuáticos y pueden ser organismos sensibles al BPA debido a un incremento de su exposición (inmovilidad y alimentación por filtrado). Mejillones azules de agua dulce (*Mytilus edulis*) hembras, expuestos a 50  $\mu\text{g/l}$

de BPA durante 3 semanas mostraron elevados niveles de VTG (Aarab et al., 2006).

#### 2.4.1.5 Efectos sobre la función tiroidea

Se realizaron análisis de transcriptoma de genes regulados por TH en peces cebra durante la etapa eleuteroembrionaria (días 2-5 postfertilización) para detectar posibles marcadores de alteración tiroidea. El BPA (0,1, 0,4, 1, 2 y 4 mg/l) actúa como un agonista T3 débil cuando se prueba solo, pero aumenta fuertemente el efecto de las concentraciones subsaturadas de T3, con efectos a 2 y 4 mg/l (Pelayo et al., 2012), a pesar de que no impide la capacidad de los folículos tiroideos para sintetizar tiroxina. La exposición a 200 µg/l de BPA aceleró el desarrollo embrionario temprano dentro de las 24 horas de exposición, atenuó el crecimiento corporal y avanzó los tiempos de eclosión y maduración reproductiva en el medaka (Ramakrishnan y Wayne, 2008). La aceleración del desarrollo embrionario y el tiempo de incubación fueron bloqueados por el antagonista del receptor de la hormona tiroidea amiodarona, lo que sugiere que el BPA altera el desarrollo global, también a través de una vía hormonal tiroidea.

#### 2.4.1.6 Efectos sobre el metabolismo

Se han obtenido algunas pruebas de los efectos obesogénicos del BPA también en los vertebrados inferiores. La exposición del embrión de pez cebra a BPA induce la acumulación de lípidos inducida, así como el aumento

de peso de inicio tardío en el pez cebra juvenil (Riu et al., 2014). Recientemente, se ha desarrollado en larvas de pez cebra una prueba de laboratorio para examinar los efectos potenciales de los obesógenos a través de la dieta y la exposición a contaminantes ambientales (Tingaud-Sequeira et al., 2011).

#### 2.4.1.7 Efectos sobre la función inmunitaria y estrés oxidativo

Además de ser un disruptor endocrino, el BPA aumentó la proliferación de linfocitos a concentraciones de 5 µg/l a 50 mg/l en peces de colores acuícolas, (*Carassius auratus*). A dosis más altas (500-1000 mg/l), inhibió la proliferación de macrófagos (Yin et al., 2007). En perca amarilla, una exposición de BPA de 7 días a concentraciones ambientalmente relevantes (2-8 µg/l) aumentó significativamente los recuentos de leucocitos (Rogers y Mirza, 2013). A corto plazo, tal respuesta inmunoestimuladora puede ser beneficiosa; sin embargo, se necesitan más estudios para establecer sus posibles consecuencias a largo plazo.

Por otro lado, las concentraciones de BPA que se pueden encontrar en la naturaleza son capaces de inducir el estrés oxidativo, lo que conduce a la calidad del esperma deteriorado y la fragmentación del ADN en los peces. Se observaron niveles más altos de oxidación de proteínas y lípidos y actividad de superóxido dismutasa en espermatozoides de sterlet (*Acipenser ruthenus*) después de exposición a BPA a concentraciones de 1,75 a 10 µg/l durante 2 horas, reflejando estrés oxidativo (Hulak et al., 2013). En general,

los datos disponibles proporcionan pruebas convincentes de que el BPA afecta a la homeostasis fisiológica de los vertebrados acuáticos, también a concentraciones ambientales ( $\leq 12 \mu\text{g/l}$ ).

## 2.4.2 Efectos sobre la salud humana

Debido al amplio uso industrial de BPA y a la posibilidad demostrada de entrada en nuestro organismo por distintas vías, se han descrito efectos a distintos niveles orgánicos en seres humanos (Konieczna et al., 2015). Entre los efectos descritos destacamos, (1) efectos sobre la reproducción, (2) efectos sobre el páncreas endocrino, (3) efectos sobre el sistema inmune, (4) acción sobre la hormona tiroidea y (5) efectos sobre el tejido adiposo, entre otros.

### 2.4.2.1 Efectos sobre la reproducción humana

Debido a su estructura fenólica, se ha demostrado que el BPA interacciona con los receptores estrogénicos para actuar como agonista o antagonista en las vías de señalización endocrina dependientes de receptores. Por tanto, se ha demostrado que el BPA juega un papel importante en la patogénesis de diversos desórdenes endocrinos relacionados con la reproducción como son la infertilidad femenina y masculina, la pubertad precoz, la aparición de tumores hormonalmente dependientes como el cáncer de mama y de próstata y con distintos



desórdenes metabólicos incluyendo el síndrome de ovario poliquístico (Konieczna et al., 2015)

El BPA ha sido implicado junto con otros disruptores endocrinos por numerosos estudios en una disminución de la fertilidad en las hembras, y actualmente se estudia en profundidad el papel de los estrógenos sobre el desarrollo de los oocitos, por ser un tema de considerable interés para los investigadores.

Las células de la teca en su última fase folicular expresan ambos receptores tanto el ER $\alpha$  como el ER $\beta$ , mientras que las células de la granulosa expresan predominantemente el ER $\beta$ . En consecuencia, el BPA tiene potencial para afectar tanto a las células de la teca como a las células de la granulosa, sin embargo, el grado de impacto y la afinidad sobre estas células ováricas es desconocido (Routledge et al., 2000; Matthews et al., 2001).

El impacto del BPA, a dosis tan bajas como 0,1 nM sobre las células granulomatosas en el ovario de ratón fue investigado por Xu et al. (2002) quienes encontraron a estas dosis tan bajas, una disminución de la viabilidad de las células de la granulosa por apoptosis, sugiriendo que éstas células son altamente sensibles al BPA. En un estudio *in vivo* se encontró que la exposición crónica a bajas dosis de BPA causó aneuploidía meiótica en oocitos de ratones, lo que implica al BPA en la disrupción de la meiosis en las hembras (Hunt et al., 2003).

La exposición en mujeres embarazadas es una preocupación debido a la posibilidad de bioacumulación en los fetos y en períodos sensibles específicos durante el desarrollo embrionario (Lee et al., 2003; Sun et al., 2004; Wetherill et al., 2007, Gerona et al., 2016). Diversos estudios han demostrado que las mujeres embarazadas están expuestas posiblemente a niveles más altos de BPA que la población en general (Lee et al., 2003; Kruger et al., 2008). También se conoce que el BPA atraviesa la placenta, según lo evidenciado por su presencia en el tejido placentario y líquido amniótico (Wetherill et al., 2007). Además, un estudio reciente en células placentarias expuso los múltiples efectos deletéreos demostrados por el BPA en varios resultados adversos de embarazo tales como preeclampsia, niños prematuros y pérdida del embarazo lo que podría ayudar a explicar abortos involuntarios de etiología desconocida (Benachour y Aris, 2009).

En cuanto a animales de laboratorio, en ratones hembra se produjo un incremento en la mortalidad de los embriones tras exponer a las madres a dosis de 25  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  (Al Hiyasat et al., 2004). La exposición fetal con BPA a través de la madre resultó en un comienzo temprano del desarrollo en la maduración de ratones hembras a 2,4-20  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  (Howdeshell et al., 1999; Honma et al., 2002).

La exposición a BPA durante la gestación y la lactación causa la aparición de unos niveles reducidos de testosterona y de hormona folículo estimulante (FSH) y una elevación de los estrógenos en la descendencia

adulta, así como disrupción del ciclo estral en las ratas y los ratones adultos por lesiones ováricas a dosis de entre 50 y 2500 µg/kg/día (Talsness et al., 2000; Nikaido et al., 2004; Ma et al., 2017). Además, altera los niveles de la hormona luteinizante (LH) a dosis de 2 µg/kg/día (Akingbemi et al., 2004).

Ejemplos de efectos causados sobre las células y los tejidos reproductivos masculinos por exposición a bajas dosis de BPA en ratas y ratones, son una significativa disminución en la producción diaria de esperma y en la fertilidad en machos a dosis de entre 0,2 y 20 µg/kg/día (vom Saal et al., 1998; Sakaue et al., 2001; Al Hiyasat et al., 2002; Chitra et al., 2003). Estudios sobre las células de Leydig en adultos, demostraron que bajas dosis de BPA (0,01 nM) disminuyen la síntesis de testosterona en un 25% como resultado de una disminución en la expresión de la enzima esteroideogénica 17α-monooxigenasa (Kawai et al., 2003; Akingbemi et al., 2004). Estos hallazgos demuestran que el periodo perinatal es una ventana de sensibilidad para la exposición al BPA en este sistema animal (Wetherill et al., 2007).

#### 2.4.2.2 Efectos sobre el páncreas endocrino

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó en el informe del año 2014 que más de 422 millones de personas en el mundo padecen diabetes mellitus, con una prevalencia mundial de 8,5% en población adulta, habiéndose duplicado estos datos desde el año 1980. La diabetes tipo 2 comprende el 90% de la gente afectada, y se estima que la diabetes es responsable de 1,5 millones de muertes al año. Las causas parecen

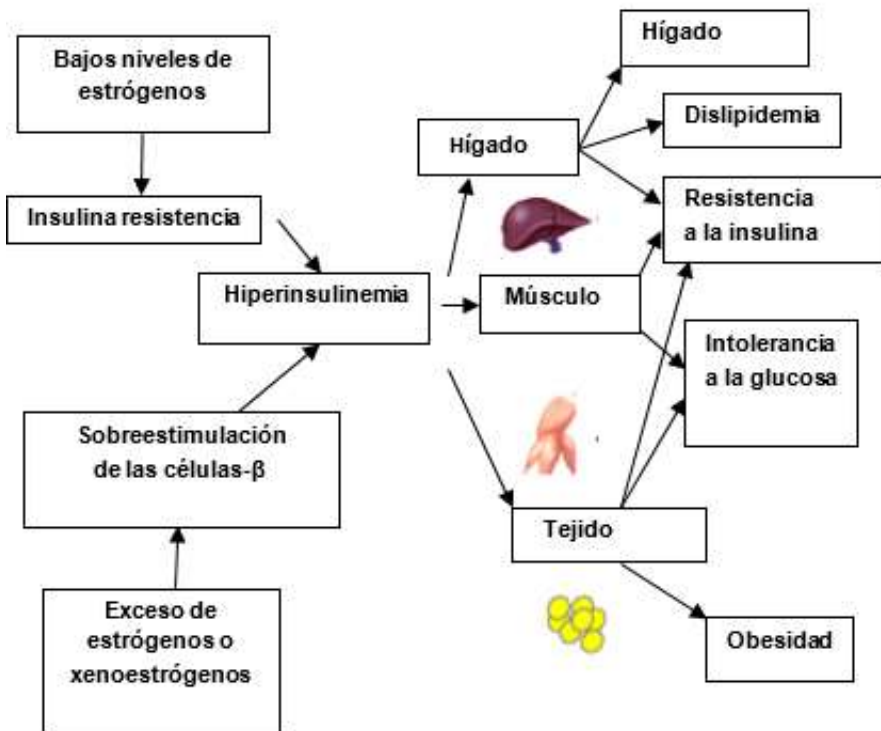
misteriosas, aunque la predisposición genética, la obesidad, la dieta, la falta de ejercicio y una población envejecida están entre las principales causas consideradas ([www.diabetes.org](http://www.diabetes.org)). La diabetes tipo 2 ocurre tras un periodo prolongado de resistencia a la insulina, caracterizada por una disminución de la acción de la insulina en tejidos periféricos. También es la principal causa del síndrome metabólico caracterizado por obesidad visceral, dislipidemia, hiperglicemia e hipertensión (Biddinger y Kahn, 2006).

El BPA afecta drásticamente las funciones de los islotes de Langerhans, la unidad fisiológica del páncreas endocrino. Cada islote contiene entre 1.000 y 3.000 células de cinco tipos, las más abundantes son las células  $\beta$ , que sintetizan y liberan la insulina y las células  $\alpha$  que sintetizan y secretan el glucagón (Brissova et al., 2005; Cabrera et al., 2006).

En estudios sobre ratones se demostró que el BPA y el estradiol tienen la misma potencia y eficacia, además ambos inhiben la liberación de adiponectina de los adipocitos humanos a 1 nM, más allá de una implicación adicional del BPA en la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico en humanos a niveles actuales de exposición (Hugo et al., 2008; vom Saal y Myers, 2008). Las concentraciones a las cuales el BPA afecta a las células  $\alpha$  y  $\beta$  están dentro del rango de BPA detectado en el suero humano (0,9-8,8 nM) (Takeuchi y Tsutsumi, 2002). Weldingh et al. (2017) demostraron que exposiciones de entre 5 y 500 nM de BPA en exposiciones de 72 horas provocaban una disminución significativa de las células  $\beta$ , así como, un incremento de la secreción de insulina tras 2 horas de exposición. El

tratamiento en ratones machos adultos durante 4 días con dosis diarias de 100 µg/kg/día alteró el contenido y la secreción de la insulina pancreática, provocando hiperinsulinemia postprandial y resistencia a la insulina en ratones machos (Alonso-Magdalena et al., 2006).

Un exceso en la acción ER $\alpha$  mediada por un estrógeno como el BPA provocaría un aumento en el contenido y secreción de las células  $\beta$  pancreáticas *in vivo* e *in vitro*, sobreestimulando a las células  $\beta$  (Fig. 4). Una excesiva señal de insulina en el hígado o el endotelio produce dislipidemia, y en el tejido graso produce obesidad, intolerancia a la glucosa y dislipidemia (Biddinger y Kahn, 2006). Además, una excesiva señal de insulina puede provocar resistencia a la insulina en el hígado y el músculo (Ueno et al., 2005), así como, un agotamiento de las células  $\beta$  y de esa forma contribuir al desarrollo de diabetes tipo 2 (Nadal et al., 2009). Es por tanto que los efectos del BPA sobre el páncreas endocrino, tanto a nivel de las células  $\beta$ -pancreáticas como sobre los niveles de insulina, presentan una repercusión importante, no sólo sobre el páncreas endocrino, sino a distintos niveles orgánicos (Fig. 4).



**Figura 4. Excesiva señal de insulina en diferentes tejidos.**

Estimulación del ER $\alpha$  por exposición al BPA en presencia de glucosa, sobreestimulando las células  $\beta$ , induciendo hiperinsulinemia postprandial, intolerancia a la glucosa e insulina resistencia. La hiperinsulinemia generada por el exceso o la ausencia de señal ER $\alpha$  puede producir dislipidemia y obesidad cuando afecta a las células grasas y hepáticas (Nadal et al., 2009).

Se ha demostrado que la diabetes tipo 2 solamente se desarrolla en sujetos insulina resistentes con inicio de disfunción de las células  $\beta$ . En seres humanos adultos, sin embargo, existe evidencia epidemiológica de que el BPA actúa como un importante factor de riesgo dentro del desarrollo de la diabetes tipo 2 (Lang et al., 2008). Además, hay nexos causales entre la exposición al BPA y la resistencia a la insulina (Alonso-Magdalena et al.,

2006), alteración de la biosíntesis de la insulina y secreción de las células  $\beta$  en ratones macho adultos (Alonso-Magdalena et al., 2008) y disminución de la adiponectina de los adipocitos humanos (Hugo et al., 2008).

Aunque dos de las causas principales de fallo en las células  $\beta$  en la diabetes tipo 2 son la sobrenutrición y la carencia de ejercicio, los estrógenos ambientales, en particular el BPA, son fuertes candidatos a exacerbar y acelerar el desarrollo de la diabetes tipo 2 (Nadal et al., 2009).

#### 2.4.2.3 Acción sobre la hormona tiroidea

La hormona tiroidea (TH) es esencial para el desarrollo normal del cerebro tanto en seres humanos como en animales (Dussault y Ruel, 1987). Existe una cierta evidencia de que el BPA se une a los receptores de la hormona del tiroides (TR), actuando como antagonista de la activación de la triyodotironina (T3) (Moriyama et al., 2002). Además, se encontró que la exposición al BPA en ratas produce un perfil endocrino similar al que se observa en el síndrome de resistencia a la hormona tiroidea (Cheng, 2005).

Estudios *in vivo* que examinaban los efectos del BPA sobre la hormona del tiroides han sido llevados a cabo en ratas expuestas a 1, 10, o 50 mg/kg de peso vivo, en ratas perinatales (Zoeller et al., 2005), observando en el día 15 posterior al nacimiento una sobre regulación de los niveles del gen responsable de la hormona tiroidea en el cerebro. Meerts et al. (2001) demostraron que los compuestos polibrominados del BPA tienen actividad

estrogénica, demostrando que los derivados brominados actúan como TR agonistas en las células GH3 de la pituitaria, Lee et al. (2017) determinó efectos de baja regulación en células GH3 de pituitaria de rata causados por el BPA y análogos del mismo como el bisfenol S (BPS).

#### 2.4.2.4 Efectos sobre el sistema inmune

Se conoce bien que los estrógenos juegan un papel fundamental en el sistema inmune, distintos hallazgos demuestran que el BPA es capaz de influenciar las funciones del sistema inmune (Holdstock et al., 1982, Rogers et al., 2013, Gostner et al., 2014). Por otro lado, las enfermedades alérgicas tales como el asma bronquial y la dermatitis atópica han crecido marcadamente durante las últimas décadas en los países desarrollados (Burr et al., 1989; Bjorksten, 1999; von Mutius, 2000). Revisando todos los datos disponibles se ha sugerido que los factores ambientales contribuyen a este aumento observado en las enfermedades alérgicas (Fujimaki et al., 1994; Takano et al., 1997; Nel et al., 1998). También se ha observado que enfermedades autoinmunes tales como la púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), el lupus eritematoso sistémico (SLE), la dermatomiositis y la escleroderma han aumentado de forma alarmante durante varias décadas (Yurino et al., 2004). Al mismo tiempo, ha existido un aumento de la atención científica y social en productos químicos que podemos encontrar en el medioambiente y que pueden ser incorporados a nuestro organismo por ingestión o absorción, mimetizando las acciones de los estrógenos, siendo uno de estos productos químicos el BPA.



También se han examinado los efectos del BPA sobre la producción de interleukina-4 (IL-4), una citoquina proinflamatoria muy asociada a la respuesta alérgica inmune, llegando a la conclusión de que el BPA aumenta la producción de varias citoquinas, incluyendo la IL-4 (Lee et al., 2003; Tian et al., 2003).

#### 2.4.2.5 Efectos sobre el tejido adiposo

La incidencia de la obesidad ha crecido notablemente en las últimas décadas, aunque se ha considerado como principales causas una alta dieta calórica y un estilo de vida sedentaria, el rol de los factores medioambientales está ganando crédito (Hugo et al., 2008).

La adiponectina es una hormona específica de los adipocitos que incrementa la oxidación de ácidos grasos y el metabolismo de la glucosa en el músculo, reduce la salida de glucosa y aumenta la sensibilidad a la insulina en el hígado, también tiene funciones protectoras contra el síndrome metabólico (Kadowaki et al., 2006) el cual incluye obesidad abdominal, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia e hipertensión y es asociado con un aumento en el riesgo de diabetes y enfermedades cardiovasculares (Ritchie y Connel, 2007). La disponibilidad de la adiponectina es controlada a 3 niveles: biosíntesis, ensamblaje y liberación (Trujillo y Sherer, 2005). La síntesis es estimulada por el agonista PPAR $\gamma$ , la insulina y el IGF-1 e inhibido por el TNF $\alpha$  y las catecolaminas (Lihn et al., 2005). El BPA podría suprimir la

adiponectina por un antagonismo del PPAR $\gamma$  (Wright et al., 2000; Knouff y Auwerx, 2004).

La formación correcta de enlaces disulfuro es crítica para el ensamblaje y retención de adiponectina (Trujillo y Scherer, 2005). La formación del enlace disulfuro dentro del retículo endoplásmico es catalizado por oxirreductasas, de las cuales la proteína disulfuroisomerasa (PDI) juega un papel crítico (Tsao et al., 2003; Wang et al., 2007). Puesto que se publicó que el BPA se unía a la PDI inhibiendo su actividad enzimática, éste podría representar otro mecanismo por el cual el BPA inhibe a la adiponectina (Ben-Jonathan et al., 2009).

#### 2.4.2.6 Otros efectos

El BPA provoca otros efectos a diferentes niveles, como cambios en los receptores de somatostatina del cerebro a dosis muy bajas de 400  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  (Facciolo et al., 2002), efectos comportamentales que incluyen hiperactividad a 30  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  (Ishido et al., 2004), un incremento en la agresividad a 2-40  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  (Farabollini et al., 2002; Kawai et al., 2003) una alterada reacción al dolor a 40  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  (Aloisi et al., 2002), una alteración del aprendizaje a 100  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  (Negishi et al., 2004). De manera importante, Lang et al. (2008) en su estudio, relacionaron altas concentraciones de BPA en la orina de humanos con un incremento en la prevalencia de enfermedades coronarias.

Seiwa et al. (2004) demostraron que el BPA bloquea el desarrollo de la T3 inducida por las células precursoras oligodendrocíticas (OPCs). Además, puede haber una asociación entre el síndrome de resistencia a la hormona tiroidea y el síndrome de atención dispersa e hiperactividad (ADHD) en los seres humanos (Vermiglio et al., 2004; Siesser et al., 2005) y en las ratas (Siesser et al., 2005), por lo tanto, es potencialmente importante que las ratas expuestas al BPA mostraran síntomas parecidos a los del ADHD (Ishido et al., 2004).

La exposición al BPA también altera la histogénesis neocortical en el ratón, siendo posible que el BPA altere el desarrollo temprano de la corteza interfiriendo con la señalización de la hormona tiroidea (Nakamura et al., 2006).

## 2.5 EL USO DEL PEZ CEBRA COMO ORGANISMO MODELO.

El uso de peces como modelos animales en experimentación tiene sus inicios en el campo de la toxicología acuática, los primeros ensayos de toxicidad aguda datan de 1863, pero es a partir de 1940 cuando asciende considerablemente el número de trabajos experimentales con peces como resultado de la creciente utilización de plaguicidas. En los años 60, además de establecerse las dosis letales en experimentos de toxicidad aguda, se utilizan los peces en ensayos crónicos con la finalidad de determinar los efectos genotóxicos, patológicos, comportamentales, u otros de

determinados xenobióticos (Ostrander, 2000; De Jesus et al., 2016; Sapone et al., 2016). Es a partir de la década de los 90, con el impulso de los principios establecidos internacionalmente de reemplazo, reducción y refinamiento, cuando la elección de los métodos experimentales sigue la estricta jerarquía del requisito de utilizar procedimientos alternativos, recurriendo al uso de métodos *in vitro* u otros métodos que puedan evitar y optimizar la utilización de animales, o cuando no haya un método alternativo reconocido por la legislación de la Unión, reduciendo el número de animales utilizados, y siempre recurriendo a especies lo más alejadas posible al ser humano (Ostrander, 2000; Giráldez, 2001). Bajo estas premisas, la utilización de los peces como modelo experimental se generaliza en la investigación biomédica, (fisiología, genética, reproducción, patología, nutrición, etc.), llegando en la actualidad, a utilizarse en la mayoría de laboratorios dedicados a la biología del desarrollo y expresión génica, destacando también su empleo como centinelas o bioindicadores medioambientales (De Jesus et al., 2016; Sapone et al., 2016).

Son muchas las especies de peces empleadas en experimentación, tradicionalmente las líneas de investigación más conocidas son las referidas a la mejora genética de especies que pueden acuicultivarse (carpa (*Cyprinus carpio*), trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*), salmón (*Salmo salar*), rodaballo (*Psetta maxima*), etc.), destinadas a la alimentación humana o a estudios medioambientales y toxicológicos. Asimismo, las especies de agua dulce medaka (*Oryzias latipes*), y en particular el pez cebra (*Danio rerio*), ambos ovíparos, son los más utilizados en estudios de carcinogénesis,

desarrollo embrionario y biología del desarrollo (Karlsson et al., 2001; Briggs, 2002). Otros peces utilizados como modelos biomédicos son los vivíparos de la familia Poeciliidae (guppy (*Poecilia reticulata*) y platy (*Xiphophorus maculatus*) (Lele y Krone., 1996).

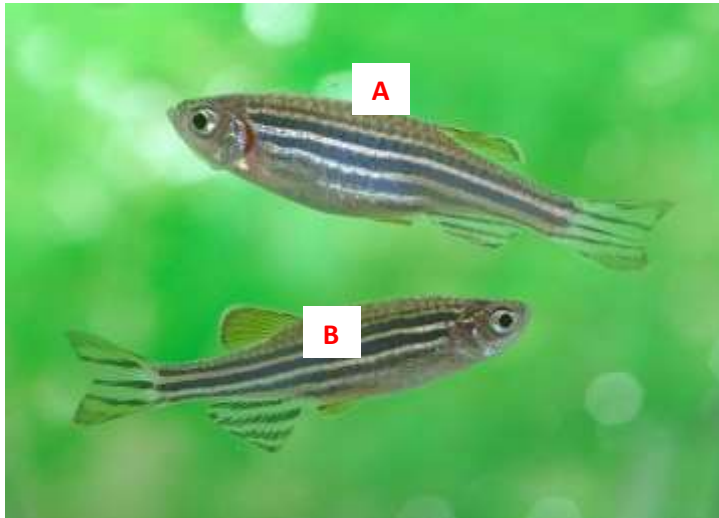
### 2.5.1 El pez cebra (*Danio rerio*)

El pez cebra fue incorporado a la Directiva 2010/63/UE, en su Anexo I, en el listado de animales empleados en procedimientos experimentales y su utilización está cada vez más extendida en el campo de la experimentación animal.

Pertenece al género *Danio* (Fam. Cyprinidae), y es un pez tropical de agua dulce originario del sudeste asiático (Westerfield, 2000). Es de pequeño tamaño (4 - 6 cm de longitud y 2 - 3 g de peso). Presentan un color de fondo dorado o plateado, con cinco bandas longitudinales que comienzan detrás del opérculo y llegan hasta el extremo de la aleta caudal, confiriéndole un aspecto cebrado al que debe su nombre común. La aleta anal también está rayada, no así la dorsal. La vida media de estos animales es de 2 a 3 años (Moody, 1999; Williams et al., 2009; Pelkowski et al., 2011).

Presentan dimorfismo sexual, siendo la hembra más robusta que el macho, con el vientre más voluminoso y de color plateado. El macho es más estilizado y su vientre presenta una tonalidad más amarillenta (Fig. 5). Cuando la hembra está cargada de huevos se hacen más evidentes estas

diferencias fenotípicas (Wixon, 2000). Generalmente, los peces cebras prefieren las aguas en calma o con bajo movimiento, ligeramente alcalinas (pH≈ 8.0) (McClure et al., 2006; Spence et al., 2006).



**Figura 5.- Diferencias fenotípicas asociadas al sexo en el pez cebrá.**

La hembra (A) es de mayor tamaño que el macho, posee un abdomen más abultado y redondeado y carece de un tinte rojizo a lo largo de las líneas longitudinales plateadas. El pez cebrá macho (B) es más esbelto, por lo general superior en longitud a la hembra y posee un tinte rojizo a lo largo de las líneas longitudinales plateadas del cuerpo.

Se trata de un organismo modelo que ofrece numerosas ventajas técnicas y prácticas para estudiar los principales procesos biológicos, así como sus efectos y sus mecanismos (Nüsslein-Volhard y Dahm, 2002). Su pequeño tamaño permite un elevado número de animales en espacios reducidos. Es un animal de fácil mantenimiento y reproducción en las condiciones de laboratorio, su tiempo de generación es relativamente corto

(3 - 4 meses), pudiéndose obtener semanalmente alrededor de cien embriones por pareja, lo que permite desarrollar procedimientos a gran escala con solidez estadística. Además, los descendientes pueden ser producidos continuamente y en número elevado, puesto que bajo condiciones laboratoriales, el pez cebra se reproduce durante todo el año (Spence et al., 2007; Williams et al., 2009; Pelkowski et al., 2011).

La fecundación es externa, por lo que se tiene acceso a los embriones desde el estadio de una célula, pudiéndose observar el desarrollo embrionario sin manipular ni sacrificar a sus progenitores (Segner, 2009). Además, en una misma puesta todos los embriones se desarrollan sincrónicamente. Éstos son relativamente grandes y transparentes durante las primeras 24 h de desarrollo, lo que permite que pueda ser observado fácilmente a través del corion sin necesidad de manipulación. El desarrollo de este organismo es rápido y a las 24 h ya se aprecia la segmentación del cerebro y se han formado estructuras como el tubo neural, la notocorda y los somitas, además de ser visibles los eritrocitos (Wixon, 2000). A las 24 - 36 h post fecundación, los embriones miden unos 2,5 mm. A los cinco días de desarrollo se han formado algunos órganos sensoriales como los ojos y los oídos, asimismo, se observan el corazón, el hígado, los riñones y el páncreas, además de comenzar a ser funcionales los sistemas circulatorio, digestivo y nervioso (Kimmel et al., 1995; Segner, 2009). Alcanzan la madurez sexual a los 3 ó 4 meses de vida. En contraste con otros organismos modelo, los cuales pueden ser triploides o tetraploides, dificultando el análisis genético, el pez cebra mantiene el estado diploide (Wixon, 2000; Williams et al., 2009; Pelkowski et

al., 2011), lo que ha permitido conocer su genoma al completo y disponer de amplia información en bancos de datos genómicos y proteómicos.

Otro aspecto que ha favorecido el desarrollo del pez cebra como modelo experimental es la facilidad de generar de animales transgénicos, habiéndose obtenido organismos modificados genéticamente en prácticamente todos los tejidos o poblaciones celulares de interés científico (Udvardy y Linney, 2000). Por otra parte, presenta una capacidad natural de regenerar ciertas partes de su cuerpo durante toda su vida, esta capacidad combinada con las numerosas técnicas de manipulación genética existentes en el pez cebra lo convierten en una herramienta única para el estudio de la respuesta regenerativa (Poss et al., 2002; Akimenko et al., 2003). Una de las objeciones al uso de pez cebra como organismo modelo extrapolable al hombre es su distancia filogenética respecto al ser humano (unos 400 millones de años), sin embargo, pese a las evidentes diferencias morfológicas y fisiológicas, muchos genes y sus funciones se han conservado a lo largo de la evolución. La similitud genética del pez cebra (> 85 %) con los humanos permite el estudio de enfermedades humanas con un alto índice de correlación.

Entre los ámbitos de aplicación en los que el pez cebra es utilizado como modelo experimental, destacamos diferentes áreas de investigación, como la biología del desarrollo, genética, la medicina regenerativa, la farmacología, etc... (Amsterdam et al., 2004; Aleström et al., 2006; Beis y Stainier, 2006; Ingham, 2009). Desde 1950 ha sido utilizado tradicionalmente



en estudios de toxicología (Carvan et al., 2007). Entre sus aplicaciones en este campo cabe citar el análisis de los efectos de residuos tóxicos y contaminantes en el medio ambiente, y la creación de bioindicadores que emiten una señal cuando detectan un compuesto tóxico (Spitsbergen y Kent, 2003; Hill et al., 2005; Aleström et al., 2006; Carvan et al., 2007). Igualmente señalar que los embriones de pez cebra también suponen una alternativa fiable en los estudios de toxicidad, cuyo objetivo es predecir los efectos de ciertos compuestos químicos en los mamíferos (Selderslaghs et al., 2009) y permitir la detección rápida de compuestos neurotóxicos (Fan et al., 2010).

Las branquias de estos peces son el objetivo principal de muchos contaminantes acuáticos porque son el sitio donde se realiza el intercambio gaseoso y tienen una importante función en la regulación iónica. Martínez et al. (2004) observaron que los peces expuestos a plomo mostraron lesiones histopatológicas en las branquias y alteraciones temporales en la regulación iónica. Estas alteraciones morfológicas causadas por la exposición a contaminantes resultaron en una serie de desórdenes respiratorios (Cerqueira y Fernandes., 2002), siendo el epitelio de las branquias un excelente modelo para examinar los efectos de las sustancias disueltas en los tejidos (Evans 1987). Es más, las branquias son los órganos más afectados debido a su constante contacto con el agua (Mishra et al., 1985). Las alteraciones histológicas observadas en las branquias están reconocidas como un método válido para determinar los daños causados por la exposición a diferentes contaminantes (Arellano et al., 1999; Fontanetti et al., 2012). Perry y Laurent (1993) sugirieron que estas alteraciones ocurrían durante los

cambios medioambientales eran una forma adaptativa para intentar conservar la función fisiológica de las branquias.

La exposición de peces a distintos contaminantes, también puede resultar en distintos grados de alteración en la regulación iónica y los niveles de iones en plasma pueden ser empleados para cuantificar los efectos tóxicos de estos contaminantes durante la exposición aguda (Mayer et al., 1992). En los peces de agua dulce, la entrada de agua osmótica y las pérdidas difusas de iones tales como sodio y cloro se compensan mediante la excreción de grandes volúmenes de orina diluida y absorción activa para reemplazar los iones perdidos por las branquias (Evans et al., 1999). Dado que las branquias son los principales sitios de regulación osmótica e iónica en los peces, cualquier cambio en la morfología de las branquias puede resultar en un estado osmótico e iónico perturbado.

### 2.5.2 La regulación iónica

La regulación iónica la conforman una serie de mecanismos que permite a los peces mantener el balance iónico entre el cuerpo y el ambiente externo, para esto existen diferentes mecanismos pasivos que van desde el intercambio de agua y sales a través de la superficie corporal dependiendo de la concentración iónica de medio externo hasta la variación de la permeabilidad del organismo a agua y sales, dado que ninguna de las dos estrategias pasivas mencionadas impide completamente los flujos de iones y agua, deben existir mecanismos de compensación activos para mantener el

estado estacionario del medio interno. (Schmidt-Nielsen, 1983; Mantel y Farmer, 1983).

La mayoría de las especies de peces usan las branquias como el sitio principal para dicho intercambio iónico activo. Las branquias están clasificadas como el primer órgano de intercambio gaseoso en peces vertebrados y están compuestas esencialmente por un sistema vascular altamente complejo, rodeado por una gran superficie de epitelio que forma una fina barrera entre la sangre y el ambiente externo (Evans et al., 2005).

La macro arquitectura de la branquia en teleósteos se puede delimitar a dos regiones bien definidas: el arco branquial y los filamentos, originándose del arco branquial dos hileras de filamentos. El arco branquial es un almacén de tejido óseo, cubierto y protegido en su superficie interna por una membrana serosa, por donde discurren los vasos sanguíneos de mayor calibre, que se van ramificando en vasos de mediano y pequeño calibre que irrigan a los filamentos y avanzan hasta la lamela.

Las lamelas son estructuras digitiformes, cubiertas por un epitelio plano simple (epitelio lamelar), el cual forma pliegues cuyo análisis ultraestructural muestra una organización a manera de huellas dactilares aumentando la superficie de intercambio (Ferguson, 2006).

Entremezcladas con las células planas, se ubican varias poblaciones celulares, tales como las células pilares, las células caliciformes y las células

osmorreguladora de cloro, ricas en mitocondrias, que secretan NaCl a través de un gradiente electroquímico producido por la acción de una ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>, participando en el balance ácido base, regulación iónica y procesos de aclimatación (Daborn et al., 2001; Biagini et al., 2009). Estas células cloro son esenciales en peces marinos para eliminar el exceso de iones (McCormick, 1995; Barasona et al., 2017).

La regulación iónica que se produce en las branquias está en parte regulada por la prolactina (PRL), tal y como demuestran la amplia presencia de receptores PRL en el tejido branquial (Pierce et al., 2007). La PRL regula el balance osmótico, estimulado por procesos relacionados con la adaptación a agua dulce, no solamente en las branquias, sino también en el riñón y en el intestino (Manzon, 2002).

La PRL es una hormona hipofisaria liberada por las células lactotropas localizadas en la hipófisis anterior. A pesar de que la hipófisis es el principal sitio de producción de PRL, la expresión extrahipofisaria está documentada entre otros órganos, en el cerebro, las gónadas, el intestino y la placenta en humanos (Marano y Ben-Jonathan., 2014) habiéndose descrito hallazgos similares en vertebrados inferiores incluyendo algunas especies de peces (Santos et al., 1999; Zhang et al., 2004). En mamíferos, la PRL juega un papel importante en las funciones reproductivas, incluyendo la producción de leche, la diferenciación mamaria, el comportamiento paternal, y la función luteotropa y la implantación en los primeros estadios de gestación (Egli et al., 2010, Bouilly et al., 2012). También está relacionada con otras respuestas

biológicas incluyendo la osmorregulación, la respuesta inmune, la proliferación y migración celular, la organogénesis y el desarrollo fetal (Freeman et al., 2000; Ben-Jonathan et al., 2008; Shelly et al., 2012). En peces teleósteos, la PRL es esencial para la osmoregulación bajo condiciones hipoosmóticas, especialmente durante la adaptación a agua dulce de los peces marinos (Breves et al., 2014).

Durante esta adaptación los niveles de PRL en hipófisis y en plasma aumentan, actuando esta sobre la regulación del balance hidromineral mediante una disminución de la entrada de agua a través de los órganos osmoregulatorios y permitiendo un incremento de la retención de iones, principalmente sodio y cloro. Estos efectos son el resultado de las alteraciones que se producen en la permeabilidad de las superficies osmoregulatorias (branquias, piel, riñón, intestino y vejiga urinaria) y en los mecanismos de transporte de iones (Hirano et al., 1986, Barasona et al., 2017).

Todos estos mecanismos se producen debido a la unión de la PRL a los receptores PRL que se encuentran presentes en todos estos órganos osmoregulatorios, incluido las branquias, lo que nos indica que son sitios de acción de la PRL.

La PRL parece tener un marcado efecto en la morfología, número y distribución de las células cloro de las branquias (McCormick, 1995)

habiéndose encontrado receptores PRL en estas células (Weng et al., 1997; Santos et al., 2001).

Es por este motivo por el que alteraciones en los niveles de PRL, y por extrapolación en las células PRL de la hipófisis podrían causar alteraciones en la regulación iónica y en las células cloro y viceversa (Pierce et al., 2007).





### 3. Material y métodos





## 3.- Material y métodos

### 3.1 ANIMALES UTILIZADOS

Para el presente estudio se utilizaron 60 peces cebra (*Danio rerio*), machos de unas 16 semanas de edad, con un peso medio de  $0,553 \pm 0,118$  gramos y una longitud media de  $4,22 \pm 0,211$  centímetros, en buen estado de salud y libres de malformaciones.

El procedimiento experimental se realizó en el Servicio de Animales de Experimentación de la Universidad de Córdoba (SAEX), centro registrado como establecimiento de cría, suministrador y usuario de animales de experimentación y otros fines científicos. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Córdoba y se realizaron cumpliendo en todo momento las directrices del Real Decreto

53/2013 de 1 de febrero sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, así como la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

Previamente a la experiencia, los peces se sometieron durante 2 semanas a un periodo de aclimatación en condiciones idénticas a las que posteriormente se utilizaron en nuestra experiencia (pH: 7-8; temperatura del agua:  $26\pm 1^{\circ}$  C; dureza: 50-250 mg  $\text{CaCO}_3$ ). El fotoperiodo utilizado para los peces fue de 16 horas luz: 8 horas oscuridad, los animales se mantuvieron bajo condiciones de flujo de agua controladas (10 renovaciones/día), y el oxígeno en disolución se mantuvo por encima del 60% del nivel de saturación mediante una aireación continuada de la disolución (Fig. 6). Durante toda su estancia los animales fueron alimentados 2 veces al día, por la mañana y por la tarde (Supervit® minigranulado compuesto de: pescado y subproductos de pescado, cereales, extractos de proteínas vegetales, moluscos y crustáceos, carnes y subproductos animales, levaduras, subproductos de origen vegetal, algas, aceites y grasas, sustancias minerales, vitamina A6 500 IU/kg, vitamina E 190 mg/kg, proteína bruta 48%, materias grasas brutas 8,5%, celulosa bruta 3,5%, cenizas brutas 10,5% y humedad 8%).



**Figura 6. Rack para peces con sistema de aireación continuada y control automático de pH.**

## 3.2 PROTOCOLO Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Los animales se introdujeron al azar en acuarios de 25 litros en 5 grupos de 12 peces a diferentes concentraciones de BPA, grupo control, 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{g/l}$  (Tabla 5). Para evitar cualquier tipo de estrés o cambio

de comportamiento, las condiciones a las que se encontraba el agua de estos acuarios era la misma a la utilizada en el periodo de aclimatación.

El BPA (Sigma Aldrich®, St. Luis, EE.UU.) se les administró a los animales disuelto en el agua, durante 14 días siguiendo las directrices de la OCDE (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico) número 204: "Fish, Prolonged Toxicity Test: 14-day Study" a través de un flujo continuo regulado por bombas peristálticas programadas (GHL® EL09819) que renovaban a intervalos regulares de tiempo (10-12 renovaciones/día) la solución formada por el BPA y el agua.

ACUARIO	DOSIS BPA	Nº MACHOS
1	CONTROL	12
2	1µg/l BPA	12
3	10 µg/l BPA	12
4	100 µg/l BPA	12
5	1000 µg/l BPA	12

**Tabla 5. Distribución de los peces en los acuarios.**

Los acuarios contaban en su interior con un filtro interno (Eheim modelo Pick Up 2006-02®) que mediante un motor, aspiraba el agua y la transportaba a través de una esponja filtrante, para a continuación el agua limpia volver a ser conducida al interior de la pecera a través de un difusor ajustable; además, en cada acuario colocamos un termómetro de cristal con

ventosa (Ica ka 21<sup>®</sup>), para controlar la temperatura, y un aireador (Sonic silent powerful 9905<sup>®</sup>) que consistió en un sistema que producía burbujas por medio de un motor, que distribuye de manera uniforme el oxígeno, mejorando la captación de éste por parte de los peces y facilitándoles el intercambio gaseoso (Fig. 7).



**Figura 7. Acuario de peces con el filtro interno y el aireador.**

Con el fin de asegurarnos de que las concentraciones de BPA no variaban a lo largo del experimento, se tomaron diariamente y siempre a la misma hora, muestras de los acuarios, las cuales se congelaron para realizar posteriormente la medición de los niveles de BPA en el agua mediante la técnica LC-MS/MS (cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas).

Después de las 2 semanas de exposición, todos los animales fueron eutanasiados según las recomendaciones de FELASA (Federación de Asociaciones Europeas de las Ciencias del Animal de Laboratorio), con una

solución del anestésico MS-222® (tricaína metano sulfonato, CAS: 886-86-2) a una concentración de 100-500 mg/l y bicarbonato sódico (NaHCO<sub>3</sub> CAS: 144-55-8) a una concentración de 300 mg/l para reducir la irritación de las membranas mucosas y el daño tisular que pudiera producir el MS-222. Se midió la longitud y se pesaron, e inmediatamente se diseccionaron 6 machos de los que se extrajeron muestras de branquias e hipófisis para su estudio histopatológico y morfométrico.

El resto de peces, tras el sacrificio, fueron macerados por lotes para el posterior estudio del BPA mediante la técnica LC-MS/MS. El macerado del cuerpo entero de los peces se realizó con un homogeneizador (Ribolyser®) a 10.000 G en tubos de 1 ml con bolas de cerámica, utilizando una proporción peso del pez: volumen (50 mM Tris-HCl ph 7,4 y 1% de la proteasa inhibidora (P 8340 Sigma-Aldrich®, MO, USA)) de 1:2. Para la determinación del BPA, las muestras procedentes del homogeneizado del cuerpo entero de los peces fueron congeladas a -80°C.

## 3.3 DETERMINACION DE BPA

### 3.3.1 Determinación de BPA en las muestras de peces

El análisis del BPA se llevó a cabo sobre las muestras del cuerpo entero de los peces cebra, que fueron descongeladas previamente a realizar determinación de los niveles de BPA. Paralelamente a las muestras y para cada lote se preparó:

- Blanco de reactivos: compuestos por 0,5 ml de H<sub>2</sub>O ultrapura (mili Q), 6 ml de ácido nítrico y 1 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- Muestras a analizar: se tomó 1 gramo de pez homogenizado.
- Muestra adicionada a 5 ppb: Se tomó 1 gramo de una muestra control negativa y se añadieron 50 µl de la solución de 0,1 ppm de bisfenol. Muestra adicionada a nivel de 5 ppb.
- Muestra adicionada a 10 ppb: Se tomó 1 gramo de una muestra control negativa y se añadieron 10 µl de la solución de 1 ppm de bisfenol. Muestra adicionada a nivel de 10 ppb.
- Muestra adicionada a 25 ppb: Se tomó 1 gramo de una muestra control negativa y se añadieron 25 µl de la solución de 1 ppm de bisfenol. Muestra adicionada a nivel de 25 ppb.
- Muestra adicionada a 50 ppb: Se tomó 1 gramo de una muestra control negativa y se añadieron 50 µl de la solución de 1 ppm de BPA. Muestra adicionada a nivel de 50 ppb.
- Añadir a todos los puntos de la serie de trabajo 25 µl de la solución de 1 p.p.m. de bisfenol-d16.



Una vez preparados el blanco y las muestras adicionadas podemos distinguir tres etapas en la realización de la detección del BPA: extracción, purificación y detección.

a) Extracción

- Añadimos 100  $\mu$ l de tampón acetato sódico 2M pH 4,8 y 25  $\mu$ l de  $\beta$ - glucuronidasa a cada una de las muestras y elementos de la serie de trabajo.
- Incubamos en estufa a  $40 \pm 5^{\circ}\text{C}$  durante al menos 150 minutos.
- Enfriar, añadir 2 ml de agua reactiva tipo I, agitar y centrifugar a 3000 rpm durante 10 minutos.
- Tomar el sobrenadante.

b) Purificación

- Activar el cartucho de extracción en fase sólida de Oasis HLB con 3 ml de metanol y 3 ml de agua calidad reactiva tipo I.
- Pasar la muestra (sobrenadante) por el cartucho.
- Lavar el cartucho con 3 ml de la solución de (2% de ácido fórmico en agua) 50 %/metanol 50 %.
- Reequilibrar con 3 ml x 2 de agua calidad reactiva tipo I.
- Lavar con 3 ml de la solución (4% de hidróxido amónico) 90 % / metanol 10 %.
- Pasar 6 ml de agua calidad reactiva tipo I (3 ml x 2).
- Secar bien con  $\text{N}_2$  para eliminar el agua.
- Acondicionar el cartucho bondelut  $\text{NH}_2$  con 3 ml de metanol (1 x 3 ml).

- Acoplar los cartuchos oasis hlb reservados con los cartuchos isolute ya acondicionados (hlb sobre isolute).
- Eluir con 3 ml de metanol (1ml x 3).
- Evaporar los 3 ml de metanol en el TurboVap y llevar a sequedad a  $48 \pm 5^\circ\text{C}$ .
- Disolver el residuo de evaporación con 200 microlitros de acetonitrilo/agua (10/90) y filtrar a través del filtro de  $0.45 \mu\text{m}$  y transferirlo a viales.

c) Detección por LC-MS/MS

El sistema cromatográfico, debe ser capaz de visualizar la solución patrón de 50 ppb con una relación señal/ruido  $\geq 3$  para la transición.

- Condiciones instrumentales

Cromatógrafo líquido:

- 1) Temperatura del horno de columna:  $40^\circ\text{C}$ .
- 2) Flujo: 0,2 ml/min.
- 3) Volumen de inyección: 20  $\mu\text{l}$ .
- 4) Fase móvil: Gradiente.

Tiempo	% A	% B
0,00	90	10
0,40	90	10
5,00	50	50
13,00	50	50
14,00	20	80
18,00	20	80
18,01	90	10
21	90	10

Condiciones del espectrómetro de masas:

- 1) Ionización negativa.
- 2) Detector 1400 V.
- 3) Gas de secado: 350 ° C.
- 4) Presión del gas de secado: 30 psi.
- 5) Presión del CID: 2-2,1 psi.
- 6) Housing: 60 ° C.
- 7) Manifold: 42 ° C.
- 8) Método de MS-MS: Se trabaja en modo MRM en un sólo segmento en las siguientes condiciones:

Se realizó una curva de calibrado correspondiente a 5, 10, 25, 50 ppb.

Analito	Voltaje de capilar	Transición	Energía de colisión
Bisfenol	- 108 V	227 > 132	24,0 Volts
	- 108 V	227 > 211	18,0 Volts
Bisfenol – d16	- 112 V	241 > 142	26,5 Volts
	- 112 V	241 > 222	20,0 Volts

La ecuación de la curva es  $y=ax+b$ . Siendo:

X= Concentración (ppb) del bisfenol manteniendo fija la concentración del bisfenol-d16.

Y= Relación entre el área del bisfenol correspondiente a la transición 227>132, y el bisfenol-d16 correspondiente a la transición 241>142.

La concentración final en la muestra en el caso de dos o más replicados será la media de la concentración de los replicados debiendo tener un C.V.  $\leq 2$  x 32%. La concentración obtenida en la muestra, deberá estar dentro de los márgenes de la curva de calibrado.

### 3.3.2 Determinación de BPA en las muestras de agua

El análisis del BPA en el agua, se llevó a cabo sobre muestras de 20 ml de agua recogidas diariamente de los acuarios en los que se encontraban los peces. Las muestras se mantuvieron en congelación hasta su análisis, atemperándose antes de empezar el análisis.

Se utilizaron diversos reactivos, patrones químicos, así como material de referencia. Paralelamente, se prepararon unas muestras adicionadas según se describe a continuación. Se prepararon en tubos eppendorf y se pasaron a los viales de microinyección del cromatógrafo.

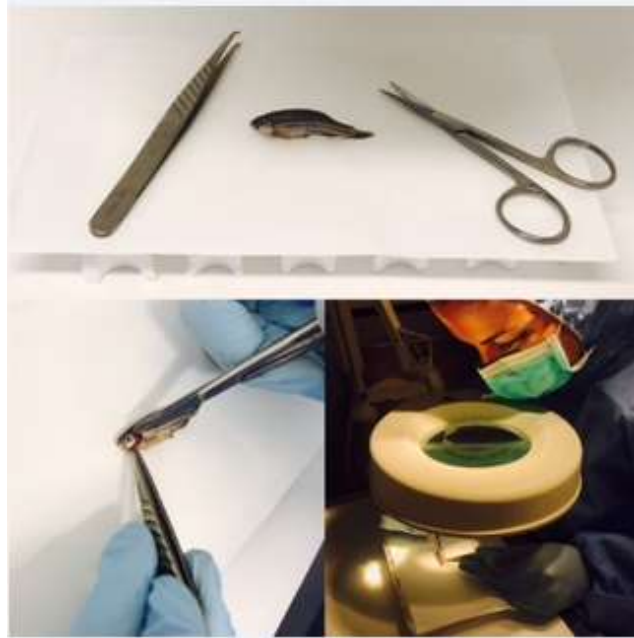
- Muestras a analizar: se tomaron 940 µl de agua + 10 µl de amoníaco al 0,1 % en agua.
- Muestra adicionada a 1 ppb: Se tomaron 940 µl amoníaco al 0,1 % en agua y se añadieron 10 µl de la solución de 0,1 ppm de bisfenol.  
Muestra adicionada a nivel de 1 ppb.
- Muestra adicionada a 10 ppb: Se tomaron 850 µl de amoníaco al 0,1 % en agua y se añadieron 100 µl de la solución de 0,1 ppm de bisfenol.  
Muestra adicionada a nivel de 10 ppb.
- Muestra adicionada a 25 ppb: Se tomaron 700 µl amoníaco al 0,1 % en agua y se añadieron 250 µl de la solución de 0,1 ppm de bisfenol.  
Muestra adicionada a nivel de 25 ppb.

- Muestra adicionada a 50 ppb: Se tomaron 900 µl de amoniaco al 0,1 % en agua y se añaden 50 µl de la solución de 1 ppm de bisfenol. Muestra adicionada a nivel de 50 ppb.
- Muestra adicionada a 100 ppb: Se tomaron 850 µl amoniaco al 0,1 % en agua y se añadieron 100 µl de la solución de 1 ppm de bisfenol. Muestra adicionada a nivel de 100 ppb.
- Añadir a todos los puntos de la serie de trabajo 50 µl de la solución de 1 p.p.m. de bisfenol-d16

La fase de detección por medio de la técnica LC-MS/MS es igual a la realizada para la detección del BPA en las muestras del homogeneizado de los peces (apartado c).

### 3.4 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO ESTRUCTURAL Y ULTRAESTRUCTURAL

Tras el sacrificio, se obtuvieron las muestras de branquias e hipófisis de 3 machos de cada lote al azar, que se incluyeron para estudiar la histopatología al microscopio óptico y la morfometría, estos órganos se procesaron para el estudio histopatológico mediante microscopía electrónica y morfométrica (Fig. 8)



**Figura 8. Detalle de la disección de los animales para toma de muestras de branquia e hipófisis**

### 3.4.1 Microscopio óptico

Las muestras de branquias e hipófisis seleccionadas fueron fijadas en formaldehído (*Sigma® Aldrich, CO, USA*) tamponado al 10% a temperatura ambiente, se deshidrataron en escala ascendente de etanol y fueron incluidos en parafina (*Sigma® Aldrich, CO, USA*).

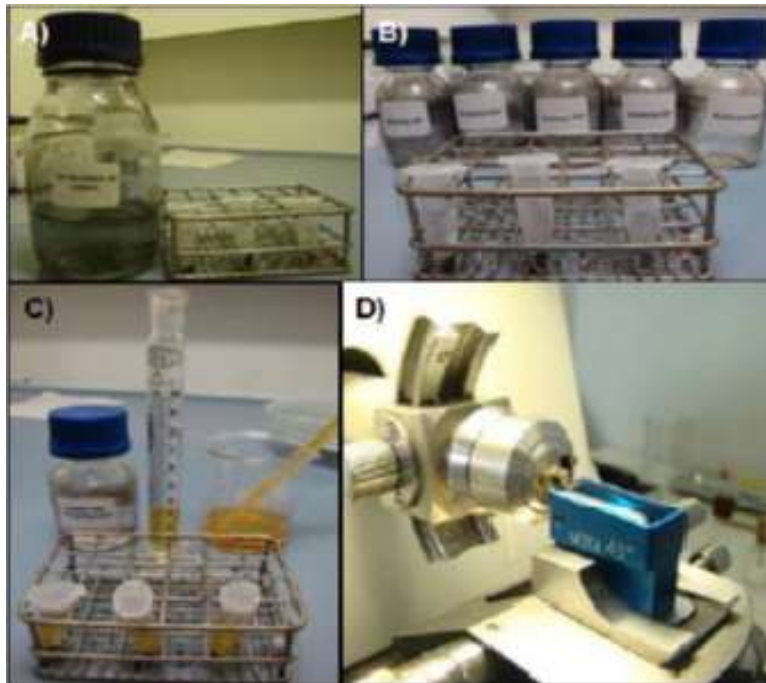
Las primeras secciones de cada bloque (4  $\mu\text{m}$ ) fueron teñidas con hematoxilina/eosina para su estudio morfométrico e histopatológico. Los

cortes fueron observados y fotografiados en un fotomicroscopio *Leitz Ortholux* (*ORTHOLUX microscope. Ernst Leitz GMBH Wetzlar*).

### 3.4.2 Microscopio electrónico de transmisión (MET) y de barrido (MEB)

Pequeñas muestras de la hipófisis y las branquias fueron fijadas en glutaldehído al 2% en solución 0,1 M de buffer fosfato (pH 7,4) a 4 °C durante toda la noche y, posteriormente refijadas en tetróxido de osmio en solución 0,1 M de buffer fosfato (pH 7,4) durante 30 minutos. Después de la deshidratación en escala ascendente de alcoholes e inclusión en Araldita, los cortes semifinos y ultrafinos se realizaron en un ultramicrotomo LKB (*Ultratome Nova LKB Bromma*) (Instalaciones Centrales de Microscopía, Universidad de Córdoba) (Fig. 9). Los cortes semifinos se tiñeron con azul de toluidina (*Sigma® Aldrich, CO, USA*), mientras que en los cortes ultrafinos se realizó doble tinción con acetato de uranilo y citrato de plomo. Para el estudio estereoscópico las muestras fueron secadas hasta el punto crítico y luego cubiertas con oro coloidal.





**Figura 9. Preparación de las muestras para su observación en el microscopio electrónico de transmisión y en el microscopio electrónico de barrido.**

A) Fijación de las muestras en tetróxido de osmio — solución 0,1 M de tampón fosfato (pH 7,4) — durante 30 min. B) Deshidratación en escala ascendente de alcoholes. C) Inclusión en araldita. D) Realización de cortes semifinos y ultrafinos en un ultramicrotomo LKB.

Los cortes para el estudio ultraestructural fueron estudiados y fotografiados en un microscopio electrónico de transmisión (MET) (*JEOL JEM – 1400 Jeol 1400*) y en los microscopios electrónicos de barrido (MEB) (*JEOL JSM 6300*) y (*JEOL 7800*), respectivamente (Fig. 10).



**Figura 10. MET y MEB empleados para el estudio y fotografía de los cortes.**

A) MET JEOL JEM – 1400. B) y MEB JEOL JSM 6300. Ambos situados en el Área de Microscopía del Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba.

### 3.5 PROCEDIMIENTOS MORFOMÉTRICOS Y ESTEREOLÓGICOS.

El estudio morfométrico de las células prolactínicas se llevó a cabo en imágenes tomadas directamente del lóbulo cefálico de la hipófisis bajo microscopía electrónica, cuantificando el número y tamaño de las células. Se

cuantificaron 20 campos/animal, de manera que fueron contados 100 campos/grupo, cada uno de estos campos tenía 10  $\mu\text{m}$  por lado, por lo que el total de la superficie medida fue de  $10 \times 10 = 100 \mu\text{m}^2$ , la superficie total analizada por grupo fue de  $100 \times 100 = 10000 \mu\text{m}^2$ . Para la identificación celular nos basamos en el pleomorfismo de los gránulos, midiendo los núcleos presentes en la superficie por lo que se obtuvo el número de células presentes en la superficie.

Los parámetros morfométricos incluyeron datos sobre el tamaño de los núcleos y citoplasmas de las poblaciones celulares de interés. Las estimaciones de los tamaños celulares se realizaron trazando los perfiles de los núcleos a estudiar mediante el cursor del sistema de análisis.

El estudio morfométrico de las células cloro se realizó mediante microscopía óptica amplificada hasta X40. Estas células fueron contadas mediante la medición de los núcleos de 5 preparaciones diferentes por animal teñidas con hematoxilina-eosina

Este estudio se llevó a cabo mediante un sistema de análisis de imagen constituido por un microscopio triocular Leitz Ortholux conectado con un sistema informático digitalizador de imágenes por medio de una cámara de vídeo SONY SSC-C370P® y utilizando el programa informático *Visilog 5*®.

## 3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el programa estadístico *Statgraphic (Centurión XVI®)*, a través de diferentes pruebas estadísticas y gráficas. Para ver si existían diferencias significativas entre las medias se usó la prueba- F en la tabla ANOVA. Las Pruebas de Múltiples Rangos se utilizaron para comprobar si las medias son significativamente diferentes unas de otras, usando el método de LSD de Fisher para discriminar entre las medias. Los resultados se expresan como media  $\pm$  desviación típica y un valor de  $p < 0,05$  fue considerado significativo.





## 4. Resultados



## 4.- Resultados

### 4.1 NIVELES DE BPA

Los niveles de concentración de BPA en el pez cebra tras 14 días de exposición a 1, 10, 100 y 1000  $\mu\text{g/l}$  de BPA se muestran en la Tabla 6. Se observó un aumento en la concentración de BPA en los peces cebra expuesto a concentraciones crecientes de BPA. No se detectaron niveles de BPA en el grupo de control mientras que, en los grupos tratados, se observaron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) con respecto al grupo control. Se mostraron diferencias significativas entre los grupos tratados a 1 y 10  $\mu\text{g/l}$  y las mayores concentraciones de BPA (100 y 1000  $\mu\text{g/l}$ ), mientras que no se



detectaron diferencias significativas entre los grupos de concentraciones más bajas (1 y 10 µg/l).

Concentración de BPA (µg/l)					
	Control	1	10	100	1000
Concentración de BPA (µg/g)	nd	0,045±0,03*	0,072±0,014*	0,55±0,009*	40,64±1,404*

**Tabla 6. Niveles de BPA (µg/g) expresados por media ± SD**

(nd: no detectado, \* Diferencia significativa con el control con P <0,05)

## 4.2 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO CUALITATIVO

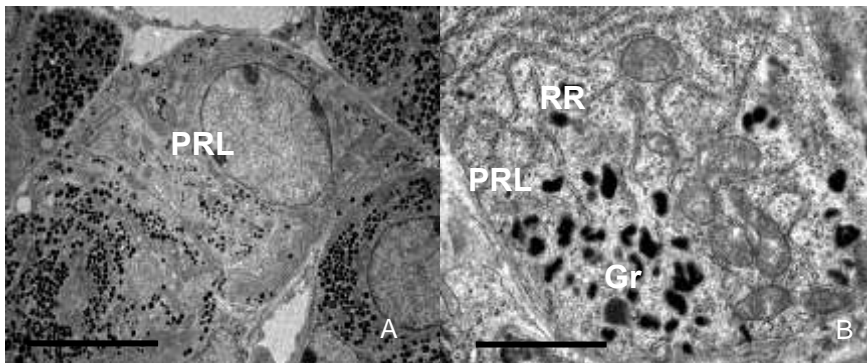
### 4.2.1 Grupo control

#### 4.2.1.1 Estudio de las células PRL

En el grupo control las células PRL, se disponen conjuntamente con las células adenocorticotropas (ACTH) por todo el lóbulo rostral o anterior de la hipófisis del pez cebra. Estas células PRL no se suelen relacionar entre sí, ni disponerse en mosaicos celulares y suelen estar en un 9% de las células glandulares hipofisarias. Tienen un tamaño aproximadamente de 20 µm de forma alargada con escasas prolongaciones citoplasmáticas, con una disposición próxima a los capilares (Fig. 11). Su núcleo entre esférico a oval,

se dispone en el centro de la célula, tiene unos 7  $\mu\text{m}$  de diámetro medio, con cromatina poco densa y un nucléolo desarrollado.

Esta célula tiene abundantes orgánoides, como el retículo rugoso y sobre todo complejo de Golgi, y también abundantes mitocondrias. Pero morfológicamente lo que define a las células PRL son sus gránulos de secreción, estos tienen tendencia a disponerse próximos al núcleo relacionándose con el complejo de Golgi (Fig. 11), pero el hecho diferencial es su fuerte pleomorfismo, que hacen a las células PRL inconfundibles en relación a las diferentes células hipofisarias. Estos gránulos muestran diferentes formas: bastonados, esféricos, ovoides y contorno ramificado, y su ocupación citoplasmática es del 15 %.



**Figura 11 Grupo Control y 1 $\mu\text{g/l}$ .**

A: Célula prolactínica (PRL) al microscopio electrónico de transmisión MET de forma estrellada, con un núcleo de gran tamaño y un citoplasma con abundantes orgánoides y gránulos de secreción (Barra 10 $\mu\text{m}$ ).

B: Detalle de célula prolactínica (PRL) al MET, donde se destaca el retículo rugoso (RR) y gránulos de secreción agrupados y altamente pleomórficos (Gr) (Barra 2 $\mu\text{m}$ ).

#### 4.2.1.2 Estudio de las branquias y las células de Cloro.

Al evaluar el grupo control hemos identificamos los siguientes elementos:

- Un arco branquial que posee un núcleo central de tejido mesodérmico cubierto por tejido ectodérmico (externo), y revestido por tejido endodérmico (interno).
- Un arco aórtico que corre alrededor de la faringe primitiva hacia la aorta dorsal.
- Un bastón cartilaginoso, que forma el esqueleto del arco, que deriva de las células de la cresta neural.
- Un componente muscular que formaran los músculos de la cabeza y el cuello.
- Un componente nervioso, nervio que deriva del neuroectodermo del encéfalo primitivo, que inerva la mucosa y músculos derivados del arco.

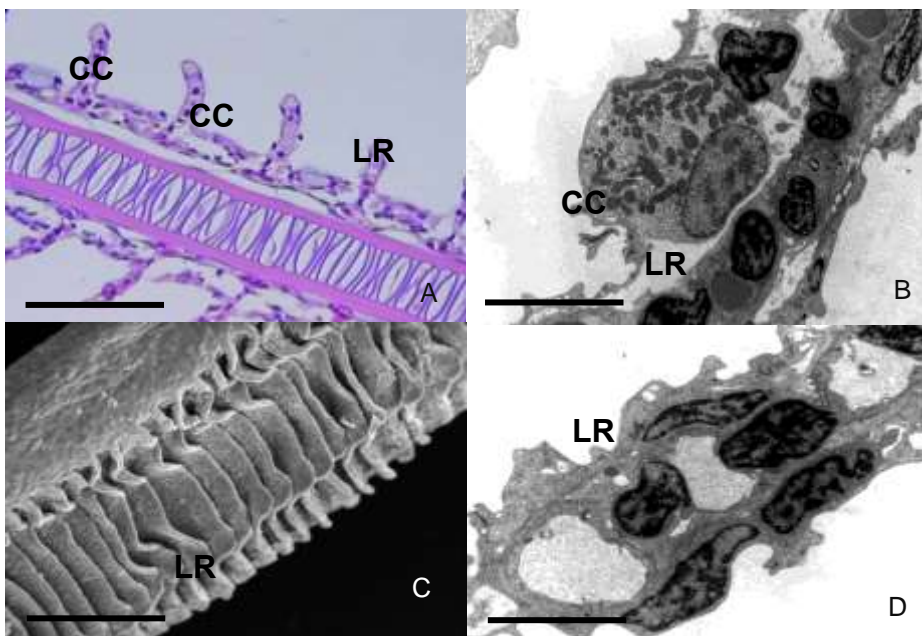
El mesodermo original de los arcos forma los músculos de la cara y el cuello. De tal manera, cada arco branquial se caracteriza por poseer sus propios componentes musculares, los cuales conducen su propio nervio, y cualquiera que sea el sitio al que emigren las células musculares llevará consigo su componente nervioso craneal. Asimismo, cada arco posee su propio componente arterial.

Al microscopio óptico dentro de la estructura de las branquias, se considera como unidad de morfología y función, por una parte, el filamento básico y por otro las lamelas. Ambos elementos están revestidos por un epitelio, pero este epitelio se diferencia por el grosor del mismo y el tipo de sus células. Este hecho es fundamental para identificar y diferenciar las lamelas y los filamentos básicos.

La morfología que hemos obtenido en las lamelas, utilizando el microscopio electrónico de barrido (MEB), es de una estructura laminar que muestra una superficie irregular, con unos surcos grandes e irregulares, en tanto que, en los filamentos de las espinas branquiales, junto a las protuberancias celulares y de las yemas, su superficie muestra a grandes aumentos, unos surcos regulares a modo de huellas dactilares. La diferencia de ambas superficies, se detecta al microscopio electrónico de transmisión (MET), ya que las lamelas se encuentran revestidas por un epitelio simple plano, que muestra unos surcos longitudinales, escasos, delgados e irregulares, en tanto que la superficie de la zona de la espina branquial, esta revestida por un epitelio multiseriado, el cual está revestido por una hilera de células entre planas a cúbicas, y cuya característica es la presentación de unas pequeñas espículas cónicas, que sobresalen a la superficie y son las responsables de las imágenes a modo de huella dactilar que se aprecia en el MEB.

En este grupo, en las imágenes obtenidas con el microscopio óptico (MO) de las branquias respiratorias, observamos una espina central y a ambos lados de ella numerosas lamelas respiratorias, que presentan un

centro de capilares y todas las células funcionales y de revestimiento. Observamos una imagen muy tradicional de las lamelas respiratorias, utilizando el MEB, ya que, del cuerpo central espinoso, se proyectan unas protuberancias laminares, con una superficie irregular. Y finalmente, los estudios realizados con el MET, muestran una lamela alargada, con un revestimiento formado por células aplanadas, encerrando una hilera de capilares, con sus correspondientes células endoteliales, separadas por la cavidad interna las células de los pilares, y en las zonas más basales se observan las células del cloro y las células mucosas (Fig. 12).



**Figura 12. Grupo control y 1µg/l**

A: Detalle de la branquia al microscopio óptico MO donde se muestran lamelas respiratorias normales (LR) y células cloro (CC) en la zona basal (Barra 10µm).

B: Detalle de la lamela respiratoria (LR) al microscopio electrónico de transmisión MET. Se observa la presencia de células cloro (CC) con abundantes mitocondrias (Barra 5µm).

C: Detalle de la branquia al microscopio electrónico de barrido MEB. Se aprecian lamelas respiratorias de apariencia normal y uniformes (Barra 10µm).

D: Detalle de la lamela respiratoria (LR) al MET. Destaca la presencia de capilares normales (Barra 5µm).

Los filamentos de las espinas branquiales, de las branquias sensibles, son complejos, debido a las funciones que recaen en estas finas protuberancias. Por una parte, juega un importante papel en la protección de estos componentes, también protegen por las células mucosas que poseen, regulan las concentraciones iónicas, y finalmente es una zona neurosensible por los neuroepitelios que tienen. Para realizar una protección, fundamentalmente mecánica, desarrollan un epitelio multiseriado, donde se mezclan células de revestimiento y mucosas, y en contacto con la superficie diferencian una hilera de células planas a cúbicas, que muestran las pequeñas espinas cónicas. Participan en la regulación iónica con las células del cloro, y es una zona sensible al desarrollar las yemas sensitivas, que poseen un neuroepitelio muy especializado.

Estas células se encuentran distribuidas en las caras laterales de las lamelas respiratorias branquiales, en contacto con la superficie acuosa. Morfológicamente son muy similares a las células parietales de la mucosa gástrica glandular.

Estas células se disponen bien de forma aislada o en pequeños acúmulos, en toda la superficie de las lamelas respiratorias.

Al microscopio óptico se aprecia una célula de grandes proporciones de unos 23  $\mu\text{m}$ , tienen forma de cúpulas dispuestas en la zona más externa de su superficie, pero morfológicamente se destaca la fuerte acidofilia que tiene el citoplasma. Su núcleo esférico y denso se dispone en la zona basal.

Al microscopio electrónico las células de cloro tienen forma de cúpula, exteriorizándose en la superficie de las lamelas. En su morfología se destacan dos componentes, gracias a los cuales se transforman en células de un gran gasto energético. En primer lugar la membrana celular produce un canal intracelular, y siguiendo un trayecto a modo de uve (V), este canalículo muestra una pequeña luz que está ocupada por numerosas microvellosidades producidas por la membrana del surco canalicular. El segundo elemento energético que poseen son numerosas mitocondrias que se disponen por todo el citoplasma, pero fundamentalmente se condensan sobre la pared del canal intracelular.

También tienen abundante complejo de Golgi y sobre todo retículo rugoso. El núcleo se encuentra próximo a la membrana basal y es muy denso con un nucléolo bastante desarrollado.

## 4.2.2 Grupo 1 $\mu\text{g/l}$

### 4.2.2.1 Estudio de las células PRL

En este grupo las células PRL, tienen una morfología similar a las células del control en su configuración y distribución en el lóbulo anterior de la hipófisis (Fig 11). Manteniéndose de forma aislada están en un 13,2 % del total de células glandulares. Su forma se mantiene entre esférica a ovoide, con un diámetro medio de 24  $\mu\text{m}$ . Los núcleos morfológicamente son similares a los anteriores, pero con 8,2  $\mu\text{m}$  de diámetro medio.

Las imágenes que existen corresponden a una célula endocrina muy activa, con un complejo de Golgi amplio y abundantísimo retículo rugoso.

Los gránulos son muy pleomórficos y muy numerosos, si bien los más pleomórficos mantienen contacto con el complejo de Golgi, pero son numerosos los gránulos homogéneos que se disponen próximos a la membrana celular y estos tienen tendencia a ser esféricos. Todos ellos son muy densos, ocupando un 17% del volumen citoplasmático.

#### 4.2.2.2 Estudio de las branquias y las células de Cloro

Los peces del grupo expuesto a una dosis de  $1\mu\text{g/L}$  no mostraron alteraciones en ninguna de las muestras estudiadas. En las branquias no se observaron modificaciones de la estructura branquial. Tanto al microscopio óptico (MO), como al microscopio electrónico (ME), pudimos comprobar que la morfología de los filamentos y de las lamelas mostraba un tejido respiratorio normal, con las luces de los capilares dilatados y con sus envueltas aparentes en todos los grupos control evaluados.

Las branquias presentaban un aspecto similar al de los grupos control, excepto que mostraron zonas hiperémicas aisladas.

Al MO se apreció en las branquias una estructura similar al grupo control en los componentes esqueléticos cartilagosos del arco branquial, presentando un amplio desarrollo de los filamentos branquiales y lamelas, con una morfología aparentemente normal, salvo algunas zonas hiperémicas



y edematizadas. Las células de revestimientos eran continuas y planas, destacándose las células de los pilares y las lagunillas. Las células del cloro mantenían sus abundantes mitocondrias y apenas se presentaban células mucosas (Fig.12).

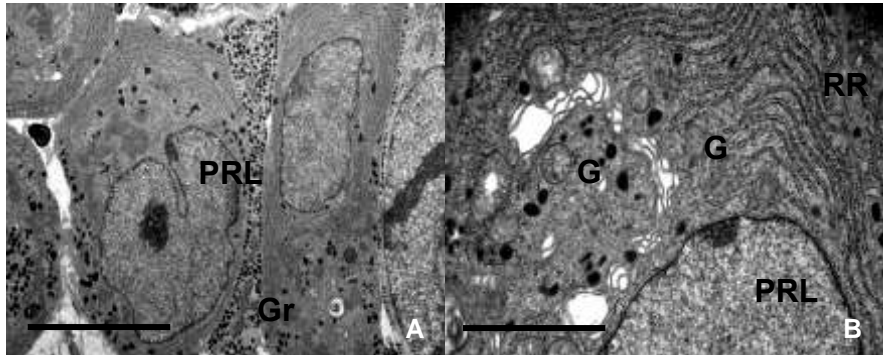
### 4.2.3 Grupo 10 µg/l

#### 4.2.3.1 Estudio de las células PRL

Las células PRL de este grupo difieren de las del grupo control. Estas presentan gránulos de secreción en dos posiciones, unos localizados en relación con el complejo de Golgi, que son pleomórficos (característicos de este tipo de células) y otros, muy abundantes, que se presentan en las zonas periféricas que son esféricos y muy densos a los electrones, ocupando un 21% del volumen citoplasmático.

Estas células mantienen su disposición, con un 17,2% del total de las células glandulares, y con un diámetro medio de 31,1 µm. El núcleo es ovoide con 8,7 µm de diámetro medio.

Por otra parte, son células con gran desarrollo de sus organoides, sobre todo complejo de Golgi, retículo rugoso y mitocondrias (Fig. 13).



**Figura 13. Grupo de 10  $\mu\text{g/l}$**

A: Célula Prolactínica (PRL) al MET, de forma oval con un núcleo evidente, organoides y gran cantidad de gránulos pleomórficos (Gr) (Barra 5 $\mu\text{m}$ ).

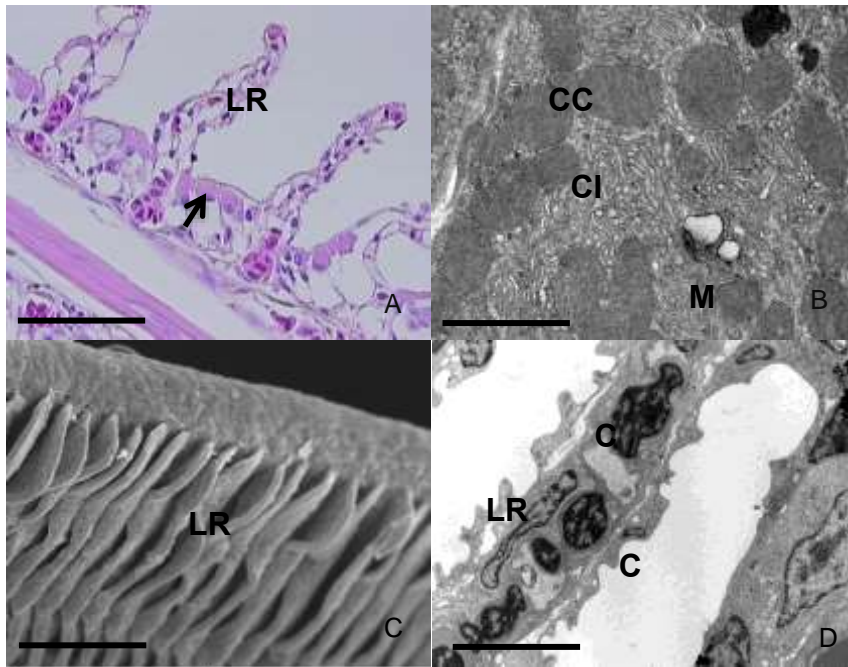
B. Detalle de una célula Prolactínica muy activa(PRL) al MET. Un retículo rugoso(RR) y un complejo de Golgi (G) considerables, y un especial aumento en los gránulos de

#### 4.2.3.2 Estudio de las branquias y las células de Cloro

En el tejido branquial se describió una leve hiperemia capilar y edema, siendo todos sus componentes celulares aparentemente modificados.

Con el MO, a nivel branquial, tanto los filamentos como las lamelas primarias, se evidenciaron tumefactas, presentando interdigitaciones que se disponían a modo de mosaico. También se describió hiperemia activa generalizada con numerosas células de naturaleza exudativa e inflamatoria y abundantes zonas hemorrágicas. La tumefacción y desorganización de las

lamelas, así como la presencia de células inflamatorias y hemorrágicas se detectó mayoritariamente en el MEB. No obstante, las lesiones más importantes se apreciaron con el MET, pudiendo observarse tumefacciones capilares con hiperemia y ligera desorganización de los componentes que forman la barrera respiratoria. En este grupo las branquias son el órgano que presentó mayor alteración. Al MO se detectó una acentuada desorganización, presentándose destrucción total de las lamelas, con hiperemia muy marcada, edema, exudado y extensas hemorragias. Las imágenes obtenidas corresponden a un grave shock vascular-tóxico. Al MEB se evidenció salida e infiltración de células sanguíneas y exudativas, junto con pérdida total de la estructuración normal. Se pudo apreciar en el MET graves alteraciones vasculares, principalmente a nivel capilar, con hiperemia generalizada y desestructuración de sus paredes y de las membranas respiratorias (Fig. 14).



**Figura 14. Grupo de 10 µg/l**

A: Detalle de la lamela respiratoria (LR) al MO. Pueden observarse células cloro acidófilas (flecha) e hiperemia vascular (Barra 5µm).

B: Detalle de célula Cloro (CC) bajo MET. Destacamos el canalículo intracelular (CI) con numerosas microvellosidades y mitocondrias (M) (Barra 2µm).

C: Detalle de la branquia bajo MEB. Se observan lamelas respiratorias edematizadas (LR) (Barra 10µm).

D: Detalle de una lamela respiratoria (LR) bajo MET. Se observan capilares (C) con la luz dilatada y con presencia de glóbulos rojos (Barra 5µm).

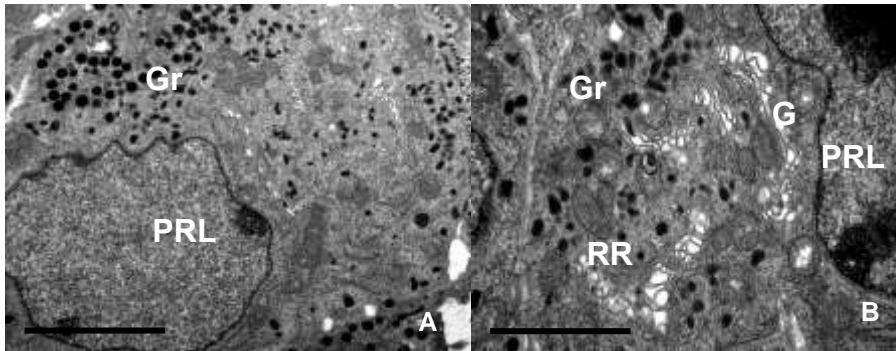
## 4.2.4 Grupo 100 µg/l

### 4.2.4.1 Estudio de las células PRL

En este grupo de estudio, las células PRL, muestran dos formas funcionalmente diferentes.

En primer lugar, existe un 11,2% de células PRL, que son muy similares a las del grupo anterior con una disminución de densidad de gránulos hasta un 19% del citoplasma. Con unas medidas también similares de 32,2 µm y 8,5 µm respectivamente del citoplasma y del núcleo. Con desarrollo de sus organoides citoplasmáticos que participan directamente en la formación de los gránulos.

En tanto existe una segunda forma de presentarse estas células, que están en un 5,3%, y se caracterizan morfológicamente por ser una célula endocrina con abundantes organoides formadores de los gránulos, y además estas granulaciones son muy abundantes, pleomórficas y densas a los electrones, ocupando gran parte de la célula, alrededor de un 22,5%. Pero lo que define a estas células, es la existencia de autofagosomas a modo de figuras de mielina, que se forman fundamentalmente de los gránulos más centrales, y que indica una autodestrucción de la hormona en el seno de la granulación (Fig. 15).



**Figura 15. Grupo de 100  $\mu\text{g/l}$**

A: Célula prolactínica altamente desarrollada (PRL) al MET con un núcleo excéntrico y con abundantes organoides y gránulos de secreción (Gr) (Barra 5  $\mu\text{m}$ ).

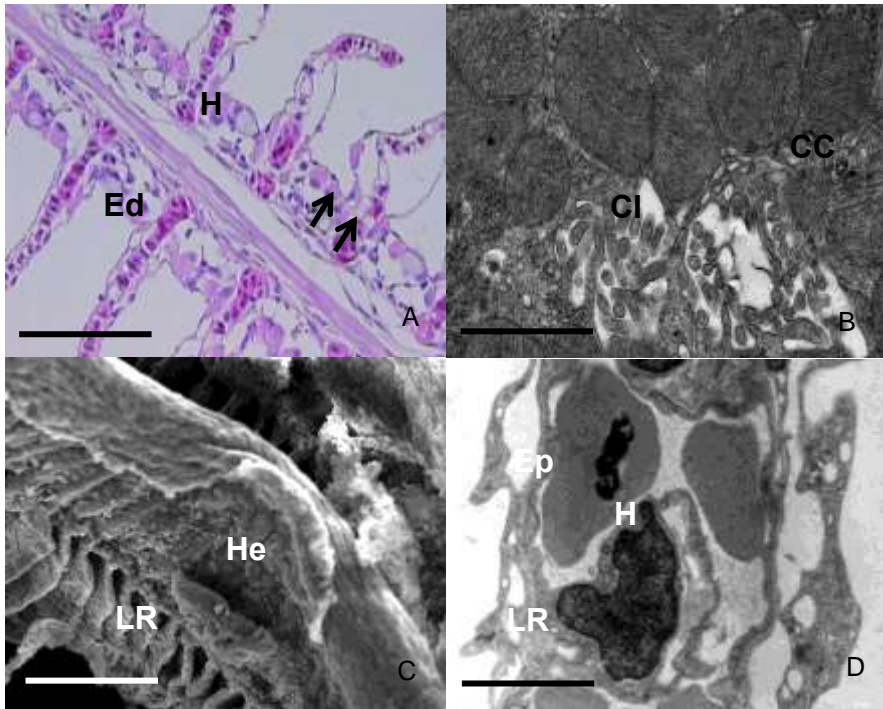
B. Detalle de célula prolactínica (PRL) al MET, que muestra un gran desarrollo de los organoides, del complejo de Golgi (G) y del retículo rugoso (RR). Presenta abundantes gránulos altamente pleomórficos (Gr) (Barra 2  $\mu\text{m}$ ).

#### 4.2.4.2 Estudio de las branquias y de las células de Cloro

Con el MO, a nivel branquial, tanto los filamentos como las lamelas primarias, se evidenciaron tumefactas, presentando interdigitaciones que se disponían a modo de mosaico. También se describió hiperemia activa generalizada con numerosas células de naturaleza exudativa e inflamatoria y abundantes zonas hemorrágicas. La tumefacción y desorganización de las lamelas, así como la presencia de células inflamatorias y hemorrágicas se detectó mayoritariamente en el MEB. No obstante, las lesiones más importantes se apreciaron con el MET, pudiendo observarse tumefacciones capilares con hiperemia y ligera desorganización de los componentes que forman la barrera respiratoria

Dentro de las alteraciones histológicas en las branquias, la lesión degenerativa más frecuente fue la hiperplasia interlaminar en un 100% en forma leve, seguida de la hiperplasia del filamento branquial en un 45%, predominantemente en forma leve, habiendo también pérdida de laminillas branquiales en forma severa en un 5%; observándose una moderada infiltración de células inflamatorias, mayormente de tipo mononuclear, en filamento branquial en un 100%; y cambios circulatorios como congestión en el filamento en un 30%. Así mismo, al igual que el músculo se observaron alteraciones en el arco branquial y filamento branquial en un 5% de la población. Los quistes lamelares se observaban como estructuras redondas y ovaladas, presentando interiormente diferentes estructuras esféricas, elongadas o con procesos caudales, que representan estadios patológicos vasculares. Uno de ellos ubicado en el filamento branquial, estaba rodeado de tejido conectivo y presentaba estadios apoptótico en su interior, habiendo una reacción inflamatoria en su periferia.

Se observó también un incremento en el número de células cloro, que mantuvieron la acidofilia, mostrando un citoplasma más claro y vacuolizado (Fig. 16).



**Figura 16. Grupo de 100 µg/l**

A: Detalle de la branquia observada al MO. Existen numerosas células cloro (flechas) con alteraciones vasculares, edema (Ed) e hiperemia (H) (Barra 5µm).

B: Detalle de célula cloro (CC) bajo el MET. Destacando un dilatado canalículo (CI) intracelular (Barra 2µm).

C: Detalle de la branquia bajo el MEB. Se observa desorganización de la lamela respiratoria (LR) con hemorragias (He) (Barra 10µm).

D: Detalle de la lamela respiratoria (LR) bajo el MET con una destacada desorganización de los capilares hiperémicos (H) y del epitelio (Ep) (Barra 5µm).



## 4.2.5 Grupo 1000 µg/l

### 4.2.5.1 Estudio de las células PRL

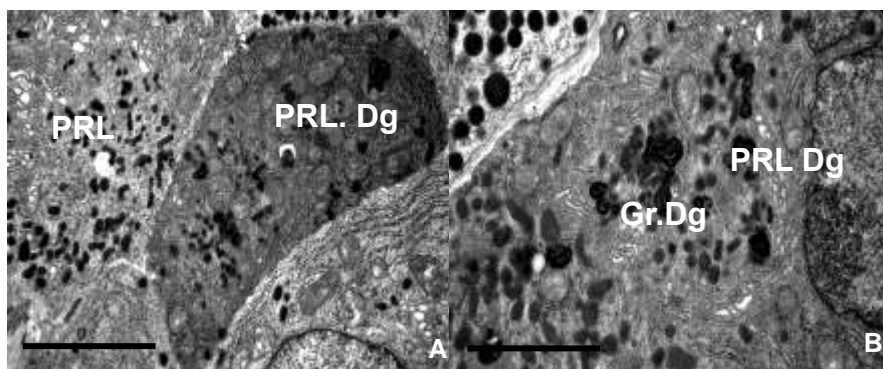
Finalmente, los animales expuestos a la concentración más alta de BPA, mostraron unas células PRL de dos formas diferentes, pero más definidas, por una parte, células PRL aparentemente funcionales, y un segundo tipo que no solo modifica sus gránulos de secreción, sino que comienza a mostrar signos morfológicos de células en vía de degeneración.

Las células activas están en un 9,7% de las células endocrinas de la hipófisis, con un gran desarrollo de sus granulaciones, pleomórficas y densas a los electrones, ocupando un 21,8% del volumen citoplasmático, y abundante desarrollo del retículo rugoso, complejo de Golgi y mitocondrias. Y un tamaño de 31,1 µm de diámetro medio del citoplasma y de 8,7 µm de su núcleo.

El segundo tipo de células PRL, corresponden a fases degenerativas o en regresión de estas células y se cuantifican en un 7,9% de células glandulares. En primer lugar, se destaca un aumento de su densidad electrónica de todos sus componentes citoplasma y núcleo. Estas modificaciones se evidencian preferentemente en el citoplasma, mostrando dilataciones del complejo de Golgi y retículo rugoso, y junto a una hialinización de la matriz celular destacan tumefacciones de las mitocondrias con pérdida parcial de las crestas mitocondriales. Y como indicamos en el grupo anterior, aunque se mantienen abundantes gránulos densos y

pleomórficos, numerosos de ellos se ven afectados por fenómenos de crinofagia, que se presentan a modo de autofagosomas o figuras de mielina (Fig. 17).

Estas células son pleomórficas, aunque se sitúan en unos 33,7  $\mu\text{m}$  y 9,2  $\mu\text{m}$  de diámetros medios del citoplasma y núcleo.



**Figura 17. Grupo de 1000  $\mu\text{g/l}$**

A: Células prolactínicas (PRL) al MET, células activadas (PRL) y célula prolactínica degenerada (PRL Dg), ambas con núcleo y citoplasma muy denso, destacando un gran número de granulos en crinofagia (auto-destrucción) (Barra 2 $\mu\text{m}$ ).

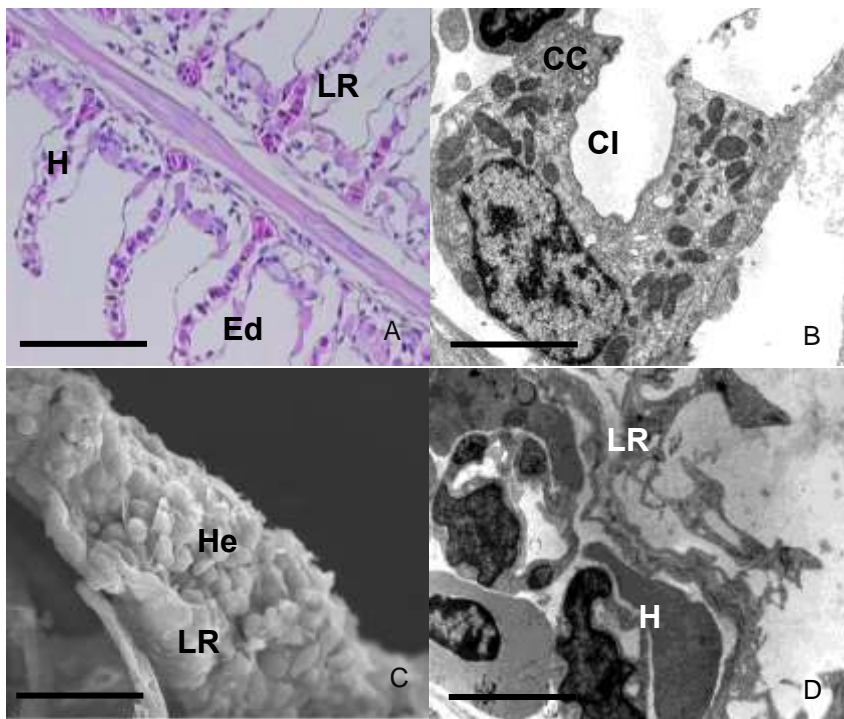
B: Detalle de célula prolactínica (PRL Dg) al MET, con la mayoría de los granulos en autofagocitosis (GrDg) (Barra 1 $\mu\text{m}$ ).

#### 4.2.5.2 Estudio de las branquias de las células de Cloro

En este grupo las branquias son el órgano que presentó mayor alteración. Al MO se detectó una acentuada desorganización, presentándose destrucción total de las lamelas, con hiperemia muy marcada, edema, exudado y extensas hemorragias. Las imágenes obtenidas corresponden a un grave shock vascular-tóxico. Al MEB se evidenció salida e infiltración de células sanguíneas y exudativas, junto con pérdida total de la estructuración

normal. Se pudo apreciar en el MET graves alteraciones vasculares, principalmente a nivel capilar, con hiperemia generalizada y desestructuración de sus paredes y de las membranas respiratorias.

El tamaño de las células cloro se vio incrementado, con la vacuolización de todo el citoplasma (Fig. 18).



**Figura 18. Grupo de 1000 µg/l**

A: Detalle de la lamela respiratoria (LR) al MO. Existen numerosas células cloro con membrana hiperémica (H) y edema (Ed) (Barra 10µm).

B: Detalle de la célula cloro (CC) bajo el MET. Se aprecia un canalículo intracelular dilatado (CI) y falta de microvellosidades (Barra 5µm).

C: Detalle de la branquia bajo el MEB. Hay una desorganización de la lamela respiratoria (LR), con pérdida parcial del recubrimiento y acumulación de globulos rojos (He) (Barra 10µm).

D: Detalle de la lamela respiratoria bajo MET. Se aprecia una desorganización de las lamelas respiratorias (LR) con capilares hiperémicos muy dilatados (H) y una pérdida de epitelio de recubrimiento (Ep) (Barra 5µm).

## 4.3 ESTUDIO MORFOMÉTRICO Y ESTEREOLÓGICO

Los datos obtenidos de las cuantificaciones realizadas con el microscopio óptico y electrónico se incluyen en la Tabla 6. Los datos obtenidos en el grupo control y grupo de 1 µg/l se consideraron de forma conjunta ya que los valores fueron similares.

Las células PRL fueron cuantificadas al microscopio electrónico (Tabla 6). Observando un incremento en el número de células en los grupos de 10 y 100 µg/l, mostrando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el grupo de 100 µg/l con respecto a los grupos control y de 1 µg/l. Estas diferencias también fueron observadas en el grupo expuesto a mayor concentración (1000 µg/l) comparadas con el control, aunque mostró un descenso en el número de células. No se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados.

Se produjo un aumento en el diámetro medio de las células PRL en los grupos expuestos a 10 y 100 µg/l, que fue más evidente en el grupo de 100 µg/l, mientras que en el grupo de 1000 µg/l, el diámetro medio disminuyó. Todos los grupos tratados mostraron diferencias significativas respecto al control ( $p < 0,05$ ), y entre ellos, excepto entre los grupos de 10 y 100 µg/l.

		Grupos			
		Control y 1 µg/l	10 µg/l	100 µg/l	1000 µg/l
<b>Células Cloro</b>	<b>Número</b>	3,46±0,76	5,44±0,70*	7,05±0,86*	5,82±0,79*
	<b>Tamaño (µm)</b>	19,29±3,59	27,85±1,54*	30,26±2,75*	30,42±4,17*
<b>Células prolactínicas</b>	<b>Número</b>	1,93±0,51	2,60±0,71	3,03±0,39*	2,69±0,38*
	<b>Tamaño (µm)</b>	15,63±1,19	17,45±1,02*	21,11±1,94*	19,85±1,19*

**Tabla 6. Número y tamaño de las células prolactínicas y cloro en zebrafish expuestos a diferentes concentraciones de BPA (media±SD)**

\*Diferencia significativa con el grupo Control y de 1 µg/l con  $p < 0,05$ .

En la cuantificación de las células cloro al MO (Tabla 6), en los grupos de 10 y 100 µg/l, se observó un aumento en el número de células con diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en ambos casos con respecto al control y al grupo de exposición más bajo. Este incremento se observó en el grupo de exposición más alta (1000 µg/l) aunque las diferencias significativas se mantuvieron respecto al control.

En relación al tamaño de los núcleos de las células cloro, todos los grupos tratados (excepto el de 1 µg/l) mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control, pero no se mostraron estas diferencias entre los grupos tratados.



## 5. Discusión



## **5.- Discusión**

El pez cebra es un modelo animal de fácil manejo y bajo coste de mantenimiento, con una gran fertilidad durante toda la vida reproductiva. Los huevos y embriones son transparentes, lo que facilita el estudio del desarrollo de los órganos, y la incidencia de productos químicos en los sistemas orgánicos desde las primeras horas de vida, además de un genoma diploide similar al de los mamíferos con la ventaja que eso conlleva a la hora de realizar estudios genéticos y realizar extrapolaciones al ser humano. Pueden exponerse fácilmente a químicos disruptores endocrinos en agua, en diferentes estadios durante su ciclo de vida, y muestran una sensibilidad medible a los disruptores endocrinos (Van Den Belt et al., 2001; Orn et al., 2003; McGonnell y Gowkes, 2006).



En la OECD y en otros organismos oficiales, podemos encontrar multitud de directrices relacionadas con el análisis de sustancias químicas con potencial estrogénico, donde recomiendan el uso del pez cebra como modelo experimental (OECD número 204, 210, 212), así como en el anexo I de la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos donde se recoge al pez cebra dentro de los animales criados para su utilización en procedimientos experimentales.

Son muchos los autores que han utilizado esta especie para estudiar la acción endocrina de distintas sustancias químicas como el cadmio, los metales pesados y los disruptores estrogénicos (Blechinger et al., 2002; Hallare et al., 2005; Richetti et al., 2011; Molina et al., 2013; Lora et al., 2016; Barasona et al., 2017).

Entre las sustancias disruptoras endocrinas podemos destacar el BPA, que es un pequeño monómero estrogénico, que fue desarrollado como estrógeno sintético en 1890 y cuyo primer efecto descrito fue tener una eficacia similar a los estrógenos en la estimulación del sistema reproductor femenino de la rata en 1930 (Doods, 1936), posteriormente fue polimerizado para producir policarbonato plástico y epoxi resinas. Así el BPA también se utiliza para recubrir latas de conserva, como aditivo en otros tipos de plástico como el PVC, en el material médico, los juguetes, las tuberías, en las botellas de agua mineral, en los biberones o en el material dental entre otros usos (Vandenberg et al., 2007; Mileva et al., 2014).

La producción anual total asciende a más de 5.16 millones de toneladas (Chemical Weekly, 2009), siendo uno de los productos químicos con mayor volumen comercial producido. El BPA tiene la eficacia del estradiol en algunos tejidos y se ha demostrado recientemente, que es capaz de unirse a receptores estrogénicos o de disminuir los niveles de estrógenos, actuando como un antiestrogénico (Vinas et al., 2012), de antagonizar la acción de la hormona tiroidea (Moriyama et al., 2002) o antagonizar una acción androgénica (Lee et al., 2003) entre otros efectos en el sistema nervioso, páncreas endocrino o sistema inmune (Rochester, 2013).

Existen distintas vías de exposición en humanos, como son la dieta, la vía inhalatoria o la dérmica entre otras (Vandenberg et al., 2012), es por tanto que la presencia de BPA en productos de consumo ha generado preocupación por sus efectos potencialmente adversos sobre la salud reproductiva, y por sus efectos biológicos en niveles de exposición ambientalmente relevantes, lo que podría implicar importantes consecuencias para la salud pública (EFSA 2015).

Hasta hace unos años, se ha considerado al BPA como un estrógeno débil medioambiental, debido a que, en algunos ensayos, el BPA resultó de 10.000 a 100.000 veces menos potente que el estradiol (Welshons et al., 2003), utilizándose como afirmación común entre los diversos autores que el BPA tiene una actividad estrogénica débil en sistemas *in vivo* e *in vitro* (Snyder et al., 2002). Sin embargo, estudios sobre mecanismos moleculares

han revelado una variedad de rutas a través de las cuales el BPA puede estimular una respuesta celular a muy bajas dosis (Welshons et al., 2006).

Los efectos de dosis bajas de disruptores endocrinos como el BPA están mediados por las vías de señalización endocrina que han evolucionado para actuar como potentes amplificadores, teniendo como resultado la aparición de cambios importantes en la función celular (Welshons et al., 2003).

La acción del BPA como disruptor neuroendocrino ha sido ampliamente estudiada (Molina et al., 2013; Gimenez et al., 2016; Jedeon et al., 2016; Lora et al., 2016; Rhaman et al., 2016; Barasona et al., 2017). Debido a su importancia como contaminante medioambiental y fundamentalmente como contaminante acuático, en este trabajo propusimos evaluar los efectos en la regulación iónica de los peces, mediante el estudio de las células cloro y prolactínicas.

Las concentraciones de BPA a las que se han expuesto los peces se han mantenido mediante un sistema de flujo continuo en el agua de acuarios, logrando mantenerse de forma constante la exposición a 1, 10, 100 y 1000 µg/l de BPA, dosis muy similares a las empleadas por diferentes autores en diversas especies de peces (Mandich et al., 2007; Molina et al., 2013; Yang et al., 2015, Lora et al., 2016). Coincidiendo con los datos indicados en los estudios de estos autores, no se produjo mortalidad durante el período de exposición a BPA. Tampoco se obtuvieron diferencias con respecto al peso y

longitud de los animales después del período de estudio, coincidiendo con lo observado por Mandich et al. (2007).

En nuestro estudio, encontramos que el BPA se acumula en los tejidos de los peces, detectando unas concentraciones que van aumentando a medida que la concentración de BPA a la que han sido expuestos los peces es mayor. Nuestros valores oscilan desde  $0,0465 \pm 0,005 \mu\text{g/l}$  al ser expuestos a  $1 \mu\text{g/l}$  de BPA, hasta valores de  $29,5617 \pm 4,076 \mu\text{g/l}$  a dosis de  $1000 \mu\text{g/l}$  de BPA. Estos resultados son muy similares a los obtenidos por Mandich et al. (2007) en su estudio en carpas, en el que utilizando las mismas dosis de BPA que nosotros obtuvieron unas concentraciones similares, con unos valores de  $0,23 \pm 0,032 \mu\text{g/l}$ ,  $1,79 \pm 0,68 \mu\text{g/l}$  y  $24,47 \pm 10,15 \mu\text{g/l}$ , al exponer a las carpas a dosis de 10, 100 y  $1000 \mu\text{g/L}$  respectivamente, siendo casi idénticas a las obtenidas en nuestro estudio, en peces cebra expuestos a  $1000 \mu\text{g/l}$  de BPA, y no llegando a detectar concentración alguna en las carpas expuestas a la dosis de  $1 \mu\text{g/l}$  de BPA.

Para entender qué acontece en las células adenohipofisarias, en este trabajo fue necesario primero analizar lo que ocurría en las branquias. Tal y como describió Marcato et al. (2014), las branquias son el objetivo principal de muchos contaminantes acuáticos, por estar en contacto directo y permanente con las sustancias químicas que están disueltas en el agua, ya que son el principal sitio de intercambio gaseoso y donde se lleva a cabo la regulación iónica, que conlleva una serie de mecanismos que permite

mantener el balance iónico entre el cuerpo y el ambiente externo y siendo las branquias el principal lugar del intercambio activo de iones.

Los disruptores endocrinos afectan al sistema branquial, y por tanto a la regulación iónica debido al contacto directo de la superficie de las branquias con los mismos, siendo estas, biomarcadores adecuados de la contaminación acuática (Bernet et al., 1999). Las branquias de los peces muestran respuestas limitadas a una amplia gama de estímulos físico-químicos medioambientales, y en relación a esto, son consideradas como biomarcadores generales no específicos. Los daños histológicos observados en las branquias de los peces están reconocidos como un método rápido y válido de determinar los daños causados por la exposición a diferentes contaminantes (Arellano et al., 1999; Faheem et al., 2016). Perry y Laurent (1993) sugirieron que estas alteraciones morfológicas de las branquias que ocurrían durante cambios medioambientales es una forma adaptativa que trata de conservar las funciones fisiológicas de las branquias. Por tanto, es necesario evaluar el daño tisular para obtener información sobre el potencial compensatorio y su influencia en la homeostasia de los peces. Manera et al. (2016) en su estudio reflejó la necesidad de realizar un examen histopatológico de las branquias, así como un estudio morfométrico para poder evaluar la consecuente alteración en las branquias.

En el análisis de las branquias de los animales de nuestro estudio, se observaron modificaciones vasculares en las lamelas respiratorias primarias y secundarias, con un incremento de capilares hiperémicos que evolucionó

en un edema severo al aumentar la dosis a la que se expusieron los animales, mientras que las células cloro sufrieron una vacuolización del citoplasma acompañada de un aumento importante de su tamaño.

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por otros autores, quienes, tras la exposición a BPA, también describieron imágenes con edema, hiperplasia e hipertrofia (Barišić et al., 2015; Faheem et al., 2016), cuyo daño se incrementaba a medida que se incrementó la concentración de metales pesados y BPA, respectivamente.

Barišić et al. (2015) en su estudio compararon las alteraciones histopatológicas presentes en las branquias de especies habitantes de distintos ríos con un alto índice de contaminación con metales pesados y entre los cuadros lesionales que describió, destaca la aparición de alteraciones circulatorias como congestión o edema interlamelar, así como la hipertrofia e hiperplasia del epitelio branquial acompañado de algunas zonas de necrosis.

Elshaer et al. (2013) observó necrosis celular tras una exposición a 50 µg/l a BPA durante 15 días, observando también necrosis en las lamelas branquiales secundarias tras 30 días de tratamiento. Los cambios progresivos, como la hiperplasia y la hipertrofia de las células epiteliales, podría incrementar el grosor epitelial, que ensancha la distancia entre el ambiente externo y la sangre, retardando o previniendo la entrada de iones

tóxicos en el torrente sanguíneo. Esto puede ser considerado como medidas generales de seguridad contra tóxicos (Elshaer 2013; Barišić et al., 2015).

Otros autores han descrito la aparición de cambios histológicos degenerativos así como alteraciones circulatorias en distintas especies de peces de agua dulce como el pez cebra (*Danio rerio*), la carpa prusiana (*Carassius gibelio*) o el pez gato africano (*Clarias batrachus*), tras la exposición a diferentes metales como el Cd, Cu, Pb y Zn (Campagna et al., 2008; Velcheva et al., 2010; Khan et al., 2011; Wani et al., 2011; Das y Gupta., 2012; Sheriff et al., 2012).

De igual modo, Faheem et al. (2016) en su estudio describieron la aparición de signos degenerativos en las branquias de Carpa India (*Catla catla*) expuestas a concentraciones ascendentes de BPA, incrementándose la severidad de estas lesiones a medida que se incrementaba la concentración de BPA. Estas lesiones incluyeron hiperplasia y fusión de las lamelas secundarias en los animales expuestos a dosis más bajas así como necrosis y degeneración de las lamelas primarias en los peces expuestos a dosis altas.

Otros autores como Mazon et al. (2002), describieron cambios similares en el epitelio branquial de peces de agua dulce, *Prochilodus scrofa* tras exponerlos a distintas dosis de cobre.

En el epitelio branquial cabe destacar la presencia de las células osmorreguladoras cloro, que desempeñan un papel fundamental en la regulación iónica secretando NaCl, participando en el balance ácido base, regulación iónica y procesos de aclimatación (Daborn et al., 2001; Biagini et al., 2009), siendo esenciales en peces marinos para eliminar el exceso de iones (McCormick, 1995; Barasona et al., 2017).

Al analizar las células cloro de las muestras de nuestro estudio, se observó un incremento en el número de células cloro en los grupos de 10 y 100  $\mu\text{g/l}$  debido a la hiperplasia, pero disminuyeron en el grupo de 1000  $\mu\text{g/l}$ , probablemente también debido al agotamiento de estas células.

En relación con el tamaño de las células cloro, en los grupos de 10 y 100  $\mu\text{g/l}$ , aumentó debido a la dilatación del canal intracelular, que se mantuvo en el grupo expuesto a 1000 $\mu\text{g/l}$ , en el que había una dilatación total del mismo probablemente debido al agotamiento, que podría acabar causando la pérdida de la funcionalidad por excesiva dilatación.

Coincidiendo con nuestros resultados, Li (2007) observó la aparición de más del doble de casos de apoptosis de células cloro en Tilapias expuestas a 3.2  $\mu\text{l}$  de Cu durante un periodo de 28 días, así como un incremento significativo de necrosis en dichas células.

BariŠic et al. (2015) describieron en su estudio una hiperplasia severa de las células cloro en un alto porcentaje de los peces estudiados



procedentes de los ríos con alto nivel de contaminación por metales pesados, así como hiperplasia severa de las células epiteliales y mucosas, lo que describieron como un mecanismo de defensa a la entrada de tóxicos.

Con estos resultados podemos determinar que aunque las alteraciones histopatológicas ocurridas en las branquias no son respuestas específicas ante diferentes contaminantes, podrían indicar diferentes tipos y sitios de contaminación en los sistemas de agua dulce tal y como han descrito previamente otros autores (Jabeen y Chaudhry, 2013; BariŠic et al., 2015), para los que cambios histopatológicos en las branquias demostraron que estas eran un biomarcador adecuado para determinar el nivel de contaminación del agua en estudios de monitorización.

El BPA afectaría seriamente al sistema branquial de los peces y a su regulación iónica, hecho que hemos observado en el análisis histopatológico de las branquias y que ha sido descrito por diversos autores (Elshaer et al., 2013; BariŠic et al., 2015). Hemos observado que una exposición continua con este compuesto puede desencadenar progresivamente lesiones serias y evidentes en las branquias, aunque se debe recordar que la afectación de las gónadas e hipófisis causada por disruptores endocrinos puede favorecer las alteraciones branquiales tal y como han descrito varios autores (Hirano et al., 1986; Manzon, 2002; Pierce et al., 2007). De cualquier modo, ambos factores están estrechamente relacionados.

Analizando las células prolactínicas hipofisarias, observamos que las granulaciones son el componente que marca el agotamiento celular debido a la falta de actividad en las células cloro a las que regulan. Estas células actúan como todas las células endocrinas y acumulan gran cantidad de hormonas en sus gránulos, que no son capaces de utilizar. Se produce una degradación en el gránulo mismo, llamado crinofagia o autólisis, que es probablemente la razón por la que hemos observado gran cantidad de autofagosomas en los grupos con las concentraciones más altas de exposición.

La activación de las células prolactínicas está definida por la hipertrofia, que es debida al incremento generalizado en todos los componentes celulares, al incremento nuclear y, especialmente, al gran desarrollo de los organoides metabólicos, que resultan en un gran número de gránulos de secreción. Es bastante curioso que la activación de la granulación no se expresó únicamente por el incremento en el número, sino también en profundos cambios en la morfología. Por tanto, hemos descrito una relación directa entre estos gránulos pleomórficos y el complejo de Golgi, y largos depósitos de gránulos grandes, esféricos y densos en la periferia citoplasmática. En la cuantificación de las células prolactínicas se produjo un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en su número en los grupos de exposición de 10 y 100  $\mu\text{g/l}$  con respecto al control debido a la hiperplasia, difiriendo de lo que fue observado en un estudio en ratas en el que el número de células prolactínicas se vio modificado aunque no de manera significativa (Velasco-Marinero et al., 2011), así como una ligera disminución el grupo de 1000  $\mu\text{g/l}$

respecto al de 100 µg/l posiblemente debido al agotamiento, lo que se corresponde con lo descrito por Velasco-Marinero et al. (2011), que observaron un aumento de células prolactínicas en la hipófisis de rata expuestas a BPA en los grupos expuestos a dosis mayores, aunque sus diferencias no fueron significativas.

Existió un incremento en el diámetro medio celular en los grupos de 10 y 100 µg/l, que fue más evidente en el grupo de 100µg/l debido a la hipertrofia, y una disminución del tamaño en el grupo de 1000 µg/l, probablemente porque estas no recibieron ningún estímulo hormonal desde los testículos, provocándose una disminución de la capacidad secretora, causando esto autofagia.

Las células prolactínicas hipofisarias juegan un papel crucial en la regulación central de la reproducción de la mayoría de los vertebrados. Aunque, esto podría ser seriamente modificado por los disruptores endocrinos y podría ser una de las razones de infertilidad producida por estos compuestos. Posibles modificaciones de las células prolactínicas son escasamente conocidas en estas concentraciones de exposición, aunque su participación en procesos patológicos ha sido descrita (Winiewsky et al., 2015, Barasona et al., 2017).

La reacción y evolución de las células prolactínicas fue muy significativa y ha evolucionado de manera paralela a las alteraciones descritas en las branquias. Todo esto, la hipertrofia e hiperplasia reactiva por

un lado y por el otro, la atrofia e hipoplasia con la que las células prolactínicas terminan, se corresponde a las fases, primero, de la activación celular y segundo, a los procesos degenerativos de las células branquiales. (Goloubkova et al., 2000; Velasco-Marinero et al., 2011; Barasona et al., 2017).

Por todo ello, puede deducirse que, en una primera instancia, el BPA tiende a alterar el sistema branquial, y este reacciona activando las células cloro, que están influenciadas por la acción hormonal de las células prolactínicas. Cuando la exposición a BPA es a concentraciones muy altas (100 y 1000  $\mu\text{g/l}$ ), se produce un agotamiento defensivo de las branquias debido a alteraciones circulatorias severas y degradación de las células cloro, haciendo la regulación hipofisaria imposible, lo que puede ser considerado, como la causa principal de la inversión funcional de las células prolactínicas.





## 6. Conclusiones



## 6.- Conclusiones

**Primera:** El pez cebra (*Danio Rerio*) puede ser considerado como un biomodelo idóneo para el estudio de los efectos tóxicos del BPA, debido a la posibilidad que ofrece de poder evaluar los distintos biomarcadores relacionados con la disrupción endocrina, así como, los efectos causados por la contaminación acuática, siendo las branquias uno de los órganos de elección para la biomonitorización de la contaminación de aguas.

**Segunda:** En los peces expuestos durante 14 días a concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 µg/l en agua se produce una acumulación del BPA en los tejidos, existiendo una correlación entre estos niveles de BPA, y la concentración de BPA a la que estuvieron expuestos. Estas diferencias son estadísticamente significativas al comparar el último lote de estudio (1000 µg/l) con respecto al control y al resto de lotes.



**Tercera:** La exposición durante 14 días al BPA produce alteraciones a nivel hipofisario, que hace que a la mayor concentración de exposición (1000 µg/l) se generen lesiones que podrían llegar a ser irreversibles al perder las células prolactínicas su funcionalidad, observándose en estas un proceso degenerativo en todos los grupos expuestos a BPA, tanto mediante microscopía óptica como electrónica.

**Cuarta:** El BPA afecta de forma severa al sistema branquial de los peces observándose en el análisis histopatológico de las branquias modificaciones severas a nivel vascular, lo que provoca la degeneración de las lamelas respiratorias, así como a nivel celular, con el agotamiento de las células cloro, lo que podría comprometer de manera grave la regulación iónica.

**Quinta:** En el estudio morfométrico y estereológico de las células prolactínicas así como, en el de las células cloro, se produce un incremento del número y diámetro de ambos tipos de células a medida que aumentan los niveles de BPA, produciéndose en el grupo expuesto a la mayor concentración (1000 µg/l), una disminución del número de las mismas respecto al grupo expuesto a 100 µg/l , que sería debido al agotamiento de las células. En ambos casos existieron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo control.

**Sexta:** La exposición a BPA provoca cambios morfológicos en las células cloro, que estarían influenciadas por la acción hormonal de las células prolactínicas, y que se ven intensificados a medida que la concentración de exposición aumenta. Estas modificaciones, conllevarían una serie de alteraciones en las células prolactínicas, que pretenden compensar la hipofuncionalidad de las células cloro con la finalidad de mantener un adecuado funcionamiento branquial y, por tanto, garantizar la regulación iónica.

**Séptima:** La exposición a BPA a concentraciones muy elevadas (100 y 1000  $\mu\text{g/l}$ ), produce un agotamiento defensivo de las branquias debido a alteraciones circulatorias severas y degradación de las células cloro, inhibiendo la regulación hipofisaria, lo que puede ser considerado como la causa principal de la inversión funcional de las células prolactínicas. Por ello se deduce, que el BPA puede afectar al sistema branquial de manera tan severa que su acción no puede ser compensada a nivel hipofisario, y por tanto, la regulación iónica podría verse afectada.





## 7. Resumen



## 7.- Resumen

El Bisfenol A (BPA) es uno de los productos químicos producido en mayor volumen en el mundo. Es comúnmente utilizado como un componente de plásticos y envases de alimentos, y puede actuar como xenoestrógeno en animales y humanos. Posee actividad endocrina, lo que hace que sea capaz de desencadenar, en células diana, una respuesta semejante a la de las hormonas endógenas, o de inhibir esta respuesta ejerciendo un efecto antagónico. Debido al riesgo de exposición al BPA desde el medio ambiente y la dieta, y principalmente como contaminante acuático, nuestro objetivo ha sido el de evaluar los efectos del BPA en la regulación iónica mediante el estudio histopatológico y morfométrico de las células cloro y las células prolactínicas en pez cebra (*Danio rerio*) como modelo experimental.

Para este estudio se utilizaron 60 machos de pez cebra (*Danio rerio*), que fueron distribuidos aleatoriamente en 5 grupos (n=12/grupo), un grupo control, y cuatro grupos tratados, expuestos a concentraciones graduales de 1, 10, 100 y 1000 µg/l de BPA, respectivamente. Tras dos semanas, los animales fueron sacrificados y se tomaron muestras de branquias e hipófisis para su posterior análisis histopatológico, así como, para la determinación de los niveles de BPA presentes en los animales.

Al analizar las muestras observamos una acumulación del BPA en los tejidos, existiendo una correlación entre estos niveles de BPA, y la concentración de BPA a la que los animales estuvieron expuestos.

En el estudio estructural y ultraestructural de la hipófisis, observamos como el grupo que fue expuesto a 10 µg/l de BPA mostró ciertas modificaciones con respecto al grupo control, observándose una activación de las células prolactínicas con un incremento de los gránulos de secreción. Los grupos de mayor concentración de exposición (100 y 1000 µg/l), esta activación fue más marcada y estuvo acompañada de la aparición de autofagosomas que podría hacer pensar en la autodestrucción celular, apareciendo signos evidentes de degeneración.

Al analizar las branquias se observó cómo, a partir del grupo de 10 µg/l ya empiezan a aparecer modificaciones histológicas, con la mayoría de los capilares hiperémicos e incrementándose tanto en tamaño como en número las células de cloro, siendo estas modificaciones más severas en los grupos de 100 µg/l y 1000 µg/l

En conclusión, nuestros resultados indican que la exposición al BPA produce modificaciones en las células de cloro que desencadenan una serie de alteraciones en las células prolactínicas. Estas alteraciones intentarían compensar la hipofuncionalidad de las células de cloro, para tratar de mantener un funcionamiento branquial adecuado y garantizar así la regulación iónica. Las alteraciones encontradas, fueron tan severas en los grupos de mayor concentración, que fue imposible su compensación por parte de las células prolactínicas, siendo esta la principal causa de la involución funcional de estas células hipofisarias. Deduciéndose, por tanto, que el BPA afectaría al sistema branquial de una forma tan severa que, al no poder ser compensada su acción a nivel hipofisario, la regulación iónica se podría ver afectada.







## 8. Abstract



## **8.- Abstract**

Bisphenol A (BPA) is a chemical being produced in very large quantities in the world because it is commonly used as a component of plastics and food packaging. It has been shown that BPA can act as a xenoestrogen in humans and other animals. It has activity as an endocrine disruptor, interfering with the functions of endogenous hormones, which can trigger a similar response in the target cells, or inhibit this response by exerting an antagonistic effect. In June 2017, the European Union included BPA within their list of highly worrisome chemicals and for March 1, 2018 all manufacturers, importers and suppliers of BPA must classify and label all chemical mixtures containing BPA as a category 1B toxic for reproduction,

In light of the risk of exposure to it from the environment, diet, and as a basic water pollutant, the objective of our study was to assess possible effects

on ionic regulation after exposure to BPA by means of a histopathological and morphometric study of the chloride and prolactin cells using zebrafish (*Danio rerio*) as an experimental model.

For this study 60 male zebrafish (*Danio rerio*) were used. These were randomly allocated into 5 study groups (n = 12 / group), a control group, and four treated groups, exposed to increasing concentrations of 1, 10, 100 and 1000 µg/l of BPA, respectively. After two weeks, the animals were sacrificed and samples of their gills and pituitary glands were immediately taken for further histopathological analysis, as well as, for the determination of BPA levels present in their tissues.

When analyzing the samples, we observed an accumulation of BPA in the tissues. There was an increasing concentration of BPA in the tissue as the concentration of exposure increased. Therefore there was a direct correlation between the levels of BPA and the concentration of BPA to which the animals were exposed.

In the structural and ultrastructural study of the pituitary gland, we observed certain modifications with respect to the control group. On the group exposed to 10 µg/l of BPA we observed an activation of the prolactin cells with an increase of secretion granules. Whereas in the groups exposed to higher concentrations (100 and 1000 µg/l), this activation was more evident and was accompanied by the development of autophagosomes, which could indicate cell self-destruction, with evident signs of degeneration.

When analyzing the gills, we observed how histological modifications appeared, with a large amount of hyperemic capillaries and an increase in both, size and number of chlorine cells, the group exposed to 10 µg/l of BPA. These modifications were more severe in the groups exposed to 100 µg/l and 1000 µg/l, respectively.

In conclusion, our results indicate that exposure to BPA produces changes in chlorine cells that trigger a series of alterations in prolactin cells. These modifications may try to compensate for the hypofunctionality of the chlorine cells, to try to maintain an adequate gill function and thus guarantee ionic regulation. The alterations found were so severe in the groups exposed to higher concentration that it was impossible to compensate for them by the prolactin cells, this being the main cause of the functional involution of these pituitary cells. Therefore it is inferred, that BPA would affect the gill system in such a severe way that, since its action cannot be compensated at the pituitary level, the ionic regulation would be affected.





## 9. Referencias Bibliográficas





## 9. - Referencias Bibliográficas

Aarab, N., Lemaire-Gony, S., Unruh, E., Hansen, P.D., Larsen, B.K., Andersen, O.K. Preliminary study of responses in mussel (*Mytilus edulis*) exposed to bisphenol A, diallyl phthalate and tetrabromodiphenyl ether. *Aquatic Toxicology* 78: 86-92 (2006).

Akimenko, M.A., Mari-Beffa, M., Becerra, J., Geraudie, J. Old questions, new tools, and some answers to the mystery of fin regeneration. *Dev Dyn.* 226(2): 190-201 (2003).

Akingbemi, B.T., Sottas, C.M., Koulova, A.I., Klinefelter, G.R., Hardy, M.P. Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion

- and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology*. 145 (2): 592-603 (2004).
- Al-Hiyasat, A. S., Darmani, H. and Elbetieha, A. M. Leached components from dental composites and their effects on fertility of female mice. *European Journal of Oral Sciences*. 112: 267– 272 (2004).
- Aleström, P., Holter, J.L., Nourizadeh-Lillabadi, R. Zebrafish in functional genomics and aquatic biomedicine. *Trends Biotechnol*. 24(1):15-21 (2006).
- Aloisi, A.M., Della Seta, D., Rendo, C., Ceccarelli, I., Scaramuzzino, A., Farabollini, F. Exposure to the estrogenic pollutant bisphenol A affects pain behavior induced by subcutaneous formalin injection in male and female rats. *Brain Research*. 937 (1-2): 1- 7 (2002).
- Alonso-Magdalena, P., Morimoto, S., Ripoll, C., Fuentes, E., Nadal, A. The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environmental Health Perspectives*. 114: 106-112 (2006).
- Alonso-Magdalena, P., Ropero, A.B., Carrera, M.P., Cederroth, C.R., Baquié, M., Gauthier, B.R., Nef, S., Stefani, E., Nadal, A. Pancreatic insulin content regulation by the estrogen receptor ER alpha. *Plos One*. 3 (4): 2069 (2008).
- Aluru, N., Leatherland, J.F., Vijayan, M.M. Bisphenol A: in oocytes leads to growth suppression and altered stress performance in juvenile rainbow trout. *Plos One*. 5(5) (2010).

- Amsterdam, A., Nissen, R.M., Sun, Z., Swindell, E.C., Farrington, S., Hopkins, N. Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101(35): 12792-12797 (2004).
- Andrade-Ribeiro, A.L.F.A., Pacheco-Ferreira, A., Nóbrega da Cunha, C.L., Mendes- Kling, A.S. Disruptores endocrinos: potencial problema para la salud pública y medio ambiente. *Rev. Biomédica*. 17: 146-150 (2006).
- Arellano, J.M., Storch, V., Sarasquete, C. Ultrastructural and histochemical study on gills and skin of the Senegal sole, *Solea senegalensis*. *J. Appl. Ichthyol*. 20: 452-460 (2004).
- Arukwe, A., Celius, T., Walther, B.T., Goksøyr, A. Effects of xenoestrogen treatment on zona radiata protein and vitellogenin expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat Toxicol*. 49: 159-170 (2000).
- Barasona, M. I., Molina, A., Blanco, A., Ayala, N., & Moyano, R. Assessment of the effects of bisphenol-A as a disruptor on ionic regulation in *Danio rerio* zebrafish through a study of their chloride and prolactin cells. *Acta Adriatica: international journal of Marine Sciences*. 58(1): 105-115 (2017).
- Barišić, J., Dragun, Z., Ramani, S., Marijić, VF., Krasnići, N., Čož-Rakovac, C., Kostov, V., Rebok, K., Jordanova, M. Evaluation of histopathological alterations in the gills of Vardar chub (*Squalius*

- vardarensis Karaman*) as an indicator of river pollution. *Ecotox Environ Safe*. 118: 158–166 (2015).
- Bartels, H., Docker, M., Krappe, M., White, M., Wrede, C., Potter, I. Variations in the presence of chloride cells in the gills of lampreys (Petromyzontiformes) and their evolutionary implications. *J Fish Biol*. 86: 1421-8 (2015).
- Basheer, C., Lee, H.K., Tan, K.S. Endocrine disrupting alkylphenols and bisphenol A in coastal waters and supermarket seafood from Singapore. *Marine Pollution Bulletin*. 48: 1145-1167 (2004).
- Behnisch, P.A., Fujii, K., Shiozaki, K., Kawakami, I., Sakai, S. Estrogenic and dioxin-like potency in each step of a controlled landfill leachate treatment plant in Japan. *Chemosphere*. 43: 977-984 (2001).
- Beis, D., Stainier, D.Y. In vivo cell biology: following the zebrafish trend. *Trends in Cell Biology*. 16(2): 105-112 (2006).
- Belfroid, A.C., Van der Horst, A., Vethaak, A.D., Schafer, A.J., Rijs, G.B., Wegener, J., Cofino, W.P. Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *Sci Total Environ*. 12; 225 (1-2): 101-8 (1999).
- Ben-Jonathan, N., LaPensee, C.R., LaPensee, E.W. What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr. Rev*, 29: 1-41(2008).
- Ben-Jonathan, N., Hugo, E.R., Brandebourg, T.D. Effects of bisphenol A on adipokine release from human adipose tissue: Implications for the

- metabolic syndrome. *Molecular and Cellular Endocrinology* 304: 49-54 (2009).
- Benachour, N., Aris, A. Toxic effects of low doses of bisphenol-A on human placental cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 241: 322–328 (2009).
- Berg, G., Halldin, K., Brunstrom, B. Effects of bisphenol A and tetrabromobisphenol A on sex organ development in quail and chicken embryos. *Environmental Toxicology Chemical*. 20: 2836-2840 (2001).
- Berge, T.L., Lygre, G.B., Jönsson, B.A., Lindh, C.H., Björkman, L. Bisphenol, A., concentration in human saliva related to dental polymer-based fillings. *Clin Oral Investig.* 1-8 (2017).
- Bernet, D., Schmidt, H., Meier, W., Burkhardt-Holm, P., Wahli, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J Fish Dis* 22: 25–34 (1999).
- Bhandari, R., Deem, S., Holiday, D., Jandegian, C., Kassotis C., Nagel, S., Tillitt, D., Vom Sall, F., Rosendeld, C. Effects of the environmental estrogenic contaminants bisphenol A and 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol on sexual development and adult behaviors in aquatic wildlife species. *Gen Comp Endocrinol.* 214: 195-219 (2015).
- Bhat, A. Diversity and composition of freshwater fishes in streams of Central Western Ghats, India. *Environ Biol Fishes.* 68: 25–38 (2003).

- Biagini, F.R., De Oliveira, D.J.A., Fontanetti, C.S. The use of histological, histochemical and ultramorphological techniques to detect gill alterations in *Oreochromis niloticus* reared in treated polluted waters. *Micron*. 40(8): 839-44 (2009).
- Biddinger, S.B., Kahn, C.R. From mice to men: insights into the insulin resistance syndromes. *Annual Review of Physiology* 68: 123-158 (2006).
- Biello, D. Plastic (not) fantastic: Food containers leach a potentially harmful chemical. *Scientific American* 2. (2008).
- Bishop, PL. *Pollution Prevention: Fundamentals and Practice*. Boston, McGraw-Hill (2000).
- Bjerregaard, L.B., Madsen, AH.,Korsgaard, B., Bjerregaard, P. Gonad histology and vitellogenin concentrations in brown trout (*Salmo trutta*) from Danish streams impacted by sewage effluent. *Ecotoxicology*. 15 (3): 315-327 (2006).
- Bjorksten, B. Environment and infant immunity. *Proceedings of the Nutrition Society*. 58: 729-732 (1999).
- Blechinger, S.R., Warren Jr, J.T., Kuwada, J.Y., Krone, P.H. Developmental toxicology of cadmium in living embryos of a stable transgenic zebrafish line. *Environmental health perspectives*. 110(10): 1041 (2002).

- Bouilly, J., Sonigo, C., Auffret, J., Gibori, G., Binart, N. Prolactin signaling mechanisms in ovary. *Mol.Cell.Endocrinol.* 356: 80-87 (2012).
- Brede, C., Fjeldal, P., Skjevrak, I., Herikstad, H. Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing,boiling and brushing. *Food Addit Contam* 20: 684-689 (2003).
- Breves, J.P., McCormick, S.D., Karlstrom, R.O. Prolactin and teleost ionocytes: new insights into cellular and molecular targets of prolactin in vertebrate epithelia *Gen. Comp. Endocrinol* (2014).
- Briggs, J.P. The zebrafish: a new model organism for integrative physiology. *Am. J.Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 282: R3-R9 (2002).
- Brissova,M., Fowler,M.J., Nicholson,W.E., Chu,A., Hirshberg, B., Harlan, D.M., Powers, A.C. Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. *Journal Histochemistry and Cytochemistry* 53: 1087-1097 (2005).
- Burr, M., Butland, B., King, S., Vaughan-Williams, E. Changes in asthmatic prevalence: Two surveys 15 years apart. *Archives of Disease in Childhood* 64: 1452-1456 (1989).
- Bushnik, T., Haines, D., Levallois, P., Levesque, J., Van Oostdam, J., Viau, C. and bisphenol A concentrations in the Canadian population. *Health Rep.* 21(3): 7-18. (2010).



- Buysch, HJ. Bisphenols. *Industrials organic chemicals*, vol. 6: 3768-3774 (1999).
- Cabrera, O., Berman, D.M., Kenyon, N.S., Ricordi, C., Berggren, P.O., Caicedo, A. The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 2334-2339 (2006).
- Calafat, A.M., Kuklennyik, Z., Reidy, J.A., Caudill, S.P., Ekong, J., Needham, L.L. Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environmental Health Perspectives*. 113: 391-395 (2005).
- Calafat, A.M., Weuve, J., Ye, X., Jia, L.T., Hu, H., Ringer, S., Huttner, K., Hauser, R. Exposure to bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants. *Environmental Health Perspectives*. 117 (4): 639-644 (2009).
- Campagna, A.F., Fracácio, R., Rodrigues, B.K., Eler M.N. Effects of the copper in the survival, growth and gill morphology of *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae) *Acta Limnol. Bras.* 20: 253- 259 (2008).
- Canesi, L., Fabbri, E. Environmental Effects of BPA: Focus on Aquatic Species. *Dose Response*. 28: 13(3) (2015).
- Cao, X.L., Corriveau, J. Migration of bisphenol A from polycarbonate baby and water bottles into water under severe conditions. *Journal Agriculture Food Chemical*. 56 (15): 6378-6381 (2008).

- Cao, X.L., Dufresne, G., Belisle, S., Clement, G., Falicki, M., Beraldin, F., Rulibikiye, A. Levels of bisphenol A in canned liquid infant formula products in Canada and dietary intake estimates. *Journal Agriculture Food Chemical* 56 (17): 7919-7924 (2008).
- Cargouët, M., Perdiz, D., Mouatassim-Souali, A., Tamisier-Karolak, S., Levi, Y. Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Sci Total Environ.* 25; 324(1-3): 55-66 (2004).
- Carvan, M.J., Gallagher, E.P., Gosoir, A., Hahn, M., Larsson, D.G. Fish models in toxicology. *Zebrafish* 4(1): 9-20 (2007).
- Cerqueira, C.C., Fernandes, M.N. Gill tissue recovery after copper exposure and blood parameter responses in the tropical fish *Prochilodus scrofa*. *Ecotoxicol Environ Saf.* 52(2): 83-91 (2002).
- Cheng, S.Y. Thyroid hormone receptor mutations and disease: beyond thyroid hormone resistance. *Trends Endocrinology and Metabolism* 16 (4): 176-82 (2005).
- Chichizola, C. Disruptores endocrinos. Efectos en la reproducción. *RAEM.*, 40: 172-188 (2003).
- Chitra, K.C., Latchoumycandane, C., Mathur, P.P. K.C. Induction of oxidative stress by bisphenol A in the epididymal sperm rats. *Toxicology* 185: 119-127 (2003).

- Conolly, RB. Commentary on “Toxicity testing in the 21st century: implications for human health risk assessment” by Krewski et al. *Risk Anal.* 29(4):480–481 (2009).
- Corrales, J., Kristofco, L.A., Steele, W.B., Yates, B.S., Breed, C.S., Williams, E.S., Brooks, B.W. Global Assessment of Bisphenol A in the Environment: Review and Analysis of Its Occurrence and Bioaccumulation. *Dose Response.* 29,13-(3) (2015).
- Cousins, I.T., Staples, C.A., Klecka, G.M., Mackay, D. A multimedia assessment of the environmental fate of bisphenol A. *Human and Ecological Risk Assessment* 8 (5): 1107-1135 (2002).
- Covaci, A., Den Hond, E., Geens, T., Govarts, E., Koppen, G., Frederiksen, H., Knudsen, L.E., Mørck, T.A., Gutleb, A.C., Guignard, C., Cocco, E., Horvat, M., Heath, E., Kosjek, T., Mazej, D., Tratnik, J.S., Castaño, A., Esteban, M., Cutanda, F., Ramos J.J., Berglund, M., Larsson, K., Jönsson, B.A., Biot, P., Casteleyn, L., Joas, R., Joas, A., Bloemen, L., Sepai, O., Exley, K., Schoeters, G., Angerer, J., Kolossa-Gehring, M., Fiddicke, U., Aerts, D., Koch, HM. Urinary BPA measurements in children and mothers from six European member states: Overall results and determinants of exposure. *Environ Res.* 141:77-85 (2015).
- Crain, D.A., Guillette Jr, L.J. Reptiles as models of contaminant-induced endocrine disruption. *Animal Reproduction Sciences* 53: 77-86 (1998).

- Crain, D.A., Eriksen, M., Iguchi, T., Jobling, S., Laufer, H., LeBlanc, G.A., Guillette Jr, L.J. An ecological assessment of bisphenol A: Evidence from comparative biology. *Reproductive Toxicology* 24: 225-239 (2007).
- Daborn, K., Cozzi, R.R., Marshall, W.S. Dynamics of pavement cell-chloride cell interactions during abrupt salinity change in *Fundulus heteroclitus*. *J Exp Biol.* 204(Pt 11): 1889-99 (2001).
- Das, S., Gupta, A. Effects of cadmium chloride on oxygen consumption and gill morphology of Indian flying barb, *Esomus danricus* *J. Environ. Biol.*, 33: 1057-1061 (2012).
- De Jesus, I.S., Cestari, M.M., Bezerra, M.A., Affonso, P.R. Genotoxicity Effects in Freshwater Fish from a Brazilian Impacted River. *Bull Environ Contam Toxicol* 96(4): 490-5 (2016).
- Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., Hartemann, P., Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. *Int J Hyg Environ Health.* 214(6): 442-8 (2011).
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T., Gore, A.C. Endocrinedisrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine reviews.* 30: 293-342 (2009).
- Dodds, L.W. Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature* 137:996 (1936).

- Drastichova, J., Svoboda, Z., Groenland, M., Dobsikova, R., Zlabek, V., Weissova, D. Effect of exposure to bisphenol A and 17 $\beta$ -estradiol on the sex differentiation in zebrafish (*Danio rerio*). *Acta Veterinaria Brno* 74: 287-291 (2005).
- Durando, M., Cocito, L., Rodríguez, H.A., Varayoud, J., Ramos, J.G., Luque, E.H., Muñoz de Toro, M. Neonatal expression of amh, sox9 and sf-1 mRNA in *Caiman latirostris* and effects of in ovo exposure to endocrine disrupting chemicals. *Gen Comp Endocrinol* 191: 31-38 (2013).
- Duty, S.M., Mendonca, K., Hauser, R., Calafat, A.M., Ye, X., Meeker, J.D., Ackerman, R., Cullinane, J., Faller, J., Ringer, S. Potential sources of bisphenol A in the neonatal intensive care unit. *Pediatrics*. 131(3): 483-9 (2013).
- Egli, M., Leeners, B., Kruger, T.H. Prolactin secretion patterns: basic mechanisms and clinical implications for reproduction *Reproduction*, 140: 643-654 (2010).
- Ehlert, K.A., Beumer, C.W., Groot, M.C. Migration of bisphenol A into water from polycarbonate baby bottles during microwave heating. *Food Additives and Contaminant* 25 (7): 904-910 (2008).
- Elshaer, M., Walid, A., Shaeir- Sayed, A., Bakry, A. Histopathological changes in the kidney of mosquito fish, *Gambusia Affinis* and guppy fish, *Poecilia reticulata* exposed to Bisphenol A. *Egypt. J. Aquat. Biol. & Fish.* 17: 83-93 (2013).

- En Van Zutphen L.F.M., Baumans V., Beynen A.C. Principios de la Ciencia del Animal de Laboratorio. Ed. Elsevier. 442 (1999).
- Erler, C., Novak, J. Bisphenol a exposure: human risk and health policy. *Journal of Pediatric Nursing* 25 (5): 400-407 (2010).
- European Union Risk Assessment report: Bisphenol A. Ispra, Italy: European Commission (2003).
- European Food Safety Authority Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA Journal*, 13(1): 3978 (2015).
- Evans, D.H. The fish gill: site of action and model for toxic effects of environmental pollutants *Environ Health Perspect.* 71: 47-58 (1987).
- Evans, D. H., Piermarini, P. M., Choe, K. P. The multifunctional fish gill: dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological reviews.* 85(1): 97-177 (2005).
- Facciolo, R.M., Alo, R., Madeo, M., Canonaco, M., Dessi-Fulgheri, F. Early cerebral activities of the environmental estrogen bisphenol A appear to act via the somatostatin receptor subtype sst2. *Environmental Health Perspectives* 110 (3): 397-402 (2002).
- Farabollini, F., Porrini, S., Della Seta, D., Bianchi, F., Dessi-Fulgheri, F. Effects of perinatal exposure to bisphenol A on sociosexual behavior of female and male rats. *Environmental Health Perspectives* 3: 409-14 (2002).

- Faheem, M., Jahan, N. Lone, K. Histopathological effects of bisphenol-A on liver, kidneys and gills of Indian major carp, *Catla Catla*. J. Anim. Plant Sci. 26: 514-522 (2016).
- Fan, C.Y., Cowden, J., Simmons, S.O. Padilla, S., Ramabhadran, R. Gene expression changes in developing zebrafish as potential markers for rapid developmental neurotoxicity screening. Neurotoxicol Teratol 2(1): 91-98 (2010).
- Fattore, M., Russo, G., Barbato, F., Grumetto, L., Albrizio, S. Monitoring of bisphenols in canned tuna from Italian markets. Food Chem Toxicol. 83: 68-75 (2015).
- Fathy, M., Elshaer Walid, A. Abu-Shaeir and Sayed, A. Bakry Histopathological changes in the Kidney of mosquito fish, *Gambusia affinis* and guppy fish, *Poecilia reticulata* exposed to Bisphenol A. Researchgate. (2013)
- Fent, G., Hein, W.J., Moendel, M.J., Kubiak, R. Fate of <sup>14</sup>C bisphenol A in soils. Chemosphere 51: 735-746 (2003).
- Ferguson, H.W., Girons, A., Rizgalla, G., LaPatra, S., Branson, E.J., MacKenzie, K., Davies, M., Collins, R.O., Diab, A., Crumlish, M. Strawberry disease in rainbow trout in Scotland: pathology and association with *Flavobacterium psychrophilum*. Vet Rec. 6; 158 (18):630-2 (2006).
- Fiegue, H., Heinz-Werner, V., Hamamoto, T., Umemura, S., Iwata, T., Miki, H., Fujita, Y. F., Buysch, H.J., Garbe, D., Paulus, W. Phenol

- Derivatives. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Weinheim: Wiley-VCH (2002).
- Filho, I.D.N., von Mühlen, C., Schossler, P., Caramao, E.B. Identification of some plasticizers compounds landfill leachate. *Chemosphere*. 50: 657-663 (2003).
- Fitzgerald, R.E., Wilks, M.F. Bisphenol A-Why an adverse outcome pathway framework needs to be applied. *Toxicol lett*. 230: 368-374 (2014).
- Flint, S., Markle, T., Thompson, S., Wallace, E. Bisphenol A exposure, effects and policy: A wildlife perspective. *Journal of Environmental Management* 104, 19-34 (2012).
- Folmar, L.C., Denslow, N.D., Rao, V., Chow, M, Crain, DA., Enblom, J. Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environmental Health Perspectives* 104: 1096-101 (1996).
- Fontanetti, C.S., Souza, T.S., Christofolletti, C.A. The role of biomonitoring in the quality assessment of water resources. In: Bilibio C, Hensel O, Selbach J (eds) Sustainable water management in the tropics and subtropics and cases study in Brazil. UNIPAMPA/UNIKASSEL, Brasil/Alemanha, 975–1005 (2012).



- Freeman M.E., Kanyicska B., Lerant A., Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion *Physiol. Rev*, 80: 1523-1631 (2000).
- Fu, P., Kawamura, K. Ubiquity of bisphenol A in the atmosphere. *Environ Pollut*. 158(10): 3138-43 (2010).
- Fujimaki, H., Nohara, O., Ichinose, T., Watanabe, N., Saito, S. IL-4 production in mediastinal lymph node cells in mice intratracheally instilled with diesel exhaust particles and antigen. *Toxicology* 92: 261-268 (1994).
- Furhacker, M. Bisphenol-A: emissions from point sources. *Chemosphere* 41: 751-756 (2000).
- Gatidou, G., Vassalou, E., Thomaidis, N.S. Bioconcentration of selected endocrine disrupting compounds in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Pollut Bull* 60: 2111-6 (2010).
- Gauthier, C., Griffin, G. Using animals in research, testing and teaching. *Rev Sci Tech*. 24(2): 735-45 (2005).
- Geens, T., Aerts, D., Berthot, C., Bourguignon, J.P., Goeyens, L., Lecomte, P., Maghuin-Rogister, G., Pironnet, A.M., Pussemier, L., Scippo, M.L., Van Loco, J., Covaci, A. A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food Chem Toxicol*. 50(10): 3725-40 (2012).
- Gerona, R.R., Pan, J., Zota, A.R., Schwartz, J.M., Friesen, M., Taylor, J.A., Hunt, P.A., Woodruff, T.J. Direct measurement of Bisphenol A (BPA),

- BPA glucuronide and BPA sulfate in a diverse and low-income population of pregnant women reveals high exposure, with potential implications for previous exposure estimates: a cross-sectional study. *Environ Health*. 12: 15-50 (2016).
- Gimenez, M., Molina, A., Blanco, A., Ayala, M., Moyano, R. Structural and ultrastructural evaluation of fibre muscles after exposure to Bisphenol-A, and a study of their possible recovery after treatment with platelet-rich plasma. *Veterinarski Arhiv*, 86(1): 49-64 (2016).
- Giráldez, A. Desarrollo Histórico. En *Ciencia y Tecnología en Protección y Experimentación Animal*. Ed. McGraw-Hill, Madrid (2001).
- Goloubkova, T., Ibeiro, M., Odrigues, L., Eaconello, A., Spritzer, P. Effects of xenoestrogen bisphenol A on uterine and pituitary weight, serum prolactin levels and immunoreactive prolactin cells in ovariectomized Wistar rats. *Arch Toxicol.*, 74: 92-8. (2000).
- Goodson, A., Summerfield, V., Cooper, I. Survey of bisphenol A and bisphenol F in canned foods. *Food Additives and Contaminants* 19: 796-802 (2002).
- Goodson, A., Robin, H., Summerfield, W., Cooper, I. Migration of bisphenol A from can coatings-effects of damage, storage conditions and heating. *Food Additives and Contaminants* 21 (10): 1015-1026 (2004).
- Gostner, J.M., Raggl, E., Becker, K., Überall, F., Schennach, H., Pease, J.E., Fuchs, D. Bisphenol A suppresses Th1-type

- immune response in human peripheral blood mononuclear cells in vitro. *Immunol Lett.* 168(2): 285-92 (2015).
- Gye, M.C., Kim, D.H. Bisphenol A induces hepatic vitellogenin mRNA in male *Bombina orientalis*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol* 75: 1-6 (2005).
- Hallare, A. V., Schirling, M., Luckenbach, T., Köhler, H. R., Tribskorn, R. Combined effects of temperature and cadmium on developmental parameters and biomarker responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal of Thermal Biology.* 30(1): 7-17 (2005).
- Hassanin, A., Kuwahara, S., Nurhidayat., Tsukamoto, Y., Ogawa, W. Gonadosomatic index and testis morphology of common carp (*Cyprinus carpio*) in rivers contaminated with estrogenic chemicals. *J Vet Med Sci.* 64: 921-926 (2002).
- Hatef, A., Zare, A., Alavi, S.M., Habibi, H.R., Linhart, O. Modulations in androgen and estrogen mediating genes and testicular response in male goldfish exposed to bisphenol A. *Environ Toxicol Chem.* 31: 2069-2077 (2012).
- Haubruge, E., Petit, F., Gage, M.J. Reduced sperm counts in guppies (*Poecilia reticulata*) following exposure to low levels of tributyltin and bisphenol. *Annual Proceedings Biological Science.* 1459: 2333-2337 (2000).
- Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, R.E. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences.* 86 (1): 6-19 (2005).

- Hines, C.J., Jackson, M.V., Deddens, J.A., Clark, J.C., Ye, X., Christianson, A.L., Meadows, J.W., Calafat, A.M. Urinary Bisphenol A (BPA) Concentrations among Workers in Industries that Manufacture and Use BPA in the USA. *Ann Work Expo Health.* 1;61(2): 164-182 (2017).
- Hirano, T., Ogasawara, T., Bolton, J. P., Collie, N. L., Hasegawa, S., Iwata, M. Osmoregulatory role of prolactin in lower vertebrates. *Comparative Physiology of Environmental Adaptations* 1: 112–124 (1986).
- Holdstock, G., Chastenay, B.F., Krawitt, E.L. Effects of testosterone, oestradiol and progesterone on immune regulation. *Clinical and Experimental Immunology.* 47 (2): 449-456 (1982).
- Honma, S., Suzuki, A., Buchanan, D.L. Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reprod Toxicol.* 16: 117-122 (2002).
- Howdeshell, K.L., Hotchkiss, A.K., Thayer, K.A., Vanderbergh, J.G., von Saal, F.S. Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature.* 401: 763-764 (1999).
- Howdeshell, K.L., Peterman P.H., Judy, B.M., Taylor, J.A., Orazio, C.E., Ruhlen, R.L., Welshons W.V. Bisphenol A is released from used polycarbonate animal cages into water at room temperature. *Environ Health erspect.* 111:1180–1187 (2003).
- Huang, Y., Wong, C., Zheng, J., Bouwman, H., Barra, R., Wahlstrom, B., Neretin, L., Hong, M., Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources,

environmental levels, and potential human impacts. *Environ. Int.* 42, 91–99 (2012).

Hugo, E.R., Brandebourg, T.D., Woo, J.G., Loftus, J., Alexander, J.W., Ben-Jonathan, N. Bisphenol A at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes. *Environment Health Perspectives* 116 (12): 1642-1647 (2008).

Hulak, M., Gazo, I., Shaliutina, A., Linhartova, P. In vitro effects of bisphenol A on the quality parameters, oxidative stress, DNA integrity and adenosine triphosphate content in sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 158 (2): 64-71 (2013).

Hunt, P.A., Koehler, K.E., Susiarjo, M., Hodges, C.A., Ilagan, A., Voigt, R.C., Thomas, S., Thomas, B.F., Hassold, T.J. Bisphenol a exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Curr Biol.* 1; 13(7): 546-53 (2003).

Ido, P., Uller, t., Feldmeyer, B., Harts, A., While, G.M., Wapstra E. Climate-driven population divergence in sex-determining system. *Nature* 468: 436–439 (2010).

Ike, M., Chen, M.Y., Danzl, E., Sei, K., Fujita, M. Biodegradation of a variety of bisphenols under aerobic and anaerobic conditions. *Water Science Technology* 53 (6): 153-159 (2000).

- Ingham, P.W. The power of the zebrafish for disease analysis. *Hum Mol Genet* 15(18): 107-112 (2009).
- Inokuchi, M., Breves, J., Moriyama, S., Watanabe, S., Kaneko, T., Lerner, D., Grau, E., Seale, A. Prolactin 177, prolactin 188, and extracellular osmolality independently regulate the gene expression of ion transport effectors in gill of Mozambique tilapia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 309: 1251-63 (2015).
- Ishido, M., Masuo, Y., Kunimoto, M., Oka, S., Morita, M. Bisphenol A causes hyperactivity in the rat concomitantly with impairment of tyrosine hydroxylase immunoreactivity. *Journal of Neuroscience Research* 76: 423–433 (2004).
- Jabeen, F., Chaudhry A.S. Metal uptake and histological changes in gills and liver of *Oreochromis mossambicus* inhabiting Indus River Pak. *J. Zool.* 45: 9-18 (2013).
- Jedeon, K., Berdal, A., Babajko, A. Impact of three endocrine disruptors, Bisphenol A, Genistein and Vinclozolin on female rat enamel. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol.*, 28:53 (2016).
- Jolanki, R., Kanerva, L., Estlander, T. Occupational allergic contact dermatitis caused by epoxy diacrylate in ultraviolet-lightcured paint, and bisphenol A in dental composite resin. *Contact dermatitis* 33: 94-99 (1995).

- Kabir, E.R., Rahman, M.S., Rahman, I. A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environ Toxicol Pharmacol.* 40(1): 241-58 (2015).
- Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K., Tobe, K. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation* 116: 1784-1792 (2006).
- Kamrin, MA. Bisphenol A: A scientific evaluation. *Medscape General Medicine* 6 (3) (2004).
- Kan, J., Sima, J., Cao, X. Transformation and bioaccessibility of lead induced by steamed bread feed in the gastrointestinal tract. *Ecotoxicol Environ Saf.* 137:158-164 (2017).
- Kanerva, L., Jolanki, R., Estlander, T., Henriks- Eckerman, M., Tuomi, M., Tarvainen, K. Airborne occupational allergic contact dermatitis from triglycidyl-p-ainophenol and tetraglycidyl- 4,4-methylene dianiline in preimpregnated epoxy products in the aircraft industry. *Dermatology.* 201: 29-22 (2000).
- Kanerva, L., Pelttari, M., Jolanki, R., Alanko, K., Estlander, T., Suhonen, R. Occupational contact urticaria from diglycidyl ether of bisphenol A epoxy resin. *Allergy.* 57: 1205-1207 (2002).
- Kang, J.H., Aasi, D., Katayama, Y. Bisphenol A in the aquatic environment and its endocrine-disruptive effects on aquatic organism. *Critical Reviews in Toxicology.* 37: 670-625 (2007).

- Kang, J.H., Kondo, F. Bisphenol A degradation by bacteria isolated from river water. *Archive Environmental Contamination and Toxicology* 43: 265-269 (2002a).
- Kang, J.H., Kondo, F. Effects of bacterial counts and temperature on the biodegradation of bisphenol A in river water. *Chemosphere* 49: 493-498 (2002b).
- Kang, J.H., Kito, K., Kondo, F. Factors influencing the migration of bisphenol A from cans. *Journal of Food Protection* 66: 1444-1447 (2003).
- Kang, J.H., Kondo, F. Bisphenol A degradation in river water is different from that in seawater. *Chemosphere* 60: 1288-1292 (2005).
- Kang, J.H., Kondo, F., Katayama, Y. Human exposure to bisphenol A. *Toxicology* 226: 79-89 (2006)
- Karlsson, J., von Hofen, J., Olsson, P.E. Generating transparent zebrafish: a refined method to improve detection of gene expression during embryonic development. *Mar. Biotechnol.* 3: 522-7 (2001).
- Kashiwagi, K., Utsumi, K., Kashiwagi, K., Ohta, S., Sugihara, K., Hanada, H., Kitamura, S. Effects of Endocrine Disrupting Chemicals on amphibian metamorphosis and mitochondrial membrane permeabilitytransition. *J. Health Sci.* 54: 273-280 (2008).



- Kawagoshi, Y., Fujita, Y., Kishi, I., Fukunaga, I. Estrogenic chemicals and estrogenic activity in leachate from municipal waste landfill determined by yeast two-hybrid assay. *J Environ Monit.* 5(2): 269-74 (2003).
- Kawaguchi, M., Sakui, N., Okanouchi, N., Ito, R., Saito, K., Izumi, S., Makino, T., Nakazawa, H. Stir bar sorptive extraction with in situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for measurement of phenolic xenoestrogens in human urine samples. *Journal Chromatography B* 820: 49-57 (2005).
- Kawahata, H., Ohta, H., Inoue, M., Suzuki, A. Endocrine disrupter nonylphenol and bisphenol A contamination in Okinawa and Ishigaki islands. *Chemosphere* 55: 1519-1527 (2004).
- Kawai, K., Takehiro, N., Nishikata, H., Aou, S., Takii, M., Kubo, C. Aggressive behavior and serum testosterone concentration during the maturation process of male mice: the effects of fetal exposure to bisphenol A. *Environmental Health Perspectives* 111: 175-178 (2003).
- Kawamura, Y., Sano, H., Yamada, T. Migration of bisphenol A from can coatings to drinks. *Journal Food Hygienic Society of Japan* 40: 158-165 (1999).
- Kawamura, Y., Inoue, K., Nakazawa, H., Yamada, T., Maitani, T. Causes of bisphenol A migration from cans for drinks and assessment of improved cans. *Journal Food Hygienic Society of Japan* 42: 13-17 (2001).

- Khan, H.A., Sikdar-Bar, M., Kamlesh, B., Wani, A.A., Pervaiz P.A. Lead nitrate induced histopathological changes in the gills of the African *Clarias batrachus* J. Appl. Sci. Res. 7: 1081-1086 (2011).
- Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B., Schilling, T.F. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental dynamics* 203 (3): 253-310 (1995).
- Kiyama R, Wada-Kiyama Y. Estrogenic endocrine disruptors: Molecular mechanisms of action. *Environ Int.* 83: 11-40 (2015).
- Klecka, G.M., Gonsior, S.J., West, R.J., Goodwin, P.A., Markham, D.A. Biodegradation of bisphenol A in aquatic environments: river die-away. *Environ Toxicol Chem.* 20(12): 2725-35 (2001).
- Klecka, G.M., Staples, C.A., Clark, K.E., Van der Hoeven, N., Thomas, D.E., Hentges, S.G. Exposure analysis of bisphenol A in surface water systems in North America and Europe. *Environ Sci Technol.* 15: 43(16): 6145-50 (2009).
- Kloas, W., Lutz, I., Einspanier, R. Amphibians as a model to study endocrine disruptors: II. Estrogenic activity of environmental chemicals in vitro and in vivo. *Sci Total Environ.* 225: 59-68 (1999).
- Konieczna, A. Rutkowska, A. Rachoń, D. Health risk of exposure to Bisphenol A (BPA). *Rocz Panstw Zakl Hig.* 66(1): 5-11 (2015).

- Knouff, C., Auwerx, J. Peroxisome proliferator-activated receptor-gammacalls for activation in moderation: lessons from genetics and pharmacology. *Endocrinology Review* 25: 899-918 (2004).
- Kruger, T., Long, M. and Bonfeld-Jorgensen, E.C. Plastic components affect the activation of the aryl hydrocarbon and the androgen receptor. *Toxicology*. 246: 112–123 (2008).
- Kuch, H.M., Ballschmiter, K. Determination of endocrine-disrupting phenolic compounds and estrogens in surface and drinking water by HRGC-(NCI)-MS in the picogram per liter range. *Environ Sci Technol*. 1;35(15): 3201-6 (2001).
- Kwak, H.I., Bae, M.O., Lee, M.H., Lee, Y.S., Lee, B.J., Kang, K.S., Chae, C.H., Sung, H.J., Shin, J.S., Kim, J.H., Mar, W.C., Sheen, Y.Y., Cho, M.H. Effects of nonylphenol, bisphenol A, and their mixture on the viviparous swordtail fish (*Xiphophorus helleri*). *Environ Toxicol Chem*. 20: 787-795 (2001).
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Kletz, M., Weismann, T. Effects of bisphenol A on maturation and quality of semen and eggs in the brown trout, *Salmo trutta f. fario*. *Aquatic Toxicology* 75: 213-224 (2005).
- Lang, I.A., Galloway, T.S., Scarlett, A., Henley, W.E., Depledge, M., Wallace, R.B., Melzer, D. Association of urinary bisphenol A with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA*., 300: 1303-1310 (2008).

- Lahnsteiner, F., Berger, B., Kletzl, M., Weismann, T. Effect of bisphenol A on saturation and quality of semen and eggs in the brown trout, *Salmo trutta f. fario*. *Aquat Toxicol.* 75:213-224 (2005).
- Le, H.H., Carlson, E.M., Chua, J.P., Belcher, S.M. Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicol Lett.* 30; 176(2): 149-56 (2008).
- Lee, H.B., Peart, T.E. Determination of bisphenol A in sewage effluent and sludge by solid-phase and supercritical fluid extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *JAOAC International* 83 (2): 290-297 (2000).
- Lee, H.J., Chattopadhyay, S., Gong, E.Y., Ahn, R.S., Lee, K. Antiandrogenic effects of bisphenol A and nonylphenol on the function of androgen receptor. *Toxicol Sci.* 75(1): 40-6 (2003).
- Lee, Y.J., Ryu, H-Y., Kim, H-K., Min, C.S., Lee, JH., Kim, E. Maternal and fetal exposure to bisphenol A in Korea. *Reproductive Toxicology* 25: 413-419 (2008).
- Lee, S., Kim, C., Youn, H., Choi, K. Thyroid hormone disrupting potentials of bisphenol A and its analogues - in vitro comparison study employing rat pituitary (GH3) and thyroid follicular (FRTL-5) cells. *Toxicol In Vitro.* 40: 297-304 (2017).
- Lele, Z., Krone, P.H. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological & transgenic research. *Biotechnol. Adv.* 14, 57-72 (1996).

- Levy, G., Lutz, I., Krüger, A., Kloas, W. Bisphenol A induces feminization in *Xenopus laevis* tadpoles. *Environ Res* 94: 102-111 (2004).
- Leyssens, L., Vinck, B., Van Der Straeten, C., Wuyts, F., Maes, L. Cobalt toxicity in humans-A review of the potential sources and systemic health effects. *Toxicology*. 15;387: 43-56 (2017).
- Li, J., Quabius, E.S., Wendelaar Bonga, S.E., Flik, R., Clock, A. Effects of water-borne copper on branchial chloride cells and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activities in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Aquatic Toxicology* 43: 1-11 (1998).
- Li, J.S., Li, J.L., Wu, T.T. The effects of copper, iron and zinc on digestive enzyme activity in the hybrid tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) *Oreochromis aureus* (Steindachner). *Journal of Fish Biology*. 71: 1788–1798 (2007).
- Liao, Ch., Liu, F., Kannan, K. Bisphenol S, a new bisphenol analogue in paper products and currency bills and its association with bisphenol A residues. *Environ. Sci. Technol.* 46: 6515–6522 (2012).
- Lihn, A.S., Pedersen, S.B., Richelsen, B. Adiponectin: action, regulation and association to insulin sensitivity. *Obesity Reviews* 6: 13-21 (2005).
- Liu, Z.H., Yin, H., Dang, Z. Do estrogenic compounds in drinking water migrating from plastic pipe distribution system pose adverse effects to

- human? An analysis of scientific literature. *Environ Sci Pollut Res Int.* 24(2): 2126-2134 (2017).
- Liu, Z., Wolff, M.S., Moline, J. Analysis of environmental biomarkers in urine using an electrochemical detector. *Journal Chromatography B* 819: 155-159 (2005).
- Liu, J.L., Wang, R.M., Huang, B., Lin, C., Zhou, J.L., Pan, X.J. Biological effects and bioaccumulation of steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in high-back crucian carp exposed to wastewater treatment plant effluents. *Environ Pollut* 162: 325-31. (2012).
- Lv, Y., Lu, S., Dai, Y., Rui, C., Wang, Y., Zhou, Y., Li, Y., Pang, Q., Fan, R. Higher dermal exposure of cashiers to BPA and its association with DNA oxidative damage. *Environ Int.* 98: 69-74 (2017).
- López-Cervantes, J., Paseiro-Losada, P. Determination of bisphenol A in, and its migration from, PVC stretch film used for food packaging. *Food Addit Contam.* 20 (6): 596-606 (2003).
- López-Cervantes, J., Sánchez-Machado, D.I., Pastorelli, S., Rijk, R., Paseiro-Losada, P. Evaluating the migration of ingredients from active packaging and development of dedicated methods: a study of two iron-based oxygen absorbers. *Food Addit Contam.* 20(3): 291-9 (2003).
- Lora Benítez, A.J., Molina López, A.M., Ayala Soldado, N., Blanco Rodríguez, A., Moyano Salvago, M.R. Relación de los estadios de maduración del ovario y el efecto del BPA a nivel hipofisario en pez cebra (*Danio rerio*). *Rev. Toxicol.* 30: 132-137 (2013).

- Lora, A.J., Molina, A.M., Bellido, C., Blanco, A., Monterde, J.G., Moyano, M.R. Adverse effects of bisphenol A on the testicular parenchyma of zebrafish revealed using histomorphological methods. *Veterinari Medicina*. 61 (10): 577–589 (2016).
- Lyons, G. Bisphenol A: A known endocrine disruptor. European Toxics Programme Report, UK. (2000).
- Lyu, Y., Zhang, K., Chai, F., Cheng, T., Yang, Q., Zheng, Z., Li, X. Atmospheric size-resolved trace elements in a city affected by non-ferrous metal smelting: Indications of respiratory deposition and health risk. *Environ Pollut*. 224: 559-571 (2017).
- Ma, S., Shi, W., Wang, X., Song, P., Zhong, X. Bisphenol A Exposure during pregnancy alters the mortality and levels of reproductive hormones and genes in offspring mice. *Biomed Res Int*. 2017: 3585809 (2017).
- Mandich, A., Bottero, S., Benfenati, E., Cevasco, A., Erratico, C., Maggioni, S., Massari, A., Pedemonte, F., Vigano, L. In vivo exposure of carps to graded concentrations of bisphenol A. *General and Comparative Endocrinology* 153: 15-24 (2007).
- Manera, M., Giari, L., Depasquale, J., Dezfuli, B. European sea bass gill pathology after exposure to cadmium and terbuthylazine: expert versus fractal analysis *J. Microsc.* 261: 291-299 (2016).
- Mantel, L., Farmer, L. Osmotic and ionic regulation. *The biology of crustacea*. 5 (1983).

- Manzon, L. A. The role of prolactin in fish osmoregulation: a review. *General and comparative endocrinology*. 125(2): 291-310 (2002).
- Marano, R.J., Ben-Jonathan, N. Minireview: extrapituitary prolactin: an update on the distribution, regulation, and functions. *Mol. Endocrinol.* 28: 622-633 (2014).
- Martinez, C.B.R., Nagae, M.Y., Zaia, C.T.B.V., Zaia, D.A.M. Acute morphological and physiological effects of lead in the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Braz. J. Biol.* 64: 797-807 (2004).
- Masoner, J.R., Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Cozzarelli, I.M., Gray, J.L., Schwab, E.A. Contaminants of emerging concern in fresh leachate from landfills in the conterminous United States. *Environ Sci Process Impacts*. 16(10): 2335-54 (2014).
- Maragou, N.C., Makri, A., Lampi, E.N., Thomaidis, N.S., Koupparis, M.A. Migration of bisphenol A from polycarbonate baby bottles under real use conditions. *Food Additives and Contaminants* 25 (3): 373-383 (2008).
- Marcato, A., Yabuki, A., Fontanetti, C.. Nickel exposure promotes osmoregulatory disturbances in *Oreochromis niloticus* gills: histopathological and energy dispersive spectrometry analysis. *Env Sci Poll Res Int.* 21: 13095-102 (2014).
- Markey, C.M., Luque, E.H., Muñoz De Toro, M., Sonnenschein, C., Soto, A.M. In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue



organization of the mouse mammary gland. *Biological of Reproduction* 65: 1123- 1215 (2001).

Matthews, J.B., Twomey, K., Zacharewski, T.R. In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . *Chem Res Toxicol.* 14: 149–157 (2001).

Matsumoto, A., Kunugita, N., Kitagawa, K., Isse, T., Oyama, T., Foureman, G.L. Bisphenol A levels in human urine. *Environmental Health Perspectives* 111: 101-104 (2003).

Mcgonnell, I., Gowkes, R. Fishing for gene function -endocrine modelling in the zebrafish. *J Endocrinol.*, 189: 425-439 (2006).

McClure, M.M., McIntyre, P.B., McCune, A.R. Notes on the natural diet and habitat of eight danio in fishes, including the zebrafish *Danio rerio*. *J Fish Biol* 69: 553–570 (2006).

McCormick, S. D. Hormonal control of gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase and chloride cell function. *Fish Physiology* 14. 285–315 (1995).

Meerts, I.A., Letcher, R.J., Hoving, S., Marsh, G., Bergman, A., Lemmen, J.G., van der Burg, B., Brouwer, A. In vitro estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated PDBEs, and polybrominated bisphenol A compounds. *Environmental Health Perspectives* 109 (4): 399-407 (2001).

- Mendonca, K., Hauser, R., Calafat, A.M., Arbuckle, T.E., Duty, S.M. Bisphenol A concentrations in maternal breast milk and infant urine. *Int Arch Occup Environ Health*. 87(1):13-20 (2014).
- Mercea P. Physicochemical processes involved in migration of bisphenol A from polycarbonate. *Journal of Applied Polymer Science*. 112: 579–593 (2009).
- Mileva, G., Baker, S.L., Konkle, A.T., Bielajew, C. Bisphenol-A: epigenetic reprogramming and effects on reproduction and behavior. *Int J Environ Res Public Health*. 22; 11(7): 7537-61 (2014).
- Mishra, V., Lal, H., Chawla, G., Viswanatan, P.N. Pathomorphological changes in the gills of fish fingerlings (*Cirrhina mimgala*) by lineal alkylbenzene sulfonate. *Ecotoxicol Environ Safety* 10: 302–308 (1985).
- Miyamoto, K., Kotake, M. Estimation of daily bisphenol A intake of Japanese individuals with emphasis on uncertainty and variability. *Environmental Science* 13 (1): 15-29 (2006).
- Mohammed, F., Elshaer, F., Khalaf-Allah, H, Bakry, S. Histopathological alterations in gills of some poecilid fishes after exposure to bisphenol A. *World J Fish Mar Sci.*, 5: 693-700 (2013).
- Molina, A.,Lora, A., Blanco, A., Monterde, J. Ayala, N., Moyano, R. Endocrine-active compound evaluation: Qualitative and quantitative histomorphological assessment of zebrafish gonads after bisphenol-A exposure. *Ecotox Environ Safe.*, 88: 155-162 (2013).

- Mondel, M. Adsorption/desorption of bisphenol A on four different soils. Staatliche-Lehr und Forschungsanstalt 71 (2001a).
- Mondel, M. Degradation of bisphenol A on four different soils under aerobic conditions. Staatliche-Lehr-und Forschungsanstalt 71 (2001b).
- Moody, S. Introduction to the Zebrafish. En, W. Driever, Cell Lineage and Fate Determination Academic Press, Washington 371-382 (1999).
- Moriyama, K., Tagami, T., Akamizu, T., Usui, T., Saijo, M., Kanamoto, N., Hataya, Y., Shimatsu, A., Kuzuya, H., Nakao, K. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. Journal of Clinincal Endocrinoloy and Metabolism 87: 5185-5190 (2002).
- Mountfort, K.A, Kelly, J., Jickells, S.M., Castle, L. Investigations into the potential degradation of polycarbonate baby bottles during sterilization with consequent release of bisphenol A. Food Additives and Contaminants 14 (6-7): 737-740 (1997).
- Munguía- López, E.M., Soto-Valdez, H. Effect of heat processing and storage time on migration of bisphenol A (BPA) and bisphenol A-diglycidyl ether (BADGE) to aqueous food simulatnt from Mexican can coatings. Journal of Agriculture and Food Chemical 49 (8): 3366-3371 (2001).
- Munguía-López, E.M., Peralta, E., Gonzalez-Leon, A., Vargas-Requena, C., Soto-Valdez, H. Migration o bisphenol A (BPA) from epoxi can coatings to Jalapeño and acid food simulatnt. Journal of Agriculture and Food Chemical 50 (25): 7299-7302 (2002).

- Munguía-López, E.M., Gerardo-Lugo, S., Peralta, E., Bolumen, S., Soto-Valdez, H. Migration of bisphenol A (BPA) from can coatings into a fatty-food stimulant and tuna fish. *Food Additives and Contaminants* 22 (9): 892-898 (2005).
- Muñoz-de-Toro, M., Markey, C.M., Wadia, P.R., Luque, E.H., Rubin, B.S., Sonnenschein, C., Soto, A.M. Perinatal exposure to bisphenol A alters peripubertal mammary gland development in mice. *Endocrinology* 146: 4138-4147 (2005).
- Murk, A.J., Legler, J., van Lipzig, M.M., Meerman, J.H., Belfroid, A.C., Spenkeliink, A., van der Burg, B., Rijs, G.B., Vethaak, D. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three in vitro bioassays. *Environ Toxicol Chem.* 21(1):16-23. (2002).
- Nadal, A., Alonso-Magdalena, P., Soriano, S., Quesada, I., Ropero, A.B. The pancreatic beta-cell as a target of estrogens and xenoestrogens: implications for blood glucose homeostasis and diabetes. *Molecular and Cellular Endocrinology.* 304: 63–68 (2009).
- Nakamura, K., Itoh, K., Yaoi, T., Fujiwara, Y., Sugimoto, T., Fushiki, S. Murine neocortical histogenesis is perturbed by prenatal exposure to low doses of bisphenol A. *Journal of Neuroscience Research* 84 (6): 1197-205 (2006).
- Nakao, T., Akiyama, E., Kakutani, H., Mizuno, A., Aozasa, O., Akai, Y., Ohta, S., Levels of tetrabromobisphenol A, tribromobisphenol A,

- dibromobisphenol A, monobromobisphenol A, and bisphenol a in Japanese breast milk. *Chem Res Toxicol.* 20; 28 (4): 722-8 (2015).
- Nam, S., Seo, Y., Kim, M. Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottle with repeated use. *Chemosphere* 79, 949–952 (2010).
- National Toxicology Program CERHR expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of bisphenol A (2007).
- Navas, J.M., Segner, H. Vitellogenin synthesis in primary cultures of fish liver cells as endpoint for in vitro screening of the (anti)estrogenic activity of chemical substances. *Aquat Toxicol.* 80:1-22 (2006).
- Ndaw, S., Remy, A., Jargot, D., Robert, A. Occupational exposure of cashiers to Bisphenol A via thermal paper: urinary biomonitoring study. *Int Arch Occup Environ Health.* 89(6): 935-46 (2016).
- Negishi, T., Kawasaki, K., Suzaki, S., Maeda, H., Ishii, Y., Kyuwa, S. Behavioral alterations in response to fear-provoking stimuli and tranylcypromine induced by perinatal exposure to bisphenol A and nonylphenol in male rats. *Environmental Health Perspectives* 112 (11): 1159-64 (2004).
- Nel, A. E., Diaz-Sanchez, D., Nag, D., Hiura, T., Saxon, A. Enhancement of allergic inflammation by the interaction between diesel exhaust particles and the immune system. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 102: 539-554 (1998).

- Nikaido, Y., Yoshizawa, K., Danbara, N., Tsujita-Kyutoku, M., Yuri, T., Uehara, N. Effects of maternal xenoestrogen exposure on development of the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 mouse offspring. *Reproduction Toxicology* 18: 803-811 (2004).
- Nüsslein-Volhard, Christiane., Dahm, Ralf. *Zebrafish. Practical Approach.* Oxford University Press (2002).
- Orn, S., Holbech, H., Madsen, T., Norrgren, L., Petersen, G. Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone. *Aquat Toxicol.*, 65:397-411 (2003).
- Ostrander, G.K. *The laboratory Fish.* Academic Press, San Diego (2000).
- Ozaki, A., Baba, T. Alkylphenol and bisphenol A levels in rubber products. *Food Addit Contam.* 20(1): 92-8 (2003).
- Pelkowski, S.D., Kapoor, M., Richendfer, H.A., Wang, X., Colwill, R.M. y cols. A novel high-throughput imaging system for automated analyses of avoidance behavior in zebrafish larvae. *Behavioural Brain Research* 223: 135–144 (2011).
- Pelayo, S., Oliveira, E., Thienpont, B., Babin, P.J., Raldúa, D., André, M., Piña, B. Triiodothyronine-induced changes in the zebrafish transcriptome during the eleutheroembryonic stage: implications for bisphenol A developmental toxicity. *Aquat Toxicol.* 110-111:114-122 (2012).

- Perry, S.F., Laurent, P. Environmental effects on fish gill structure and function. In: Rankin JC, Jensen FB (eds) Fish ecophysiology. Chapman & Hall, 231–264 (1993).
- Pickford, DB., Hetheridge, MJ., Caunter, JE., Hall, AT., Hutchinson, TH. Assessing chronic toxicity of bisphenol A to larvae of the African clawed frog (*Xenopus laevis*) in a flow-through exposure system. *Chemosphere*. 53: 223-235 (2003).
- Pierce, A., Fox, B., Davis, L., Visitación, N., Kitahashi, T., Hirano, T., Grau, E. Prolactin receptor, growth hormone receptor, and putative somatolactin receptor in Mozambique tilapia: Tissue specific expression and differential regulation by salinity and fasting. *Gen Comp Endocrinol.*, 154: 31-40 (2007).
- Poss, K.D., Wilson, L.G., Keating, M.T. Heart regeneration in zebrafish. *Science* 298 (5601): 2188-2190 (2002).
- Ramakrishnan, S., Wayne, N.L. Impact of bisphenol-A on early embryonic development and reproductive maturation. *Reprod Toxicol* 25:177-183 (2008).
- Ramos, J., Varayoud, J., Kass, H., Rodriguez, H., Costable, L., Muñoz de Toro, M., Luque, E. Bisphenol A induces both transient and permanent histofunctional alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in prenatally exposed male rats. *Endocrinology*. 144: 3206-3215 (2003).
- Rhaman, M., Kwon, W., Karmakar, P., Yoon, S., Ryu, B. Gestational exposure to bisphenol-A affects the function and proteome profile of F1

- spermatozoa in adult mice. *Environ Health Perspect.* 125 (2) : 238 (2016).
- Richetti, S. K., Rosemberg, D. B., Ventura-Lima, J., Monserrat, J. M., Bogo, M. R., & Bonan, C. D. Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. *Neurotoxicology.* 32(1), 116-122. (2011).
- Ritchie, S.A., Connell, J.M. The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Disease* 17: 319-326 (2007).
- Riu, A., McCollum, C.W., Pinto, C.L., Grimaldi, M., Hillenweck, A., Perdu, E., Zalko, D., Bernard, L., Laudet, V., Balaguer, P., Bondesson, M., Gustafsson, J.A., Halogenated bisphenol-A analogs act as obesogens in zebrafish larvae (*Danio rerio*). *Toxicol Sci.* 139(1): 48-58 (2014).
- Rocha, S., Domingues, V.F., Pinho, C., Fernandes, V.C., Delerue-Matos, C., Gameiro, P., Mansilha, C. Occurrence of bisphenol A, estrone, 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in Portuguese rivers. *Bull Environ Contam Toxicol.* 90(1): 73-8 (2013).
- Rochester, J.R. Bisphenol A and human health: A review of the literature *Reproductive Toxicology.* 42: 132- 155 (2013).
- Rodriguez-Mozaz, S., Alda, M.J.L., Barcelos, D. Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol a in natural waters and drinking water treatment plants by solid-phase extraction- liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatog A* 1045: 85-92 (2004).



- Rogers, J.A., Mirza, R.S. The Effects of Bisphenol-A on the Immune System of Wild Yellow Perch, (*Perca flavescens*). *Water Air Soil Pollut* 224: 1728-1734 (2013).
- Rogers, J.A., Metz, L., Yong, V.W. Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Mol Immunol*. 53(4): 421-30 (2013).
- Routledge, E.J., White, R., Parker, M.G., Sumpter, J.P. Differential effects of xenoestrogens on coactivator recruitment by estrogen receptor (ER) alpha and ERbeta. *J. Biol. Chem.* 275: 35986–35993 (2009).
- Runyon, J., Noti, A., Grob, K., Biedermann, M., Dudler, V. Isolation of the < 1000 Dalton Migrants from Food Packaging Materials by Size Exclusion Chromatography (SEC). *Mitt. Lebensm. Hyg.* 93/93, 57-72 (2002).
- Santos, C.R., Brinca, L., Ingleton, P.M., Power, D.M. Cloning, expression, and tissue localisation of prolactin in adult sea bream (*Sparus aurata*) *Gen. Comp. Endocrinol*, 114: 57-66(1999).
- Santos, C. R. A., Ingleton, P. M., Cavaco, J. E. B., Kelly, P. A., Edery, M., Power, D. M. Cloning, characterization, and tissue distribution of prolactin receptor in the sea bream (*Sparus aurata*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 121, 32–47 (2001).
- Sapone, A, Canistro, D., Vivarelli, F., Paolini, M. Perturbation of xenobiotic metabolism in *Dreissena polymorpha* model exposed in

- situ to surface water (Lake Trasimene) purified with various disinfectants. *Chemosphere*. 144: 548-549. (2016).
- Sakaue, M., Ohsako, S., Ishimura, R., Kurosawa, S., Kurohmaru, M., Hayashi, Y. Bisphenol A affects spermatogenesis in the adult rat even at a low dose. *Journal of Occupational Health* 43: 185-90 (2001).
- Schmidt-Nielsen, B., Graves, B., Roth, J. Water removal and solute additions determining increases in renal medullary osmolality. *Am J Physiol*. 244(5):F472-82 (1983).
- Segner, H. Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. *Comparative biochemistry and physiology C. Toxicology and Pharmacology* 149 (2): 187-195 (2009).
- Seiwa, C., Nakahara, J., Komiyama, T., Katsu, Y., Iguchi, T., Asou, H. Bisphenol A exerts thyroid-hormone-like effects on mouse oligodendrocyte precursor cells. *Neuroendocrinology* 80 (1): 21-30 (2004).
- Selderslaghs, I.W., Van Rompay, A.R., De Coen, W., Witters, H.E. Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. *Reprod Toxicol* 28(3): 308-320 (2009).
- Serini, V. Polycarbonates. In: E.S. Wilks (ed.), *Industrial Polymers Handbook*. 291-304(2001).

- Shelby, M.D. NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of bisphenol A. NTP CERHR MON.(22):5, 7-9, 1-64(2008).
- Shelly, S., Boaz, M., Orbach, H. Prolactin and autoimmunity Autoimmun. Rev, 11: A465-A470 (2012).
- Sheriff, M.A., Mohideen, A.K.S., Altaff, K. Lead induced toxicity on the gills of the Indian major carp: *Labeo rohita* (Hamilton) Int. J. Res. Fish. Aquac. 2: 38-40 (2012).
- Sohoni, P., Tyler, C.R., Hurd, K., Caunter, J., Hetheridge, M., Williams, T., Woods, C., Evans, M., Toy, R., Gargas, M., Sumpter, J.P. Reproductive effects of long-term exposure to Bisphenol A in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Environ Sci Technol 35: 2917-2925 (2001).
- Siesser, W.B., Cheng, S.Y., McDonald, M.P. Hyperactivity, impaired learning on a vigilance task, and a differential response to methylphenidate in the TR\_PV knock-in mouse. Psychopharmacology 181: 653-663 (2005).
- Spence, R., Runa, K.F., Reichard, M., Huq, K.A., Wahab, M.A., Ahmed, Z.F., Smith, C. The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. J Fish Biol 69: 1435–1448 (2006).
- Spence, R., Smith, C. The role of early learning in determining shoaling preferences based on visual cues in the zebrafish, *Danio rerio*. Ethology 113 62-67 (2007).

- Spitsbergen, J.M., Kent, M.L. The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research advantages and current limitations. *Toxicologic Pathology* 31: 62-87 (2003).
- Stahlhut, R.W., Welshons, W.V., Swan, S.H. Bisphenol A data in NHANES suggest longer than expected half-life, substantial nonfood exposure, or both. *Environ Health Perspect.* 117(5):784-9 (2009).
- Staples, C.A., Dorn, F.B., Klecka, G.M., Oblock, S.T., Harrys, L.N. A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere* 36 (10): 2149-2173 (1998).
- Stoker, T., Robinette, C., Britt, B., Laws, S., Cooper, R. Prepubertal exposure to compounds that increase prolactin secretion in the male rat: Effects on the adult prostate. *Biol Reprod.*, 61: 1636-1643 (1999).
- Stoker, C., Rey, F., Rodriguez, H., Ramos, J.G., Sirosky, P., Larriera, A., Luque, E.H., Muñoz de Toro, M. Sex reversal effects on Caiman latirostris exposed to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol A. *Gen Comp Endocrinol* 133:287-296 (2003).
- Sumpter, J.P., Jobling, S. Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 7:173-178 (1995).
- Sun, Y., Irie, M., Kishikawa, N., Wada, M., Kuroda, N., Nakashima, K. Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with

- column-switching and fluorescence detection. *Biomed Chromatogr* 18(8): 501–507 (2004).
- Takano, H., Yoshikawa, T., Ichinose, T., Miyabara, Y., Imaoka, K., Sugai, M. Diesel exhaust particles enhance antigen-induced airway inflammation and local cytokine expression in mice. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 156: 36-42 (1997).
- Takao, Y., Lee, C.H., Yasuhiro, I., Kohra, S., Tominaga, N., Arizono, K. Fast screening method for bisphenol A in environmental water and in food by solid-phase microextraction (SPEM). *Journal Health Science* 45: 39 (1999).
- Takao, Y., Lee, H.C., Kohra, S., Arizono, K. Release of bisphenol A from food can lining upon heating. *Journal Health Science* 48: 31-334 (2002).
- Takeuchi, T., Tsutsumi, O. Serum bisphenol a concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 291 (1): 76-78 (2002).
- Talsness, C., Fialkowski, O., Gericke, C., Merker, H.J., Chahoud, I. The effects of low and high doses of bisphenol A on the reproductive system of female and male rat offspring. *Congen. Anomal.* 40: 94-107 (2000).
- Tarvainen, K., Kanerva, L. Occupational dermatoses from plastic composites. *J. Environmental Medicine* 1: 3-17 (1999).

- Teuten, E.L., Saquing, J.M., Knappe, D.R., Barlaz, M.A., Jonsson, S., Björn, A., Rowland, S.J., Thompson, R.C., Galloway, T.S., Yamashita, R., Ochi, D., Watanuki, Y., Moore, C., Viet, P.H., Tana, T.S., Prudente, M., Boonyatumanond, R., Zakaria, M.P., Akkhavong, K., Ogata Y, Hirai H, Iwasa S, Mizukawa K, Hagino Y, Imamura A, Saha M, Takada H. Transport and release of chemicals from plastics to the environment and to wildlife. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* Jul 27;364 (1526):2027-45 (2009).
- Thomas, P., Dong, J. Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 102 (1-5): 175-9 (2006).
- Tian, X., Takamoto, M., Sugane, K. Bisphenol A promotes IL-4 production by Th2 cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 132: 240-247 (2003).
- Tingaud-Sequeira A, Ouadah N, Babin PJ. Zebrafish obesogenic test: a tool for screening molecules that target adiposity. *J Lipid Res.* 52: 1765-1772 (2001).
- Trujillo, M.E., Scherer, P.E. Adiponectin-journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome. *Journal of Internal Medicine* 257: 167-175 (2005).
- Tsao, T.S., Tomas, E., Murrey, H.E., Hug, C., Lee, D.H., Ruderman, N.B., Heuser, J.E., Lodish, H.F. Role of disulfide bonds in Acrp30/adiponectin structure and signaling specificity. *Different*

- oligomers activate different signal transduction pathways. *Journal of Biological Chemistry* 278: 50810-50817 (2003).
- Udvardia, A.J., Linney, E. Windows into development: historic, current, and future perspectives on transgenic zebrafish. *Dev Biol* 256(1): 1-17 (2000).
- Ueno, M., Carnevalheira, J.B., Tambascia, R.C., Bezerra, R.M., Amaral, M.E., Carneiro, E.M., Folli, F., Franchini, K.G., Saad, M.J. Regulation of insulin signalling by hyperinsulinaemia: role of IRS-1/2 serine phosphorylation and the mTOR/p70 S6K pathway. *Diabetologia* 48: 506-518 (2005).
- Uglea, C.V., Negulescu, I. *Synthesis and Characterization of Oligomers*. CRC Press 103 (2005)
- Van den Belt, K., Verheyen, R., Witters, H. Reproductive effects of ethynylestradiol and 4t-octylphenol on the zebrafish (*Danio rerio*). *Arch Environ Contam Toxicol.*, 41: 458-67 (2001).
- Van den Belt, K., Verheyen, R., Witters, H. Comparison of vitellogenin responses in zebrafish and rainbow trout following exposure to environmental estrogens. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56: 271-281 (2003).
- Vandenberg, L.N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., Welshons, W.V. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology* 24: 139-177 (2007).

- Vandenberg, L.N., Maffini, M.V., Sonnenschein, C., Rubin, B.S., Soto, A.M. Bisphenol-A and the great divide. A review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocrine reviews* 30: 75-95 (2009).
- Vandenberg, L.N., Chahoud, I., Heindel, J.J., Padmanabhan, V., Paumgarten, F.J., Schoenfelder, G. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environmental Health Perspectives* 118 (8): 1055-1070 (2010).
- Vandenberg, L.N., Colborn, T., Hayes, T.B., Heindel, J.J., Jacobs Jr, D.R., Lee, D.H. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and non-monotonic dose responses. *Endocr Rev*; 33:3 78-455 (2012).
- Velasco Marinero, E., Herrero-Payo, J., Carretero- Gonzalez, J. Changes in pituitary and prolactin cells of Wistar rats after two dental fillings with bisphenolic resins. *Arch Oral Biol.*, 56:592-8 (2011).
- Velcheva, I.G., Arnaudov, A.D., Georgieva E.S. Influence of zinc on gill morphology of Gibelio carp (*Carassius gibelio*) *Ecol. Balk.*, 2: 19-23 (2010).
- Vermeirssen, E.L., Burki, R., Joris, C., Peter, A., Segner, H., Suter, M.J. Characterization of the estrogenicity of Swiss midland rivers using a recombinant yeast bioassay and plasma vitellogenin concentrations in feral male brown trout. *Environmental Toxicology Chemical* 24: 2226-2233 (2005).



- Vermiglio, F., Lo Presti, V.P., Moleti, M., Sidoti, M., Tortorella, G., Scaffidi, G., Castagna, M.G., Mattina, F., Violi, M.A., Crisa, A., Artemisia, A., Trimarchi, F. Attention deficit and hyperactivity disorders in the offspring of mothers exposed to mild-moderate iodine deficiency: a possible novel iodine deficiency disorder in developed countries. *Journal Clinical Endocrinology and Metabolism* 89: 6054-6060 (2004).
- Vigano, L., Mandich, A., Benfenati, E., Bertolotti, R., Botero, S., Porazzi, E. Investigating the estrogenic risk along the river Po and its intermediate section. *Arch Environmental Contamination and Toxicology* 51: 641-651 (2006).
- Villeneuve, D.L., Garcia-Reyero, N., Escalon, B.L., Jensen, K.M., Cavallin, J.E., Makynen, E.A., Durhan, E.J., Kahl, M.D., Thomas, L.M., Perkins, E.J., Ankley, G.T. Ecotoxicogenomics to support ecological risk assessment: a case study with bisphenol A in fish. *Environ Sci Technol* 46:51-59 (2012).
- Vinas, R., Jeng, Y.J., Watson, C.S. Non-genomic effects of xenoestrogen mixtures. *Int J Environ Res Public Health* 9:2694-714 (2012).
- Vom Saal, F. S., Cooke, P. S., Buchanan, D. L., Palanza, P., Thayer, K. A., Nagel, S. C., Parmigiani, S., 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. *Toxicology and Industrial Health* 14: 239-260 (1998).
- Vom Saal, F.S., Hughes, C. Review. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ Health Perspect.* 113 (8): 926-33 (2005).
- Vom Saal, F.S., Myers, J.P. Bisphenol A and a risk of metabolic disorders. *JAMA* 300 (11): 1353-1355 (2008).
- Von Goetz, N., Pirow, R., Hart, A., Bradley, E., Poças, F., Arcella, D., Lillegard, I.T., Simoneau, C., van Engelen, J., Husoy, T., Theobald, A., Leclercq, C. Including non-dietary sources into an exposure assessment of the European Food Safety Authority: The challenge of multi-sector chemicals such as Bisphenol A. *Regul Toxicol Pharmacol.* 85: 70-78 (2017).
- Von Mutius, E. (2000). The environmental predictors of allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 105: 9-19 (2000).
- Wang, Z.V., Schraw, T.D., Kim, J.Y., Khan, T., Rajala, M.W., Follenzi, A., Scherer, P.E. Secretion of the adipocyte-specific secretory protein adiponectin critically depends on thiol-mediated protein retention. *Molecular Cellular Biology* 27: 3716-3731 (2007).
- Wani, A.A., Sikdar-Bar, M., Borana, K., Khan, H.A., Andrabi, S.S.M., Pervaiz, P.A. Histopathological alterations induced in gill epithelium of African catfish, *Clarias gariepinus*, exposed to copper sulphate *Asian J. Exp. Biol. Sci.*, 2: 278-282 (2011).

- Warner, D.A., Shine, R., The adaptive significance of temperature-dependent sex determination in a reptile. *Nature* 451;7178: 566–568 (2008).
- Weldingh, N.M., Jørgensen-Kaur, L., Becher, R., Holme, J.A., Bodin, J., Nygaard, U.C., Bølling, A.K., Bisphenol A Is More Potent than Phthalate Metabolites in Reducing Pancreatic  $\beta$ -Cell Function. *Biomed Res Int.* 4614379 (2017).
- Welshons, W.V., Thayer, K.A., Judy, B.M., Taylor, J.A., Curran, E.M., Vom Saal, F.S. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ Health Perspect.* 111: 994-1006 (2003).
- Weng, C.-F., Lee, T.-H., and Hwang, P.-P. Immune localization of prolactin receptor in the mitochondria-rich cells of the euryhaline teleost (*Oreochromis mossambicus*) gill. *FEBS Lett.* 405: 91–94. (1997).
- Wen-Tien, T. Human health risk on environmental exposure to bisphenol A: A review. *Journal of environmental Science and Health, part C*, 24 (2): 225-255 (2006).
- Wetherill YB, Akingbemi BT, Kanno J, McLachlan JA, Nadal A, Sonnenschein C, Watson CS, Zoeller RT, Belcher SM. 2007 In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod Toxicol.* 24(2):178-98 (2007).

- Westerfield, M. The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*). 4th Ed. (University of Oregon Press, Eugene, OR, USA) 385 (2000).
- Williams, T., Readman, G., Owen, S. Key issues concerning environmental enrichment for laboratory-held fish species. *Lab Anim* 43: 107–120 (2009).
- Wilson, N.K., Chuang, J.C., Lyu, C. Levels of persistent pollutants in several child day care centers. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* 11: 449-458 (2001a).
- Wilson, N.K., Chuang, J.C., Lyu, C., Menton, R., Morgan, M.K. Aggregate exposures of nine preschool children to persistent organic pollutants at day care at home. *Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology* 13: 187-202 (2001b).
- Wisniewsky, P., Romano, R.M., Kizys, M., Kasamatsu, T., Giannocco, G., Chiamolera, M.I., Dias da Silva, M.R., Romano, M.A.. Adult exposure to bisphenol A (BPA) in Wistar rats reduces sperm quality with disruption of the hypothalamic-pituitary-testicular axis. *Toxicology*, 329: 1-9 (2015).
- Wixon, J. *Danio rerio*, the zebrafish. *Yeast* 17: 225-231 (2000).
- Wolkowicz, I.R., Herkovits, J., Pérez Coll, C.S., Stage-dependent toxicity of bisphenol a on *Rhinella arenarum* (*anura, bufonidae*) embryos and larvae. *Environ Toxicol.* 29: 146-154 (2014).

- Wright, H.M., Clish, C.B., Mikami, T., Hauser, S., Yanagi, K., Hiramatsu, R., Serhan, C.N., Spiegelman, B.M., 2000. A synthetic antagonist for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits adipocyte differentiation. *Journal Biology and Chemistry* 275: 1873-1877 (2000).
- Xue, S., Shi, L., Wu, C., Wu, H., Qin, Y., Pan, W., Hartley, W., Cui, M. Cadmium, lead, and arsenic contamination in paddy soils of a mining area and their exposure effects on human HEPG2 and keratinocyte cell-lines. *Environ Res.* 156: 23-30 (2017).
- Yamada, K., Urase, T., Matsuo, T., Suzuki, N. Constituents of organic pollutions in leachates from different types of landfill sites and their fate in the treatment processes. *Journal Japan Society Water Environmental* 22: 40-45 (1999).
- Yamamoto, T., Yasuhara, A., Shiraishi, H., Nakasugi, O. Bisphenol A in hazardous waste landfill leachates. *Chemosphere* 42: 415-418 (2001).
- Yang, M., Kim, S.Y., Lee, S.M., Chang, S.S., Kawamoto, T., Jang, J.Y., Ahn, Y.O. Biological monitoring of bisphenol A in a Korean population. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44: 546-551 (2003).
- Yang, J., Li, H., Ran, Y., Chan, K. Distribution and bioconcentration of endocrine disrupting chemicals in surface water and fish bile of the Pearl River Delta, South China. *Chemosphere* 107:439-46 (2014).

- Ye, X., Kuklennyik, Z., Needham, L.L., Calafat, A.M. Quantification of urinary conjugates of bisphenol A, 2,5-dichlorophenol, and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in humans by online solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 383: 638-644 (2005).
- Yeung, B.H., Wan, H.T., Law, A.Y.S., Wong, C.K.C. Endocrine disrupting chemicals. Multiple effects on testicular signaling and spermatogenesis. *Spermatogenesis* 1, 231-239 (2011).
- Ying, G.G., Kookana, R.S. Degradation of five selected endocrine-disrupting chemicals in seawater and marine sediment. *Environmental Science Technology* 37: 1256-1260 (2003).
- Yin, D.Q., Hu, S.Q., Gu, Y., Wei, L., Liu, S.S., Zhang, A.Q. Immunotoxicity of bisphenol A to *Carassius auratus* lymphocytes and macrophages following in vitro exposure. *J Environ Sci (China)*. 19: 232-237 (2007).
- Yoshida, T., Horie, M., Hoshino, Y., Nakazawa, H. Determination of bisphenol A in canned vegetables and fruit by high performance liquid chromatography. *Food Additives and Contaminants* 18: 69-75 (2001).
- Yurino, H., Ishikawa, S., Sato, T., Akadegawa, K., Ito, T., Ueha, S., Inadera, H., Matsushima, K. Endocrine disruptors (environmental estrogens) enhance autoantibody production by B1 cells. *Toxicology Science* 81 (1): 139-147 (2004).

- Zeng, G., Zhang, C., Huang, G., Yu, J., Wang, Q., Li, J., Xi, B., Liu, H. Adsorption behavior of bisphenol A on sediments in Xiangjiang River, Central-south China. *Chemosphere*. 65 (9): 1490-9 (2006).
- Zhang, W., Tian, J., Zhang, L., Zhang, Y., Li, X., Lin, H. cDNA sequence and spatiotemporal expression of prolactin in the orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides* Gen. Comp. Endocrinol, 136:134-142 (2004).
- Zhuang, P., Li, Y., Zou, B., Su, F., Zhang, C., Mo, H., Li, Z. Oral bioaccessibility and human exposure assessment of cadmium and lead in market vegetables in the Pearl River Delta, South China. *Environ Sci Pollut Res Int*. 23 (23): 24402-24410 (2016).
- Zimmers, S.M., Browne, E.P., O'Keefe, P.W., Anderton, D.L., Kramer, L., Reckhow, D.A., Arcaro, K.F. Determination of free Bisphenol A (BPA) concentrations in breast milk of U.S. women using a sensitive LC/MS/MS method. *Chemosphere*. 104: 237-43 (2014).
- Zoeller, R.T., Bansal, R., Parris. Bisphenol-A, an environmental contaminant that acts as a thyroid hormone receptor antagonist in vitro, increases serum thyroxine, and alters RC3/neurogranin expression in the developing rat brain. *Endocrinology* 146: 607-612 (2005).

## 9.- Normativa

Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

Directiva 2011/8/UE de la Comisión de 28 de enero de 2011 que modifica la Directiva 2002/72/CE por lo que se refiere a la restricción del uso de bisfenol A en biberones de plástico para lactantes.

Directiva 2017/898 de la Comisión de 24 de mayo de 2017 (DOUE 25 de Mayo 2017) por la que se modifica, con el fin de adoptar valores límite específicos para determinados productos químicos utilizados en los juguetes, el apéndice C del Anexo II de la Directiva 2009/48/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre la seguridad de los juguetes, en lo que respecta al Bisfenol A.

Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio.

OECD. 1992. OECD Guidelines for testing of chemicals: Fish, early life stage toxicity test, Section 2, Guideline 210.

OECD, 1993. OECD Guidelines for testing of chemicals: Fish, prolonged toxicity test: 14-day-study, Section 2, Guideline 204.



OECD. 1998. OECD Guidelines for testing of chemicals: Fish, short-term toxicity test on embryo and sac-fry stages, Section 2, Guideline 212

Real Decreto 53/2013 de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.

Reglamento (UE) 10/2011 de la Comisión de 14 de enero de 2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos.

Reglamento de ejecución (UE) 321/2011 de la Comisión de 1 de abril de 2011 que modifica el Reglamento (UE) 10/2011 por lo que respecta a la restricción del uso de bisfenol A en biberones de plástico para lactantes.



## 10. Anexo



10. Anexo. Barasona M<sup>a</sup> I et al. Assessment of the effects of bisphenol-A as a disruptor on ionic regulation in zebrafish through a study of their chloride and prolactin cells. *Acta Adriat.*, 58 (1): 127-138 (2017).

## Assessment of the effects of bisphenol-a as a disruptor on ionic regulation in zebrafish through a study of their chloride and prolactin cells

María I. BARASONA<sup>1</sup>, Ana MOLINA<sup>1\*</sup>, Alfonso BLANCO<sup>2</sup>, Nahum AYALA<sup>1</sup>  
and Rosario MOYANO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Department of Pharmacology, Toxicology and Legal and Forensic Medicine. Veterinary Faculty. University of Córdoba, Campus de Rabanales Carretera Madrid-Cádiz s/n, Córdoba 14071, Spain*

<sup>2</sup>*Department of Anatomy and Comparative Pathology and Anatomy. Veterinary Faculty. University of Córdoba, Campus de Rabanales Carretera Madrid-Cádiz s/n, Córdoba 14071, Spain*

\*Corresponding author, e-mail address: ft2moloa@uco.es

*Bisphenol A (BPA) is one of the chemicals produced in the largest volume in the world. It is commonly used as a component of plastics and food containers and can act as a xenoestrogen in humans. In view of the risk of exposure to it from the environment and diet, and basically as a water pollutant, the objective of our study was to assess possible effects on ionic regulation after exposure to BPA by means of a histopathological and morphometric study of the chloride and prolactin cells in zebrafish (*Danio rerio*) as an experimental model.*

*Twenty-five male 16-week old zebrafish (*Danio rerio*) were allocated randomly into 5 study groups (n=5/group); a control group, and four groups, exposed for 2 weeks to a concentration of (1, 10, 100 and 1000 µg/L) of BPA, respectively. After those 2 weeks, the animals were sacrificed and samples of their gills and pituitary gland were immediately taken for their subsequent histopathological analysis.*

*Our results showed how, in the first study groups, lesions appeared in chloride cells, generating compensatory modifications in the prolactin cells, which were enough to maintain stability in the ionic exchange. As the exposure concentration increased, more serious histological modifications occurred. In the groups with the highest concentration (100 and 1000 µg/L), the lesions were so severe that the prolactin cells underwent some degenerative processes, which probably prevented the compensatory action at gill level.*

**Key words:** Bisphenol A, zebrafish, ionic regulation, prolactin cells, chloride cells

## INTRODUCTION

Bisphenol A (BPA) is a component of, among other items, plastics and food containers, and it is one of the chemicals produced in the largest volume in the whole world (LANG *et al.*, 2008), reaching high world production figures; in 2006, 3.8 million tons of it were produced (FITZGERALD *et al.*, 2014). Changes in pH, mechanical abrasions and heat, accelerate hydrolysis of the ester bond linking BPA molecules in polycarbonate plastic, and repeated washing of polycarbonate products causes BPA to easily leach out of products and spread it over the environment, even at ambient temperatures (HOWDESHELL *et al.*, 2003). It is a known fact that BPA is a weak oestrogenic chemical, which produces important effects in the male tract, mainly in testes, with a significant sperm decrease (BHANDARI *et al.*, 2015; WISNIEWSKI *et al.*, 2015). It is known that BPA acts on the anterior pituitary gland, stimulating PRL production by up to 50% of the maximal response obtained with 17  $\beta$ -estradiol (E2) from prolactin cells in the adult, inducing lactotrope proliferation (STOKER *et al.*, 1999; RAMOS *et al.*, 2003; VELASCO-MARINERO *et al.*, 2011). Further, it has been reported that BPA induces gill modifications and severely alters chloride cells (MOHAMMED *et al.*, 2013; FAHEEM *et al.*, 2016). Prolactin cells regulate osmotic balance, stimulating processes involved in freshwater adaptation in the gill, kidney, and gut (PIERCE *et al.*, 2007). These types of alterations in prolactin cells could be reflected in those changes in chloride cells. Several research works have reported prolactin cell participation in gill ionic regulation, because of which the serious modifications in chloride cells could induce a palliative prolactin cell reaction (BARTELS *et al.*, 2015; INOKUCHI *et al.*, 2015).

Many works have been focused on fish since, as they are aquatic inhabitants, they receive sewage or industrial effluents and agricultural runoff containing oestrogenic chemicals (HASSANIN *et al.*, 2002). Zebrafish are suitable for assessing toxic effects because test protocols have already been established, including OCDE guidelines (OCDE 204, 210, 212), that recommend these fish for chemical toxicity assessments, as well

as in Annex I of Directive 2010/63/EU, relative to the protection of animals used for scientific purposes.

With the aim of investigating in depth BPA toxicity, our objective was to evaluate the effects of BPA on ionic regulation through the study of gills and chloride cells and their possible relationship with prolactin cells by histological evaluation after 14 days of BPA exposure.

## MATERIAL AND METHODS

A total of twenty-five 16-week old male zebrafish (*Danio rerio*), were used to carry out this research. The animals were distributed randomly into 5 groups ( $n=5/\text{group}$ ), a control group, and four treated groups, which were exposed for 14 days (OCDE 204) to graded concentrations (1, 10, 100 and 1000  $\mu\text{g/L}$ ) of BPA (Sigma Aldrich®), under flow-through conditions (10 water renewals/day) and photoperiod of 16 light hours: 8 dark hours. Water temperature was  $26\pm 1$  °C and dissolved oxygen was maintained above 60% of saturation level by continuously aerating the test solution.

The study was carried out in the Experimental Animal Service at the University of Córdoba (Spain). All procedures were approved by the Animal Care Committee of the University of Córdoba, and in concordance with the European Regulations for the Protection of Experimental Animals (Directive 2010/63/EU).

After 2 weeks of exposure, zebrafish were sacrificed with an overdose of anaesthetic solution of tricaine methanesulfonate (MS-222® 500 mg/L; Sigma-Aldrich®, St. Luis, EE.UU) buffered with sodium bicarbonate (300 mg/L; Sigma-Aldrich®, St. Luis, EE.UU), and next samples of gills and pituitary gland were removed for histological analysis.

### Histological evaluation

For the structural evaluation, samples were routinely processed for paraffin sections by fixing in 10% formaldehyde, dehydrating in graded series of ethanol, immersing in xylol and embedding in paraffin wax. Every tenth section (4  $\mu\text{m}$

thick) of each block was stained with hematoxylin and eosin and used for the morphological study.

For the ultrastructural study, small randomly selected samples were primarily fixed in a 2% glutaldehyde solution in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) overnight at 4 °C and then refixed in 1% osmium tetroxide in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) for 30 min. After dehydration in graded ethanol series and embedding in Araldite, semi-thin and ultra-thin sections were cut on an LKB ultramicrotome (Central Microscopy Research Facilities, University of Córdoba, Spain). Ultra-thin sections were double-stained with uranyl acetate and lead citrate. For the scanning study, the sample was critical point dried and then coated in colloidal gold. Ultra-thin sections were viewed and photographed in a JEM 1400 transmission electron microscope.

#### Morphometric study

The morphometric studies of the prolactin cells were done directly on images taken of the cephalic lobe of the pituitary gland under the electron microscope, quantifying both the number and size of the cells. 20 small squares/animal were quantified so that 100 squares/group were counted, each grid square being 100  $\mu\text{m}$  per side, so that the totality of the surface  $10 \times 10 = 100 \mu\text{m}^2$ , the total surface analyzed/group being of  $100 \times 100 = 10000 \mu\text{m}^2$ . We based ourselves on cell identification by the pleomorphism of granules, measuring the nucleus surface so that we obtained the number of cells observed on that surface.

The morphometric studies of the chloride cells were made by optical microscope magnified to  $\times 40$ . Chloride cells were counted by measuring the nucleus of the five different preparations per animal (H&E).

#### Statistical analysis

Data were analyzed using the statistical program Statgraphic Centurion XVI®, to determine BPA effects on every exposed group. ANOVA (test-F) was used to demonstrate whether there

were any significant differences between the averages. The Fisher LSD post hoc test was performed on multiple comparisons between groups. Results are expressed as mean values  $\pm$  standard deviation (SD) and  $P < 0.05$  was considered to be significant.

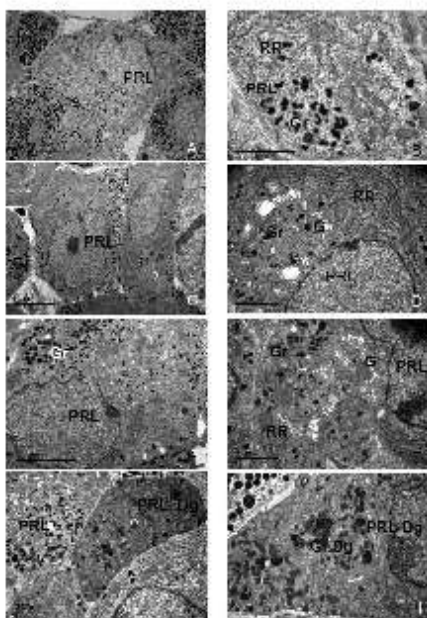
## RESULTS

In the control group, the prolactin cells were distributed jointly with the adenocorticotrophic hormones throughout the zebrafish posterior and anterior pituitary gland. Prolactin cells were elongated in shape, with scant cytoplasmic prolongations, and they were near the capillaries (Fig. 1A). Their nucleus, spherical and oval in shape, was arranged in the center of the cell, with a thin chromatin and a developed nucleolus. This cell had abundant organoids, such as the rough reticulum and especially the Golgi complex, as well as proliferous mitochondria. These prolactin cells displayed secretion granules, which tended to be laid out near the nucleus relating themselves to the Golgi complex (Fig. 1B). However, their differential characteristic was their strong pleomorphism, which made the prolactin cells unmistakable in relation to the different pituitary gland cells. These granules came in different shapes, i.e. spherical, ovoid and with a branched contour.

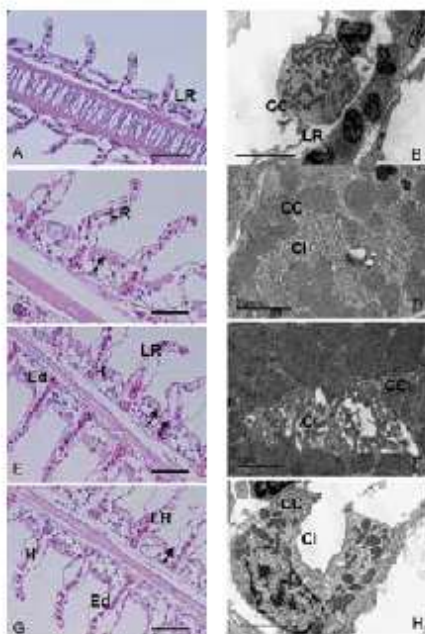
In the analysis of the gills of the control group, the layout of the apparently normal primary and respiratory lamellae was observed as having large acidophilic chloride cells, these being found preferably in the basal zones of the respiratory lamellae (Fig. 2A, 2B, 3A, 3B).

In the exposure group of 1  $\mu\text{g/L}$  of BPA, when evaluating the pituitary gland, we observed that the prolactin cells morphology was similar to that of the cells in the control group with regard to their configuration and distribution in the anterior lobe of the gland (Fig. 1A). They appeared in an isolated manner of between spherical and ovoid in shape. The images observed corresponded to a very active endocrine cell with a broad Golgi complex and a very abundant rough reticulum. The granules were seen to be highly pleomorphic and numerous, although the most pleomorphic ones were located as being related





**Fig. 1.** Ultrastructural observations of the pituitary gland.  
**A.** Control and 1 µg/L group. Prolactin cell (PRL), with a stellate morphology, a large nucleus and a cytoplasm with abundant organoids and secretion granules.  
**B.** Control and 1 µg/L group. Detail of (PRL). A rough reticulum (RR) and grouped and highly pleomorphic secretion granules (Gr) stand out.  
**C.** 10 µg/L group. Prolactin cell (PRL), oval-shaped with a clear nucleus, organoids and pleomorphic granules (Gr) in a large amount.  
**D.** 10 µg/L group. Detail of a very active Prolactin cell (PRL). A sizeable rough reticulum (RR) and Golgi complex (G) are prominent, and there is especially an increase in dense, pleomorphic secretion granules (Gr).  
**E.** 100 µg/L group. A highly developed prolactin cell (PRL) with an eccentric nucleus and abundant organoids and secretion granules (Gr).  
**F.** 100 µg/L group. Detail of Prolactin cell (PRL), which shows a great development of its organoids, of the Golgi complex (G) and rough reticulum (RR). It has abundant highly pleomorphic granules (Gr).  
**G.** 1000 µg/L group. Two types of Prolactin cell (PRL) can be seen, on one hand a group which is similar to the activated cells (PRL) the other, the degenerated Prolactin cell (PRL Dg), both nucleus and cytoplasm are dense, and it is noteworthy that a large number of its granules are in crynophagy (self-destruction).  
**H.** 1000 µg/L group. Detail of prolactin cell (PRL Dg), with most of its granules in autophagocytosis (GrDg).

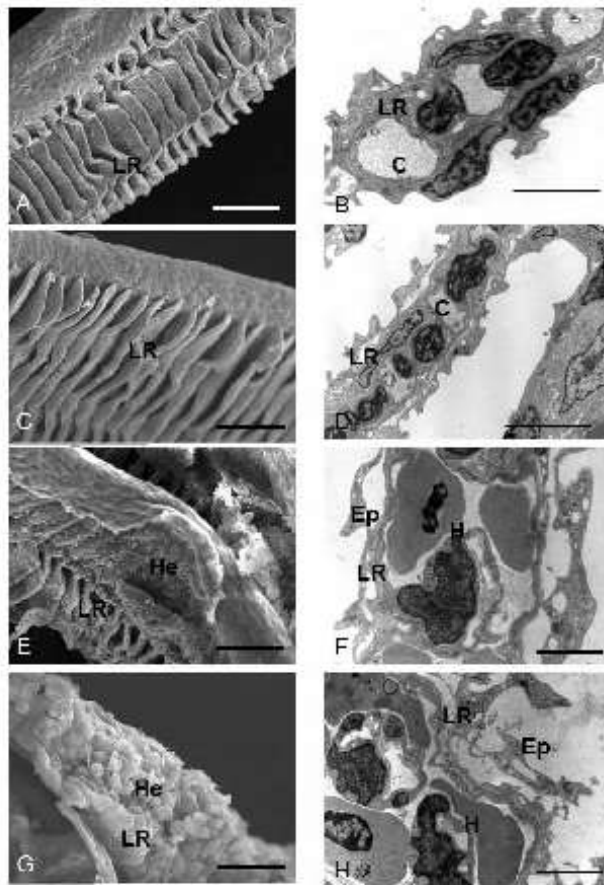


**Fig. 2.** A, C, E, G: A photomicrograph of gills stained with H&E x40. B, D, F, H:

**Ultrastructural observations**

- A.** Control and 1 µg/L group. Detail of gill under optical microscope, with normal respiratory lamellae (LR) and chloride cells (CC) in basal zone.  
**B.** Control and 1 µg/L group. Detail of respiratory lamellae (LR) under transmission electron microscope (TEM). The presence of a chloride cell (CC) with abundant mitochondria should be noted.  
**C.** 10 µg/L group. Detail of respiratory lamellae (LR). The acidophilous chloride cells (arrow) and vascular hyperaemia can be seen.  
**D.** 10 µg/L group. Detail of chloride Cell (CC) under TEM. The intracellular canaliculus (CI) with numerous microvilli and mitochondria (M) standing out.  
**E.** 100 µg/L group. Detail of gill. There are numerous chloride cells (arrow) and vascular alterations with oedema (Ed) and hyperaemia (H).  
**F.** 100 µg/L group. Detail of chloride Cell (CC) under TEM. A dilated intracellular canaliculus (CI) is highlighted.  
**G.** 1000 µg/L group. Detail of respiratory lamellae (LR). There are numerous chloride cells with hyperaemic membrane (H) and oedema (Ed).  
**H.** 1000 µg/L group. Detail of chloride Cell (CC) under TEM. A dilated intracellular canaliculus (CI) and loss of microvilli stand out.





**Fig. 3.** Gill images from the study groups. **A, C, E, G:** scanning electron microscopy (S.E.M.) **B, D, F, H:** Transmission Electron Microscopy (T.E.M.).

**A.** Control and 1 µg/L group. Detail of gill under S.E.M. The normal and uniform respiratory lamellae (LR) are notable.

**B.** Control and 1 µg/L group. Detail of respiratory lamellae (LR) under T.E.M. The presence of normal capillaries (C) stands out.

**C.** 10 µg/L group. Detail of gill under S.E.M. Swollen respiratory lamellae (LR) are seen.

**D.** 10 µg/L group. Detail of respiratory lamellae (LR) under T.E.M. Capillaries (C) with dilated lights and the presence of red blood cells are notable.

**E.** 100 µg/L group. Detail of gill under S.E.M. Disorganization of the respiratory lamellae (LR) with haemorrhages (He) is observed.

**F.** 100 µg/L group. Detail of respiratory lamellae (LR) under T.E.M. Disorganization of the hyperaemic capillaries (H) and of the epithelium (Ep) are prominent.

**G.** 1000 µg/L group. Detail of the gill under S.E.M. There is a disorganization of the respiratory lamellae (LR), with partial loss of coating and accumulations of red blood cells (He).

**H.** 1000 µg/L group. Detail of respiratory lamella under T.E.M. A disorganization of the respiratory lamellae (LR) with highly dilated and hyperaemic capillaries (H) and a loss of the coating epithelium (Ep) stands out.

Table 1. Number and size of prolactin and chloride cells in zebrafish exposed to different BPA concentrations (mean±SD)

		Study Groups			
		Control and 1 µg/L	10 µg/L	100 µg/L	1000 µg/L
Chloride Cells	Number	3.46±0.76	5.44±0.70*	7.05±0.86*	5.82±0.79*
	Size (µm)	19.29±3.59	27.85±1.54*	30.26±2.75*	30.42±4.17*
Prolactin Cells	Number	1.93±0.51	2.60±0.71	3.03±0.39*	2.69±0.38*
	Size (µm)	15.63±1.19	17.45±1.02*	21.11±1.94*	19.85±1.19*

Significantly different from the Control and 1 µg/L groups with  $p < 0.05$ .

to the Golgi complex, with the granules situated close to the cell membrane (Fig. 1B).

In the histopathological study of the gills in this first exposure group, we hardly found any morphological alterations either in the primary lamellae or in the respiratory ones. Similarly, this occurred with the chloride cells, which in addition appeared as forming cup-shaped and acidophilic cells (Fig. 2A, 2B).

In the 10 µg/L group during the evaluation of the pituitary gland, it was observed how the prolactin cells of this group differed from those of the control. They presented granules in two places: first, those located in relation to the Golgi complex which were pleomorphic (this is a characteristic of this type of cell) and, second, the granules in the peripheral areas, which were very numerous, spherical and highly electron-dense. The prolactin cells had an ovoid nucleus. These cells had highly developed organoids, especially the Golgi complex, the endoplasmic or rough reticulum and mitochondria (Fig. 1C, 1D).

During the gill analysis, the initiation of its alterations was observed, with vascular modification in the lamellae, most of their capillaries being hyperemic (Fig. 2C, 2D, 3C). The chloride cells were also seen to be affected by an increase in number (Table 1), and above all an increment in size, but maintaining a uniform stain intensity (Fig. 2C, 3D).

The animals exposed to 100 µg/L of BPA displayed prolactin cells with two functionally different shapes. First, very similar ones to those of the previous group with a decline in granule density, with the development of their cytoplasmic organoids that participated directly in the

formation of granules (Fig. 1E, 1F).

Second, one shape was characterized morphologically by being an endocrine cell with abundant granule-forming organoids, these granulations being very abundant, pleomorphic and electron-dense, occupying a large part of the cell. However, what defines these cells was the existence of autophagosome as myelin figures, which were fundamentally formed of more central granules, and which led one to think of a self-destruction of the hormone within the granulation.

In this study group, some very serious vascular alterations were found in the whole gill area. The alterations were in the vascular bed, with a generalized hyperemia, with a prominent edema, which arrived at separating the lining epithelium from the respiratory lamellae, with the vascular bed. There was an increase in the number of chloride cells; the acidophilus was maintained, also showing a clearer and vacuolated cytoplasm (Fig. 2E, 2F, 3E, 3F).

Finally, the animals exposed to the highest concentration of BPA (1000 µg/L), exhibited prolactin cells also of two different types, but which were more defined; on the one hand, apparently functional cells, and a second type which not only modified its secretion granules but began to show morphological signs of cells in a degeneration process.

The active endocrine pituitary gland cells exhibited an important development in their granulations, these being pleomorphic and electron-dense and showing an abundant growth of the rough endoplasmic reticulum, Golgi complex and mitochondria (Fig. 1G, 1H).

The second type of prolactin cell corresponded to degenerative or regression phases of these cells. First, an increase in the electron density of all their components, cytoplasm and nucleus stood out. These modifications were preferably prominent in the cytoplasm, showing dilations of the Golgi complex and the rough endoplasmic reticulum, together with a hyalinization of the cell matrix. There were swellings in the mitochondria with a partial loss of the mitochondrial crests. In addition, as mentioned in the previous group, although abundant dense, pleomorphic granules were maintained, many of them were affected by crynophagy phenomena, which presented themselves as autophagosomes or myelin figures (Fig. 1G, H).

Finally, at gill level, the alterations appearing in this last experiment group were still more evident, both the vascular and ionic regulation ones. All the blood vessels were found to be hyperemic, highlighting the edema, which affected both the primary and the respiratory lamellae. The size of the chloride cells was increased, with a vacuolization in all of the cytoplasm standing out (Fig. 2G, 2H, 3G, 3H).

#### Quantitative study

The data resulting from the optical and electron microscopic quantifications have been included in Table 1. The data obtained from the control group and 1  $\mu\text{g/L}$  were considered all together as their quantified values were equal.

The prolactin cells were quantified under the electron microscope (Table 1). We observed an increase in the number of cells in the 10 and 100  $\mu\text{g/L}$  groups, with significant differences ( $p < 0.05$ ) in the 100  $\mu\text{g/L}$  group with respect to the control and the first exposed group. This significant difference was also observed in the last study group compared to the control although it displayed a drop in the number of cells. No significant differences were obtained between the treated groups.

There was an increase in the mean diameter of the prolactin cells in the groups exposed to 10 and 100  $\mu\text{g/L}$ , which was evident in the 100  $\mu\text{g/L}$  group, while in the 1000  $\mu\text{g/L}$  group the mean diameter decreased. All the treated groups

showed significant differences with respect to the control ( $p < 0.05$ ), and between each other, with no significant differences being obtained between the 10 and 100  $\mu\text{g/L}$  groups.

In the chloride cell quantification (Table 1), in the 10 and 100  $\mu\text{g/L}$  groups, an increase in the cell number was noted with significant differences ( $p < 0.05$ ) in both cases with respect to the control and the first exposure group. This increase fell in the group with the highest concentration (1000  $\mu\text{g/L}$ ) although significant differences were still maintained compared to the control.

With regard to the nucleus size of the chloride cells, all the groups treated (except for that of 1  $\mu\text{g/L}$ ) displayed significant differences ( $p < 0.05$ ), with respect to the control but no significant differences, were obtained between the treated groups.

## DISCUSSION

Zebrafish are one of a group of small fish species that can be kept in the laboratory. They are easily exposed to endocrine-disrupting chemicals in tank water at different stages in their life cycle and exhibit measurable sensitivity to endocrine-disrupting chemicals, including sexual dimorphism (VAN DEN BELT *et al.*, 2001; ORN *et al.*, 2003; MCGONNELL *et al.*, 2006).

Low-dose effects of endocrine-disrupting chemicals such as BPA are mediated by endocrine-signaling pathways that have evolved to act as powerful amplifiers, with the result that important changes in cell function can occur in response to extremely low concentrations (WELSHONS *et al.*, 2003).

The action of the BPA as a neuroendocrine disruptor has been widely studied (MOLINA *et al.*, 2013; JEDEON *et al.*, 2016; RHAMAN *et al.*, 2016). Due to its importance as an environmental and fundamentally aquatic pollutant, in this work, we proposed to evaluate its effects on ionic regulation in fish, by studying their chloride and prolactin cells.

To understand what happens in the pituitary gland cells, in this work it was first necessary to analyze what goes on in the gills. As reported by



MARCATO *et al.* (2014), endocrine disruptors affect the gill system and, consequently, its ionic regulation. Gill surfaces are in direct and permanent contact with water contaminants and are therefore suitable markers for aquatic pollution (BERNET *et al.*, 1999). Fish gills show limited responses to a wide range of environmental physicochemical stimuli; and, accordingly, they are considered to be general but nonspecific biomarkers. Thus, quantifying the tissue damage extension is necessary in order to gain information about potential compensatory reserves and their influence on fish homeostasis (MANERA *et al.*, 2016). BPA seriously affects the respiratory system of fish and their ionic regulation. A continuous treatment with this compound could trigger progressively evident and serious lesions in the gills, although it should be remembered that pituitary and gonad affection caused by endocrine disruptors could favor gill alterations. Therefore, both facts are closely related.

On analyzing the prolactin cells, we observed that their granulations were the components marking cell depletion due to a lack of activity in the chloride cells, which they regulate. These cells behave like all endocrines as they store large amounts of hormones in their granules, which they are not able to use. A degradation is produced in the secretion granule itself, namely crynophagy or autolysis, which is probably the reason for our having observed numerous, large autophagosomes in the groups with the highest exposure concentration. There was an increase in the number of chloride cells in the (10 and 100  $\mu\text{g/L}$ ) group due to hyperplasia but they dropped in the 1000  $\mu\text{g/L}$  BPA group, probably due to depletion. Our results coincided with those of other authors who, after exposure to BPA, also described edema, hyperplasia and hypertrophy images (BARIŠIĆ *et al.*, 2015; FAHEEM *et al.*, 2016), in which damage increased with increasing concentrations of heavy metals and BPA, respectively. In relation to chloride cell size in the (10 and 100  $\mu\text{g/L}$ ) groups, it increased due to the dilation of the intracellular canal, which was maintained in the 1000  $\mu\text{g/L}$  exposure group, in which there was a total dilation probably due to depletion, which would end up causing the loss of its func-

tionality from excessive dilation. ELSHAER *et al.* (2013) observed cell necrosis after exposure to 50  $\mu\text{g/L}$  BPA for 15 days, subsequently observing necrosis in the secondary gill lamellae after 30 days of treatment. The progressive changes, such as hyperplasia and hypertrophy of epithelial cells, may increase epithelial thickness, which widens the distance between external environment and the blood, retarding or preventing the entry of toxic ions into the blood stream. This could be considered as being general safety measures against toxicants (ELSHAER *et al.*, 2013; BARIŠIĆ *et al.*, 2015).

Pituitary gonadotropin cells play a crucial role in the central regulation of the reproduction of most vertebrates. However, they can be seriously modified by endocrine disruptors and may be one of the reasons for infertility produced by these compounds. Possible modifications of prolactin cells are little known in these exposure concentrations, although their participation in pathological processes has been reported (WISNEWSKY *et al.*, 2015). The reactions and evolutions of the prolactin cells were highly significant and evolved in parallel to the alterations described in gills. Thus, the reactive hypertrophy and hyperplasia processes on one hand, and atrophy and hypoplasia on the other, with which the prolactin cells terminate (GOLOUBKOVA *et al.*, 2000; VELASCO-MARINERO *et al.*, 2011), correspond to the phases, first, of the cell activations, and, second, the degeneration processes of the gill cells. From these events, it can be deduced that, in a first instance, BPA tends to alter the gill system, and this reacts by activating the chloride cells, which are enhanced by the hormonal action of the prolactin cells. When exposure to BPA is at higher concentrations (100 and 1000  $\mu\text{g/L}$ ), a defensive depletion of the gills is produced due to severe circulatory alterations and degradation of the chloride cells, making their pituitary regulation impossible, which could be considered as being the main cause of the functional inversion of the prolactin cells.

The activation of the prolactin cells is defined by a hypertrophy, which is due to a generalized increase in all the cell components, to a nuclear increase and, especially, to a greater develop-

ment of their metabolic organoids, which results in a larger amount of secretion granules. Curiously enough, the granulation activation was not only expressed by the increase in their number, but also by profound changes in their morphology. We have therefore described the pleomorphic granules as being in direct relation to the Golgi complex, and large deposits of large, spherical, dense granules in large amounts on the cytoplasmic periphery. In the quantification of the prolactin cells there was a significant increase ( $p < 0.05$ ) in their number in the exposure groups of 10 and 100  $\mu\text{g/L}$  of BPA due to hyperplasia, differing from what was observed in a study on rats in which the number of prolactin cells was seen to be modified, although not significantly (VELASCO-MARINERO *et al.*, 2011). There was an increase in the mean diameter in groups (10 and 100  $\mu\text{g/L}$ ), which was more evident in the 100  $\mu\text{g/L}$  group due to hypertrophy, and a diminution in size in the 1000  $\mu\text{g/L}$  group, probably because it did not receive any hormonal stimulus from the testicles, thus inducing a decrease in the secretion capacity, producing autophagy.

## CONCLUSIONS

In conclusion, our results indicated that exposure to BPA caused changes in chloride cells,

which were intensified as the exposure concentration dose increased. Those modifications triggered a series of alterations in prolactin cells, which were aimed at compensating that chloride cell hypofunctionality in an attempt to maintain an adequate gill functioning and, thus, guarantee ionic regulation. In groups with the highest BPA concentrations, the circulatory alterations and chloride cell degradation were so severe that prolactin cell compensation was made impossible, this being the main cause of the functional involution of these pituitary cells. It was, therefore, deduced that BPA would affect gill system so severely that its action could not be compensated at pituitary level, and its ionic regulation could have been affected.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the Spanish Junta de Andalucía (P09-AGR-514) for their financial support for this study.

The authors are grateful to the Institut für Pathologie Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover (Germany), especially Dr Wolfgang BAUMGÄRTNER and the electron microscopy technician, for their encouragement during the ultrastructural image evaluation.

## REFERENCES

- BARIŠIĆ, J., Z. DRAGUN, S. RAMANI, V. FILIPOVIĆ MARIJIĆ, N. KRASNIĆI, R. ČOŽ-RAKOVAC, V. KOSTOV, K. REBOK & M. JORDANOVA. 2015. Evaluation of histopathological alterations in the gills of Vardar chub (*Squalius vardarensis* Karaman) as an indicator of river pollution. *Ecotox Environ Saf.*, 118: 158–166.
- BARTELS, H., M. DOCKER, M. KRAPPE, M. WHITE, C. WREDE & I. POTTER. 2015. Variations in the presence of chloride cells in the gills of lampreys (Petromyzontiformes) and their evolutionary implications. *J. Fish Biol.*, 86: 1421–1428.
- BERNET, D., H. SCHMIDT, W. MEIER, P. BURKHARDT-HOLM & T. WAHLI. 1999. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. *J. Fish Dis.*, 22: 25–34.
- BHANDARI, R., S. DEEM, D. HOLIDAY, C. JANDEGIAN, C. KASSOTIS, S. NAGEL, D. TILLITT, F. VOM SALL & C. ROSENDEL. 2015. Effects of the environmental estrogenic contaminants bisphenol A and 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol on sexual development and adult behaviors in aquatic wildlife species. *Gen Comp Endocrinol.*, 214: 195–219.
- ELSHAER FM, A. WALID, A. ABU-SHAER & S. A. BAKRY. 2013. Histopathological changes in the kidney of mosquito fish, *Gambusia affinis* and guppy fish, *Poecilia reticulata* exposed to Bisphenol A. *Egypt. J. Aquat. Biol.*



- & Fish., 17(4):83- 93.
- FAHEEM, M., N. IAHAN & K.P. LONE. 2016. Histopathological effects of bisphenol-A on liver, kidneys and gills of Indian major carp, Catla Catla (Hamilton, 1822) J. Anim. Plant Sci., 26(2): 514-522
- FITZGERAKD, R.E. & M.F. WILKS. 2014. Bisphenol A-Why an adverse outcome pathway framework needs to be applied. Toxicol lett., 230: 368-374.
- GOLOUBKOVA, T., M. RIBEIRO, L. RODRIGUES, A. CECCONELLO & P. SPRITZER. 2000. Effects of xenoestrogen bisphenol A on uterine and pituitary weight, serum prolactin levels and immunoreactive prolactin cells in ovariectomized Wistar rats. Arch. Toxicol., 74: 92-98.
- HASSANIN, A., S. KUWAHARA, NURHIDAYAT, Y. TSUKAMOTO, W. OGAWA, K. HIRAMATSU & F. SASAKI. 2002. Gonadosomatic Index and Testis Morphology of Common Carp (*Cyprinus carpio*) in Rivers Contaminated with Estrogenic Chemicals. J. Vet. Med. Sci., 64: 921-926.
- HOWDESHELL, K.L., PH. PETERMAN, B.M. JUDY, J.A. TAYLOR, C.E. ORAZIO, R.L. RUHLEN, F.S. VOM SAAL & W.V. WELSHONS. 2003. Bisphenol A is released from used polycarbonate animal cages into water at room temperature. Environ. Health Perspect., 111:1180-1187.
- INOKUCHI, M., J. BREVES, S. MORIYAMA, S. WATANABE, T. KANEKO, D. LERNER, E. GRAU & A. SEALE. 2015. Prolactin 177, prolactin 188, and extracellular osmolality independently regulate the gene expression of ion transport effectors in gill of Mozambique tilapia. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 309(10): 1251-1263.
- JEDEON, K., A. BERDAL & A. BABAJKO. 2016. Impact of three endocrine disruptors, Bisphenol A, Genistein and Vinclozolin on female rat enamel. Bull. Group Int. Rech. Sci. Stomatol. Odontol., 53(1):e28.
- LANG, I.A., T.S. GALLOWAY, A. SCARLETT, W.E. HENLEY, M. DEPLEDGE, R.B. WALLACE, & D. MELZER. 2008. Association of urinary bisphenol A with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. JAMA., 300(11): 1303-1310.
- MANERA, M., L. GIARI, J.A. DEPASQUALE & B.S. DEZFULI. 2016. European sea bass gill pathology after exposure to cadmium and terbuthylazine: expert versus fractal analysis J. Microsc. 261(3): 291-299.
- MARCATO, A.C., A.T. YABUKI & C.S. FONTANETTI. 2014. Nickel exposure promotes osmoregulatory disturbances in *Oreochromis niloticus* gills: histopathological and energy dispersive spectrometry analysis. Environ. Sci. Poll. Res. Int., 21:13095-102.
- MCGONNELL, I.M. & R.C. FOWKES. 2006. Fishing for gene function - endocrine modelling in the zebrafish. J. Endocrinol., 189: 425-439.
- MOHAMMED, F., F. ELSHAER, H. KHALAF-ALLAH & S. BAKRY. 2013. Histopathological alterations in gills of some poeciliid fishes after exposure to bisphenol A. World J Fish Mar Sci., 5(6): 693-700.
- MOLINA, A., A. LORA, A. BLANCO, J. MONTERDE, N. AYALA & R. MOYANO. 2013. Endocrine-active compound evaluation: Qualitative and quantitative histomorphological assessment of zebrafish gonads after bisphenol-A exposure. Ecotox Environ Safe., 88:155-162
- OECD. 1992. OECD Guidelines for testing of chemicals: Fish, early life stage toxicity test, Section 2, Guideline 210. 24 pp.
- OECD. 1993. OECD Guidelines for testing of chemicals: Fish, prolonged toxicity test: 14-day-study, Section 2, Guideline 204. 2 pp.
- OECD. 1998. OECD Guidelines for testing of chemicals: Fish, short-term toxicity test on embryo and sac-fry stages, Section 2, Guideline 212, 20 pp.
- ORN, S., H. HOLBECH, T. MADSEN, L. NORRGREN, & G. PETERSEN. 2003. Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone. Aquat. Toxicol., 65(4): 397-411.
- PIERCE, A., B. FOX, L. DAVIS, N. VISITACION, T. KITAHASHI, T. HIRANO & E. GRAU. 2007. Prolactin receptor, growth hormone receptor, and putative somatolactin receptor in Mozam-

- bique tilapia: Tissue specific expression and differential regulation by salinity and fasting. *Gen Comp Endocrinol.*, 154(1-3): 31-40.
- RAMOS, J., J. VARAYOUD, L. KASS, H. RODRIGUEZ, L. COSTABEL, M. MUÑOZ-DE-TORO, & E. LUQUE. 2003. Bisphenol A induces both transient and permanent histofunctional alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in prenatally exposed male rats. *Endocrinology.*, 144(7): 3206-3215.
- RHAMAN, M., W. KWON, P. KARMAKAR, S. YOON & B. RYU. 2016. Gestational exposure to bisphenol-A affects the function and proteome profile of F1 spermatozoa in adult mice. *Environ. Health Perspect.*, 125(2):238-245. DOI: 10.1289/EHP378
- STOKER, T., C. ROBINETTE, B. BRITT, S. LAWS & R. COOPER. 1999. Prepubertal exposure to compounds that increase prolactin secretion in the male rat: Effects on the adult prostate. *Biol. Reprod.*, 61(6): 1636-1643.
- VAN DEN BELT, K., R. VERHEYEN & H. WITTERS. 2001. Reproductive effects of ethynylestradiol and 4t-octylphenol on the zebrafish (*Danio rerio*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 41: 458-467.
- VELASCO-MARINERO, E., J. HERRERO-PAYO & J. CARRETERO-GONZALEZ. 2011. Changes in pituitary and prolactin cells of Wistar rats after two dental fillings with bisphenolic resins. *Arch. Oral. Biol.*, 56(6):592-598.
- WELSHONS, W. V., K.A. THAYER, B.M. JUDY, J.A. TAYLOR, E.M. CURRAN & F.S. VOM SAAL. 2003. Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ Health Perspect.*, 111: 994-1006.
- WISNIEWSKY, P., R.M. ROMANO, M.M. KIZYS, T. KASAMATSU, G. GIANNOCCO, M.I. CHIAMOLERA, M.R. DIAS-DA-SILVA & M.A. ROMANO. 2015. Adult exposure to bisphenol A (BPA) in Wistar rats reduces sperm quality with disruption of the hypothalamic-pituitary-testicular axis. *Toxicology.*, 329: 1-9.

Received: 29 August 2016

Accepted: 10 January 2017

## Procjena utjecaja disruptora bisfenola A na ionske regulacije u zebrića kroz ispitivanje njihovih kloridnih i prolaktinskih ćelija

María I. BARASONA<sup>1</sup>, Ana MOLINA<sup>1\*</sup>, Alfonso BLANCO<sup>2</sup>, Nahum AYALA<sup>1</sup>  
i Rosario MOYANO<sup>1</sup>

\*Kontakt e-adresa: [fl2moloa@uco.es](mailto:fl2moloa@uco.es)

### SAŽETAK

Bisfenol A je jedan od kemijskih spojeva koji se najviše proizvodi u svijetu. Najčešće se koristi za dobivanje plastike i posuda za hranu i može djelovati kao ksenoestrogen kod ljudi. S obzirom na rizik izloženosti bisfenolu iz okoline i ishrane, i u osnovi kao zagađivaču vode, cilj našeg istraživanja je procijeniti moguće učinke na ionsku regulaciju nakon izlaganja bisfenolu A pomoću histopatološke i morfometrijske studije kloridnih i prolaktinskih ćelija u zebrića (*Danio rerio*) kao eksperimentalnog modela.

25 muških jedinki 16 tjedana starih zebrića (*Danio rerio*) bili su nasumično raspoređeni u pet ispitivanih skupina (n=5/skupina). Kontrolna skupina i četiri skupine bile su dva tjedna izložene koncentracijama od 1, 10, 100 odnosno 1000 µg/L bisfenola A. Nakon ta dva tjedna, životinje su ubijene i uzorci njihovih škraga i hipofize su odmah izuzeti za naknadnu patohistološku analizu.

Naši rezultati su pokazali kako su se, kod prvih ispitivanih skupina, lezije pojavile u kloridnim stanicama, stvarajući kompenzacijske promjene na prolaktinskim stanicama koje su bile dovoljne za održavanje stabilnosti u izmjeni iona. Kako se povećavala koncentracija izloženosti, ozbiljnije histološke modifikacije su se dogodile. Kod skupina s višom koncentracijom (100 i 1000 µg/L) lezije su bile tako jake da su prolaktinske stanice prošle kroz određene degenerativne procese, što je vjerojatno spriječilo kompenzacijsko djelovanje na škragama.

**Ključne riječi:** bisfenol A, zebrića, ionska regulacija, prolaktinske stanice, kloridne stanice