



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“EFECTO DE LA INGESTA SUBCRÓNICA DE LIXIVIADOS DE
POLIPROPILENO EN EL CICLO ESTRAL Y DESARROLLO DEL
OVOCITO DE RATÓN (*Mus musculus*) CEPA CD-1”**

Tesis para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Biológicas

Presenta:

Biól. Monica Sastre Muñoz

Directora:

Dra. Rosalina María de Lourdes Reyes Luna

Codirector:

Dr. Juan Carlos Flores Alonso



Marzo 2023



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

H. Puebla de Z. a 31 de marzo de 2023

Asunto: Voto Aprobatorio

Comité Académico del Posgrado
PRESENTE

Por medio de la presente se hace constar que se revisó y aprobó la tesis titulada:

“Efecto de la ingesta subcrónica de lixiviados de polipropileno en el ciclo estral y desarrollo del ovocito de ratón (*Mus musculus*) CEPA CD-1”

Que presenta la estudiante **Mónica Sastré Muñoz** con número de matrícula **220470533**, aspirante al grado de **Maestra en Ciencias Biológicas**, de la Línea de Generación y Aplicación del Conocimiento: **“Estructura y Funcionamiento de los Seres Vivos”**, notificamos que la tesis reúne los requisitos y se aprueba para su réplica oral en el examen de grado.

Por lo tanto, emitimos los **VOTOS APROBATORIOS** como miembros del **Comité de Jurado de Examen de Grado** como a continuación se indica:

Tutor Interno: Dra. Berenice Venegas Meneses

Tutor Externo: Dr. Jesús Guillermo Soriano Moro

Revisor: Dr. Pablo López de Jesús



Agradecemos de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

DECLARATORIA DE TRABAJO ORIGINAL Y NO PLAGIO

Quien suscribe **Monica Sastre Muñoz** con número de matrícula 220470533 perteneciente al posgrado de Maestría en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, autora de la presente tesis titulada “**Efecto de la ingesta subcrónica de lixiviados de polipropileno en el ciclo estral y desarrollo del ovocito de ratón (*Mus musculus*) cepa CD-1**”.

Declaro la originalidad del trabajo de investigación presentado para la obtención de grado de **Maestra en Ciencias Biológicas**, manifestando que no ha sido presentado con anterioridad para la realización u obtención de algún grado académico, de igual manera que no ha sido publicado con anterioridad, exteriorizando la autenticidad de este.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca número 1084907 otorgada para realizar mis estudios de maestría.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Al Centro de Investigaciones Biomédicas de Oriente por brindarme las instalaciones y el material para llevar a cabo los experimentos realizados en este trabajo.

A la Maestría en Ciencias Biológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla incluida en el PNPC clave 005671 por haberme permitido formar parte de esta gran institución para beneficio de mi formación académica y profesional.

A mis directores de tesis, el Dr. Juan Carlos Flores Alonso por la confianza al haberme aceptado en su laboratorio, por la dirección de esta tesis, por su disposición, y paciencia incondicional durante la realización de este proyecto. Dra. Rosalina Reyes Luna por sus consejos, su constante apoyo, orientarme y confiar en mí, siempre ha sido un gran ejemplo para seguir.

A los doctores que me guiaron con su asesoría, la Dra. Berenice Venegas Meneses y el Dr. Jesús Guillermo Soriano Moro por su tiempo y dedicación en la revisión de esta tesis, por compartir su conocimiento y aportar valiosos comentarios que ayudaron a mejorar este proyecto.

A la Biotecnóloga Dulce M. mi compañera de laboratorio, pero más importante, mi amiga, por el apoyo en el laboratorio, por permitirme ser tu maestra, este aprendizaje lo llevaré siempre conmigo.

A Kevin A. por animarme a seguir aun cuando mi mundo se venía abajo, tu ayuda ha sido fundamental, generas luz y magia haciendo mis días mejores. Nuestro futuro será inefable.

Gracias a mi familia por bríndame su apoyo, han destinado tiempo, amor y cuidados para enseñarme cosas nuevas y creer en mí, todos y cada uno de ustedes; Esteban, Carmen, Jessi, Vero, Fani, Lucy, David, Rebecca, los llevo siempre en mi corazón.

A Princesa y Ónix por su compañía, me hacen ver la vida de una manera más bonita.

A mí, por luchar y no irme.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. INDUSTRIA DE PLÁSTICOS	3
2.1.1. POLIPROPILENO.....	4
2.2. LIXIVIACIÓN.....	5
2.3. DISRUPTORES ENDOCRINOS	7
2.3.1. MECANISMO DE ACCIÓN DISRUPTORES ENDOCRINOS.....	7
2.4. OVARIO.....	9
2.4.1. DESARROLLO FOLICULAR	10
2.5. EJE HIPOTALAMO-HIPÓFISIS-OVARIO.....	12
2.6. CICLO ESTRAL	14
2.7. RATÓN CEPA CD-1.....	15
2.8. APOPTOSIS	16
3. ANTECEDENTES	17
4. JUSTIFICACIÓN	22
5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	23
6. HIPÓTESIS.....	23
7. OBJETIVOS.....	23
7.1. OBJETIVO GENERAL	23
7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
8. METODOLOGÍA	24
8.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	24
8.2. ADMINISTRACIÓN DE LIXIVIADOS.....	25
8.3. EVALUACIÓN DEL CICLO ESTRAL POR FROTIS VAGINAL.....	26
8.4. DETERMINACIÓN DE LA FERTILIDAD	27
8.5. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y LA CANTIDAD FOLICULAR	28
8.6. EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE APOPTOSIS EN LAS CÉLULAS FOLICULARES.....	31
8.7. IDENTIFICACIÓN DE ADITIVOS DE PP	32
8.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	35
9. RESULTADOS.....	35
10. DISCUSIÓN.....	53
11. CONCLUSIÓN.....	59

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....60

13. ANEXOS.....77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Estructura química polipropileno. Ilustración tomada de SciFinder número de Registro CAS® 9003-07-0	5
Figura 2 Ilustración esquematizada de la migración química de contenedores para alimentos de plástico. Ilustración tomada y modificada de Muncke J. (2021). Tackling the toxics in plastics packaging. PLoS biology, 19(3).	6
Figura 3 Estructura del ovario, desarrollo folicular y ovulación. Ilustración realizada en Biorender, por la Biol. Monica Sastre Muñoz.	9
Figura 4 Desarrollo del folículo ovárico y el cuerpo lúteo, Ilustración realizada en Biorender, por la Biol. Monica Sastre Muñoz.	11
Figura 5 Eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Ilustración realizada en Biorender, por la Biol. Monica Sastre Muñoz.	13
Figura 6 .Teoría de las dos células. Ilustración realizada en Biorender, por la Biol. Monica Sastre Muñoz.	14
Figura 7 Etapas del ciclo estral. A) Estro, b) Metaestro, c) Diestro, d) Proestro. Ilustración tomada y modificada en Biorender por Biol. Monica Sastre Muñoz...	15
Figura 8 Diseño experimental. Ilustración realizada en Biorender, por la Biol. Monica Sastre Muñoz.	25
Figura 9 Equipo de filtración de agua Nanopure Diamond, con filtro D50281.	25
Figura 10 Recipiente de PP para almacenamiento de alimentos marca “CUBASA” con una capacidad de 1,125 ml.	26
Figura 11 Material empleado en el proceso de almacenamiento y calentamiento de agua.	26
Figura 12 Material empleado para la medición de peso de ratón, peso alimento y toma de frotis vaginal.	27
Figura 13 Microscopio invertido, con cámara incluida para análisis de muestras.	27
Figura 14 Presencia de tapón seminal.	28
Figura 15 Crías ratones CD-1.....	28
Figura 16 Histokicnet ThermoScientific, con proceso programado para tejidos histológicos.	29
Figura 17 Escuadras y base para inclusión de tejidos en parafina.	29
Figura 18 Ovarios incluidos en parafina, almacenados para corte histológico.	29
Figura 19 Microtomo utilizado para hacer los cortes a los órganos incluidos en parafina.	30
Figura 20 Laminillas con los cortes histológicos, previo a su observación bajo microscopio.	31
Figura 21 Software ZEN Black. Análisis de corte histológico de ovario 40x, obtención de las unidades relativas de fluorescencia de Anexina V (Carl Zeiss, Germany).	32
Figura 22 Recipientes de polipropileno marca CUBASA®.	33
Figura 23 Alícuotas conservadas a temperatura ambiente, del agua utilizada en cada semana del tratamiento.	33

Figura 24 Espectrofotómetro donde se obtuvieron los espectros Infra Rojo (IR).	33
Figura 25 Muestra de espectro de infrarrojo QTR. mediante el programa Spectrum v3 3.0.....	34
Figura 26 Programa OriginPro 9.0. Análisis y obtención de los picos y el valor para cada espectro.	34
Figura 27 Citología vaginal durante las diferentes etapas del ciclo estral. a) Estro, b) Metaestro, c) Diestro, d) Proestro	39
Figura 28 Malformaciones causadas por exposición a lixiviados. (a) Falta de desarrollo de falanges y presencia de sindactilia. (b) Ausencia de desarrollo de huesos del metacarpo y falanges. (c) Carente desarrollo de falanges y presencia de sindactilia.	45
Figura 29 Figura 30 Cortes de ovario de los ratones del grupo lixiviado. Presentan estructuras prequisticas, señaladas en un círculo rojo.....	47
Figura 31 Figura 32 Efecto de los lixiviados de PP sobre la inducción de apoptosis en las células foliculares. Se observa que las células estromales (flechas blancas) muestran mayor apoptosis como es observado por la unión de Anexina V (fluorescencia verde) en comparación con las células de la granulosa (flechas rojas). Tinción de núcleos celulares con Hoescht 33342.Imágenes capturadas a 40X.....	48

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1 Efecto de los lixiviados sobre el peso corporal. Se observa que el peso de ambos grupos tiene un comportamiento similar.....	35
Gráfica 2 Efecto de los lixiviados sobre el peso corporal al final del experimento. Los resultados se expresaron como Media y SEM en un total de 11 hembras para cada grupo. *p<0,05; ***p<0,001 (Prueba T de Student).....	36
Gráfica 3 Efecto de los lixiviados sobre el consumo de alimento. Gráfica donde se indican las diferencias entre el consumo del grupo C y el grupo L, donde este último muestra una tendencia a tener un mayor consumo.....	37
Gráfica 4 Efecto de los lixiviados sobre el consumo promedio de alimento. Gráfica donde se destaca como el grupo L tiene un incremento en el consumo de alimento ligeramente mayor al grupo C.....	37
Gráfica 5 Efecto de los lixiviados sobre el consumo de agua. En esta grafica no se logra visualizar completamente una tendencia de diferencia entre el consumo de ambos grupos.	38
Gráfica 6 Efecto de los lixiviados sobre el consumo promedio de agua. Se refleja como el grupo control presenta una mayor ingesta de agua, con relación al grupo lixiviado.	38
Gráfica 7 Número de ciclos estrales. Los valores se muestran Media+ESM del total de ciclos estrales de cada grupo. No se observó diferencia significativa de los ciclos	

estrales en comparación con el grupo Control (Mann Whitney test Two-tailed P>0.05)	40
Gráfica 8 Duración de ciclos estrales. Los valores se muestran Media+ESM de los días de ciclos estrales de cada grupo. No se observó diferencia significativa de la duración de ciclos estrales en comparación con el grupo Control (Mann Whitney test Two-tailed P>0.05)	40
Gráfica 9 Ciclos estrales completos. Los valores se muestran Media+ESM para ambos grupo. Se observó diferencia significativa de ciclos completos en comparación con el grupo Control (Unpaired t test Two-tailed *P<0.05).....	41
Gráfica 10 Ciclos estrales incompletos. Los valores se muestran Media+ESM para ambos grupo. Se observó diferencia significativa de ciclos incompletos en comparación con el grupo Control (Unpaired t test Two-tailed *P<0.05)	42
Gráfica 11 Frecuencia de cada etapa del ciclo. Los resultados se expresaron como promedio y SEM en un total de 11 hembras para cada grupo (**p<0.05; p>0.05, p>0.05 y p>0.05, respectivamente; Prueba T de Student).....	43
Gráfica 12 Días de duración de cada etapa del ciclo. Los resultados se expresaron como promedio y SEM en un total de 11 hembras para cada grupo (**p<0.05; *p<0.05, p>0.05 y p>0.05, respectivamente; Prueba T de Student)).	44
Gráfica 13 Efecto de lixiviados sobre los folículos ováricos. . Los valores se muestran Media+ESM para ambos grupo. Se observó diferencia significativa para los folículos antrales en comparación con el grupo Control (Unpaired t test Two-tailed *P<0.05). P: Primario, S: Secundarios, PA: Preantrales, A: Antrales, PO: Preovulatorios, CL: Cuerpo Lúteo.....	46
Gráfica 14 Diámetro del ovario. Se observó diferencia significativa para los ovarios del grupo control en comparación con el grupo Lixiviadol (Unpaired t test Two-tailed *P<0.05.	47
Gráfica 15 Apoptosis de células estromales y granulosa. Los valores se muestran Media+ESM para ambos grupo. Se observó diferencia significativa de en comparación con el grupo Control (Unpaired t test Two-tailed *P<0.05)	49
Gráfica 16 Apoptosis de células estromales y granulosa en los grupos. Los valores se muestran Media+ESM para ambos grupo. No se observó diferencia significativa en comparación con el grupo Control (Unpaired t test Two-tailed *P<0.05)	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Principales características de los disruptores endocrinos, (Mascolo R., 2021).	8
Tabla 2 Clasificación folicular de acuerdo con el diámetro folicular, adaptación de Myers et al. (2004).	30
Tabla 3 Distribución del peso promedio de los ratones hembra previo al experimento y al final de este para ambos grupos.	36
Tabla 4 Frecuencia y duración de los estados del ciclo en 57 días de tratamiento. ...	42

Tabla 5 Distribución de frecuencias porcentual de acuerdo con su estado gestacional de los ratones para ambos grupos.....	44
Tabla 6 Distribución de frecuencias porcentual por sexo de los ratones recién nacidas para ambos grupos.	45
Tabla 7 Distribución del peso promedio de los ratones nacidos en relación con el sexo para ambos grupos.	45
Tabla 8 Número de folículos por categoría. Media \pm SEM. del número de folículos presentes en ambos ovarios por categoría del grupo Control y Lixiviado sacrificadas al termino de administración, en etapa estral n=4 por grupo.	46
Tabla 9 Diámetro de folículos. Media \pm SEM del diámetro en μm de los folículos presentes en ambos ovarios por categoría para ambos grupos, sacrificadas al termino de administración, en etapa estral n=4 por grupo. P: Primario, S: Secundarios, PA: Preantrales, A: Antrales, PO: Preovulatorios.....	46
Tabla 10 Identificación de grupos funcionales en espectros de Infra Rojo (IR) de las alícuotas de agua. Semanas 1-8, interpretación de Aditivos. Para ver las imágenes dirigirse Anexos.	52
Tabla 11 Identificación de grupos funcionales en espectros de Infra Rojo (IR) de los contenedores de PP. Semanas 1-8, interpretación de Aditivos. Para ver las imágenes dirigirse Anexos.	52

ÍNDICE ANEXOS

Anexo 1 Espectros de Infra Rojo (IR) de la muestra de agua con lixiviados de la semana 1, muestra sustancias químicas de la familia de los aldehídos y alquinos.	77
Anexo 2 Espectros de Infra Rojo (IR) de la muestra de agua con lixiviados de la semana 2, se aprecian sustancias químicas de la familia de los aldehídos y alquinos, así como alcanos.....	77
Anexo 3 Espectros de Infra Rojo (IR) de la muestra de agua con lixiviados de la semana 3, se aprecian sustancias químicas de la familia de los aldehídos y alquinos, así como alcanos.....	78
Anexo 4 Espectros de Infra Rojo (IR) de la muestra de agua con lixiviados de la semana 4, se aprecian sustancias químicas de la familia de los aldehídos y alquinos, así como alcanos.....	78
Anexo 5 Espectros de Infra Rojo (IR) de la muestra de agua con lixiviados de la semana 5, se aprecian sustancias químicas de la familia de los aldehídos y alquinos.....	79
Anexo 6 Espectros de Infra Rojo (IR) de la muestra de agua con lixiviados de la semana 6, se aprecian sustancias químicas de la familia de los aldehídos y alquinos, así como alcanos.....	79

Anexo 7 Espectros de Infra Rojo (IR) de la muestra de agua con lixiviados de la semana 7, se aprecian sustancias químicas de la familia de los aldehídos y alquinos, así como alcanos.....	80
Anexo 8 Espectros de Infra Rojo (IR) de la muestra de agua con lixiviados de la semana 8, se aprecian sustancias químicas de la familia de los aldehídos y alquinos, así como alcanos.....	80
Anexo 9 Espectros de Infra Rojo (IR) de la muestra de polipropileno de la semana 1, se aprecian sustancias químicas de la familia de los hidroxilos, aldehídos, ester y amida.	81
Anexo 10 Espectros de Infra Rojo (IR) de la muestra de polipropileno de la semana 2, se aprecian sustancias químicas de la familia de los hidroxilos, aldehídos y ester.	81
Anexo 11 Espectros de Infra Rojo (IR) de la muestra de polipropileno de la semana 3, se aprecian sustancias químicas de la familia de los hidroxilos, aldehídos, ester y amida.	82
Anexo 12 Espectros de Infra Rojo (IR) de la muestra de polipropileno de la semana 4, se aprecian sustancias químicas de la familia de los hidroxilos, aldehídos, ester y amida.	82
Anexo 13 Espectros de Infra Rojo (IR) de la muestra de polipropileno de la semana 5, se aprecian sustancias químicas de la familia de los hidroxilos, aldehídos, ester y amida.	83
Anexo 14 Espectros de Infra Rojo (IR) de la muestra de polipropileno de la semana 6, se aprecian sustancias químicas de la familia de los hidroxilos, aldehídos, ester y amida.	83
Anexo 15 Espectros de Infra Rojo (IR) de la muestra de polipropileno de la semana 7, se aprecian sustancias químicas de la familia de los hidroxilos, aldehídos, ester y amida.	84
Anexo 16 Espectros de Infra Rojo (IR) de la muestra de polipropileno de la semana 8, se aprecian sustancias químicas de la familia de los hidroxilos, aldehídos, ester y amida.	84

ABREVIATURAS

2,4-DTBP: 2,4-di-*tert*-butilfenol

AhR: Receptores de hidrocarburos aromáticos

BPA: Bisfenol-A

BPE: Bisfenol E

BPS: Bisfenol S

CG: Células de la granulosa

DBP: Dibutilftalato

DE: Disruptor endocrino
DEHA: dietilhidroxamina
DEHP: ftalato de bis(2-etilhexilo)
DiNP: Ftalato de disononilo
Erb: Receptor de Factor epidérmico
FDA: Food and Drug Administration
FSH: Hormona folículo estimulante
GC: Grupo control
GL: Grupo lixiviados
GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas
HHO: eje hipotálamo-hipofisis-ovario
IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
LH: Hormona luteinizante
MEHP: Mono-2-etilhexilo
MEP: Ftalato de monoetililo
OMS: Organización Mundial de la Salud
PBDE: Éteres de Polibromodifenilos
PCB: Bifenilos policlorados
PP: Polipropileno
TCDD: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p- dioxina
URF: Unidades relativas de fluorescencia

RESUMEN

Actualmente la tasa de problemas en salud reproductiva como infertilidad, insuficiencia ovárica prematura, niveles anormales de hormonas esteroideas sexuales, entre otros ha ido en aumento. Una de las causas asociadas a estos es la exposición a sustancias químicas denominadas disruptores endócrinos, que son moléculas capaces de alterar el equilibrio hormonal y la regulación del desarrollo embrionario. Estudios demuestran que los disruptores endócrinos están presentes en la lixiviación de aditivos de recipientes de polipropileno utilizados para el uso alimenticio. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue analizar los efectos de los lixiviados de polipropileno sobre las características celulares del folículo ovárico y el ciclo estral en un modelo murino.

El análisis del efecto de los lixiviados sobre los ciclos estrales totales del Grupo Control (GC) con respecto al Grupo Lixiviado (GL) demostró una diferencia significativa teniendo una media de 10.73 y 10.09 ciclos respectivamente. Para la diferencia entre el tiempo de latencia de etapas del ciclo estral se mostró con una $p=0.0001$ dándose así una diferencia notable entre los grupos. En el análisis del efecto sobre el número de crías que nacieron por grupo la media fue de GC= 5.4 y GL= 8.8 crías obteniendo una $p=0.0021$. Cabe mencionar que se presentaron alteraciones morfológicas en crías del GL. Por último, no se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos sobre la evaluación del peso, consumo de alimento y agua.

Los disruptores endócrinos encontrados en los aditivos del polipropileno parecen causar alteraciones en el ciclo estral, el número de crías y el tiempo de latencia, sin embargo, no es suficiente evidencia para demostrar si causa una acción nociva a nivel celular hacia la salud reproductiva de quienes los consumen, se necesita un análisis histológico para observar estos cambios.

Palabras Claves: Disruptor Endócrino, Salud Reproductiva, Aditivos, Corte Histológico.

1. INTRODUCCIÓN

En la década de 1930, hubo un importante desarrollo tecnológico donde la industria del plástico que deriva del petróleo comenzó su producción en masa, dando paso a que en las siguientes décadas esta industria buscara desarrollar nuevos modelos, los plásticos fueron inventos revolucionarios que definieron fundamentalmente una nueva era al proporcionar materiales livianos con aplicaciones casi inagotables. Durante los últimos 60 años, esta industria ha contribuido a la prosperidad económica y al desarrollo social debió a que es un material abundante y económico, se ha propiciado el consumo masivo ya que el acceso es asequible para la mayor parte de la humanidad (Muncke, 2021; Barrick, *et al.*, 2021). Desde ese entonces hasta el día de hoy el uso de polímeros está aumentando a escala mundial lo que ha llevado a la producción de diferentes plásticos, junto con ellos está el uso de compuestos agregados a estos polímeros para brindar una amplia variedad de funciones. Estos aditivos incluyen plastificantes, colorantes, auxiliares de flujo, estabilizadores de calor y disolventes (Erytropel *et al*, 2014). En 1954, Giulio Natta desarrolló el PP a partir del uso de catalizadores, este plástico es ampliamente usado ya que cuenta con características como impermeabilidad, ligereza, barrera a los aromas, alta resistencia química, resistencia al rasgado, y a las altas temperaturas y no es tóxico. Debido a esta última característica el PP es considerado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y por la Food and Drug Administration (FDA) como un plástico seguro para estar en contacto con alimentos. Sin embargo, el uso de este en el proceso de calentamiento de alimentos en horno de microondas es considerado un factor importante para potenciar la lixiviación de sustancias aditivas presentes en el plástico, ya que puede ocurrir incluso más rápido y en mayor grado cuando el plástico se expone al calor (Hauser R., 2019). Por ejemplo, los utensilios de cocina de plástico del PP generalmente se calientan en hornos de microondas aproximadamente a 100°C (Marsh K. y Bugusu B. 2007). Esto significa que una persona podría estar obteniendo una dosis aún mayor de sustancias químicas potencialmente dañinas por el simple hecho de calentar los alimentos en el microondas dentro de recipiente de plástico. Teniendo en cuenta esto, es importante conocer los aditivos presentes en los recipientes de plástico ya que estudios reportan la presencia de aditivos en envases de PP como ftalatos, bisfenol A (BPA), esteraminidasa entre otros y estos se encuentran marcados como sustancias químicas peligrosas para la salud. Se han

asociado a los envases de plástico (para usos alimentarios y no alimentarios) con la existencia de al menos 148 aditivos con propiedades peligrosas para la salud humana y ambiental. Esto es preocupante, porque los productos químicos conocidos o potencialmente peligrosos contenidos en el plástico pueden migrar a los alimentos, por lo que el empaque que se utiliza para proteger los alimentos se convierte en una fuente de contaminación química de los alimentos (Muncke J., 2021). Estas sustancias debido a sus características se han denominado como disruptores endocrinos (DE); este concepto fue propuesto por la Dra. Theo Colborn en 1991 definiendo a los DE como sustancias químicas capaces de alterar el equilibrio hormonal y la regulación del desarrollo embrionario. En general, los DE son persistentes y se acumulan en los tejidos, por ejemplo, los compuestos como pesticidas se acumulan en el tejido adiposo y se metabolizan y excretan rápidamente. Sin embargo, ha habido una creciente preocupación por los efectos de alteración endocrina de los productos químicos no persistentes como los anteriormente mencionados (Gore *et al.*, 2015 mencionado en Hipwell *et al.*, 2019). Se sabe, por ensayos clínicos en animales, que algunos de los DE tienen acción en las gónadas (ovarios/testículos) y a nivel cerebral, causando problemas en la salud reproductiva como infertilidad, insuficiencia ovárica prematura, niveles anormales de hormonas esteroideas sexuales, carcinomas, entre otros (Wedel K., 2019). El contacto directo de lixiviados de PP con las células puede tener el potencial de causar problemas de salud (Hwang *et al.*, 2019).

2. MARCO TEÓRICO

2.1. INDUSTRIA DE PLÁSTICOS

Los plásticos son compuestos químicos sintéticos, en la industria se conocen como resinas, estos polímeros son materiales orgánicos compuestos por moléculas de gran tamaño, cadenas largas de unidades moleculares llamados monómeros. (Morales *et al.*, 2018).

A estos plásticos la gran mayoría de las veces se les agregan aditivos llamados plastificantes, para brindarles características que mejoran el producto final. Según el Consejo de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC) un plastificante es una sustancia que se incorpora a un material plástico o elastómero para aumentar su flexibilidad y facilitar su transformación. (Beltrán *et al.*, 2005).

2.1.1. POLIPROPILENO

El PP, es un polímero que se obtiene a partir del propileno compuesto extraído del petróleo siendo uno de los polímeros de mayor empleo en la industria del plástico (López *et al.*,2016). Estructuralmente es un polímero vinílico cuya cadena principal está formada exclusivamente por átomos de carbono e hidrogeno, tiene en uno de los carbonos de la unidad monomérica un grupo sustituyente metilo (CH₃), además es un polímero lineal cuya base es una cadena de hidrocarburos saturados (Galvis N., 2014). Como características fisicoquímicas se tiene que es un sólido sin olor, color blanco-transparente, con un punto de ebullición de 120-132 °C, punto de fusión 158-170 °C, densidad 0,92 g/cm³. Tiene naturaleza apolar, por lo que tiene una buena resistencia química pero una resistencia débil a los rayos ultravioletas (Monzó, 2015; SciFinder número de Registro CAS® 9003-07-0, 2022).

La empresa internacional de investigación de mercado, Ceresana, informó que el PP es el segundo polímero más importante a nivel mundial y que se utilizaron 17,66 millones de toneladas para envases flexibles en 2016 (Han *et al*, 2020).

La Norma Mexicana NMX-E-232-CNCP-2011 establece y describe los símbolos de identificación que deben tener los productos fabricados de plástico, en referencia al tipo de material, con la finalidad de facilitar su selección, separación, acopio, recolección, reciclado y reaprovechamiento. El símbolo se compone por tres flechas que forman un triángulo, con un número en el centro y una abreviatura en la base, para el caso del PP se identifica con el número 5 en el centro.

El uso de polímeros está aumentando a escala mundial y junto con él está el uso de muchos compuestos agregados a estos polímeros para servir en una amplia variedad de funciones (Erythropel *et al.*, 2014). La FDA considera al PP un plástico seguro para almacenar alimentos. Sin embargo, a pesar de que el PP es considerado como material seguro, su potencial como DE no han sido propiamente investigado (Chung B, *et al* 2013).

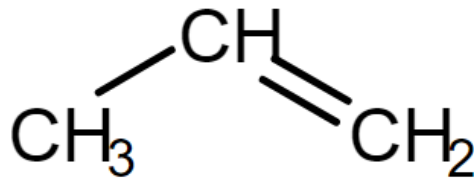


Figura 1 Estructura química polipropileno. Ilustración tomada de SciFinder número de Registro CAS® 9003-07-0

2.2. LIXIVIACIÓN

Se define como lixiviación a la disolución de las fases sólidas de los materiales a través el contacto con una fase líquida, lo que implica que partículas que por la reacción, arrastre o filtrado pueden infiltrarse hacia nuevos lugares, otra definición, es la solución de uno o más componentes de una mezcla sólida por contacto con un disolvente líquido, ambas fases entran en contacto íntimo y el soluto pueden difundirse desde el sólido a la fase líquida, lo que produce una separación de los componentes originales del sólido (Nájera H, 2009; González K., 2010; Li K., 2016).

Con la creación del horno de microondas se dio paso a un estilo de vida más confortable, ya que reduce el tiempo y el costo del proceso de calentamiento, por lo que este método es una alternativa a los calentamientos convencionales y ha encontrado su espacio en la industria alimentaria (Menéndez J.A., 2017). El funcionamiento del horno se basa en la generación de ondas electromagnéticas en frecuencia de microondas, las cuales generan energía que son absorbidas por las sustancias presentes en los alimentos ya que, al rotar, las moléculas chocan unas con otras, provocando su movimiento al dispersar la energía en forma de calor por la vibración molecular. (Restrepo R., 2013)

Existen protocolos establecidos por la FDA para las pruebas de migración de sustancias químicas volátiles de recipientes para microondas y materiales susceptibles al calor de este. Las temperaturas establecidas para realizar pruebas de migración van entre 100 a 130 °C durante 15 minutos. La temperatura que finalmente experimenta un material en contacto con los alimentos en un horno microondas depende de muchos factores como la composición de los alimentos, el tiempo de calentamiento, la masa, la forma de los alimentos y la forma del recipiente.

La lixiviación de sustancias químicas del BPA hacia los alimentos es una grave preocupación puesto que es una vía de fácil ingreso de dichas moléculas al organismo. En los últimos años se reporta un estudio que muestra que el BPA es un contaminante ubicuo en el ser humano y un generador de toxinas a muy bajas dosis, mostrando efectos relacionados con la actividad hormonal (Battocletti A., 2011).

Se ha demostrado que existe lixiviación de aditivos presentes en tubos de PP, en un experimento al utilizar tubos de PP con hidrocloreuro de tiamina, se encontró a está presente en el agua que contenían los tubos, haciendo notar el ingreso de la sustancia química al medio liquido (Xu *et al.*, 2011).

Los plásticos no son inertes y las moléculas más pequeñas se transfieren de los envases de plástico a los alimentos, este proceso de transferencia química se conoce como migración o lixiviación.

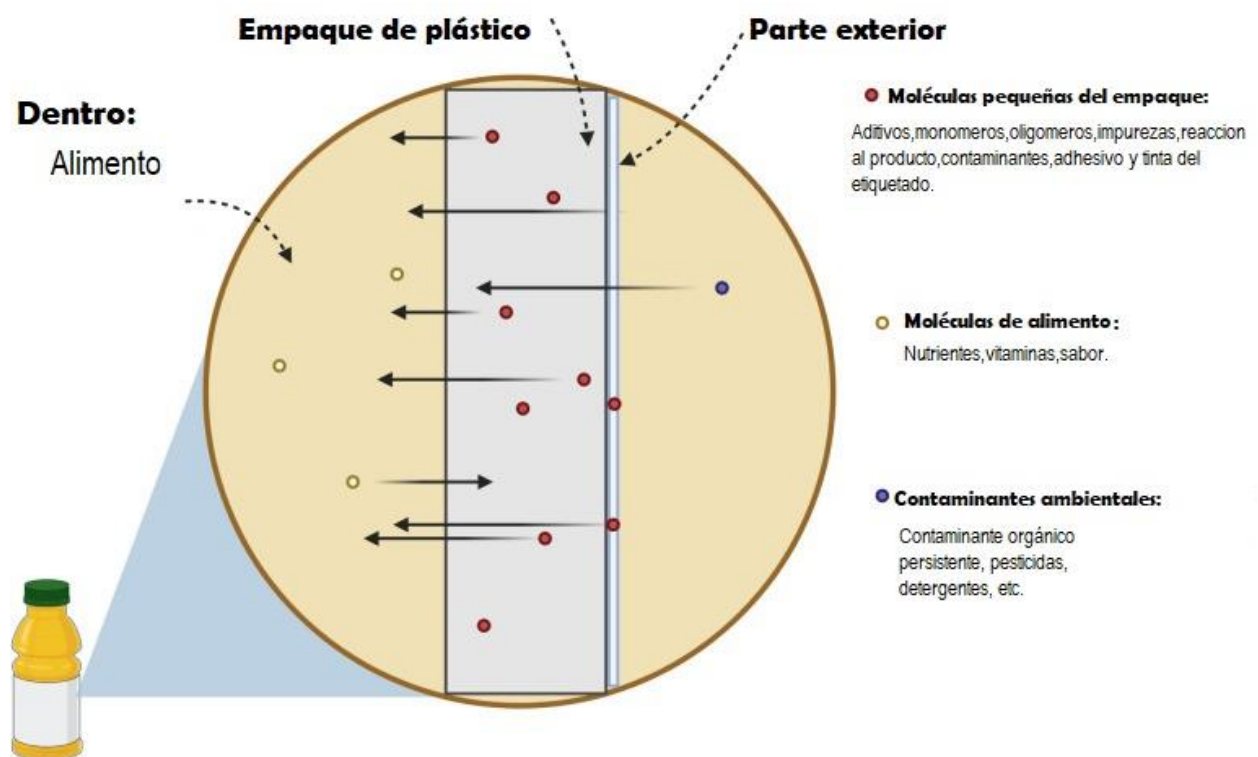


Figura 2 Ilustración esquematizada de la migración química de contenedores para alimentos de plástico. Ilustración tomada y modificada de Muncke J. (2021). Tackling the toxics in plastics packaging. PLoS biology, 19(3).

2.3. DISRUPTORES ENDOCRINOS

Las sustancias químicas peligrosas, como los DE, pueden transferirse de los envases de plástico a los alimentos, junto con otras sustancias químicas desconocidas o toxicológicamente no caracterizadas (Muncke J., 2021).

Se define a los DE como un grupo de sustancias químicas que pueden imitar o alterar la señalización hormonal. Dichos disruptores son capaces de ejercer su efecto a dosis muy bajas y actúan insidiosamente a lo largo de los años, incluso pudiendo transmitir su efecto a generaciones siguientes (Sánchez de Badajoz *et al.*, 2018). Los DE se han relacionado con el aumento de enfermedades, pero, a diferencia de otras clases de tóxicos como los carcinógenos, aún no se han codificado en las regulaciones sanitarias con una categoría de peligro (Kassotis D.D. *et al*, 2020).

El hecho de que la exposición a sustancias químicas puede dañar la reproducción humana tomó relevancia, cuando se reconoció por primera vez que el plomo causaba abortos espontáneos e infertilidad en mujeres y hombres. (Sutton P. *et al.*,2010)

Desafortunadamente se ha demostrado que los DE están de manera libre en el medio ambiente y son a menudo difíciles de evitar señalando que la mayoría de estos químicos pueden atacar al sistema reproductivo femenino y más específicamente al ovario (Karwacka A. *et al.*, 2017).

En un estudio llevado a cabo por el Instituto de Ciencias Marinas de Virginia se demostró la acumulación y presencia de polibromodifenil éteres (PBDE) en un modelo animal siendo este un compuesto químico que se usa como aditivo en los plásticos y que se consideran tóxicos, siguiendo esta misma primicia, un estudio realizado en Estados Unidos arrojó información donde los seres humanos también muestran exposición a los PBDE, principalmente a través del polvo que trae consigo con estos DE y pueden llegar a ingesta. (SEO BirdLife, 2019).

2.3.1. MECANISMO DE ACCIÓN DISRUPTORES ENDOCRINOS

La capacidad de los DE para alterar la función reproductiva y la salud en las mujeres ya se ha caracterizado. Tres diferentes vías se han propuesto para explicar la influencia de los DE en los trastornos reproductivos.

- Un efecto directo sobre la inducción de la expresión génica.
- Un mecanismo epigenético a través del cual los DE alteran las características transcripcionales sin cambiar la secuencia de ADN.
- Un mecanismo neuroendocrino, donde el sistema nervioso registra el entorno y envía señales al sistema endocrino. (Signorile P. *et al* 2012).

Por lo mismo, la comprensión de los mecanismos por los cuales los disruptores endócrinos ejercen su efecto ha ido creciendo enormemente (Kabir E.R. *et al*, 2015). Se sabe que ellos pueden.

- Imitar las hormonas naturales en el cuerpo como los estrógenos, los andrógenos y hormonas tiroideas, que potencialmente producen sobreestimulación.
- Actuar como antagonistas, donde se unen a los receptores de hormonas endógenas dentro de una célula. Por lo tanto, la hormona normal no puede unirse a los receptores y no se produce ninguna señal. Finalmente, el cuerpo no responde correctamente
- Interferir o bloquear las hormonas naturales o sus receptores (Kabir E.R *et al*, 2015).

Además, que dependiendo del tipo de DE pueden alterar la transcripción de receptores nucleares, regular el fraccionamiento del ADN y el metabolismo de lípidos (Chichizola C. *et al.*, 2009).

Características de los Disruptores Endocrinos
Interactúa con los receptores hormonales o los activa.
Antagoniza los receptores hormonales.
Cambia la expresión del receptor hormonal.
Altera la transducción de señales en pacientes sensibles a hormonas.
Induce modificaciones epigenéticas en células productoras de hormonas o que responden a hormonas.
Altera la síntesis de hormonas.
Afecta el transporte de hormonas a través de las membranas celulares.
Perturba la distribución de hormonas o los niveles circulantes de hormonas.
Altera el metabolismo o la eliminación de hormonas
Modifica el destino de las células productoras de hormonas o sensibles a hormonas.

Tabla 1 Principales características de los disruptores endocrinos, (Mascolo R., 2021).

Se ha reportado que algunos químicos como fenoles, ftalatos, percloratos y metales pesados afectan a hormonas importantes para el desarrollo endocrino y reproductivo femenino (Wang A. *et al.*, 2016). Por lo que las mujeres pueden estar expuestas a la toxicidad gonadal cuando están en contacto con productos químicos que son DE presentes en los alimentos, el agua, el aire o los productos que se usan en el hogar, por ello la seguridad reproductiva puede verse comprometida (Strauss J.S *et al.*, 2018). La función adecuada del ciclo ovárico dependerá de diversos factores incluido la exposición gonadal a productos ambientales potencialmente tóxicos, estos DE pueden acelerar la pérdida de la tasa genéticamente predeterminada de ovocitos, reduciendo así la reserva folicular (Monteiro C.S. *et al.*, 2020).

2.4. OVARIO

Los ovarios son un importante órgano reproductor primario que juega un papel importante en la producción de gametos femeninos y la liberación de hormonas sexuales. Las alteraciones funcionales de los ovarios pueden causar muchos problemas reproductivos, como anovulación, secreción irregular de estrógenos y esterilidad (Rowdhwal S. *et al.*, 2018).

El ovario se compone de folículos individuales como estructuras funcionales, junto con cuerpos lúteos. El ovario cuenta con importantes funciones exocrinas y endocrinas dentro de la reproducción sexual que mantienen las características sexuales secundarias, la más importante de estas funciones es la maduración cíclica de los folículos, seguida del establecimiento del folículo dominante y la posterior liberación de un ovocito. (Cheng X. y Jiménez, 2017; Feng Y. *et al.*, 2018).

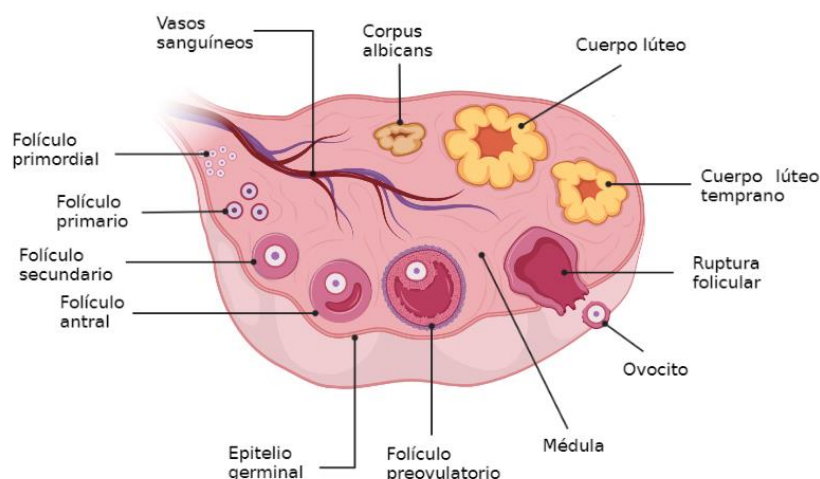


Figura 3 Estructura del ovario, desarrollo folicular y ovulación. Ilustración realizada en Biorender, por la Biol. Monica Sastre Muñoz.

Los folículos son las unidades funcionales del ovario, cuyas funciones principales son la maduración de los ovocitos, la biosíntesis y secreción de hormonas esteroideas (Liu T. *et al.*, 2018). Los ovarios de ratón hembra contienen varios miles de folículos logrando madurar aproximadamente diez ovocitos en cada ciclo estral (Komatsu K. *et al.* 2018). Las etapas de ovogénesis para el ratón y el humano parecen ser fundamentalmente similares. Por supuesto, las escalas de tiempo son diferentes (Mueller W. *et al.*, 2015).

2.4.1. DESARROLLO FOLICULAR

La foliculogénesis es un proceso complejo que involucra cambios morfológicos y funcionales en las células de la granulosa y teca. Este proceso es secuencial y está dictado por respuestas específicamente reguladas a hormonas endocrinas y reguladores intraováricos. La selección folicular depende predominantemente de la interacción célula-célula y la apoptosis. Al nacer, el número de células germinales en los folículos primordiales ha disminuido notablemente debido a la apoptosis de las células germinales que se produce antes de la formación de los folículos ováricos. El equilibrio de la proliferación celular y la apoptosis juega un papel importante en la selección de dominación folicular (Liu Y. *et al.*, 2019).

El adecuado desarrollo folicular en el ovario permitirá que se alcance el objetivo principal, aunque de manera temporal, que es proveer y garantizar el mantenimiento de un número apropiado de gametos viables que aseguren la reproducción de las especies. El crecimiento y desarrollo de los folículos, a partir de los folículos primarios hasta el folículo maduro, involucra la proliferación de las células de la granulosa (CG), al igual que el crecimiento y salida del ovocito durante la ovulación, estos se encuentran controlados principalmente por actividades neuroendocrinas en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (HHO) ya que las gonadotropinas hipofisiarias, factores de crecimiento, iones y otros metabolitos ayudan a regular los mecanismos de proliferación, diferenciación, supervivencia y muerte celular en el ovario (Vantman D. *et al.*, 2010; Peralta y Nicolás, 2013; Liu *et al.*, 2018).

Los folículos comienzan a crecer bajo la estimulación indirecta de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y finalmente culminan en atresia u ovulación. La atresia folicular en las células circundantes como las células de la granulosa y teca

puede verse influenciada a través del mecanismo de apoptosis por una estimulación hormonal débil (Carou M. *et al.*, 2017; Liu Z. *et al.*, 2018).

Los folículos se dividen en:

1. Folículos **primordiales**: si contienen un ovocito rodeado por una capa parcial o completa de células de la granulosa escamosa.
2. Folículos **primarios**: mostrando una sola capa de células de la granulosa cuboidales.
3. Folículos **intermedios**: entre primordiales y primarios, tienen células de la granulosa tanto cuboidales como escamosas. Si predominaban las células cuboidales, los folículos se clasificaban como del tipo primario.
4. Folículos **secundarios**: se clasifican así al poseer más de una capa de células de la granulosa sin antro visible.
5. Folículos **antrales tempranos**: poseen generalmente solo una o dos áreas pequeñas de líquido folicular (antro).
6. Folículos **antrales** poseen un único espacio antral grande.
7. Folículos **preovulatorios** tienen un borde de células del cúmulo que rodeaba al ovocito.

(Myers M. *et al* 2004)

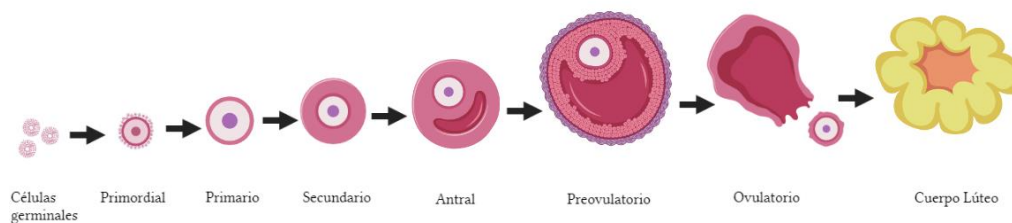


Figura 4 Desarrollo del folículo ovárico y el cuerpo lúteo, Ilustración realizada en Biorender, por la Biol. Monica Sastre Muñoz.

Un experimento *in vitro* en los que se expuso a una sustancia química llamado dibutilftalato (DBP) a un tejido de ovario, dio como resultado una disminución del crecimiento de folículos antrales y un aumento en la activación de apoptosis celular (Rasmussen L.M. *et al.*, 2017).

2.5. EJE HIPOTALAMO-HIPÓFISIS-OVARIO

El eje hipotalámico-hipofisiario-ovárico debe verse como una entidad que trabaja en conjunto para permitir la procreación por medio de la producción cíclica de hormonas gonadotrópicas y esteroides. Este ciclo está estrictamente regulado para seleccionar un folículo dominante para la ovulación, mientras que prepara el endometrio para la implantación (Mikhael S. *et al*, 2019).

El hipotálamo, localizado en la base del cerebro, rige todo el sistema hormonal, siendo el que controla la producción de las hormonas puestas en circulación en el organismo e interviene en otros fenómenos como la regulación de la temperatura corporal, el peso, el apetito y las emociones, todo esto en diferentes núcleos de este. Además, este restablece el equilibrio en caso de exceso o insuficiencia de secreción hormonal. La hipófisis es una pequeña glándula endocrina ubicada bajo el hipotálamo que dinamiza la producción hormonal de los ovarios. Estos últimos, son las glándulas sexuales femeninas que rigen el ciclo menstrual y su funcionamiento es el siguiente: el hipotálamo envía GnRH a la hipófisis, la GnRH es liberada en las terminales axónicas de las neuronas GnRHérgicas, que están localizadas en la eminencia media, hacia la circulación portal-hipotálamo-hipófisis y por esta vía la GnRH ejerce su efecto sobre los gonadotropos localizados en la adenohipófisis, estimulando tanto la liberación de la hormona luteinizante (LH) como de la hormona folículo estimulante (FSH) mediante la unión a receptores específicos de alta afinidad. Los ovarios, al ser estimulados por FSH y LH, producen estrógenos y progesterona, que posibilitan la existencia de ciclos regulares con menstruaciones normales, ausencia de dolores, un adecuado moco ovulatorio y un buen desarrollo de las mucosas (Castillo A., 2011; Trujillo A. *et al.*, 2015).

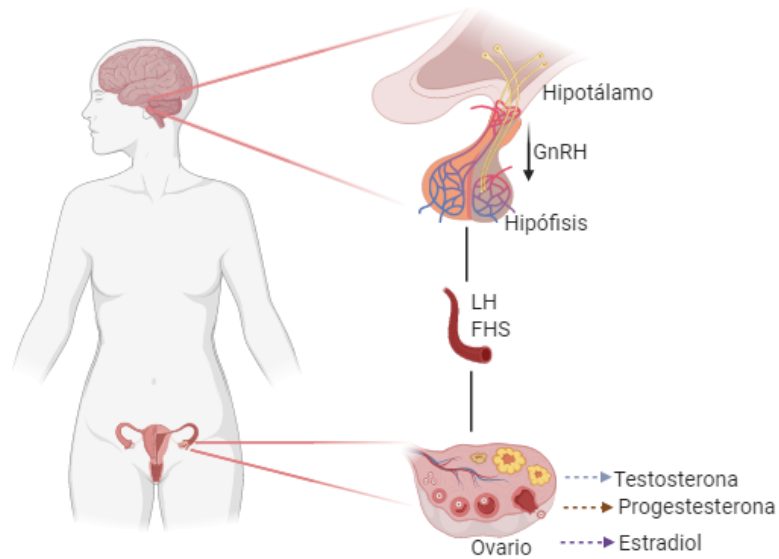


Figura 5 Eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Ilustración realizada en Biorender, por la Biol. Monica Sastre Muñoz.

De acuerdo con la teoría denominada dos células, la LH ejerce su acción sobre las células de la teca induciendo los patrones enzimáticos para la síntesis de andrógenos, se ha podido observar que la LH actúa en ambas células, las de la teca y las de la granulosa. La LH junto con la FSH inducen la producción local de inhibina B los factores de crecimiento IGF I y II que se expresan en las células de la granulosa y de la teca durante la foliculogénesis. Ambas gonadotropinas participan en el complejo mecanismo de crecimiento y selección folicular. En el proceso de reclutamiento folicular juegan un papel fundamental las gonadotropinas, siendo necesarios niveles elevados de FSH junto con unos niveles permisivos de LH. (Botti G., 2008, Tresguerres J. & Castillo C. 2005)

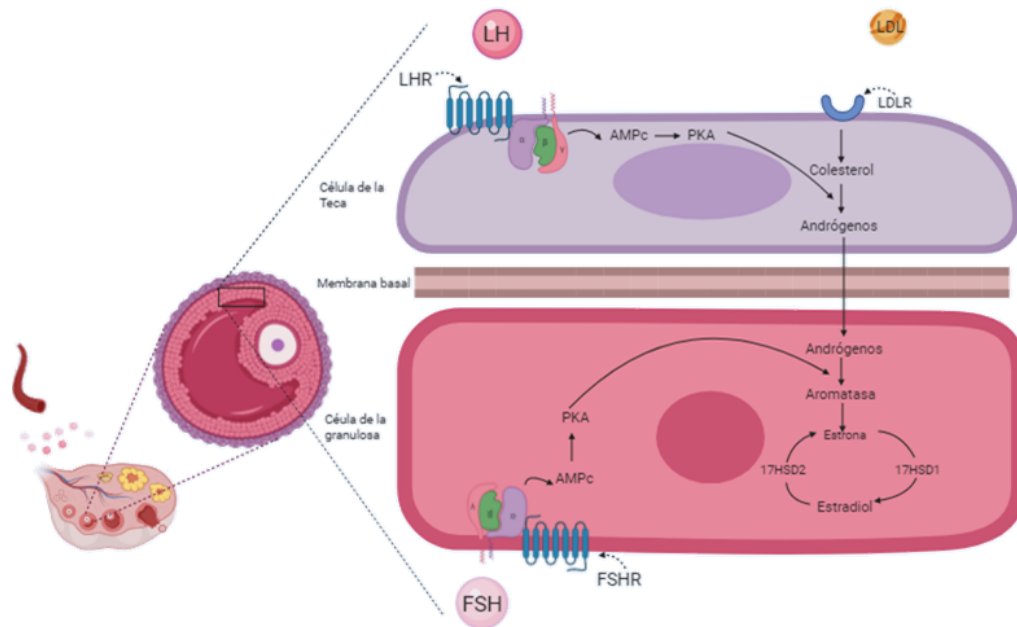


Figura 6 .Teoría de las dos células. Ilustración realizada en Biorender, por la Biol. Monica Sastre Muñoz.

2.6. CICLO ESTRAL

El ciclo estral en roedores es similar al ciclo reproductivo humano, comúnmente llamado ciclo menstrual (ciclos ovárico y uterino) (Ajayi A.F. *et al*, 2020). El ciclo estral tiene cuatro fases, proestro, estro, metaestro y diestro (Galassi P., 2011; Angulo M. 2012). El período reproductivo y el ciclo estral de los ratones comienza alrededor del día 26 después del nacimiento con la apertura de la vagina. El despliegue vaginal se asocia con un aumento de la concentración de estradiol (Ajayi A.F. *et al*, 2020).

El ciclo estral del roedor es un modelo ideal para la investigación cognitiva y reproductiva, para el caso del ratón hembra la duración del ciclo varía de 4 a 6 días en animales mantenidos con 14 h luz y 10 h de oscuridad, algunos autores también estipulan que este se puede ver influenciado por el medio ambiente a través del eje hipotálamo-hipófisis (Galassi P. 2011; Angulo M. 2012).

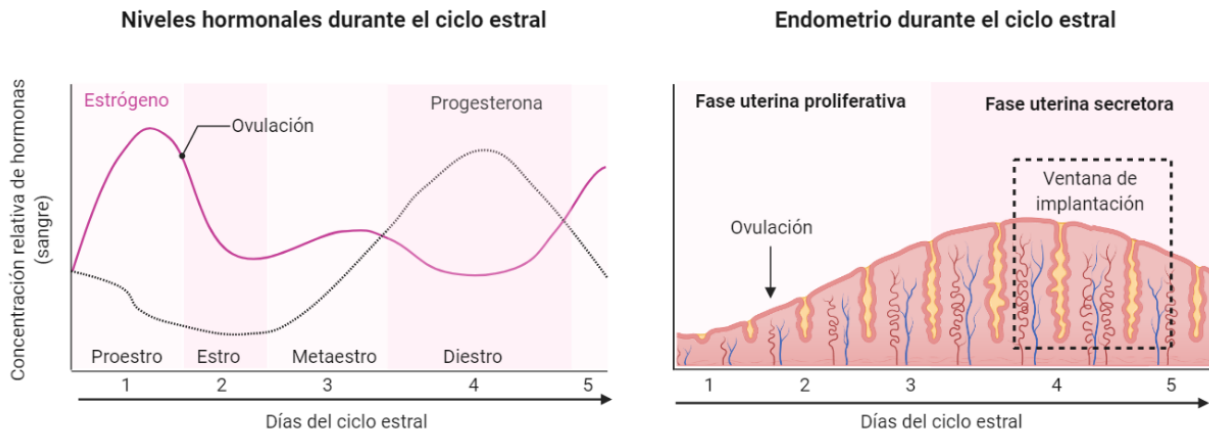


Figura 7 Etapas del ciclo estral. A) Estro, b) Metaestro, c) Diestro, d) Proestro. Ilustración tomada y modificada en Biorender por Biol. Monica Sastre Muñoz.

2.7. RATÓN CEPA CD-1

Los ratones de la cepa CD-1, son mamíferos, mantienen hábitos nocturnos y comportamiento sexual influenciado por feromonas, tiene habilidades sensoriales desarrolladas como el olfato que le permiten distinguir entre individuos de su misma familia y los intrusos, presentan comportamientos como territorialidad y localización de la pareja para la actividad sexual. El sentido del tacto le permite los movimientos en la oscuridad y la orientación a seguir, se caracterizan por un agudo sentido del oído capaz de distinguir sonidos ultrasónicos. Debido a la estructura de sus ojos, pueden ver en la oscuridad, perciben la profundidad y detectan movimientos a 10 m. Su sentido del gusto les permite descubrir sustancias amargas, ácidas y tóxicas, son susceptibles a los cambios de temperatura, afectando su fisiología. La actividad sexual del ratón se presenta durante la noche o lo que corresponde al periodo de oscuridad, definidos en los ciclos luz-oscuridad. El patrón reproductivo se caracteriza por ser una especie poliéstrica, Alcanzan la madurez sexual de 40 a 60 días después de nacer, tienen un ciclo estral de duración de 4-6 días, con celo de 12 h. Tienen la capacidad de entrar nuevamente a estro a las 24 h posteriores al parto. El periodo de gestación es de 19 a 21 días con un promedio de 8 a 10 crías por camada. Las características al nacer pueden ser: peso entre 1-2 g, nacen con los ojos y conducto auditivo cerrados, sin pelaje y poco activos. Aproximadamente al tercer día presentan desarrollo de pelaje, para el día 12 abren los ojos y el conducto auditivo externo, al día 14 inician a comer y se destetan al día 21, con un peso alrededor de 11-14 g. Tiene un sistema inmune y genoma similar al de los seres humanos.

El ciclo de vida del ratón va de 1 a 1.3 años, lo que le permite ser un modelo ideal en las investigaciones en muchas generaciones y en tiempos cortos (Vargas B. *et al.*, 2018). Una de las principales ventajas de las poblaciones consanguíneas es que son excelentes reproductoras y tienen camadas grandes, además, parte del comportamiento de los ratones CD1 se asemeja al de los ratones salvajes, y también tienen una buena agudeza visual a pesar de ser albinos (Hsieh L.S. *et al.*, 2017).

La cepa CD-1 es empleada comúnmente como modelo de investigación para definir los mecanismos que controlan el desarrollo temprano de los mamíferos de igual manera monitorear los impactos ambientales y los efectos biológicos de la exposición temprana a diferentes sustancias y las consecuencia en la fertilidad (Kaludjerovic J. *et al.*, 2012; Crocker K. *et al.*, 2017).

2.8. APOPTOSIS

La apoptosis se define como una forma conservada evolutivamente de muerte celular programada o inducida crítica para el desarrollo y la homeostasis tisular en animales (Cheng F. y Ferrel J.E., 2018). Así mismo, la muerte por apoptosis es un proceso limpio y ordenado, caracterizado por el encogimiento general del volumen de la célula y su núcleo, pérdida de adhesión a las células contiguas, formación de vesículas en la superficie celular, disección de la cromatina en pequeños fragmentos y englobamiento rápido del “cadáver” por fagocitosis.

La apoptosis es un proceso en el que aparecen múltiples eventos en diferentes momentos. Esto puede ser activado por diferentes estímulos, tales como: el daño al ADN, citocinas, pérdida de la matriz extracelular, etc. De igual manera las caspasas juegan un papel importante en la iniciación de apoptosis se activan las caspasas iniciadoras y ejecutoras provocando la morfología típica de la apoptosis (Elinos-Báez C. *et al* 2001). La detección de apoptosis ha adquirido gran importancia, debido a que es un proceso dinámico, ya que la aparición de estos depende de múltiples factores. Dentro de los procesos comúnmente utilizados para detectar apoptosis está la detección de degradación de ADN, cambios en la simetría de la membrana celular y activación de proteínas específicas, utilizando técnicas de microscopia.

3. ANTECEDENTES

(Wang A. *et al* 2016) en su revisión bibliográfica explican como la exposición a DE se ha relacionado con una variedad de resultados adversos en el desarrollo y la reproducción, incluidos los efectos relacionados con la fertilidad, los resultados adversos del embarazo y los efectos adversos para la salud en la infancia, como los efectos del desarrollo neurológico. Las propiedades químicas de los DE afectan particularmente a las hormonas que son fundamentales para el desarrollo adecuado. Estos productos químicos incluyen bifenilos policlorados (PCB), sustancias perfluoroalquilo (PFAS), PBDE, BPA, algunos pesticidas de uso actual, metales y otros.

Los efectos tóxicos crónicos pueden resultar de una exposición simple severa o en repetidas exposiciones a lo largo de un período, (Bruck S. *et al.*, 2018) relacionaron la ingesta crónica de polietileno con *Echinogammarus marinus* a los cuales expusieron mediante su alimentación con algas artificiales enriquecido con > 10000 microplásticos / g por dos semanas. Se intercambió agua y alimentos frescos suministrado dos veces por semana. Después de 14 días, seis individuos fueron diseccionados para confirmar la ingestión de partículas, este estudio sugiere que la ingestión de bajas concentraciones de microplásticos no perjudica la alimentación o el crecimiento de los anfípodos a lo largo del período de exposición, sin embargo, es importante el estudio de estas en sus diferentes concentraciones y en diferentes especies.

Existen evidencias que sugieren la relación entre las afectaciones en la salud reproductiva y la exposición a sustancias químicas, (Niederberger C. *et al.*,2018) realizaron una revisión sistemática que incluye 97 estudios, en los cuales se evaluó la asociación entre la insuficiencia ovárica primaria y tóxicos ambientales. Los investigadores descubrieron que la mayoría de aditivos como bisfenol A, ftalatos y pesticidas comúnmente tienen un impacto negativo en la función ovárica. (Rattan S. *et al.*,2017) en una revisión bibliográfica buscaron la conexión sobre la exposición en modelos animales y humanos a pesticidas, metales pesados, dietilestilbestrol, di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) y bisfenol-A, 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p- dioxina (TCDD), nonilfenol, bisfenoles policlorados, triclosán y parabenos encontrando que estos pueden estar asociados con efectos nocivos en la reproducción, como por ejemplo:

aumento en la liberación de la hormona liberadora de gonadotropina, disminución de folículos sanos, endometriosis, infertilidad, entre otros.

(An R. *et al* 2021) llegaron a la conclusión de que los microplásticos de poliestireno causan fibrosis a través de la activación de la vía de señalización Wnt / β -catenina y la apoptosis de las células de la granulosa del ovario a través del estrés oxidativo en ratas, lo que finalmente resultó en una disminución de la capacidad de reserva ovárica.

A pesar de todas las evidencias que se han llegado a observar, sorprendentemente, pocos estudios han examinado el papel de los DE en la restricción del crecimiento fetal y la pérdida del embarazo. (Andrew-Crain *et al* 2008) sugieren que la exposición a algunos DE durante el embarazo puede contribuir a una placentación incompleta.

Para el caso de problemas en la fertilidad femenina, síndrome de ovario poliquístico y endometriosis, se destaca la exposición al BPA ya que puede verse asociado a estos problemas de salud, además puede provocar disminución de folículos antrales, reducción en el número de ovocitos recuperados, acumulación de folículos primordiales, llevar a inducir falla ovárica prematura, y llegar a interrumpir el proceso de la esteroidogénesis (Sifakis S. *et al.*, 2017; Wedel K. 2019).

Los resultados del estudio que elaboró (Kummer V. *et al* 2011) mostraron que la exposición posnatal a los PAH perturba significativamente el desarrollo de los ovarios en ratas. El estudio proporcionó evidencia de varios efectos de diferentes Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs), que probablemente están asociados con una afinidad de unión diferente al ER ovárico o AhR y al grado de su mutagenicidad. La exposición posnatal a HAP probablemente alteró la constitución y maduración de ERb ovárico, que en ratas inmaduras de 23 días resultó en niveles más bajos de expresión de ERbe y reducción en el número de células ERb positivas en los ovarios. Ninguno de los HAP investigados indujo una mayor degeneración de células de la granulosa y atresia del folículo antral.

(Thomsen A.M. *et al* 2016), en Dinamarca, registraron los datos de muestras de orina de 229 mujeres que estaban en el primer estudio de planificación de embarazo y descubrieron que una mayor exposición a Ftalato de monoetilo (MEP) está asociado

con una menor probabilidad de lograr un embarazo dentro de los primeros seis intentos.

Como parte de las afectaciones que se presentan para explicar la interrupción de la reserva ovárica en humanos, (Béranger, S. *et al* 2012) señalan un mecanismo relacionado a un aumento de apoptosis en los folículos primordiales y primarios, haciendo correlación con los disruptores endocrinos, ya que el impacto de estos agentes tóxicos interfiere en el control local de la hormona del folículo estimulante, y esto conduce a una rápida reducción de la reserva folicular, indicativo de un mayor riesgo de presentar insuficiencia ovárica primaria, al igual que pueden provocar estrés oxidativo y modificaciones en la metilación de ADN.

En la revisión de (Dutta S. *et al* 2020) explican que se llevó a cabo un estudio transversal para evaluar si los biomarcadores de fenoles y ftalatos en la orina de mujeres sometidas a tratamiento de Fertilización *In Vitro* (FIV) se correlacionan con la expresión de vesículas extracelulares (EV) -miARN en su líquido folicular. La desregulación tras la exposición a Ftalatos puede afectar el crecimiento folicular, la función ovárica y, por lo tanto, las tasas de fertilidad (Martinez N. *et al*, 2019).

(Cuhra M., *et al.* 2017) hicieron un experimento donde dejaron desarrollarse y reproducirse a individuos de la especie *Daphnia magna* en tubos de 50 ml hechos de PP. Se observaron una tasa de reproducción significativamente reducida con un inicio a la edad de 15 días, además, hubo un aumento en huevos muertos. (Lithner D., *et al.*, 2012) demostraron que artículos fabricados con PP contienen un peligroso aditivo llamado DEHP. Para el caso de recipientes de plástico destinados a entrar en contacto con alimento, (Moreira M.A. *et al.* 2013) realizaron un análisis de la migración de ftalatos en contenedores de polipropileno sometidos a diferentes condiciones de calentamiento, se encontraron ftalatos en todos los contenedores de PP, sus resultados lograron demostrar que existe una mayor migración de ftalatos en envases con un tiempo de uso prolongado. Después de un uso prolongado, los envases presentan pequeñas deformaciones y son menos resistentes al calor, lo que puede permitir que los ftalatos se liberen más fácilmente. (Qian, S. *et al.* 2018) analizaron diferentes recipientes plásticos en los que se observó la migración de aditivos y recuperaron datos de la presencia de compuestos químicos liberadas al encontrar

alrededor de 100 aditivos migrantes presentes en los recipientes, sin embargo, sólo 12 productos químicos de todos los identificados estaban en la lista EU No. 10/2011 de los productos químicos permitidos para la fabricación de plástico Plastic food contact materials. Por lo anterior, el interés se centró en 4 sustancias: dietilhidroxilamina (DEHA), ftalato de bis(2-etilhexilo) (DEHP), 2,4-di-*tert*-butilfenol (2,4-DTBP) y estearamida debido a que tres de ellas se encuentran en la lista de potencial riesgo de Noruega y todas se encontraron presentes en recipientes de PP.

De acuerdo con el artículo de (Scsukova S. *et al* 2016) los estudios en animales con exposición a los DE sugieren que pueden alterar el orden de progresión programada del ciclo de vida reproductivo femenino. Utilizando el DE PCB en animales de laboratorio se ha observado que la mezcla (1 mg / kg) acelera el inicio de la pubertad y acelerar la senescencia reproductiva. Los DE se han asociado con trastornos de pubertad, incluida la pubertad de inicio temprano o pubertad tardía. Por si fuera poco, se planteó la hipótesis de que la exposición a los DE puede contribuir a la desarrollo de enfermedades ováricas, incluida la aneuploidía primaria, insuficiencia ovárica, síndrome de ovario poliquístico, deficiencia de estrógenos, anovulación, cambios en el ciclo menstrual y por lo tanto reducción de la tasa de concepción.

(Zhou C. *et al.* 2017) expusieron a ratas hembra de la cepa CD-1 a ftalatos causando ovario quístico y pérdida de peso ovárico. (Brehm, S. *et al.*, 2018) expusieron a ratones de la cepa CD-1 con DEHP, la dosis más baja que emplearon (20 µg / kg / d) la eligieron ya que se encuentra dentro del rango de la exposición humana diaria y causa efectos sobre el desarrollo ovárico en ratones, la administración se realizó de forma prenatal y los resultados que se observaron fueron un aumento significativo en la duración del proestro, con disminución del tiempo de estro y aumentó el tiempo del metaestro/diestro. Además, disminuyó el número de folículos primordiales lo que provocó una disminución en el número de folículos preantrales. (Rattan S. *et al.* 2018), elaboraron un experimento donde expusieron a ratones de la cepa CD-1 y durante su etapa puberal descubrieron que la exposición al DEHP causó un adelanto en su apertura vaginal, además aceleró la edad del primer estro. De igual manera en un trabajo similar a los anteriores, (Chiang C. *et al.* 2019) expusieron a ratones de la cepa CD-1 de manera subcrónica a ftalato DEHP durante la etapa adulta causándoles una disminución en el tiempo del proestro en comparación del control, así mismo redujo

significativamente la capacidad de las hembras para quedar embarazadas. Shi, (2019), usando como objeto de estudio a ratones de la cepa CD-1 demostró que tanto BPA como bisfenol E (BPE) y bisfenol S (BPS) hacen que la ciclicidad estral sea anormal, que haya apareamiento retrasado, así como embarazo interrumpido.

(Rashtian J. *et al* 2019) hicieron una recopilación de investigaciones acerca de diferentes plastificantes que afectan en la reproducción femenina, y sus hallazgos fueron los siguientes: Los ftalatos existen en muchos productos que se usan a diario, como adhesivos, detergentes, aceites lubricantes, dispositivos médicos, productos farmacéuticos, solventes, pisos, jabón, champú, lociones y esmalte de uñas. Estos productos químicos se liberan fácilmente al medio ambiente donde se pueden adherir en algunos alimentos y en el polvo de interiores, así como en fuentes de agua y sedimentos. Los seres humanos finalmente se exponen y las fuentes dietéticas se han considerado la principal vía de exposición. En esta revisión, los investigadores se centraron en el DEHP. Después de la ingestión, el DEHP se metaboliza en ftalato de mono-2-etilhexilo (MEHP), que se considera el biomarcador activo de la exposición al DEHP. Los estudios han sugerido que el DEHP es un agonista del receptor activado por proliferador de peroxisoma (PPAR) y del receptor x de pregnano (PXR), y se ha demostrado que altera la síntesis de estrógenos y andrógenos; Hay pruebas acumuladas de estudios experimentales con animales que sugieren que los ftalatos ejercen toxicidad reproductiva al dirigirse al ovario. Se ha demostrado que los ftalatos alteran la foliculogénesis, la esteroidogénesis, la maduración de los ovocitos y el desarrollo embrionario, lo que conduce a una reducción de la fertilidad.

(Li L. *et al* 2016) utilizaron ratones de la cepa CD-1 en etapa puberal para demostrar las acciones del DEHP, los resultados sugirieron que la exposición a DEHP aumenta el daño en el ADN y también causa apoptosis en las células somáticas de los ovarios; además de afectar la foliculogénesis temprana.

(Xu H. *et al* 2021) administró Benzo (a) pireno a ratones y descubrió que induce al estrés oxidativo y a la apoptosis, además de disfunción ovárica temprana asociada al embarazo hasta cierto punto.

En resumen, los estudios que realizaron (Li N. *et al* 2016), en ratones al administrarle DEH argumentan fuertemente a la hipótesis de que el DEH detuvo las células en las fases G0 / G1 e indujo la apoptosis de las células disminuyendo la producción de P4.

Si bien la literatura epidemiológica sobre la exposición femenina a los DE no es persistente y la fecundidad está aumentando, la evidencia que apoya una asociación entre las concentraciones urinarias femeninas de la mayoría de los DE y la fecundidad sigue siendo limitada explica (Mínguez-Alarcón *et al* 2017), después de realizar una recopilación de investigaciones y leer que Hauser y sus colegas encontraron que los metabolitos urinarios de DEHP y ftalato de disodecilo (DiDP) se asociaron con una disminución del total de ovocitos maduros, y los metabolitos de ftalato de disononilo (DiNP) y DiDP se asociaron con tasas de fertilización reducidas. Las concentraciones urinarias más altas de los metabolitos DEHP también se asociaron con una menor probabilidad de embarazo clínico y nacimiento vivo.

4. JUSTIFICACIÓN

Hoy en día, la mayoría de los envases de alimentos utilizados en la industria alimentaria y para comidas caseras están hechos de polímeros orgánicos, como el PP, en su fabricación se utilizan aditivos, que proporcionan determinadas características del producto final, la mayoría de ellos actúan como DE y son susceptibles a migrar del envase al alimento (Sáiz J., y Gómara B., 2017).

Los DE son sustancias tóxicas, que incluso a bajas concentraciones, pueden afectar la salud reproductiva, por lo tanto, se requieren estudios para determinar los efectos tóxicos de estos compuestos sobre la salud humana y que las normativas logren establecer límites de cuantificación más bajos para su evaluación. Se sospecha que cerca de 800 sustancias químicas pueden interferir con los receptores hormonales, la síntesis o la conversión hormonal, aunque solo una pequeña fracción de estos productos químicos se han investigado para identificar sus efectos endocrinos (Sutton P. *et al.*, 2010; Moreira M. *et al.*, 2013; Bergman A. *et al.*, 2013).

Por lo tanto, es necesario evaluar el impacto de los lixiviados de polipropileno, con la finalidad de proporcionar evidencias de los efectos nocivos que provocan en el ciclo estral, el desarrollo folicular y la reproducción en ratones. Además, la información

obtenida en este trabajo podría utilizarse en un futuro para poder realizar esquemas preventivos ante la desinformación de los aditivos y la lixiviación que presentan, de igual modo implementar alternativas al uso de estas sustancias químicas, buscando que con esto exista una disminución en los daños causados por la exposición a estos lixiviados, en particular en mujeres en edad reproductiva.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son los efectos de la ingesta subcrónica de lixiviados liberados del polipropileno en ratones hembra (*Mus musculus*) adultos de la cepa CD-1 sobre el ciclo estral, el desarrollo folicular y la fertilidad?

6. HIPÓTESIS

La ingesta subcrónica de lixiviados de polipropileno por parte de ratones hembra (*Mus musculus*) adultos de la cepa CD-1 modifica de manera perjudicial el ciclo estral, el desarrollo folicular así mismo la fertilidad.

7. OBJETIVOS

7.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la ingesta subcrónica de lixiviados de polipropileno sobre el ciclo estral, el desarrollo folicular y la fertilidad de ratones (*Mus musculus*) adultos de la cepa CD-1.

7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar los efectos de la ingesta subcrónica de lixiviados de polipropileno sobre la duración del ciclo estral de ratones hembra.
- Observar los efectos de la ingesta subcrónica de lixiviados de polipropileno sobre la fertilidad en ratones hembra.
- Identificar los efectos de la ingesta subcrónica de lixiviados de polipropileno sobre cantidad y calidad de los folículos en los ratones hembra.
- Determinar los efectos de la ingesta subcrónica de lixiviados de polipropileno sobre la apoptosis de las células foliculares en ratones hembra.

- Identificar los aditivos presentes en recipientes de polipropileno destinados a entrar en contacto con alimentos.

8. METODOLOGÍA

El estudio se realizó en el Laboratorio de Biología de la Reproducción, ubicado en el Centro de Investigación Biomédica de Oriente (CIBIOR), en Metepec, Atlixco, Pue., México. perteneciente al Instituto Mexicano del Seguro Social.

Los animales asignados al presente proyecto fueron obtenidos del Bioterio perteneciente al Centro de Investigaciones Biomédicas del Oriente. Los animales fueron mantenidos en condiciones estándar de bioterio con libre acceso al agua y al alimento siguiendo la norma NOM-062-ZOO-1999 que trata sobre “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio”. La eutanasia se realizó por dislocación cervical y los cadáveres se tratarán de acuerdo con la Norma Vigente de manejo de RPBI. NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002.

Se utilizaron 8 recipientes de PP de la marca CUBASA, destinados para estar en contacto con alimentos, esta marca fue seleccionada por tener una gran disponibilidad y acceso en el mercado, encontrándose en diferentes cadenas de supermercado, también cuenta con un amplia variedad de modelos y tamaños atractivos para el público, en relación con el costo, sus precios son accesibles, esta marca cuenta con el código de identificación de resinas de plástico, y no cuenta con el código de identificación para el uso en horno de microondas, aunque en su página oficial se mencione que perfectamente puede ser empleado su uso en este. Los resultados reflejados en esta investigación no pretenden lucrar ni afectar a la marca.

8.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para el desarrollo del proyecto se utilizaron 22 ratones hembra (*Mus musculus*) de la cepa CD-1 de 14 semanas posnatales, se seleccionaron de manera aleatoria para separarse en grupos de 11 ratones. Los grupos de estudio se dividieron en grupo lixiviados (GL) y grupo control (GC). Durante el tratamiento se evaluó el peso de ratón, peso de alimento y consumo de agua.

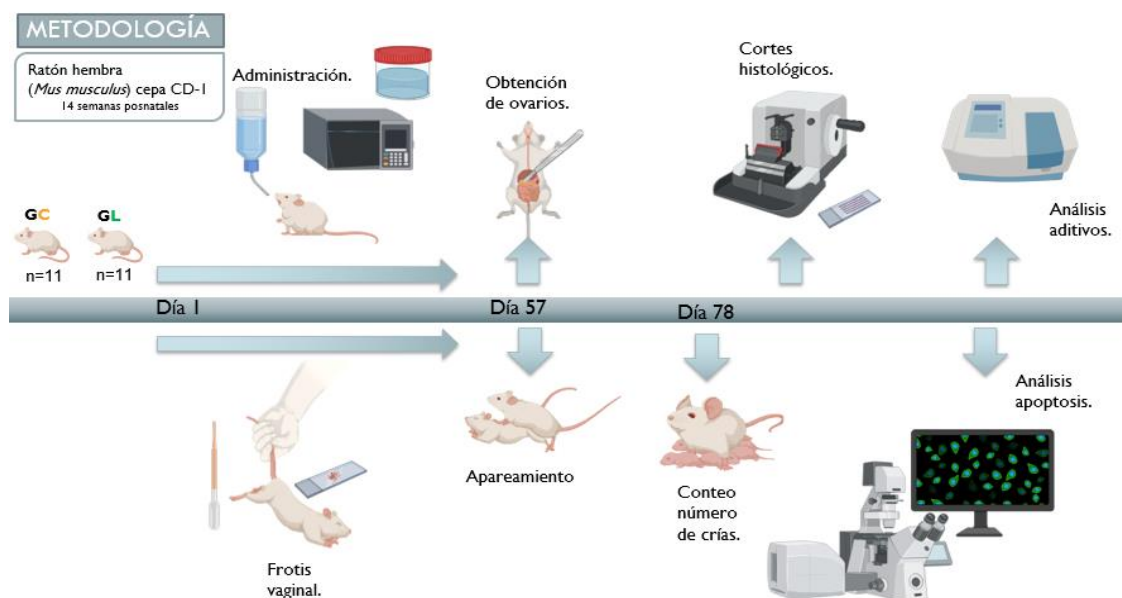


Figura 8 Diseño experimental. Ilustración realizada en Biorender, por la Biol. Monica Sastre Muñoz.

8.2. ADMINISTRACIÓN DE LIXIVIADOS

El tratamiento se llevó a cabo durante 8 semanas comenzando el registro el día 1 hasta el término de la administración en el día 57, el proceso de lixiviación y almacenamiento fue realizado cada domingo antes del inicio de semana, dejando reposar un día. Es importante resaltar que el agua utilizada para ambos grupos fue obtenida de los mismos garrafones y antes del proceso de lixiviación se pasó por un sistema de filtración (Fig.8).



Figura 9 Equipo de filtración de agua Nanopure Diamond, con filtro D50281.

El agua con lixiviados se obtuvo a través del calentamiento de agua purificada (600 ml) en un recipiente de polipropileno marca CUBASA (Fig. 9) con una capacidad de 1,120 ml, se introdujo dentro de un microondas y se llevó a un calentamiento a 1000

W de potencia durante 4 min para provocar la lixiviación, después, fue envasado en un recipiente de vidrio, con capacidad de 2000ml. Este procedimiento se realizó 3 veces para obtener la capacidad de 1,800 ml, y almacenarla para su posterior administración (Fig. 10), la cual se llevaba a cabo cada lunes, en un horario entre 7:30 a 8:30 de la mañana, en donde, cada ratón del grupo que recibió lixiviados (L) contó con su propio bebedero de vidrio con una capacidad de 250 ml, el volumen que se les administró la primer semana fue de 100ml, pero se aumentó la capacidad para las siguientes siete semanas donde en cada inicio de semana se administró una capacidad de 130 ml.

Por otro lado, al grupo control (C) se le administró agua purificada (600ml) la cual se llevó a calentamiento en el mismo microondas a 1000 W de potencia por 4 min con la diferencia de que el proceso de calentamiento se realizó en un recipiente de vidrio con capacidad de 600 ml. Para su almacenamiento se utilizaron 2 matraz Erlenmeyer con capacidad de 1000 ml, de igual manera se realizó el proceso 3 veces para lograr el total de 1800 ml el cual fue administrado diariamente a través de bebederos de vidrio para roedores con capacidad de 250 ml. De igual manera al grupo L, el volumen que se les administró la primer semana fue de 100ml, pero este volumen aumentó a 130 ml para las siguientes siete semanas donde.



Figura 10 Recipiente de PP para almacenamiento de alimentos marca "CUBASA" con una capacidad de 1,125 ml.



Figura 11 Material empleado en el proceso de almacenamiento y calentamiento de agua.

8.3. EVALUACIÓN DEL CICLO ESTRAL POR FROTIS VAGINAL

Para evaluar el ciclo estral se realizó el frotis vaginal en las ratones el cual consistió en un lavado en la vagina con solución salina al 9% con una pipeta Pasteur de plástico

y la muestra recuperada se extendió sobre un portaobjetos cubriéndose con un cubreobjetos. Este proceso se hizo todos los días de la administración (día 1-57) con horarios entre 8:30 y 9:30 h. Los portaobjetos se marcaron con el día de la muestra y el número de ratón, con el fin de llevar un control (Fig. 11).



Figura 12 Material empleado para la medición de peso de ratón, peso alimento y toma de frotis vaginal.

Una vez obtenido el frotis vaginal, cada muestra fue observada en un microscopio invertido equipado con sistema de contraste de fase y sistema de captura de imágenes (Fig. 12), Cada captura de imagen fue analizada para determinar la fase del ciclo estral en el que se encontraban los animales y llevando un registro individual por día.

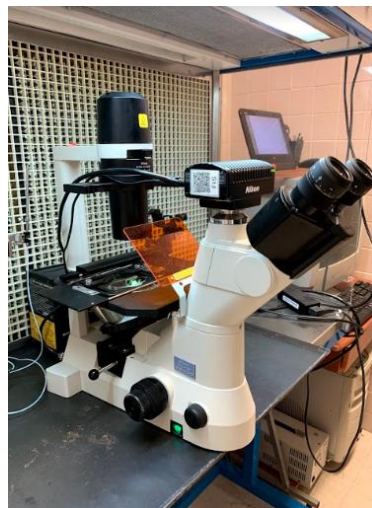


Figura 13 Microscopio invertido, con cámara incluida para análisis de muestras.

8.4. DETERMINACIÓN DE LA FERTILIDAD

Al término de la administración de los lixiviados, se seleccionaron a las hembras aleatoriamente de cada grupo experimental (GC con $n=5$ / GL con $n=5$) y cuando se encontraron en la etapa de estro se les introdujo un ratón macho con fertilidad comprobada, los cuales no contaron con ingesta de lixiviados. Posteriormente se

evaluó la presencia del tapón seminal (Fig. 13) para comprobar la copulación exitosa, tomando a este como el primer día de la gestación, al igual que se les tomó el peso para comprobar que estas lleven un aumento por la gestación. Cada hembra fue monitoreada hasta el día del parto y al final de la gestación se evaluó el número de crías por cada hembra.



Figura 14 Presencia de tapón seminal.



Figura 15 Crías ratones CD-1.

8.5. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y LA CANTIDAD FOLICULAR

Al finalizar el periodo de consumo del agua para ambos grupos se seleccionaron ratones aleatoriamente (grupo C con $n=6$ / grupo L con $n=6$) y se les realizó una eutanasia por dislocación cervical y los ovarios fueron recuperados para sus análisis histológico. Para la evaluación de la morfología de células foliculares se realizó la recuperación de los 24 ovarios los cuales pasaron por un proceso de fijación que evitó lisis celular, utilizando formol amortiguado que es una solución de aldehído fórmico al 40 %. Después de la fijación, se procedió a un lavado y etiquetado para ingresarlos en el histokicnet de la marca ThermoScientific (Fig. 15) el cual se programó para que pasara por el proceso de deshidratación que consistió en colocar cada tejido en concentraciones crecientes para eliminar agua, siendo etanol de 80%,96%,96%, 96%, 100%, 100%, seguido de un proceso de aclaración utilizando una solución 50-50

(OH100%/Xilol), xilol, xilol, y por último dos baños de parafina. Para la inclusión de los tejidos en parafina, con ayuda de unas escuadras para inclusión (Fig. 16) se vertió parafina calentada a 60° para posteriormente ingresar el ovario y con esto la parafina logre penetrar y cubrir en su totalidad al tejido. Cada tejido fue etiquetado para después ser llevados a una plancha de enfriamiento, teniendo como resultado los ovarios incluidos en cubos de parafina, los cuales fueron cubiertos en papel Parafilm para su mejor preservación hasta la realización de cortes histológicos (Fig. 17).



Figura 16 Histocicnet ThermoScientific, con proceso programado para tejidos histológicos.



Figura 17 Escuadras y base para inclusión de tejidos en parafina.



Figura 18 Ovarios incluidos en parafina, almacenados para corte histológico.

Para realizar los cortes histológicos, los cubos de parafina que contiene la muestra fueron colocados en el cabezal del microtomo (Leica) el cual se ajusta con unas perillas que controlan el movimiento y dirección en la cual se mantendrá el cubo, se utilizó un microtomo de deslizamiento (Fig.18), en el que la cuchilla es fija y el tejido que se corta está en movimiento junto con el cabezal. Los cortes se realizaron con un espesor de 4 μm , los cuales eran recuperados y colocados en un baño María para que logran extenderse. Posterior a esto fueron montados en portaobjetos previamente tratados con Poly-L-lisina. Los portaobjetos con los tejidos se dejaron

secando a temperatura ambiente y se almacenaron protegidos de polvo y humedad. Para realizar una evaluación del número y dimensiones de los folículos, se utilizarán las laminillas que pasaron por proceso de tinción hematoxilina-eosina y se tomaron fotografías de los cortes en estos midieron e identificaron los tipos foliculares (Fig.19) con el uso del Software ZEN Black (Carl Zeiss, Germany).



Figura 19 Microtomo utilizado para hacer los cortes a los órganos incluidos en parafina.

El análisis y clasificación folicular se realizó en ambos ovarios de los ratones seleccionados de ambos grupos. Los cortes se examinaron en un microscopio invertido y se capturaron fotografías con cámara Nikon DS-Fi3. Las imágenes obtenidas se analizaron con el programa Image-J, La clasificación de las etapas foliculares utilizadas para el análisis se compone: (a) Primarios son los que poseían predominantemente una sola capa de células de la granulosa cuboidales con algunas células de la granulosa escamosas; (b) Secundarios rodeados por más de una capa de células de la granulosa cuboidales, sin antro visible; (c) Preantrales tienen espacios antrales emergentes; (d) Antrales poseían un espacio antral claramente definido; (e) Preovulatorios eran los más grandes de los tipos foliculares y poseían una capa definida de células de cúmulo granuloso y Cuerpos Lúteos siguiendo los criterios de Myers *et al.* (2004).

Tipo de folículo	Diámetro del folículo
a) Primario (P)	> 20 μm
b) Secundario (S)	> 50 μm
c) Pre antral (PA)	>100 μm
d) Antral (A)	>200 μm
e) Preovulatorio (PO)	>300 μm

Tabla 2 Clasificación folicular de acuerdo con el diámetro folicular, adaptación de Myers *et al.* (2004).

8.6. EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE APOPTOSIS EN LAS CÉLULAS FOLICULARES

De cada ovario se obtuvieron aproximadamente 25 laminillas y para su análisis fueron seleccionadas 3 laminillas por cada ovario de ratón, siendo un total de 72 laminillas a analizar. Cada laminilla fue sometida a un proceso de desparafinado colocándose en una estufa de secado a 80 °C/30 minutos, después, las laminillas fueron colocadas en recipientes de caja Coplin que contenían Xileno donde se pasaron dos veces por 10 min c/u. Posteriormente se introdujeron en concentraciones de etanol descendente 100 %, 100 %, 90 %, 70 % (5 min c/u), también se realizaron dos lavados con agua desmineralizada (2 min c/u). Finalmente se mantienen en PBS 1% hasta teñir. La apoptosis en los ovarios fue analizada utilizando el kit Alexa fluor 488 Annexin V/Dead cell apoptosis kit (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante: primero se preparó 1X annexin-binding buffer, este se realizó en relación 1:5 tomando 1ml del 5X annexin-binding buffer y se agregó 4mL de agua desionizada. Para la solución final se tomaron 500 µL de la solución de 1X annexin-binding buffer, y se le agregó 1 µL de Alexa fluor 488.

Las laminillas se retiraron del PBS y se decantaron para poder colocarles la solución de Anexina V-Alexa fluor 488 y se dejaron incubando, por 30 minutos a temperatura ambiente. Después se realizaron tres lavados con PBS 1% agregándose directamente sobre el tejido. Posteriormente se agregó la solución Hoechst 33342 y se dejó incubando por 10 minutos a temperatura ambiente. Esta solución se preparó en relación 1:500 colocando 1 µL de Hoechst en 499 µL de agua desmineralizada. Después las laminillas se decantaron y se les realizaron cinco lavados con PBS 1%. Por último, se les colocó 10 µL de PBS 1x como medio de montaje y un cubreobjetos. Estas fueron conservadas en cámaras húmedas hasta su observación.



Figura 20 Laminillas con los cortes histológicos, previo a su observación bajo microscopio.

Cada laminilla fue analizada bajo microscopia de epifluorescencia, al utilizar un microscopio invertido AxioObserver V2, equipado de sistema de iluminación estructura Apotome 2 y filtros de excitación de 430nm y 488nm. Al utilizar el sistema de análisis Zen Blue (Carl Zeiss) en cada laminilla seleccionada se determinó la presencia de Anexina V (fluorescencia verde) se midió su intensidad de fluorescencia la cual fue representada en unidades relativas de fluorescencia (URF).

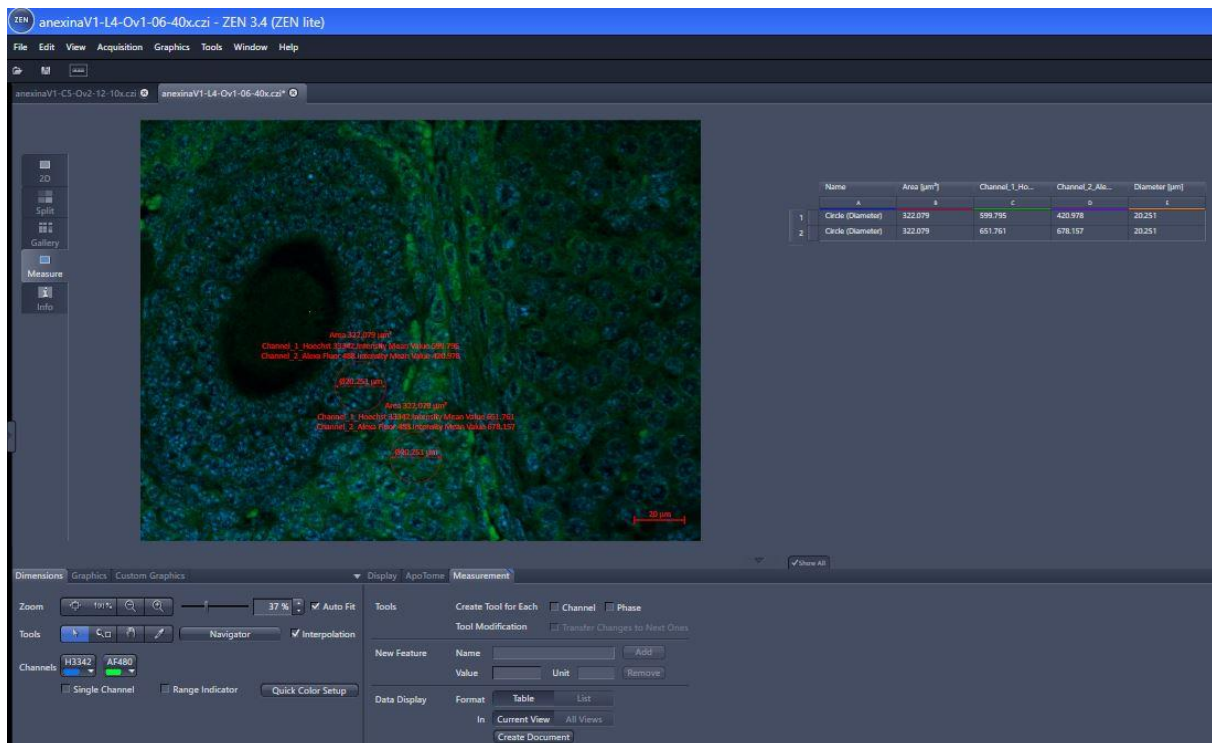


Figura 21 Software ZEN Black. Análisis de corte histológico de ovario 40x, obtención de las unidades relativas de fluorescencia de Anexina V (Carl Zeiss, Germany).

8.7. IDENTIFICACIÓN DE ADITIVOS DE PP

Para la identificación de aditivos de PP se conservaron las alícuotas de agua (Fig. 23) que se obtuvieron por el proceso de lixiviación de cada recipiente utilizado. De igual manera se conservó cada uno de los recipientes de polipropileno destinado para entrar en contacto con los alimentos (Fig.22) que fueron utilizados y a los que se les aplicó un análisis FT-IR el a través de ATR (Attenuated Total Reflectance) utilizando un espectrómetro de la marca Perkin Elmer (Fig.24). La preparación de las muestras de plástico para su análisis se realizó de la siguiente manera: se colocó un portaobjetos en una parrilla eléctrica precalentada a 200 °C. Posteriormente se fundió una muestra representativa del contenedor de polipropileno para formar una película lo

suficientemente delgada que se ajuste al portamuestras del espectrofotómetro. Los espectros adquiridos se encontraron en un intervalo de número de onda entre 4000 a 400 cm^{-1}



Figura 22 Recipientes de polipropileno marca CUBASA®.

De igual manera se analizaron los aditivos presentes en las alícuotas de agua (Fig.25), para esto se tomó una muestra de 100 μL con ayuda de una micropipeta y se colocó en el portamuestras, para así obtener los espectros y su posterior análisis, para determinar que los aditivos estuvieran presentes.



Figura 23 Alícuotas conservadas a temperatura ambiente, del agua utilizada en cada semana del tratamiento.



Figura 24 Espectrofotómetro donde se obtuvieron los espectros Infra Rojo (IR).

Los espectros infrarrojos (IR) fueron sometidos a una prueba dentro del programa Origin Pro 9.0, para la búsqueda de otros picos dentro de los espectros, y se obtuvo información bibliográfica de espectros de IR ya registrados de los aditivos, que han encontrados en recipientes de polipropileno y se determinó cuáles están presentes en los recipientes que utilizamos en este experimento. (Anexo Fig.24).

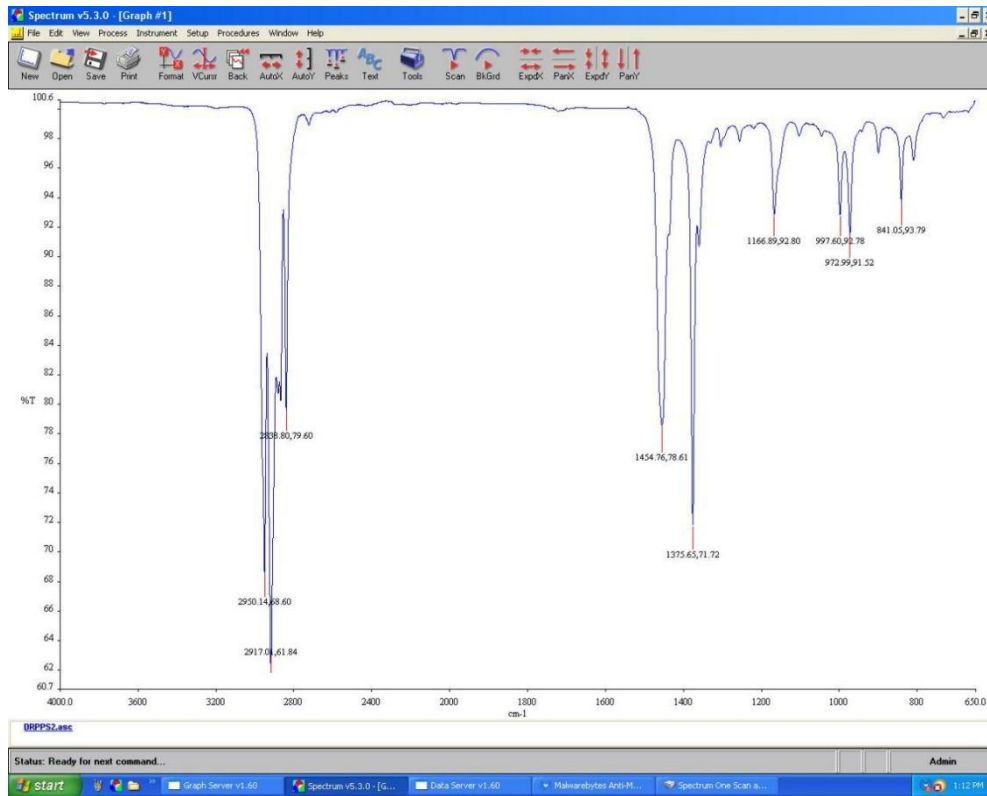


Figura 25 Muestra de espectro de infrarrojo QTR. mediante el programa Spectrum v3 3.0

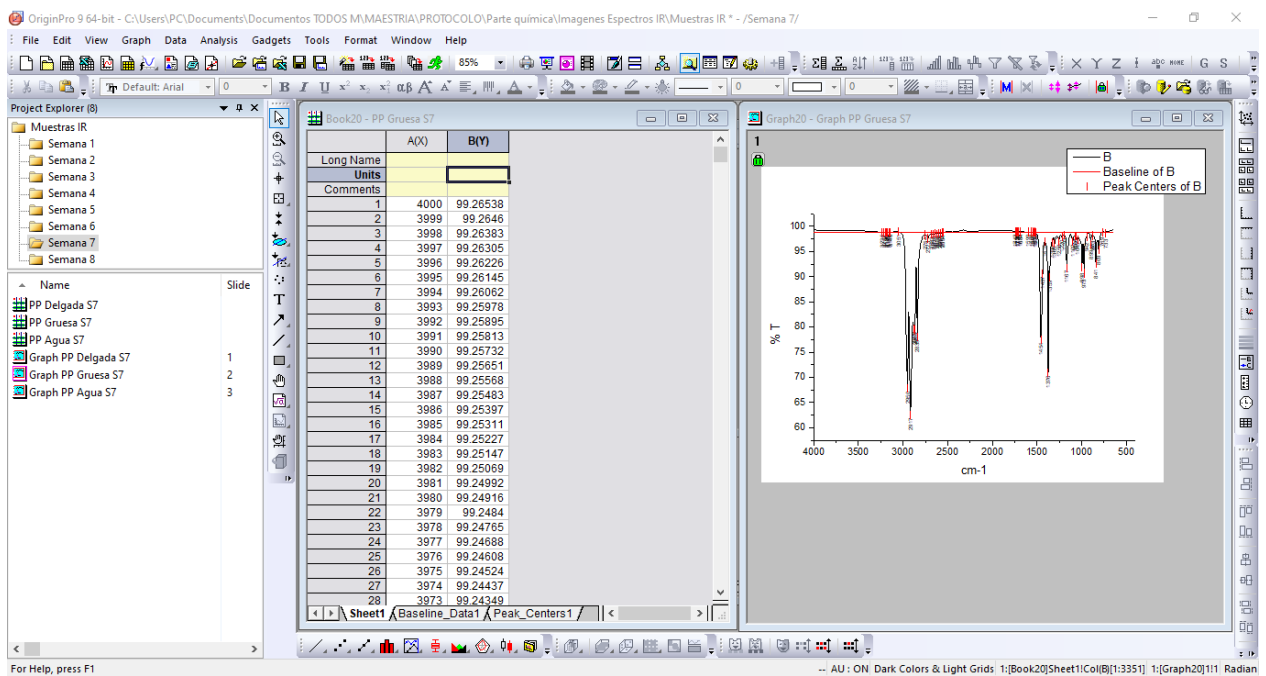


Figura 26 Programa OriginPro 9.0. Análisis y obtención de los picos y el valor para cada espectro.

8.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

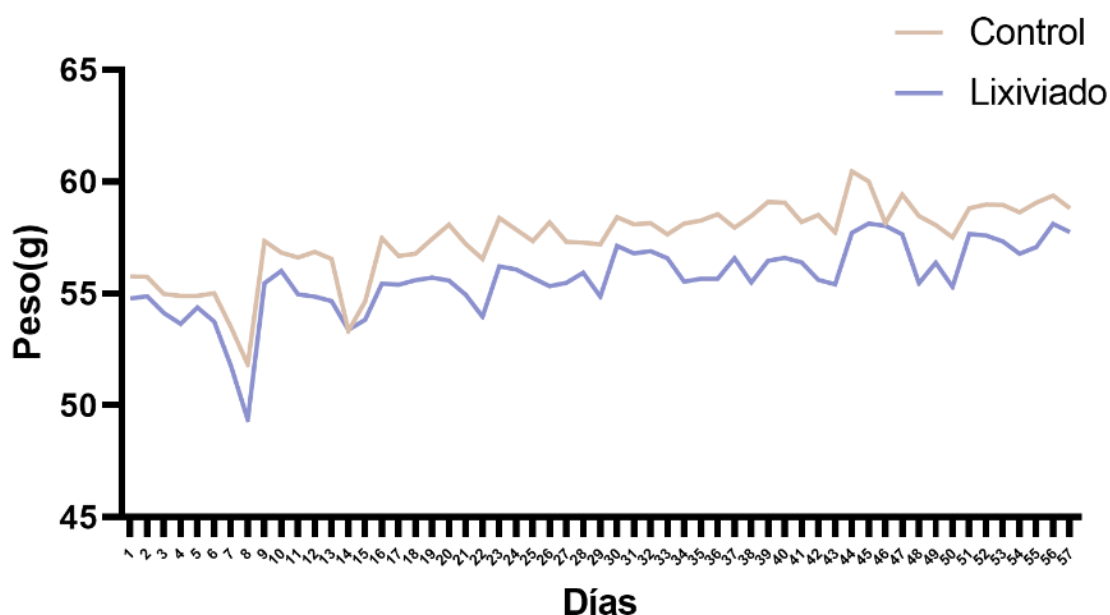
Para el análisis de los resultados se utilizó estadística descriptiva. Para valorar las diferencias entre los grupos independientes, se expresaron en Media+SEM, se empleó análisis de normalidad correspondiente para determinar el tipo de prueba y se aplicó la prueba de análisis de Varianza T de Student o Mann Whitney cuando fue requerido, las diferencias se considerarán estadísticamente significativas con una $p < 0.05$. Realizado con el programa estadístico GraphPad Prism 8.0.1

9. RESULTADOS

En este experimento se compararon cada uno de los parámetros analizados con las hembras del GL y del GC teniendo una $n=11$ por grupo. Mediante el programa GraphPad Prism 8.0.1 se evaluaron las diferencias estadísticamente significativas.

Efecto de lixiviados sobre el peso corporal.

Se midió el peso corporal de las hembras de los GL y GC teniendo una $n=11$ por grupo durante los 57 días que duró la administración desde el inicio del experimento. Se observó que los ratones del GC desde el inicio del experimento contaban con un peso corporal mayor al del GL.

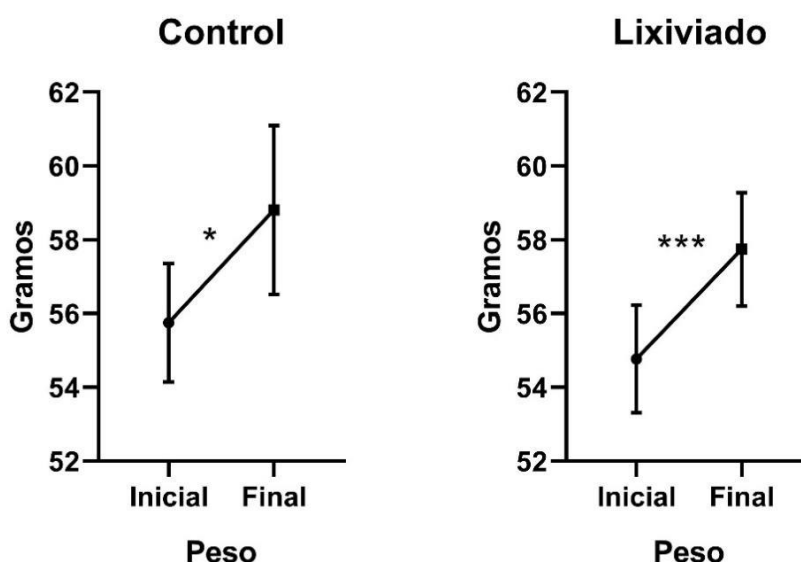


Gráfica 1 Efecto de los lixiviados sobre el peso corporal. Se observa que el peso de ambos grupos tiene un comportamiento similar.

En los ratones expuestos al consumo de lixiviados en agua, el peso promedio al inicio del estudio fue de 54.7 ± 1.45 g, mientras que después de la exposición incrementaron sus peso en un promedio 2.98 g más (Tabla 3). En los ratones no expuestos a lixiviados, el peso promedio al inicio fue de 55.75 g y al final de 58.81 g. Se encontró un aumento estadísticamente significativo ($t= 4.95$; $P= 0.05$) entre el peso de inicio y el peso al final de los ratones expuestos a los lixiviados de PP; y un aumento estadísticamente significativo ($t= 2.22$; $P= 0.001$) entre el peso de inicio y el peso final. El aumento del peso corporal en ambos grupos nos indica que la ingesta de lixiviados no afecta la pérdida o aumento de peso en ratones durante una exposición de 57 días. (Paired t test Two-tailed $P<0.05$. (Gráfica 2)

		N	MEDIA	SEM
Control	Peso inicial (g)	11	55.75	1.608
	Peso final (g)	11	58.81	2.291
Lixiviado	Peso inicial (g)	11	54.77	1.457
	Peso final (g)	11	57.75	1.537

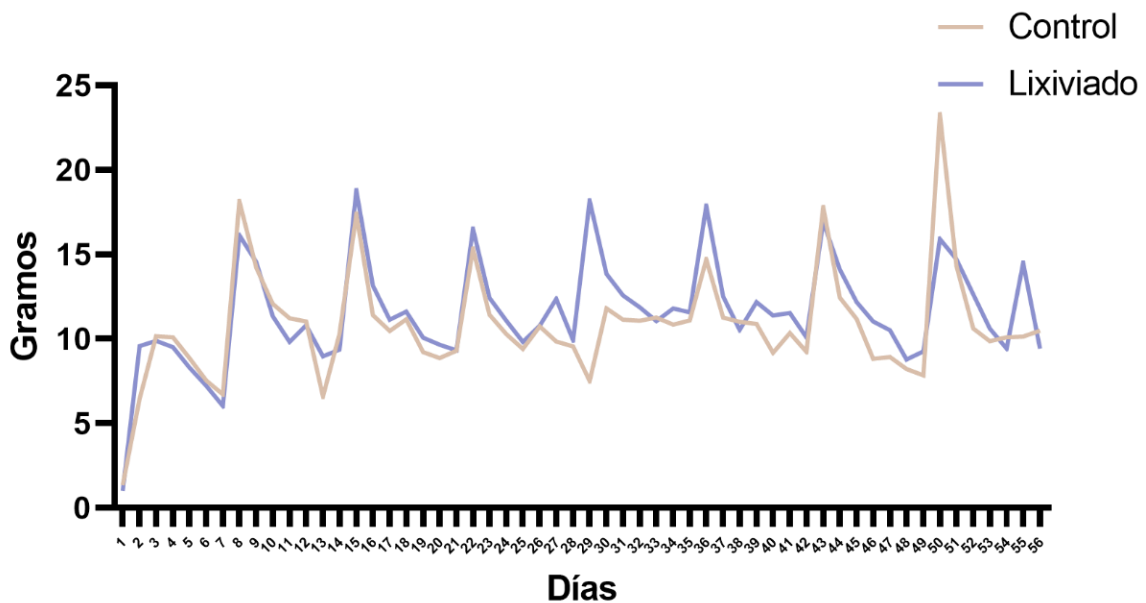
Tabla 3 Distribución del peso promedio de los ratones hembra previo al experimento y al final de este para ambos grupos.



Gráfica 2 Efecto de los lixiviados sobre el peso corporal al final del experimento. Los resultados se expresaron como Media y SEM en un total de 11 hembras para cada grupo. * $p<0,05$; *** $p<0,001$ (Prueba T de Student).

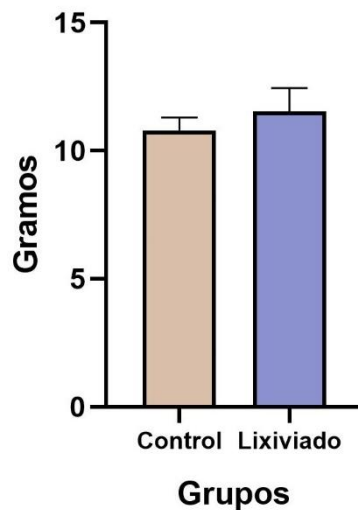
Efecto de lixiviados sobre la ingesta de alimento.

Para determinar el alimento ingerido se pesó el consumo diario y se obtuvo la diferencia entre días.



Gráfica 3 Efecto de los lixiviados sobre el consumo de alimento. Gráfica donde se indican las diferencias entre el consumo del grupo C y el grupo L, donde este último muestra un tendencia a tener un mayor consumo.

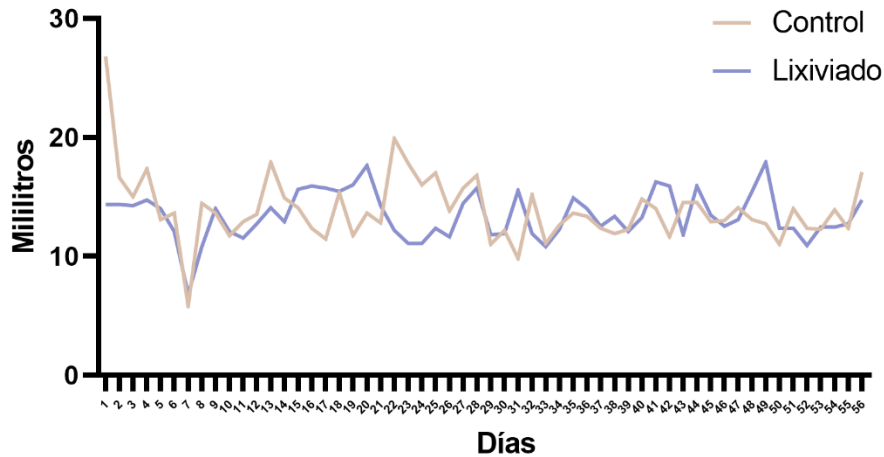
Como una forma de visualizar estos resultados por grupo, se realizó el promedio de la diferencia del consumo de alimento, manteniendo una similitud entre ambos. No se observaron modificaciones de mayor o menor consumo de alimento de manera significativa entre los grupos (Unpaired t test Two-tailed $P > 0.05$, (Gráfica 4)



Gráfica 4 Efecto de los lixiviados sobre el consumo promedio de alimento. Gráfica donde se destaca como el grupo L tiene un incremento en el consumo de alimento ligeramente mayor al grupo C.

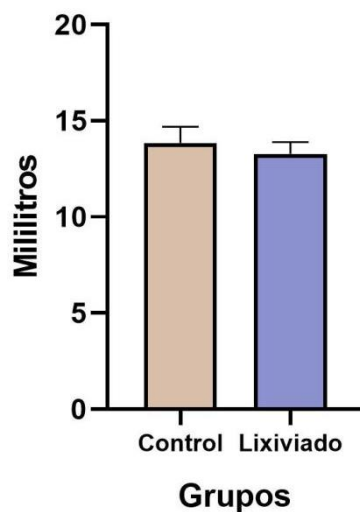
Efecto de lixiviado sobre la ingesta de agua.

Se registró el consumo de agua cada día, para conocer el consumo que de cada grupo estudiado.



Gráfica 5 Efecto de los lixiviados sobre el consumo de agua. En esta grafica no se logra visualizar completamente una tendencia de diferencia entre el consumo de ambos grupos.

Para poder analizar el consumo de agua de los grupos se obtuvo el promedio del consumo diario de cada uno. No se observaron modificaciones de mayor o menor consumo de agua de manera significativa entre los grupos (Unpaired t test Two-tailed $P > 0.05$, (Gráfica 6)



Gráfica 6 Efecto de los lixiviados sobre el consumo promedio de agua. Se refleja como el grupo control presenta una mayor ingesta de agua, con relación al grupo lixiviado.

Efecto de lixiviados sobre el ciclo estral.

En este experimento se compararon cada una de las fotografías obtenidas tras realizar frotis vaginal durante el tiempo de tratamiento las cuales fueron analizados para ambos grupos.

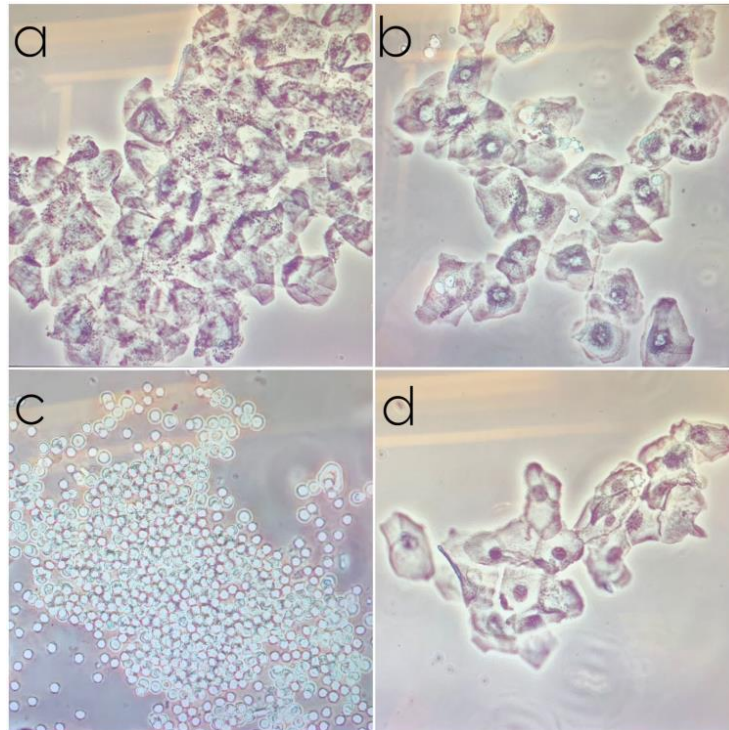
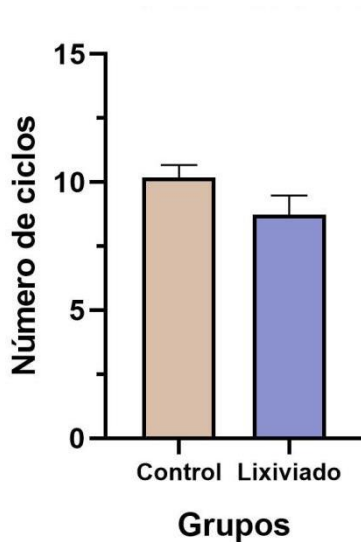


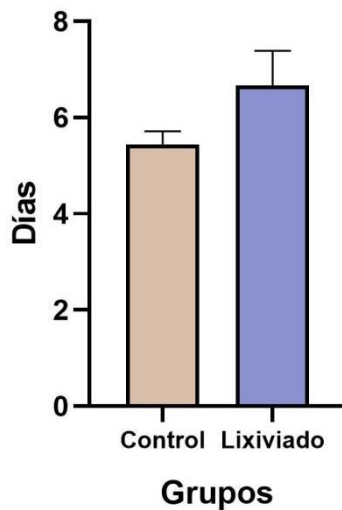
Figura 27 Citología vaginal durante las diferentes etapas del ciclo estral. a) Estro, b) Metaestro, c) Diestro, d) Proestro

Para poder comparar los resultados de los GC y GL, se enumeró y cortejó la cantidad de ciclos estrales que se presentaron en cada grupo; el grupo Control presentó 10.18 ± 0.48 ciclos, el grupo Lixiviado presentó 8.72 ± 0.75 ciclos sin embargo no se encontró diferencia significativa entre los dos grupos (Unpaired t test Two-tailed $P > 0.05$, (Gráfica 7).



Gráfica 7 Número de ciclos estrales. Los valores se muestran Media+ESM del total de ciclos estrales de cada grupo. No se observó diferencia significativa de los ciclos estrales en comparación con el grupo Control (Mann Whitney test Two-tailed $P > 0.05$)

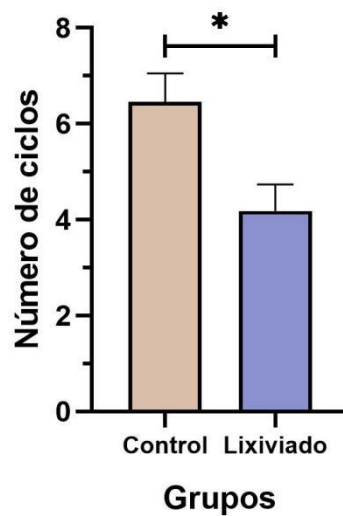
También se contabilizó y comparó la duración en días del ciclo estral de cada grupo, en el grupo Control duró 5.44 ± 0.27 días, en el grupo Lixiviado duró 6.66 ± 0.72 días; no se observó diferencia entre el grupo con ingesta de lixiviados en comparación el grupo Control (Mann Whitney test Two-tailed $P > 0.05$, (Gráfica 8)



Gráfica 8 Duración de ciclos estrales. Los valores se muestran Media+ESM de los días de ciclos estrales de cada grupo. No se observó diferencia significativa de la duración de ciclos estrales en comparación con el grupo Control (Mann Whitney test Two-tailed $P > 0.05$)

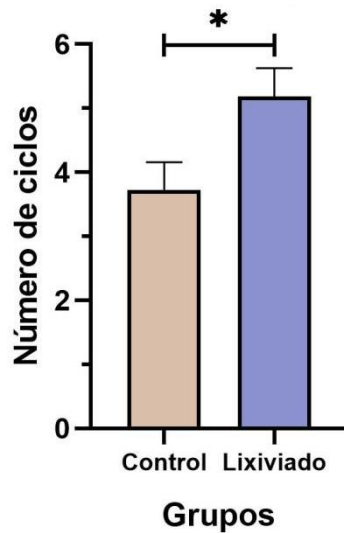
Se registraron y contrastaron la cantidad de ciclos estrales completos (presencia de las 4 etapas) que presentaron cada grupo, el GC presentó 6.45 ± 1.11 ciclos

completos, el grupo con ingesta de lixiviados presentó 4.18 ± 0.55 ciclos completos; el número de ciclos completos disminuyó significativamente ($P=0.0110$) en el grupo Lixiviado comparado con el Control (Unpaired t test Two-tailed $P<0.05$, (Gráfica 9).



*Gráfica 9 Ciclos estrales completos. Los valores se muestran Media+ESM para ambos grupo. Se observó diferencia significativa de ciclos completos en comparación con el grupo Control (Unpaired t test Two-tailed * $P<0.05$)*

De igual manera se compararon y contrastaron la cantidad de ciclos estrales incompletos (ausencia de 1 o más etapas) que presentaron cada grupo, el grupo Control presentó 3.72 ± 0.42 ciclos incompletos, el grupo con ingesta de lixiviados presentó 5.18 ± 0.44 ciclos incompletos; el número de ciclos completos disminuyó significativamente ($P=0.0286$) en el grupo Lixiviado comparado con el Control (Unpaired t test Two-tailed $P<0.05$, (Gráfica 10).

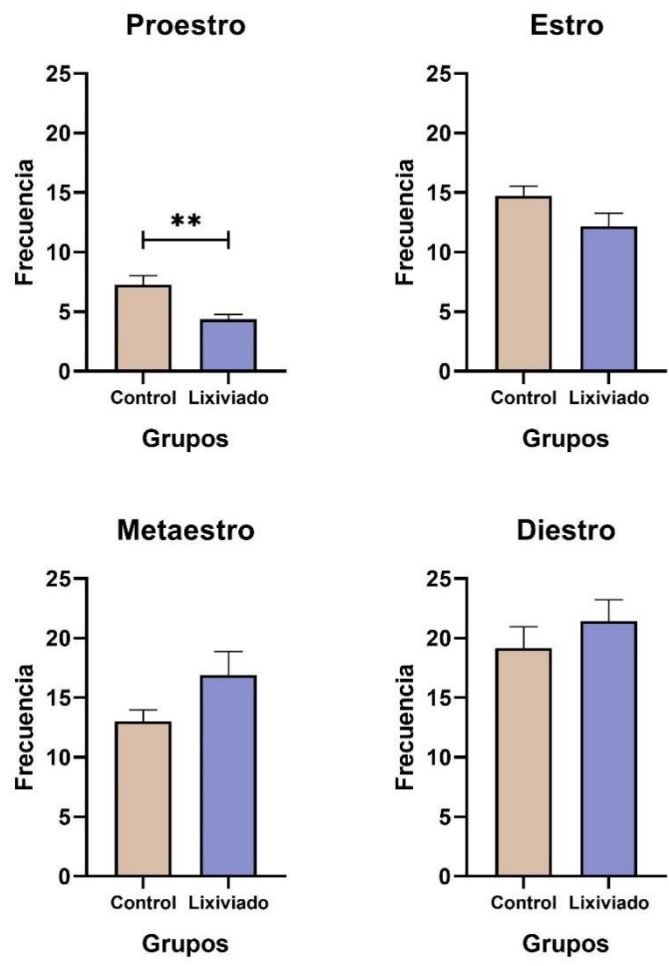


Gráfica 10 Ciclos estrales incompletos. Los valores se muestran Media+ESM para ambos grupo. Se observó diferencia significativa de ciclos incompletos en comparación con el grupo Control (Unpaired t test Two-tailed *P<0.05)

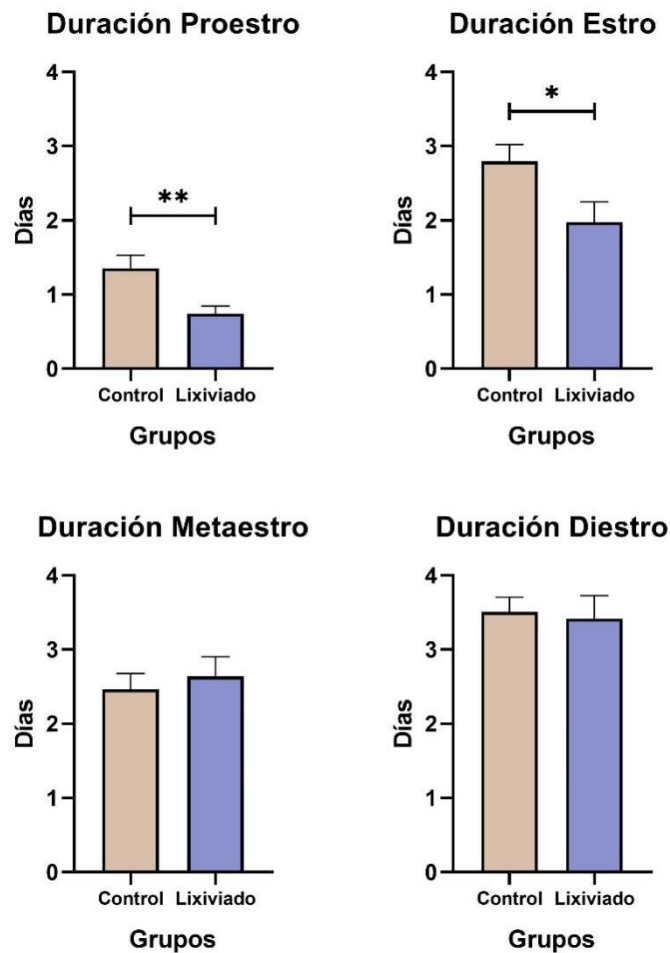
En el análisis de la ciclicidad por ratón se identificaron las diferentes etapas del ciclo estral. Se evaluaron probables diferencias en la frecuencia y duración de cada estado del ciclo estral durante el experimento en ambos grupos (Tabla 4). El número promedio del proestro disminuyó significativamente mientras que el de estro, metaestro y diestro no se encontraron diferencias significativas comparado con el grupo control ($p=0.0026$, $p=0.0802$, $p=0.0921$ y $p=0.3731$, respectivamente) (Unpaired t test Two-tailed, Gráfica 11). La duración del proestro y estro (número promedio de días) en el grupo Lixiviado se redujo significativamente *versus* el grupo Control $p=0.0065$ y $p=0.0320$ respectivamente. Mientras que la duración del metaestro y diestro no mostraron significancia respecto al grupo Control $p=0.6142$ y $p=0.8104$ y respectivamente (Unpaired t test Two-tailed, (Gráfica 11).

	Proestro	Estro	Metaestro	Diestro
Frecuencia de estados del ciclo				
Control	7.27 ± 0.75	14.73 ± 0.83	13.00 ± 0.98	19.18 ± 1.75
Lixiviado	4.36 ± 0.38 **	12.18 ± 1.20	16.91 ± 1.97	21.45 ± 1.77
Duración de los estados del ciclo (días)				
Control	1.35 ± 0.17	2.79 ± 0.22	2.46 ± 0.21	3.50 ± 0.20
Lixiviado	0.74 ± 0.10 **	1.97 ± 0.27 *	2.63 ± 0.26	3.41 ± 0.31

Tabla 4 Frecuencia y duración de los estados del ciclo en 57 días de tratamiento.



Gráfica 11 Frecuencia de cada etapa del ciclo. Los resultados se expresaron como promedio y SEM en un total de 11 hembras para cada grupo (** $p < 0.05$; $p > 0.05$, $p > 0.05$ y $p > 0.05$, respectivamente; Prueba T de Student).



Gráfica 12 Días de duración de cada etapa del ciclo. Los resultados se expresaron como promedio y SEM en un total de 11 hembras para cada grupo (** $p < 0.05$; * $p < 0.05$, $p > 0.05$ y $p > 0.05$, respectivamente; Prueba T de Student).

Efecto de lixiviados sobre fertilidad.

En este experimento se realizó el conteo de cada una de las hembras que se encontraron gestantes en cada uno de los grupos. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

	Control		Lixiviado	
	No.	%	No	%
Gestantes	3	60.00	5	100.00
No gestantes	2	40.00	0	0.00
Total	5	100	5	100

Tabla 5 Distribución de frecuencias porcentual de acuerdo con su estado gestacional de los ratones para ambos grupos.

Número y peso corporal de las crías.

Después del conteo de cada ratón gestante se monitorearon para observar que estuvieran en óptimas condiciones. y posterior al parto se contabilizo el número de crías (Tabla 6) y el peso corporal de estas de acuerdo con el sexo. (Tabla 7)

	Control		Lixiviado	
	No.	%	No	%
Hembras	12	44.44	20	45.45
Machos	15	55.56	24	54.55
Total	27	100	44	100

Tabla 6 Distribución de frecuencias porcentual por sexo de los ratones recién nacidas para ambos grupos.

		N	MEDIA (g)	SEM
Control	Peso hembras	12	32.90	3.54
	Peso machos	15	37.09	3.79
Lixiviado	Peso hembras	20	42.48	1.41
	Peso machos	24	48.08	0.92

Tabla 7 Distribución del peso promedio de los ratones nacidos en relación con el sexo para ambos grupos.

Además del peso corporal en este trabajo hemos observado que los recién nacidos presentaron falta de desarrollo de falanges y presencia de sindactilia, así como la ausencia de desarrollo de huesos del metacarpo y falanges.

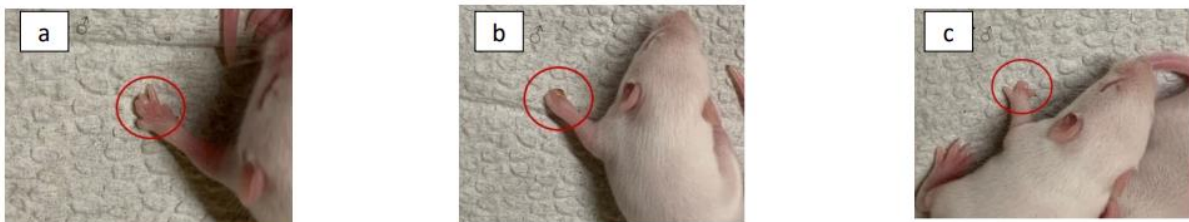


Figura 28 Malformaciones causadas por exposición a lixivios. (a) Falta de desarrollo de falanges y presencia de sindactilia. (b) Ausencia de desarrollo de huesos del metacarpo y falanges. (c) Carencia de desarrollo de falanges y presencia de sindactilia.

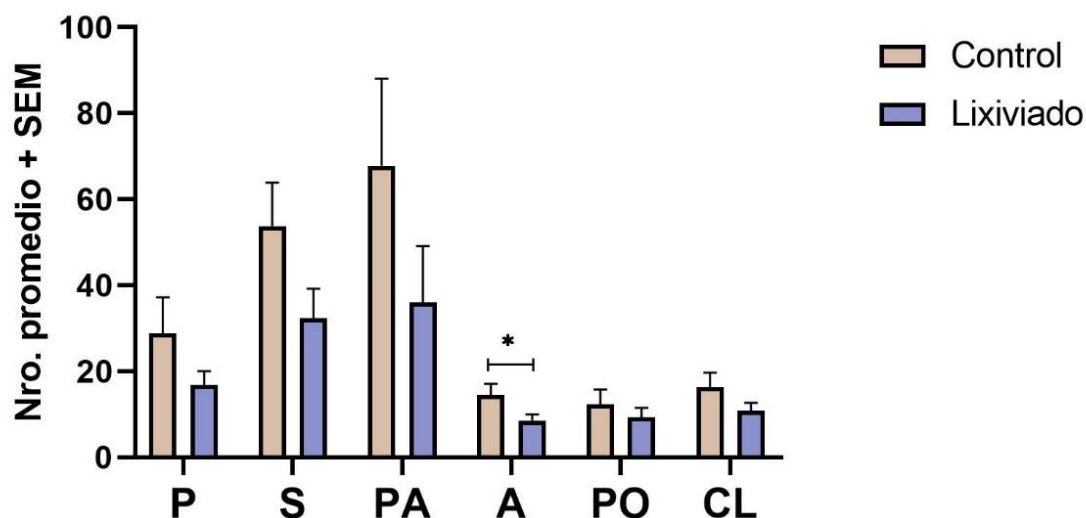
Efecto de Lixiviados sobre cantidad y calidad del desarrollo folicular.

Tras la obtención de los cortes histológicos de los ovarios se realizó la comparación del número total de folículos de cada categoría de los cuales, los folículos primarios, secundarios, preantrales, preovulatorios y cuerpos lúteos no se observó una diferencia

significativa entre GL y el GC (Unpaired t test Two-tailed $P > 0.05$). Por otro lado, se observó menor número de folículos antrales GL (Unpaired t test Two-tailed $P < 0.05$) en comparación al grupo Control (Tabla 8).

Número de folículos por categoría		
	Control	Lixiviado
Primario	28.63±6.71	16.50±2.44
Secundario	53.63±10.16	32.00±4.99
Preantral	67.50±14.62	35.50±9.37
Antral	14.25±2.16	8.375±1.30*
Preovulatorio	12.13±2.68	9.00±1.77
Cuerpo Lúteo	16.13±2.70	10.50±1.753
Total	256.33±75.91	149.16±39.51

Tabla 8 Número de folículos por categoría. Media ± SEM. del número de folículos presentes en ambos ovarios por categoría del grupo Control y Lixiviado sacrificadas al término de administración, en etapa estral $n=4$ por grupo.



Gráfica 13 Efecto de lixivados sobre los folículos ováricos. Los valores se muestran Media+ESM para ambos grupo. Se observó diferencia significativa para los folículos antrales en comparación con el grupo Control (Unpaired t test Two-tailed $*P < 0.05$). P: Primario, S: Secundarios, PA: Preantrales, A: Antrales, PO: Preovulatorios, CL: Cuerpo Lúteo.

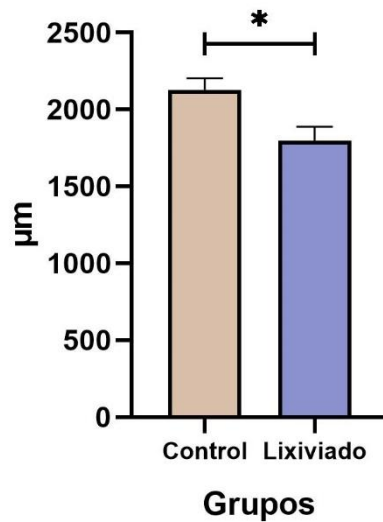
Cuando se comparó el diámetro de los folículos totales del GL vs GC, no se observaron cambios significativos. (Tabla 9).

Diámetro promedio de folículos por categoría					
Grupo	P (µm)	S (µm)	PA (µm)	A (µm)	PO (µm)
Control	39.00±0.88	73.94±1.27	138.0±2.03	241.9±4.31	458.4±11.11
Lixiviado	37.21±0.99	73.35±1.40	135.8±1.67	240.6±3.89	488.0±17.71

Tabla 9 Diámetro de folículos. Media ± SEM del diámetro en µm de los folículos presentes en ambos ovarios por categoría para ambos grupos, sacrificadas al término de administración, en etapa estral $n=4$ por grupo. P: Primario, S: Secundarios, PA: Preantrales, A: Antrales, PO: Preovulatorios.

Morfología ovárica.

Los ovarios de los ratones del GL presentaron una diferencia significativa con relación al diámetro del ovario



Gráfica 14 Diámetro del ovario. Se observó diferencia significativa para los ovarios del grupo control en comparación con el grupo Lixiviado (Unpaired t test Two-tailed * $P < 0.05$).

En los ovarios de los ratones del grupo Control la morfología muestra la presencia de cuerpos lúteos indicadores de la ovulación (Figura 27), a diferencia de lo observado en los ratones del grupo lixiviado en los que no se observaron cuerpos lúteos, en los cortes de ovario de estos últimos se observa la presencia de estructuras prequísticas (Figura 28).

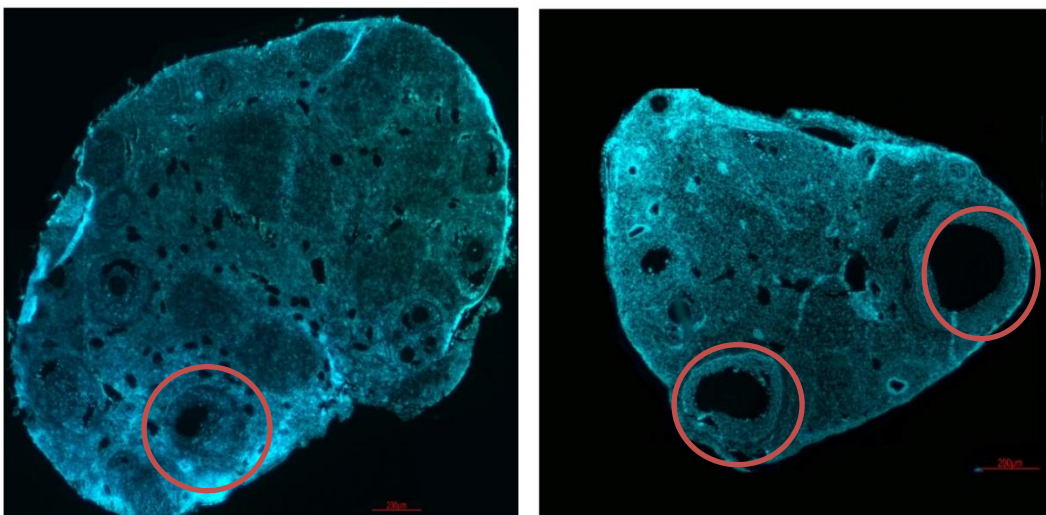


Figura 29 Figura 30 Cortes de ovario de los ratones del grupo lixiviado. Presentan estructuras prequísticas, señaladas en un círculo rojo

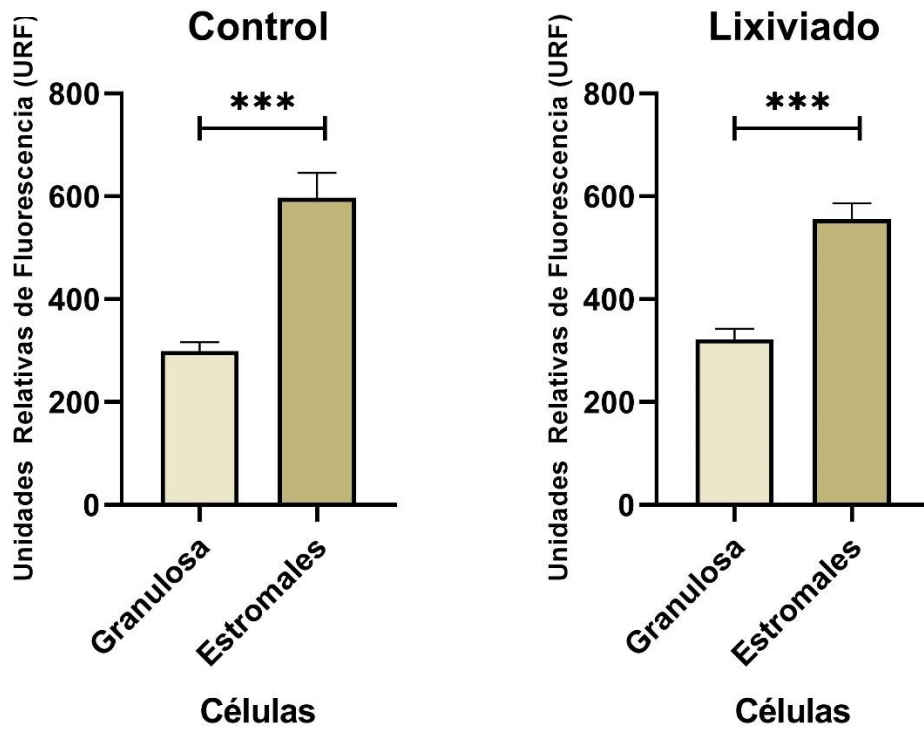
Detección de apoptosis en células de granulosa y estromales del ovario.

Tras la obtención de los cortes histológicos se procedió a la detección de apoptosis en células de granulosa y estromales mediante fluorescencia, se realizó una cuantificación de Unidades Relativas Fluorescentes (URF) donde se planteó observar el grado de presencia de Anexina V, en las células foliculares de tipo estromal y granulosa. Lo que se pudo encontrar es que para ambos grupos la presencia de Anexina V era mayor en las células estromales.



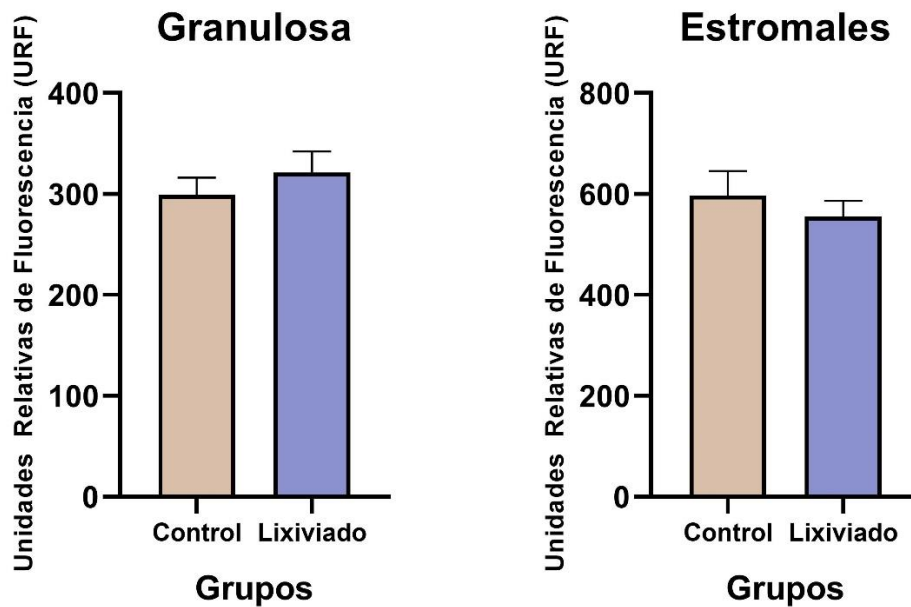
Figura 31 Figura 32 Efecto de los lixiviados de PP sobre la inducción de apoptosis en las células foliculares. Se observa que las células estromales (flechas blancas) muestran mayor apoptosis como es observado por la unión de Anexina V (fluorescencia verde) en comparación con las células de la granulosa (flechas rojas). Tinción de núcleos celulares con Hoescht 33342. Imágenes capturadas a 40X

Se obtuvieron los valores correspondientes de ambos tipos celulares para ambos grupos, el grupo Control presentó 299.0 ± 17.11 URF en células de la granulosa, y 596.8 ± 48.55 URF en células estromales teniendo una significancia de $p < 0.0001$. Para el caso del grupo con ingesta de lixiviados presentó 321.6 ± 20.65 unidades relativas de fluorescencia en células de la granulosa; para el caso de células estromales se obtuvo el valor de 596.8 ± 48.55 URF teniendo una significancia de $p < 0.0001$, siendo que para ambos grupos se observó un aumento de presencia de fosfatidilserina en células estromales (Unpaired t test Two-tailed $P < 0.05$, (Gráfico 15).



Gráfica 15 Apoptosis de células estromales y granulosa. Los valores se muestran Media+ESM para ambos grupo. Se observó diferencia significativa de en comparación con el grupo Control (Unpaired t test Two-tailed *P<0.05)

Tras observar la presencia de anexina V en las células foliculares, se realizó una comparativa para el mismo tipo de células en los dos grupos, buscando observar si existían diferencias significativas entre estas; para las células de la granulosa el grupo Control presentó 299.0 ± 17.11 URF, el grupo Lixiviado presentó 321.6 ± 20.65 URF, en el caso de células estromales el grupo Control presentó 596.8 ± 148.55 URF, el grupo Lixiviado presentó 555.5 ± 30.67 URF, sin embargo, no se encontró diferencia entre los grupos en ninguna de los dos tipos celulares analizados.



Gráfica 16 Apoptosis de células estromales y granulosa en los grupos. Los valores se muestran Media+ESM para ambos grupo. No se observó diferencia significativa en comparación con el grupo Control (Unpaired t test Two-tailed *P<0.05)

Identificación de aditivos.

Se identificaron los grupos funcionales mediante IR que se encuentran presentes en los recipientes de polipropileno utilizados y en las muestra de agua que se utilizaron durante el tiempo de tratamiento. (Anexos)

Comparación alícuotas con resina plástica.

Posteriormente se identificó los aditivos de acuerdo con los grupos funcionales presentes, tomando como base la bibliografía obtenida de identificación en espectros de IR.

	Grupo funcional	Nombre del grupo funcional	Interpretación de Aditivos
Agua semana 1	C-H	Aldehído	Formaldehído
	C-H	Aldehído	Formaldehído
	C≡C	Alquino	
	C≡C	Alquino	
	C-O	Anhídrido	Molécula del Agua
	O-H	Hidroxilo	Molécula del Agua
Agua Semana 2	C-H	Aldehído	Formaldehído

	C-H	Aldehído	Formaldehído
	C≡C	Alquino	
	C-H	Alcano	DEHP
	O-H	Hidroxilo	Molécula del Agua
	C-O	Anhídrido	Molécula del Agua
Agua Semana 3	C-H	Aldehído	Formaldehído
	C-H	Aldehído	Formaldehído
	C-H	Aldehído	Formaldehído
	C≡C	Alquino	
	C≡C	Alquino	
	C-H	Alqueno	Migración de PP
	O-H	Hidroxilo	Molécula del Agua
	C-O	Anhídrido	Molécula del Agua
	C-H	Alcano	DEHP
Agua Semana 4	C-H	Aldehído	Formaldehído
	C-H	Aldehído	Formaldehído
	C-H	Aldehído	Formaldehído
	C≡C	Alquino	
	C≡C	Alquino	
	C-H	Alqueno	Migración de PP
	O-H	Hidroxilo	Molécula del Agua
	C-O	Anhídrido	Molécula del Agua
Agua Semana 5	C-H	Aldehído	Formaldehído
	C-H	Aldehído	Formaldehído
	C≡C	Alquino	
	C≡C	Alquino	
	C-H	Alqueno	Migración de PP
	O-H	Hidroxilo	Molécula de Agua
	C-O	Anhídrido	Molécula de Agua
Agua Semana 6	C-H	Aldehído	Formaldehído
	C-H	Aldehído	Formaldehído
	C≡C	Alquino	
	C-H	Alqueno	Migración de PP
	O-H	Hidroxilo	Molécula del Agua
	C-O	Anhídrido	Molécula del Agua
Agua Semana 7	C-H	Aldehído	Formaldehído
	C-H	Aldehído	Formaldehído
	C-H	Aldehído	Formaldehído
	C≡C	Alquino	
	C≡C	Alquino	
	C-H	Alcano	
	C-H	Alcano	
	O-H	Hidroxilo	Molécula del Agua
	C-O	Anhídrido	Molécula del Agua
Agua Semana 8	C-H	Aldehído	Formaldehído
	C-H	Aldehído	Formaldehído

	C≡C	Alquino	
	C≡C	Alquino	
	C-H	Alqueno	Migración de PP
	O-H	Hidroxilo	Molécula del Agua
	C-O	Anhídrido	Molécula del Agua

Tabla 10 Identificación de grupos funcionales en espectros de Infra Rojo (IR) de las alícuotas de agua. Semanas 1-8, interpretación de Aditivos. Para ver las imágenes dirigirse Anexos.

	Grupo Funcional	Nombre	Interpretación de Aditivos
PP Semana 1	O-H	Hidroxilo	DEHA
	C-H	Aldehído	Formaldehido
	C-O	Ester	DEHP
	C-N	Amida	Estearamida
PP Semana 2	O-H	Hidroxilo	DEHA
	C-H	Aldehído	Formaldehido
	C-O	Ester	DEHP
PP Semana 3	O-H	Hidroxilo	DEHA
	C-H	Aldehído	Formaldehido
	C-O	Ester	DEHP
	C-N	Amida	Estearamida
PP Semana 4	O-H	Hidroxilo	DEHA
	C-H	Aldehído	Formaldehido
	C-O	Ester	DEHP
	C-N	Amida	Estearamida
PP Semana 5	O-H	Hidroxilo	DEHA
	C-H	Aldehído	Formaldehido
	C-O	Ester	Estearamida
	C-N	Amida	Estearamida
PP Semana 6	O-H	Hidroxilo	DEHA
	C-H	Aldehído	Formaldehido
	C-O	Ester	DEHP
	C-N	Amida	Estearamida
PP Semana 7	O-H	Hidroxilo	DEHA
	C-H	Aldehído	Formaldehido
	C-O	Ester	DEHP
	C-N	Amida	Estearamida
PP Semana 8	O-H	Hidroxilo	DEHA
	C-H	Aldehído	Formaldehido
	C-O	Ester	DEHP
	C-O	Ester	DEHP
	C-N	Amida	Estearamida
	C-N	Amida	Estearamida

Tabla 11 Identificación de grupos funcionales en espectros de Infra Rojo (IR) de los contenedores de PP. Semanas 1-8, interpretación de Aditivos. Para ver las imágenes dirigirse Anexos.

10. DISCUSIÓN

El consumo de aditivos de PP durante 57 días no afectan el peso corporal ni el consumo de alimento o agua de los ratones hembra del grupo lixiviado con respecto a los del grupo control, Un estudio realizado por (Núñez *et al* 2001) mostró que el consumo de disruptores endócrinos no afectan el consumo de alimento y bebida, lo que nos lleva a sugerir que estar bajo la exposición de los DE no aminora o aumenta el apetito.

Autores, como (Migliarini B. *et al* 2011) y (Boudalia S. *et al* 2021) aseguran que las concentraciones de disruptores endócrinos presentes en plásticos tienen implicaciones en el metabolismo de los individuos expuestos a ellos, causando acumulación de grasa, que lleva a obesidad. A pesar de que esto no se llega a observar en nuestros resultados; el índice de peso entre los GC y GL son muy similares, podemos explicar que se podría deber a la poca exposición a los aditivos que tuvieron los ratones, como también fue observado en los trabajos realizados por (Hannon P. *et al* 2014) y (Boudalia S. *et al* 2021) Hannon expuso ratones a disruptores endócrinos entre 10 y 30 días donde no tuvo un efecto estadísticamente significativo sobre el porcentaje de cambio de peso corporal en comparación con el grupo de control; y Boudalia dictaminó que en ratones machos adultos, la exposición a BPA mediante inyecciones subcutáneas durante 8 días a dosis relativamente bajas (100 µg/kg pc/día) el peso corporal no se vio afectado por la disminución de la ingesta de alimentos, la disminución de la temperatura corporal y la actividad locomotor. Así mismo dos autores (Al-Griw M. *et al* (2021) y (Capela D. *et al* 2021) coincidieron en sus resultados al explicar que los ratones macho expuestos a los disruptores endócrinos BPA y MEHP no mostraron ningún cambio significativo en cuanto al peso del cuerpo. Es probable observar cambios significativos si se expusieran más tiempo a lixiviados e incluso se verían afectados en generaciones futuras, es probable que si se exponen por más de 60 días podamos tener resultados significativos.

El ciclo estral de los roedores se divide en etapas proestro, estro, metaestro y diestro con una duración de 4 y 5 días. Los cambios en los ciclos reproductivos dependen de los cambios cíclicos en el eje hipotalámico-hipofisis-ovárico, específicamente fluctuaciones en estrógeno, progesterona, hormona luteinizante y hormona foliculoestimulante (Laws M.J. *et al* 2021) esto podría ser porque a pesar de no tener diferencias significantes se puede observar que el grupo lixiviado tendió a tener menos

ciclos en comparación con GC; así mismo se pudo examinar que el ciclo estral de los ratones del GL duró más días que el del grupo control. Los estudios han demostrado que ftalatos y/o metabolitos de ftalatos, así como otros DE alteran la ciclicidad estral cuando existe exposición prenatal y exposición adulta. (Brehm E. *et al* 2019).

Como muchos estudios han demostrado, la exposición directa a los DE causan efectos en el ciclo estral, ya sea atrasando o en su defecto afectando todo el ciclo. Como lo demostró (Chiang C. *et al* 2019) después de exponer a ratones a Diisonilftalato (DiNP) con una concentración de 20 µg/kg/día y 200 mg/kg/día se redujo significativamente el tiempo del proestro en el ciclo estral. El estudio realizado por (Fletcher E.J *et al* 2022) demostró que los ratones hembra expuestos prenatalmente a DEHP tuvieron una frecuencia menor de tiempo en estro y más tiempo en proestro, metaestro y diestro que los controles, De igual manera se puede leer en el artículo publicado por (Bonald B. *et al* 2021) que los ratones expuestos a BPA tuvieron una duración mayor cuando se encontraban en la etapa del ciclo de estro en comparación del grupo control. Así mismo en varios artículos se puede leer que el metaestro en el grupo de ratones tratados con DE tiende a aumentar. (Hannon P. *et al* 2016) donde reporta que la exposición al DEHP a dosis de 500mg/kg/día disminuyó significativamente el porcentaje de días que los ratones estuvieron en celo y además aumentó significativamente el porcentaje de días que los ratones estuvieron en metaestro/diestro en comparación con el grupo control. Sin embargo, se pueden observar en nuestros resultados que no hubo diferencias significativas en las etapas del metaestro y del diestro como lo observó también (Hannon P. *et al* 2014) donde reporta que la exposición al DEHP no tuvo ningún efecto sobre el porcentaje de días que los ratones estuvieron en metaestro y diestro en comparación con el grupo control.

De acuerdo a las evidencias de publicaciones y al compararlo con nuestros resultados se observa la etapa de estro en los ratones del GL es significativamente menor a la del GC, así como se puede apreciar que la duración de los ratones en GL tiene diferencia significativa con el control, podríamos sugerir que hubo alguna alteración en la producción de las hormonas LH y FSH como se ve reflejado en la duración del metaestro y diestro del grupo lixiviado lo que puede llevar a una descompensación en las señalizaciones encargadas de la producción de estrógeno y progesterona siendo esta última la que se nota con mayor concentración debido a que se encuentra incrementada en las etapas de metaestro y diestro. Por último, puede estar altamente

relacionado con la fertilidad observada en el grupo lixiviado ya que la ventana de implantación pasa durante metaestro y diestro.

Con respecto a la fertilidad, pudimos observar en este trabajo que todos los ratones del grupo lixiviado se encontraron gestantes, esto podría notarse como un efecto normal, esta idea puede ser reforzada con la semejanza con el trabajo de (Hannon P. *et al* 2016) donde los ratones se sometieron a reproducción a los 6 meses posteriores a la administración de DEHP y se evaluó su fertilidad. La exposición oral no alteró significativamente, la cantidad de ratones que perdieron un embarazo, la cantidad de ratones que nunca quedaron embarazadas, la cantidad promedio de crías por camada, los porcentajes de crías vivas y muertas en nacimiento, o la proporción de sexos de machos y hembras de la descendencia en comparación con el grupo de control. Estos resultados pueden relacionarse con los resultados del objetivo donde se estudió el efecto de los lixiviados en el ciclo estral de los ratones hembra, ya que se puede observar que los ratones del GL tendieron a tener más frecuencia en las etapas del metaestro y diestro, así como a permanecer más tiempo en estas mismas etapas, se sabe que durante estas dos últimas etapas el ratón se encuentra en la ventana de implantación, es decir, los ratones del grupo lixiviado pasaron más tiempo susceptibles a quedar embarazadas; por lo que ya que no hubo afectaciones en la fertilidad; esto se puede probar ya que se presentó el 100% de fecundidad en los ratones sometidos a cópula.

En un estudio realizado por (Schmit E.E. 2016) ratones fueron expuestos a BBP (benzy butil ftalato) sus crías fueron analizadas y se observó que no hubo una disminución significativa en el peso, la masa magra o la masa grasa en los ratones hembra o macho. De igual manera en el estudio realizado por (Singh S. *et al* 2019) se expusieron ratones a un disruptor endócrino: ácido de perfluoroalquilo (PFAA) y al estudiar a las crías de la primera generación observaron que no se encontraron diferencias en el peso de los neonatos en comparación con el control. Esto difiere un poco con nuestros resultados obtenidos ya que se puede ver que las crías del grupo lixiviado pesaron un poco más de mg que las del grupo control, aunque no llegando a ser significativos, aun así, se sabe que este comportamiento de concentrar mayor tejido adiposo es uno de los efectos adversos que tienen estos disruptores endócrinos, es probable que a una mayor concentración y/o mayor exposición se pueda observar de una manera más directa este efecto.

Se pudieron observar en las crías de los ratones que estuvieron expuestos a los lixiviados (L) que nacieron con malformaciones en sus extremidades. Esto ha sido reportado por (Benitez-Leite S. *et al* 2007), (Macchi *et al* 2018) y (Pombo M. *et al* 2005). Donde encontraron que la exposición DE entre ellos DEHP y DEHA, de igual manera como lo explica (Bezaco P. 2021) este último causa malformaciones. Esto lo pudimos observar de manera explícita en las crías de ratón que nacieron de los ratones expuestos a los lixiviados de polipropileno.

Diversas fuentes han explicado que, cuando la exposición a diversos DE como el BPA durante en la edad adulta, las alteraciones parecen ser transitorias, como lo confirma la reducción del número de folículos antrales y cuerpos lúteos. (Pivonello C. *et al* 2020). Así mismo (Panagiotou E.M. *et al* 2021) realizó un experimento donde ratones hembra fueron expuestas a ftalatos y concluyeron que, en general, estos DE afectaron negativamente la salud del folículo ovárico al reducir el crecimiento del folículo antral, inducir la fragmentación de ovocitos y disminuir la producción de hormonas. (Johanson S.M. *et al* 2021) utilizaron ratones de la cepa CD-1 para administrarles dosis de contaminantes con propiedades de disruptores endócrinos y observaron que el número de folículos primordiales, así como los folículos preantrales no se vieron afectados por la exposición a DE en comparación con el control. Sin embargo, los folículos antrales se vieron reducidos de manera significativa en comparación con el control. En otro estudio publicado (Gupta R.K *et al* 2010), los folículos antrales fueron tratados con DEHP o MEHP en cultivo. DEHP (1–100 µg/ml) inhibió significativamente el crecimiento del folículo antral a los 48, 72 y 96 h en comparación con los controles, Además, MEHP (0.1–10 µg/ml) también inhibió significativamente el crecimiento del folículo antral a las 72 y 96 h respecto a los controles.

Esto nos sugiere que la exposición constantemente a los DE el número de folículos antrales se verá afectados, disminuyéndolos, esto podría llegar a ser perjudicial ya que, al inicio de cada ciclo menstrual, los ovarios reclutan varios de estos folículos ya que uno de ellos se transformará en un óvulo maduro que, llegado el momento, será liberado en la ovulación y esperará en la tuba uterina a ser fecundado por un espermatozoide. Normalmente se llegan a presentar entre 10 y 20 folículos antrales, y en nuestro trabajo los resultados obtenidos fueron aproximadamente de 14 foliculos antrales en el grupo control y 8 en el grupo lixiviado. Es importante hacer notar que,

en caso de no haber embarazo, poco antes de la menstruación, otra cohorte de folículos antrales aparecerá para volver a iniciar el ciclo, por lo tanto, los lixiviados podría comprometer el número de óvulos disponibles para ser fertilizados.

Otro resultado importante que se encontró en este trabajo fue el tamaño en diámetro del ovario, esto podemos compararlo con el trabajo realizado (Ding N. *et al* 2020) donde a ratones preñados se les administró dosis orales de 200 y 500 mg/kg/día de sulfonato de perfluorobutano (PFBS) y dieron a luz crías hembras que exhibieron numerosos síntomas de alteración de la función ovárica, entre ellas de las más importantes fue que el tamaño y el peso del ovario fueron reducidos. El tamaño y el peso reducido crean problemas como la disminución del número de folículos ováricos, retraso en la apertura vaginal, retraso en el inicio del celo, diestro prolongado y niveles séricos reducidos de estradiol. Se habla del peso en esta parte ya que fue parte de la investigación realizada por Ding aunque en nuestro trabajo solo se midió el tamaño en diámetro del ovario.

Se pudo observar un indicio de formación de quistes en los ovarios de los ratones del grupo lixiviado, Esto podría deber igualmente a la exposición a los disruptores endócrinos, existiendo diversos trabajos que lo respaldan: (Frade E. *et al* 2014) que explicó que tras la administración de BPA a dosis de 0,1-1,000 µg/kg, a ratones gestantes, se observó la aparición de quistes ováricos. De igual manera la investigadora (Berret E. 2014) explicó los daños que puede causar la exposición al BPA y quizá de lo más relevante que se puede leer es que las ratas expuestas por vía subcutánea a altas dosis de BPA desarrollaron síntomas similares a los del síndrome de ovario poliquístico, incluyendo un aumento de los niveles séricos de testosterona y estradiol, así como una reducción de la progesterona y quistes ováricos. (Rattan S. *et al* 2017) explicó que el disruptor endócrino como el metoxicloro (32-200 mg/kg/día) disminuyó el peso de los ovarios, aumentó la incidencia de ovarios quísticos, inhibió el crecimiento de los folículos e indujo la atresia en roedores. Todo esto es muy importante ya que el desarrollo de quistes en los ovarios puede impedir el correcto funcionamiento de la fertilidad en los humanos.

Muchos estudios han encontrado que el BPA puede inducir estrés oxidativo en diferentes tipos de células. El importante papel del estrés oxidativo en la apoptosis de las células de la granulosa y en la disfunción ovárica se ha confirmado. Así mismo como estrógeno ambiental, el BPA puede ejercer alteraciones como disruptor

endocrino al unirse a varios tipos de receptores, Por lo tanto es necesario el aclarar aún más el mecanismo de la apoptosis de las células de granulosa inducida por BPA (Huang M. *et al* 2021). Del mismo modo (Song D. *et al* 2019) describió la apoptosis de las células de la granulosa ovárica bajo diferentes tratamientos de BPA y que fueron detectados mediante análisis de citometría de flujo. Los resultados mostraron que la exposición a BPA (10 μ M), el porcentaje de células apoptóticas totales se atenuó significativamente en relación con los controles ($p < 0,05$). Así mismo (Huang *et al* 2020) escribió que las células de la granulosa sufren de apoptosis al ser expuestas a disruptores endócrinos, como DEHP Y DEHA esto lo podemos relacionar con que la principal función de las células de la granulosa que son la producción de los esteroides sexuales y péptidos que son requeridos para la foliculogénesis y la ovulación, esto lo podemos ver en el grupo control donde se vio mayor apoptosis en las células de la granulosa causando que tuvieran una menor cantidad de crías.

Las células estromales, las cuales forman el tejido de soporte o estructural que sostienen el ovario y que producen principalmente las hormonas femeninas estrógeno y progesterona no se vieron afectadas en este experimento. Algo parecido pasó en el trabajo de (Berni M. *et al* 2018) quien expuso que las células ováricas estromales de cerdo que fueron expuestas a BPS siendo este también un disruptor endocrino, no mostraron alteraciones en comparación con el grupo control.

En nuestro experimento se pudo observar en los espectros infrarrojos de las muestras de polipropileno la existencia de diferentes aditivos en la superficie del plástico. Además, en las muestras de agua podemos observar diferentes picos, dándonos a entender que hubo migración o lixiviación de los aditivos del envase de polipropileno al agua.

Esto coincide con lo publicado por (Harper E. *et al* 2022) donde explica que, si bien los empaques para guardar alimentos de PP son menos dañinos que sus homólogos, aun así, existe migración peligrosa de sustancias tóxicas y DE. Así mismo (Howdeshell K.L. *et al* 2003) comparo la lixiviación de cajas de vidrio y polipropileno utilizados para alimento para ratón, encontrando que los contenedores de polipropileno presentaban una lixiviación importante de sustancias químicas como disruptores endócrinos. Esto lo podemos asociar con nuestros resultados al observar los aditivos que se encontraron en el agua al ser analizados por espectro infrarrojo.

En el grupo de las muestras de plásticos al ser analizadas por espectro infrarrojo podemos encontrar espectros infrarrojo podemos encontrar en su mayoría DEHP, DEHA y estearamidas, Pero en las muestras líquidas pudimos observar que hay un mayor contenido de DEHP y formaldehidos lo cual nos lleva a pensar que el disruptor endocrino que más se encuentra en las muestras de polipropileno es el DEHP.

11. CONCLUSIÓN

Este trabajo demuestra que existe una migración al agua de los aditivos que se le agregan a los recipientes de PP cuando estos son calentados en el microondas a pesar de ser denominados “seguros” para el contacto con alimentos. La ingesta de lixiviados de PP promueven: incremento del peso corporal, afecciones al ciclo estral, puede alterar el éxito reproductivo, además de generar apoptosis en las células de la teca y granulosa. Los resultados, a pesar de no observar diferencias significativas podemos decir que fue posible debido a las concentraciones bajas de las sustancias presentes en el agua.

Perspectivas: A pesar de tener resultados no significativos podemos decir que debido a las concentraciones bajas de las sustancias en este proyecto no se logren ver de manera directa las consecuencias de su ingesta. Para poder demostrarlo se puede realizar un experimento donde se trabaje con las siguientes generaciones de los ratones que ingirieron agua con lixiviados, ya que el efecto de estos es acumulativo y las afecciones causadas por estos DE se pueden reflejar en estas generaciones. Hay que recalcar que este es un tema que necesita seguir estudiándose e investigándose, para dar a conocer a las personas las consecuencias de seguir usando plásticos en este caso PP como recipiente para almacenar alimentos.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Griw, M. A., Marwan, Z. M., Hdud, I. M., & Shaibi, T. (2021). Vitamin D mitigates adult onset diseases in male and female mice induced by early-life exposure to endocrine disruptor BPA. *Open veterinary journal*, 11(3), 407–417. <https://doi.org/10.5455/OVJ.2021.v11.i3.12>

An, R., Wang, X., Yang, L., Zhang, J., Wang, N., Xu, F., ... Zhang, L. (2021). *Polystyrene microplastics cause granulosa cells apoptosis and fibrosis in ovary through oxidative stress in rats. Toxicology*, 449, 152665. doi:10.1016/j.tox.2020.152665

Angulo M., Sabanero M., Castro E., Flores V., Ramírez-Emiliano J., & Ortíz, M. (2012). Ciclo estral del ratón hembra intacto y ovariectomizado. *Acta Universitaria*. 22. 5-8. 10.15174/au.2012.360

Ajayi, A. F., & Akhigbe, R. E. (2020). Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. *Fertility research and practice*, 6, 5. <https://doi.org/10.1186/s40738-020-00074-3>

Barrett, E. S., & Sobolewski, M. (2014). Polycystic ovary syndrome: do endocrine-disrupting chemicals play a role?. *Seminars in reproductive medicine*, 32(3), 166–176. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1371088>

Barrick, A., Champeau, O., Chatel, A., Manier, N., Northcott, G. y Tremblay, LA (2021). Aditivos plásticos: desafíos en la evaluación de peligros ecotox. *Peer J*, 9, e11300. <https://doi.org/10.7717/peerj.11300>

Battocletti A. (2011) Toxicidad crónica de los plásticos. *Tendencias en Medicina*. Facultad de Medicina. Universidad de la República. pp 143-149.

Beltrán M. & Marcilla A. (2005) Tipos de plásticos, Aditivación y Mezclado. *Tecnología de Polímeros* pp 43-62.

Benitez-Leite S., Macchi ML. & Acosta M. (2005) Congenital Malformations Associated with Toxic Agricultural Chemicals. Dirección General de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad Nacional de Asunción.

Béranger, R., Hoffmann, P., Christin-Maitre, S., & Bonneterre, V. (2012). Occupational exposures to chemicals as a possible etiology in premature ovarian failure: a critical analysis of the literature. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 33(3), 269–279. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.01.002>

Bergman, A., Heindel, J. J., Kasten, T., Kidd, K. A., Jobling, S., Neira, M., Zoeller, R. T., Becher, G., Bjerregaard, P., Bornman, R., Brandt, I., Kortenkamp, A., Muir, Bezaco P. (2020) Toxicidad del Bisfenol A sobre la salud de las mujeres. Universidad de Valladolid.

Bezaco P, (2021) Conocimiento Básico de efectos del Plástico en la Salud. Facultad de Enfermería, Universidad de Valladolid.

D., Drisse, M. N., Ochieng, R., Skakkebaek, N. E., Byléhn, A. S., Iguchi, T., Toppari, J., & Woodruff, T. J. (2013). The impact of endocrine disruption: a consensus statement on the state of the science. *Environmental health perspectives*, 121(4), A104–A106. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205448>

Berni, M., Gigante, P., Bussolati, S., Grasselli, F., Grolli, S., Ramoni, R., & Basini, G. (2018). Bisphenol S, a Bisphenol A alternative, impairs swine ovarian and adipose cell functions. *Domestic Animal Endocrinology*. doi:10.1016/j.domaniend.2018.08.0

Bonaldo, B., Casile, A., Bettarelli, M., Gotti, S., Panzica, G., & Marraudino, M. (2021). Effects of chronic exposure to bisphenol A in adult female mice on social behavior, vasopressin system, and estrogen membrane receptor (GPER1). *European journal of histochemistry* : EJH, 65(s1), 3272. <https://doi.org/10.4081/ejh.2021.3272>

Botti G. (2008) Controversia: Conceptos Modernos en Estimulación de Ovulación. Encuentro Latinoamericano de Endocrinología, Ginecología y Reproducción.

Boudalia, S., Bousbia, A., Boumaaza, B., Oudir, M., & Canivenc Lavier, M. C. (2021). Relationship between endocrine disruptors and obesity with a focus on bisphenol A: a narrative review. *BiolImpacts* : BI, 11(4), 289–300. <https://doi.org/10.34172/bi.2021.33>

Brehm, E., & Flaws, J. A. (2019). Transgenerational Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on Male and Female Reproduction. *Endocrinology*, 160(6), 1421–1435. <https://doi.org/10.1210/en.2019-00034>

Brehm, E., Rattan, S., Gao, L., & Flaws, J. A. (2018). Prenatal Exposure to Di(2-Ethylhexyl) Phthalate Causes Long-Term Transgenerational Effects on Female Reproduction in Mice. *Endocrinology*, 159(2), 795–809. <https://doi.org/10.1210/en.2017-03004>

Bruck, S., & Ford, A. T. (2018). Chronic ingestion of polystyrene microparticles in low doses has no effect on food consumption and growth to the intertidal amphipod *Echinogammarus marinus*?. *Environmental pollution (Barking, Essex: 1987)*, 233, 1125–1130. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.015>

Capela, D., & Mhaouty-Kodja, S. (2021). Effects of pubertal exposure to low doses of di-(2-ethylhexyl)phthalate on reproductive behaviors in male mice. *Chemosphere*, 263, 128191. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.12

Carou, M. C., Cruzans, P. R., Maruri, A., Farina, M. G., Fiorito, C. D., Olea, G., & Lombardo, D. M. (2017). Apoptosis of bovine granulosa cells: Intracellular pathways and differentiation. *Acta histochemica*, 119(5), 462–470. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2017.04.010>

Castillo A. (2011) Anatomía, Complejo Hospitalario Universitario Albacete.

Chiang, C., & Flaws, J. A. (2019). Subchronic Exposure to Di(2-ethylhexyl) Phthalate and Diisononyl Phthalate During Adulthood Has Immediate and Long-Term Reproductive Consequences in Female Mice. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 168(2), 620–631. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz013>

Chichizola C, Scaglia H., Franconi C., Ludueña B., Mastandrea C., Ghione-Pelayo A (2009). Disruptores endócrinos y el sistema reproductivo. *Revista Bioquímica y Patología clínica*. 73(3): 9-23

Chen, L. X., & Jimenez, P. T. (2017). Female Fertility: It Takes Two to Tango. *Endocrinology*, 158(7), 2074–2076. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00447>

Cheng, X., & Ferrell, J. E., Jr (2018). Apoptosis propagates through the cytoplasm as trigger waves. *Science (New York, N.Y.)*, 361(6402), 607–612. <https://doi.org/10.1126/science.aah4065>

Chung, B. Y., Kyung, M., Lim, S. K., Choi, S. M., Lim, D. S., Kwack, S. J., Kim, H. S., & Lee, B. M. (2013). Uterotrophic and Hershberger assays for endocrine disruption properties of plastic food contact materials polypropylene (PP) and polyethylene terephthalate (PET). *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, 76(10), 624–634. <https://doi.org/10.1080/15287394.2013.801767>

Corso P., López A., Caleffi C., Domínguez N. & Díaz G. (2016) Polipropileno. Universidad José Antonio Páez.

Crain, D. A., Janssen, S. J., Edwards, T. M., Heindel, J., Ho, S. M., Hunt, P., Iguchi, T., Juul, A., McLachlan, J. A., Schwartz, J., Skakkebaek, N., Soto, A. M., Swan, S., Walker, C., Woodruff, T. K., Woodruff, T. J., Giudice, L. C., & Guillette, L. J., Jr (2008). Female reproductive disorders: the roles of endocrine-disrupting compounds and developmental timing. *Fertility and sterility*, 90(4), 911–940. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.08.067>

Crocker, K., Calder, M. D., Edwards, N. A., Betts, D. H., & Watson, A. J. (2018). CD-1 mouse fertility rapidly declines and is accompanied with early pregnancy loss under conventional housing conditions. *Theriogenology*, *108*, 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.12.018>

Cuhra, M., Bøhn, T., & Cuhra, P. (2017). In plastica: laboratory material newness affects growth and reproduction of *Daphnia magna* reared in 50-ml polypropylene tubes. *Scientific reports*, *7*, 46442. <https://doi.org/10.1038/srep46442>

Ding, N., Harlow, S. D., Randolph, J. F., Jr, Loch-Caruso, R., & Park, S. K. (2020). Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances (PFAS) and their effects on the ovary. *Human reproduction update*, *26*(5), 724–752. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmaa018>

Ding, T., Yan, W., Zhou, T., Shen, W., Wang, T., Li, M., Zhou, S., Wu, M., Dai, J., Huang, K., Zhang, J., Chang, J., & Wang, S. (2022). Endocrine disrupting chemicals impact on ovarian aging: Evidence from epidemiological and experimental evidence. *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, *305*, 119269. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119269>

Dutta, S., Haggerty, D. K., Rappolee, D. A., & Ruden, D. M. (2020). Phthalate Exposure and Long-Term Epigenomic Consequences: A Review. *Frontiers in genetics*, *11*, 405. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00405>

Erythropel, H. C., Maric, M., Nicell, J. A., Leask, R. L., & Yargeau, V. (2014). Leaching of the plasticizer di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) from plastic containers and the question of human exposure. *Applied microbiology and biotechnology*, *98*(24), 9967–9981. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6183-8>

Feng, Y., Tamadon, A., & Hsueh, A. (2018). Imaging the ovary. *Reproductive biomedicine online*, *36*(5), 584–593. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.02.006>

Fletcher, E. J., Santacruz-Márquez, R., Mourikes, V. E., Neff, A. M., Laws, M. J., & Flaws, J. A. (2022). Effects of Phthalate Mixtures on Ovarian Folliculogenesis and Steroidogenesis. *Toxics*, 10(5), 251. <https://doi.org/10.3390/toxics10050251>

Food and Drug Administration (FDA) (2013) Guidance for Industry: Preparation of Premarket Submissions for Food Contact Substances (Chemistry Recommendations). Center for Food Safety and Applied Nutrition.

Frade E., Spritzer P., Hohl A. & Bachega T. (2014) Effects of Endocrine Disruptors in the development of the female reproductive tract. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Galassi P. & Guillase F. (2011) Reproducción de animales en laboratorio 1° parte: Rata y Ratón. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad de Buenos Aires. pp 2-22.

Galvis N. (2014) *Caracterización del Polipropileno Reciclado Disponible a partir de Tapas, para reincorporarlo en Procesos Productivos, Mezclado con Polipropileno Virgen* (Tesis doctoral). Universidad EAFIT.

González K. (2010) *Contenido de Taninos Presentes en la Corteza de Pino Palo Blanco (pinus maximinoi H.E Moore), en Función de Dos Etapas de Crecimiento* (Tesis de Licenciatura) Universidad de San Carlos de Guatemala.

Gupta, R. K., Singh, J. M., Leslie, T. C., Meachum, S., Flaws, J. A., & Yao, H. H.-C. (2010). Di-(2-ethylhexyl) phthalate and mono-(2-ethylhexyl) phthalate inhibit growth and reduce estradiol levels of antral follicles in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 242(2), 224–230. doi:10.1016/j.taap.2009.10.011

Han, C., Sahle-Demessie, E., Varughese, E., & Shi, H. (2019). Polypropylene-MWCNT composite degradation, release, detection, and toxicity of MWCNT during accelerated aging. *Environmental science. Nano*, 6, 1876–1894. <https://doi.org/10.1039/c9en00153k>

Hannon, P. R., Niermann, S., & Flaws, J. A. (2016). Acute Exposure to Di(2-Ethylhexyl) Phthalate in Adulthood Causes Adverse Reproductive Outcomes Later in Life and Accelerates Reproductive Aging in Female Mice. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 150(1), 97–108. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv317>

Hannon, P. R., Peretz, J., & Flaws, J. A. (2014). Daily exposure to Di(2-ethylhexyl) phthalate alters estrous cyclicity and accelerates primordial follicle recruitment potentially via dysregulation of the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in adult mice. *Biology of reproduction*, 90(6), 136. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.119032>

Harper, E., Cunningham, E., & Connolly, L. (2022). Using in vitro bioassays to guide the development of safer bio-based polymers for use in food packaging. *Frontiers in toxicology*, 4, 936014. <https://doi.org/10.3389/ftox.2022.936014>

Hauser R. (2019). Is plastic a threat to your health?. *Harvard Health Publishing*, 12, 1-5.

Hipwell, A.E., Kahn, L. G., Factor-Litvak, P., Porucznik, C. A., Siegel, E. L., Fichorova, R. N., Hamman, R. F., Klein-Fedyshin, M., Harley, K. G., & program collaborators for Environmental influences on Child Health Outcomes (2019). Exposure to non-persistent chemicals in consumer products and fecundability: a systematic review. *Human reproduction update*, 25(1), 51–71. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmy032>

Howdeshell, K. L., Peterman, P. H., Judy, B. M., Taylor, J. A., Orazio, C. E., Ruhlen, R. L., Vom Saal, F. S., & Welshons, W. V. (2003). Bisphenol A is released from used polycarbonate animal cages into water at room temperature. *Environmental health perspectives*, 111(9), 1180–1187. <https://doi.org/10.1289/ehp.5993>

Hsieh, L. S., Wen, J. H., Miyares, L., Lombroso, P. J., & Bordey, A. (2017). Outbred CD1 mice are as suitable as inbred C57BL/6J mice in performing social tasks. *Neuroscience letters*, 637, 142–147. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.11.035>

Hu, L., Fu, J., Wang, S., Xiang, Y., & Pan, X. (2020). *Microplastics generated under simulated fire scenarios: Characteristics, antimony leaching, and toxicity. Environmental Pollution, 115905.* doi:10.1016/j.envpol.2020.115905

Huang, M., Li, X., Jia, S., Liu, S., Fu, L., Jiang, X., & Yang, M. (2020). *Bisphenol AF induces apoptosis via estrogen receptor beta (ER β) and ROS-ASK1-JNK MAPK pathway in human granulosa cell line KGN. Environmental Pollution, 116051.* doi:10.1016/j.envpol.2020.116051

Huang, M., Huang, M., Li, X., Liu, S., Fu, L., Jiang, X., & Yang, M. (2021). Bisphenol A induces apoptosis through GPER-dependent activation of the ROS/Ca²⁺-ASK1-JNK pathway in human granulosa cell line KGN. *Ecotoxicology and Environmental Safety, 208*, 111429. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111429

Johanson, S. M., Ropstad, E., Østby, G. C., Aleksandersen, M., Zamaratskaia, G., Boge, G. S., Halsne, R., Trangerud, C., Lyche, J. L., Berntsen, H. F., Zimmer, K. E., & Verhaegen, S. (2021). Perinatal exposure to a human relevant mixture of persistent organic pollutants: Effects on mammary gland development, ovarian folliculogenesis and liver in CD-1 mice. *PloS one, 16(6)*, e0252954. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0252954>

Kabir, E. R., Rahman, M. S., & Rahman, I. (2015). *A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. Environmental Toxicology and Pharmacology, 40(1)*, 241–258. doi:10.1016/j.etap.2015.06.009

Kaludjerovic, J., Franke, A. A., & Ward, W. E. (2012). Circulating isoflavonoid levels in CD-1 mice: effect of oral versus subcutaneous delivery and frequency of administration. *The Journal of nutritional biochemistry, 23(5)*, 437–442. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.01.008>

Karwacka, A., Zamkowska, D., Radwan, M., & Jurewicz, J. (2019). Exposure to modern, widespread environmental endocrine disrupting chemicals and their effect on the reproductive potential of women: an overview of current epidemiological

evidence. *Human fertility (Cambridge, England)*, 22(1), 2–25. <https://doi.org/10.1080/14647273.2017.1358828>

Kassotis C.D, Vandenberg, L. N., Demeneix, B. A., Porta, M., Slama, R., & Trasande, L. (2020). Endocrine-disrupting chemicals: economic, regulatory, and policy implications. *The lancet. Diabetes & endocrinology*, 8(8), 719–730. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(20\)30128-5](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(20)30128-5)

Komatsu, K., Iwase, A., Murase, T., & Masubuchi, S. (2018). Ovarian Tissue Culture to Visualize Phenomena in Mouse Ovary. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (136), 57794. <https://doi.org/10.3791/57794>

Kummer, V., Mašková, J., Zralý, Z., & Faldyna, M. (2011). Ovarian disorders in immature rats after postnatal exposure to environmental polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Applied Toxicology*, 33(2), 90–99. doi:10.1002/jat.1714

Laws, M. J., Neff, A. M., Brehm, E., Warner, G. R., & Flaws, J. A. (2021). Endocrine disrupting chemicals and reproductive disorders in women, men, and animal models. *Advances in Pharmacology*, 151–190. doi:10.1016/bs.apha.2021.03.008

Li, K. (2016). Leaching. In *Durability Design of Concrete Structures*, K. Li (Ed.). <https://doi.org/10.1002/9781118910108.ch4>

Li, L., Liu, J. C., Lai, F. N., Liu, H. Q., Zhang, X. F., Dyce, P. W., Shen, W., & Chen, H. (2016). Di (2-ethylhexyl) Phthalate Exposure Impairs Growth of Antral Follicle in Mice. *PloS one*, 11(2), e0148350. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148350>

Li, N., Liu, T., Zhou, L., He, J., & Ye, L. (2012). Di-(2-ethylhexyl) phthalate reduces progesterone levels and induces apoptosis of ovarian granulosa cell in adult female ICR mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34(3), 869–875. doi:10.1016/j.etap.2012.08.013

Liu, T., Di, Q.-N., Sun, J.-H., Zhao, M., Xu, Q., & Shen, Y. (2020). Effects of nonylphenol induced oxidative stress on apoptosis and autophagy in rat ovarian

granulosa cells. Chemosphere, 261, 127693.
doi:10.1016/j.chemosphere.2020.12

Liu, Y.X., Zhang, Y., Li, Y. Y., Liu, X. M., Wang, X. X., Zhang, C. L., Hao, C. F., & Deng, S. L. (2019). Regulation of follicular development and differentiation by intra-ovarian factors and endocrine hormones. *Frontiers in bioscience (Landmark edition), 24*, 983–993.

Liu, Z., Sun, Y., Jiang, Y., Qian, Y., Chen, S., Gao, S., Chen, L., Li, C., & Zhou, X. (2018). Follicle-stimulating hormone (FSH) promotes retinol uptake and metabolism in the mouse ovary. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E, 16*(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0371-9>

Lithner, D., Nordensvan, I., & Dave, G. (2012). Comparative acute toxicity of leachates from plastic products made of polypropylene, polyethylene, PVC, acrylonitrile-butadiene-styrene, and epoxy to *Daphnia magna*. *Environmental science and pollution research international, 19*(5), 1763–1772. <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0663-5>

Macci E. Dutra L.S & Ferreira A. (2018) Identificación de malformaciones congénitas asociadas a disruptores endócrinos. Escuela Nacional de salud Pública.

Marsh, K. and Bugusu, B. (2007) Food Packaging—Roles, Materials, and Environmental Issues. *Journal of Food Science, 72*, R39-R55. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00301.x>

Martinez N. (2019) Concentración de Bisfenol A como Disruptor Endócrino en enlatados chilenos de la región metropolitana, Universidad Finis Terrae.

Menéndez, J.A., Moreno, A.H. (Eds.). (2017). Aplicaciones industriales del calentamiento con energía microondas. Latacunga, Ecuador: Editorial Universidad Técnica de Cotopaxi, Primera Edición, pp 14. ISBN: 978-9978-395-34-9

Migliarini, B., Piccinetti, C. C., Martella, A., Maradonna, F., Gioacchini, G., & Carnevali, O. (2011). Perspectives on endocrine disruptor effects on metabolic sensors. *General and comparative endocrinology*, 170(3), 416–423. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.11.025>

Mínguez-Alarcón L., & Gaskins, A. J. (2017). Female exposure to endocrine disrupting chemicals and fecundity: a review. *Current opinion in obstetrics & gynecology*, 29(4), 202–211. <https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000373>

Mikhael, S., Punjala-Patel, A., & Gavriloja-Jordan, L. (2019). Hypothalamic-Pituitary-Ovarian Axis Disorders Impacting Female Fertility. *Biomedicines*, 7(1), 5. <https://doi.org/10.3390/biomedicines7010005>

Monteiro, C. S., Xavier, E., Caetano, J., & Marinho, R. M. (2020). A critical analysis of the impact of endocrine disruptors as a possible etiology of primary ovarian insufficiency. *JBRA assisted reproduction*, 24(3), 324–331. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20200005>

Monzó M. (2015). *Investigación de la influencia del tipo de gas utilizado en el plasma atmosférico, en la modificación superficial del polipropileno* (Tesis doctoral). Universidad de Valencia.

Morales J., Tellez, D., Caraveo, Y., & Sandoval A. (2018). Caracterización de la industria del plástico para definir la competencia en manufactura del ingeniero industrial, en una región del estado de Sonora México. *Revista de Aplicación Científica y Técnica*, pp 20-30.

Moreira, M. A., André, L. C., & Cardeal, Z. L. (2013). Analysis of phthalate migration to food simulants in plastic containers during microwave operations. *International journal of environmental research and public health*, 11(1), 507–526. <https://doi.org/10.3390/ijerph110100507>

Mueller, W. A, Hassel, M., Grealy, M. (2015) Development and Reproduction in Humans and Animal Model Species. *Springer Heidelberg New York Dordrecht London Library of Congress*, pp 158. ISBN 978-3-662-43783-4

Muncke J. (2021). Tackling the toxics in plastics packaging. *PLoS biology*, 19(3), e3000961. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000961>

Myers M., Britt K.L., Wreford N.G.M, Ebling F.J.P & Kerr J.B Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reproduction Research* ISSN 1470–1626 (paper) 1741–7899

Nájera H., (2009) Lixiviados ¿Que son, ¿cómo se clasifican? UNICACH pp 3-5.

Niederberger, C., Pellicer, A., Cohen, J., Gardner, D. K., Palermo, G. D., O'Neill, C. L., Chow, S., Rosenwaks, Z., Cobo, A., Swain, J. E., Schoolcraft, W. B., Nunez, A. A., Kannan, K., Giesy, J. P., Fang, J., & Clemens, L. G. (2001). Effects of Bisphenol A on energy balance and accumulation in brown adipose tissue in rats. *Chemosphere*, 42(8), 917–922. doi:10.1016/s0045-6535(00)00196-x

Frydman, R., Bishop, L. A., Aharon, D., Gordon, C., New, E., Decherney, A., Tan, S. L., Paulson, R. J., Goldfarb, J. M., ... LaBarbera, A. R. (2018). Forty years of IVF. *Fertility and sterility*, 110(2), 185–324.e5. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.06.005>

NORMA Oficial Mexicana NMX-E-232-CNCP-2011 Industria del plástico-símbolos de identificación de plásticos. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 21 de septiembre de 2011.

NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos peligrosos biológico-infecciosos-Clasificación y especificaciones de manejo. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación el 23 de abril de 2003.

NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación con el 6 de diciembre de 1999.

Ortiz D. (2018) Efecto del sobrepeso y consumo de plastificantes en la fragmentación de ADN espermático en ratones de la cepa CD-1. Tesis para recibir el grado de licenciada en biología. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Panagiotou, E. M., Ojasalo, V., & Damdimopoulou, P. (2021). Phthalates, ovarian function and fertility in adulthood. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 35(5), 101552. doi:10.1016/j.beem.2021.101552

Peralta I. y Nicolás P., (2013). Foliculogénesis; camino hacia la sobrevivencia o la muerte celular, Departamento de Biología Celular y Tisular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, *Revista de educación bioquímica*, pp 136.

Pivonello, C., Muscogiuri, G., Nardone, A., Garifalos, F., Provisiero, D. P., Verde, N., de Angelis, C., Conforti, A., Piscopo, M., Auriemma, R. S., Colao, A., & Pivonello, R. (2020). Bisphenol A: an emerging threat to female fertility. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 18(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s12958-019-0558-8>

Pombo M. & Castro L. *Disruptores Endocrinos* (2005) Sociedad Española de Endocrinología Pediátrica.

Qian, S., Ji, H., Wu, X., Li, N., Yang, Y., Bu, J., Zhang, X., Qiao, L., Yu, H., Xu, N., & Zhang, C. (2018). Detection and quantification analysis of chemical migrants in plastic food contact products. *PloS one*, 13(12), e0208467. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208467>

Rasmussen, L. M., Sen, N., Vera, J. C., Liu, X., & Craig, Z. R. (2017). Effects of in vitro exposure to dibutyl phthalate, mono-butyl phthalate, and acetyl tributyl citrate

on ovarian antral follicle growth and viability. *Biology of reproduction*, 96(5), 1105–1117. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.144691>

Rashtian, J., Chavkin, D. E., & Merhi, Z. (2019). Water and soil pollution as determinant of water and food quality/contamination and its impact on female fertility. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 17(1), 5. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0448-5>

Rattan, S., Zhou, C., Chiang, C., Mahalingam, S., Brehm, E., & Flaws, J. A. (2017). Exposure to endocrine disruptors during adulthood: consequences for female fertility. *The Journal of endocrinology*, 233(3), R109–R129. <https://doi.org/10.1530/JOE-17-0023>

Rattan, S., Brehm, E., Gao, L., & Flaws, J. A. (2018). Di(2-Ethylhexyl) Phthalate Exposure During Prenatal Development Causes Adverse Transgenerational Effects on Female Fertility in Mice. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 163(2), 420–429. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfy042>

Restrepo R. & Cadavid M. (2013). Horno microondas, su funcionamiento, mitos y realidades y una medida a la velocidad de la luz. Universidad de Antioquia. pp 1-5.

Rowdhwal, S., & Chen, J. (2018). Toxic Effects of Di-2-ethylhexyl Phthalate: An Overview. *BioMed research international*, 2018, 1750368. <https://doi.org/10.1155/2018/1750368>

Sáiz, J., & Gómara, B. (2017). Evaluation of Endocrine Disrupting Compounds Migration in Household Food Containers under Domestic Use Conditions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(31), 6692–6700. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b02479>

Sanchez de Badajoz, E., Lage-Sánchez, J. M., & Sánchez-Gallegos, P. (2017). Endocrine disruptors and prostate cancer. Disruptores endocrinos y cáncer de próstata. *Archivos españoles de urología*, 70(3), 331–335.

SciFinder número de Registro CAS® 9003-07-0, 2022

Schmitt, E. E., Vellers, H. L., Porter, W. W., & Lightfoot, J. T. (2016). Environmental Endocrine Disruptor Affects Voluntary Physical Activity in Mice. *Medicine and science in sports and exercise*, 48(7), 1251–1258. <https://doi.org/10.1249/MSS.0000000000000908>

Scsukova, S., Rollerova, E., & Bujnakova Mlynarcikova, A. (2016). *Impact of endocrine disrupting chemicals on onset and development of female reproductive disorders and hormone-related cancer. Reproductive Biology*, 16(4), 243–254. doi:10.1016/j.repbio.2016.09.001

SEO BirdLife (2019). Impacto del abandono de plástico en la naturaleza. *Ecombes*, (1) 1-24.

Signorile, P., G. (2012). *Endocrine disruptors in utero cause ovarian damages linked to endometriosis. Frontiers in Bioscience*, E4(1), 1724. doi:10.2741/493

Singh, S., & Singh, S. K. (2019). Effect of gestational exposure to perfluorononanoic acid on neonatal mice testes. *Journal of Applied Toxicology*. doi:10.1002/jat.3883

Shi, M., Whorton, A. E., Sekulovski, N., MacLean, J. A., & Hayashi, K. (2019). Prenatal Exposure to Bisphenol A, E, and S Induces Transgenerational Effects on Female Reproductive Functions in Mice. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 170(2), 320–329. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz124>

Sifakis, S., Androutsopoulos, V. P., Tsatsakis, A. M., & Spandidos, D. A. (2017). Human exposure to endocrine disrupting chemicals: effects on the male and female reproductive systems. *Environmental toxicology and pharmacology*, 51, 56–70. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.02.024>

Song, D., Wu, G., Wei, Q., & Shi, F. (2019). Bisphenol A attenuates thyroxine-induced apoptosis in ovarian granulosa cells of pigs. *Reproduction in Domestic Animals*. doi:10.1111/rda.13436

Strauss J.S., Barbieri R., Gargiulo A. & Jaffe's. (2018). *Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathophysiology and Clinical Management*. 8th ed. Philadelphia: *Elsevier*.

Sutton, P., Giudice, L. C., & Woodruff, T. J. (2010). Reproductive environmental health. *Current opinion in obstetrics & gynecology*, 22(6), 517–524. <https://doi.org/10.1097/GCO.0b013e3283404e59>

Thomsen, A. M., Riis, A. H., Olsen, J., Jönsson, B. A., Lindh, C. H., Hjollund, N. H., Jensen, T. K., Bonde, J. P., & Toft, G. (2017). Female exposure to phthalates and time to pregnancy: a first pregnancy planner study. *Human reproduction (Oxford, England)*, 32(1), 232–238. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew291>

Tresguerre J.A. (2005) *Fisiología Humana*, Vol. 3 Capitulo 79 Fisiología del eje Hipotálamo-Hipófiso-Ovárico pp. 1007-1023.

Trujillo A., Gutierrez G., Linares R. & Eguibar J. (2015) El eje hipotálamo-hipófisis-ovarios Un viejo conocido, nuevos hallazgos y más por conocer. Instituto de Fisiología BUAP.

Vabre, P., Gatimel, N., Moreau, J., Gayrard, V., Picard-Hagen, N., Parinaud, J., & Leandri, R. D. (2017). Environmental pollutants, a possible etiology for premature ovarian insufficiency: a narrative review of animal and human data. *Environmental health: a global access science source*, 16(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s12940-017-0242-4>

Vantmant D. & Vega B. (2010) Fisiología reproductiva y cambios evolutivos con la edad de la mujer. *Revista Médica Las Condes*. Vol 21, pp. 348-362. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(10\)70545-9](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(10)70545-9)

Vargas B., Ambriz D., Navarro Ma. del C., Trejo A., Rodríguez G. & González Ma. del R. (2018). *Manejo de Animales de Bioterio de la UAM-1*. Universidad Autónoma de México. pp 1-73.

Wang, A., Padula, A., Sirota, M., & Woodruff, T. J. (2016). Environmental influences on reproductive health: the importance of chemical exposures. *Fertility and sterility*, 106(4), 905–929. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.07.1076>

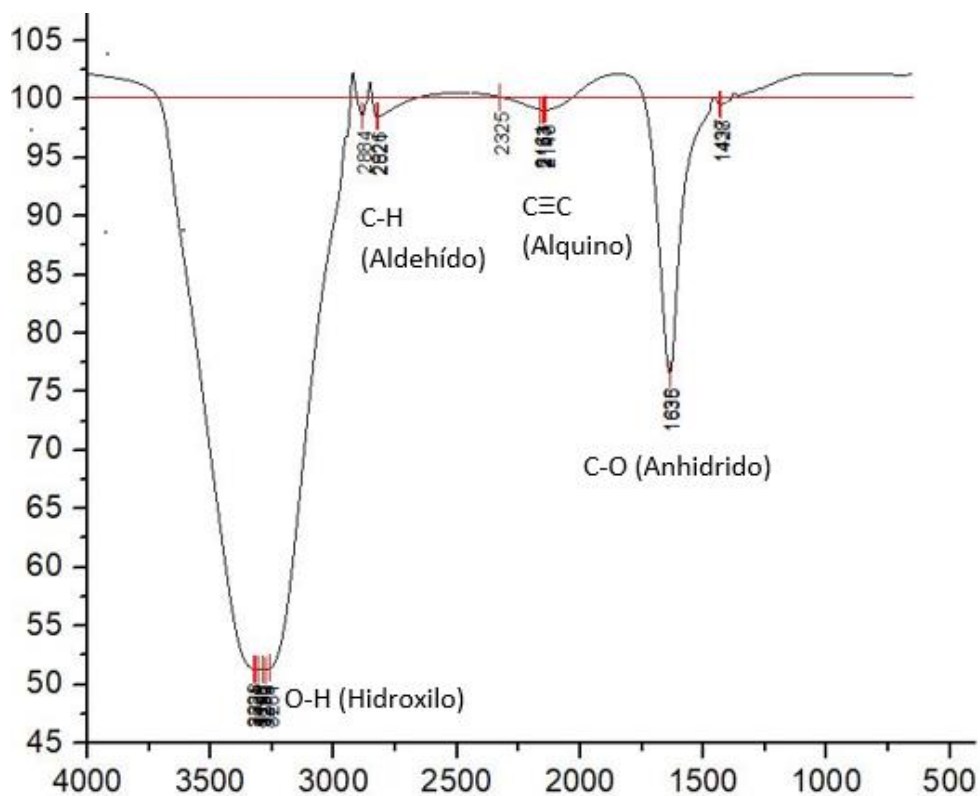
Wedel K. (2019). Disruptores endocrinos: un riesgo para la salud reproductiva. *Médica Sinergia Vol.4*. pp 24 -30. doi: <https://doi.org/10.31434/rms.v4i6.242>

Xu, H., Mu, X., Ding, Y., Tan, Q., Liu, X., He, J., ... Chen, X. (2021). *Melatonin alleviates benzo(a)pyrene-induced ovarian corpus luteum dysfunction by suppressing excessive oxidative stress and apoptosis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 207, 111561. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111561

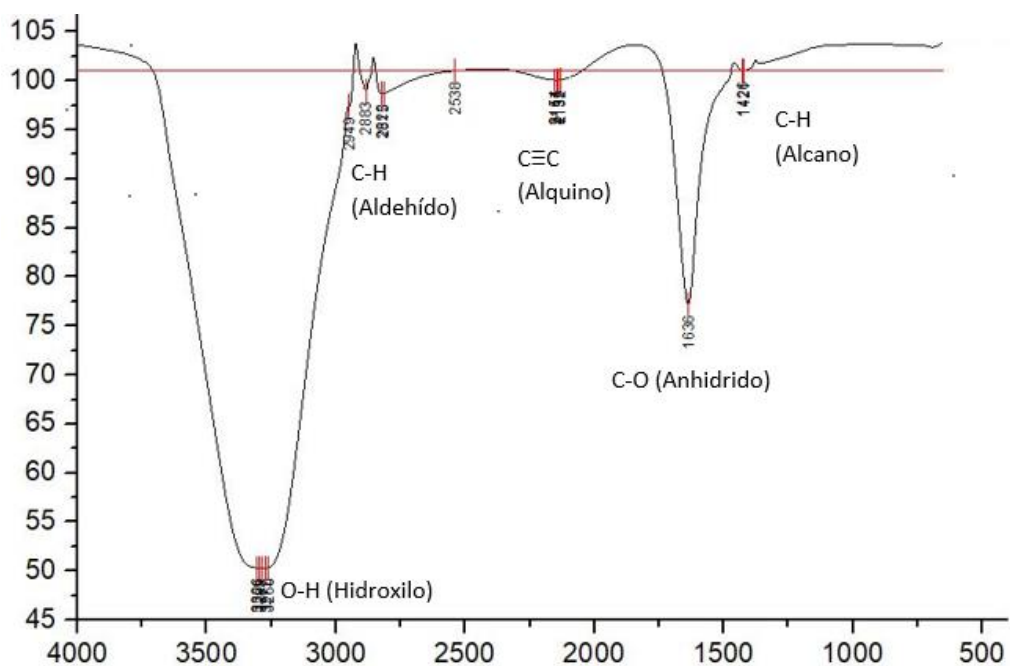
Xu Z., Gartia M., Choi C., Jiang J., Chen Y., Cunningham B. & Liu G. (2011) Quick detection of contaminants leaching from polypropylene centrifuge tubes with surface-enhanced Raman spectroscopy and ultraviolet absorption spectroscopy. *Journal Raman Spectroscopy*, 42, 1939-1944. DOI 10.1002/jrs.2950

Zhou, C., Gao, L., & Flaws, J. A. (2017). Exposure to an Environmentally Relevant Phthalate Mixture Causes Transgenerational Effects on Female Reproduction in Mice. *Endocrinology*, 158(6), 1739–1754. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00100>

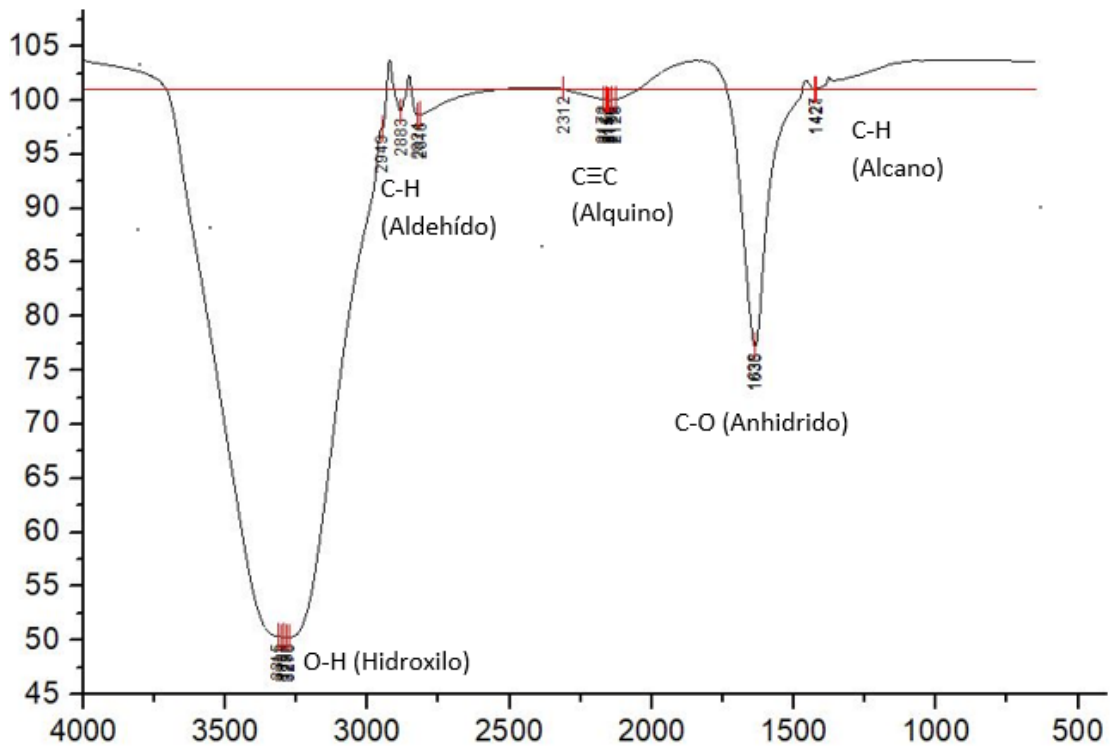
13. ANEXOS



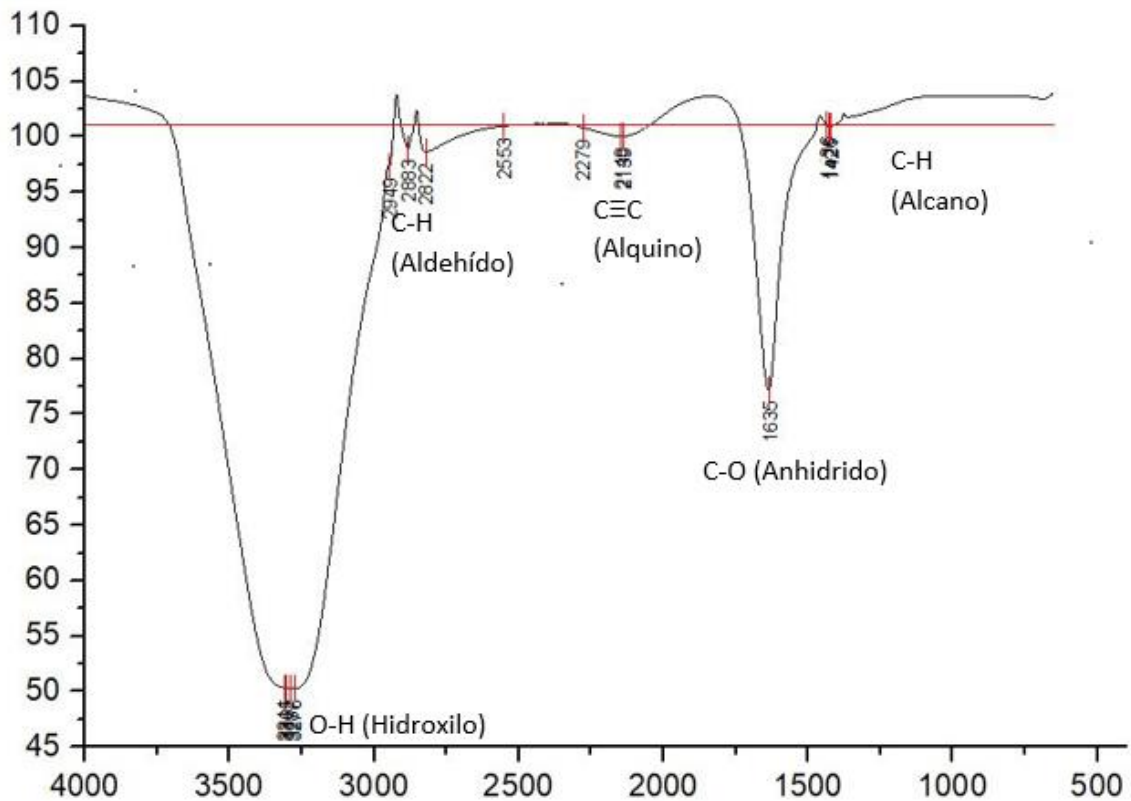
Anexo 1 Espectros de Infra Rojo (IR) de la muestra de agua con lixiviados de la semana 1, muestra sustancias químicas de la familia de los aldehídos y alquinos.



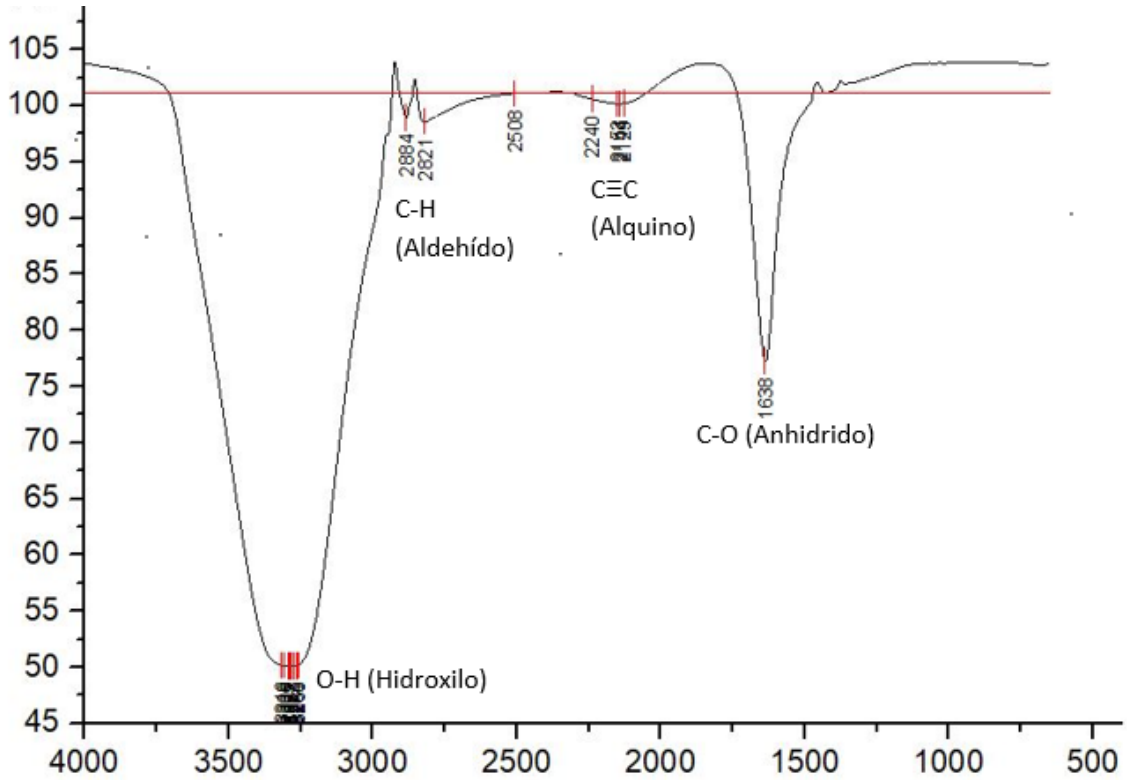
Anexo 2 Espectros de Infra Rojo (IR) de la muestra de agua con lixiviados de la semana 2, se aprecian sustancias químicas de la familia de los aldehídos y alquinos, así como alcanos.



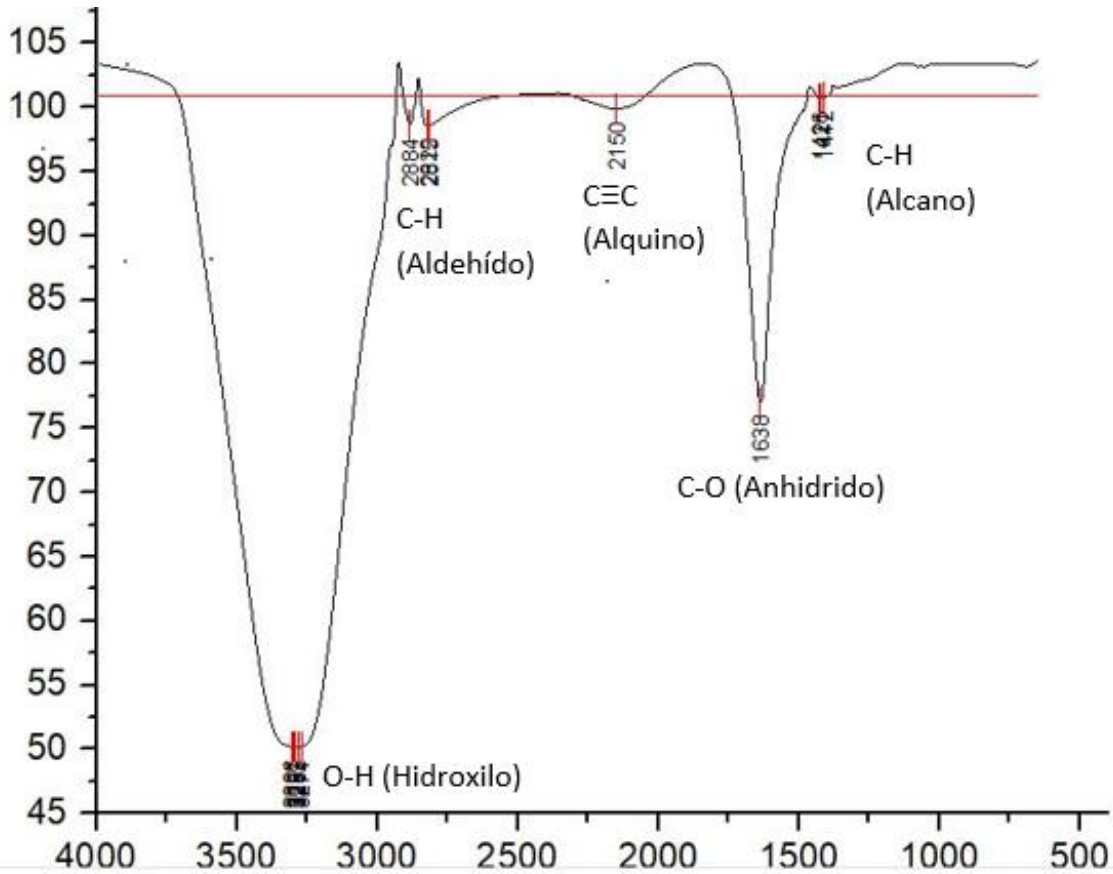
Anexo 3 Espectros de Infra Rojo (IR) de la muestra de agua con lixiviados de la semana 3, se aprecian sustancias químicas de la familia de los aldehídos y alquinos, así como alcanos.



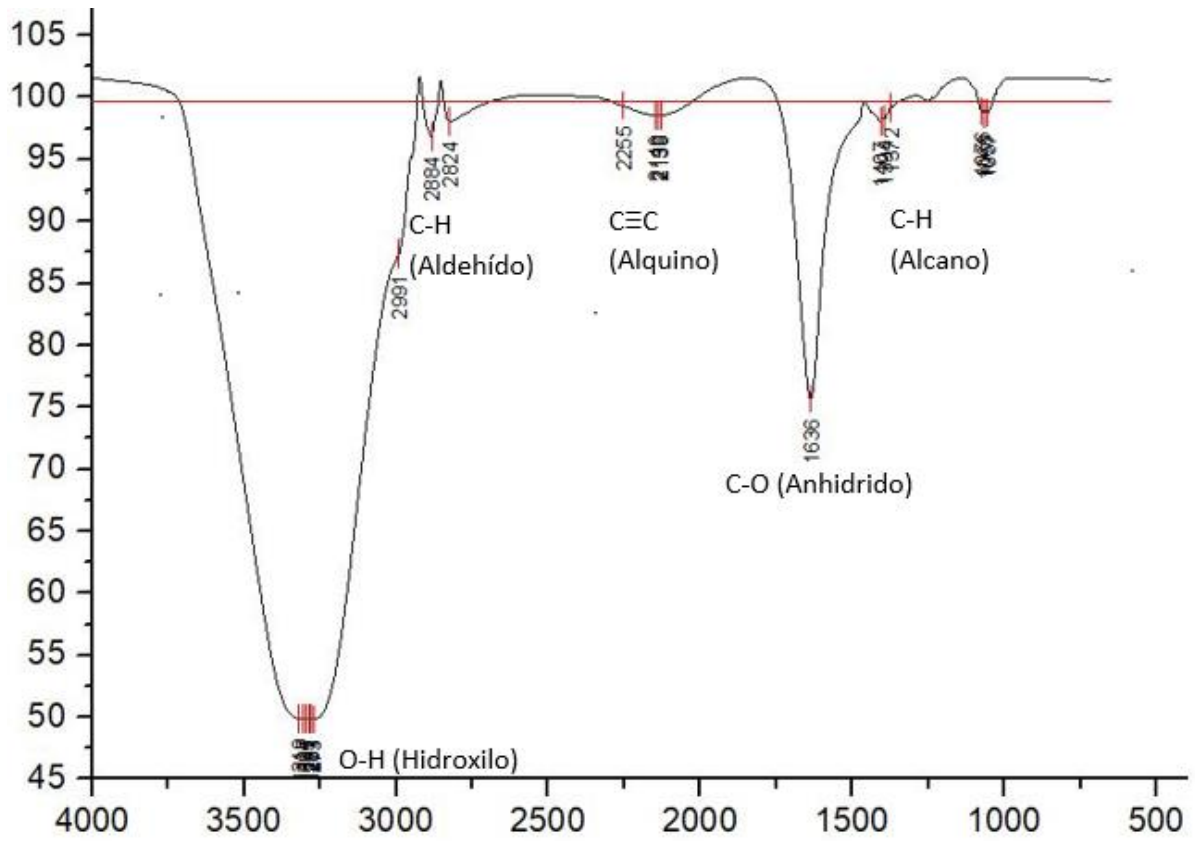
Anexo 4 Espectros de Infra Rojo (IR) de la muestra de agua con lixiviados de la semana 4, se aprecian sustancias químicas de la familia de los aldehídos y alquinos, así como alcanos.



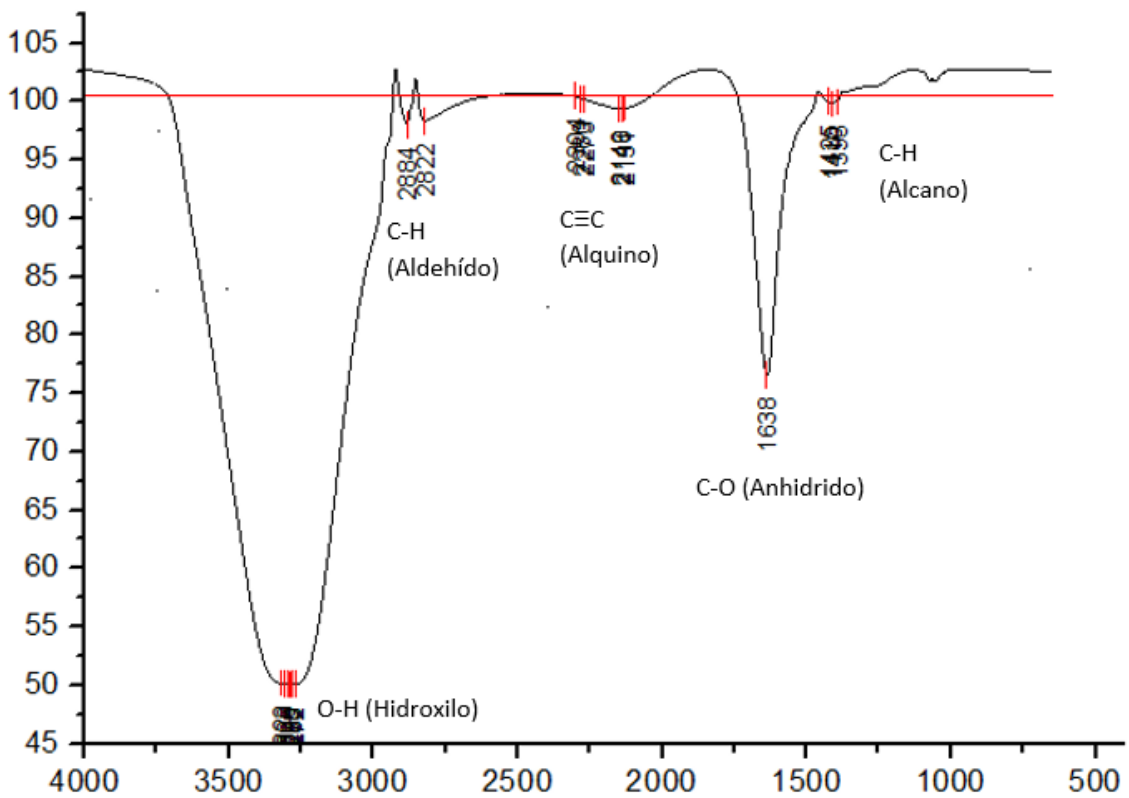
Anexo 5 Espectros de Infra Rojo (IR) de la muestra de agua con lixiviados de la semana 5, se aprecian sustancias químicas de la familia de los aldehídos y alquinos.



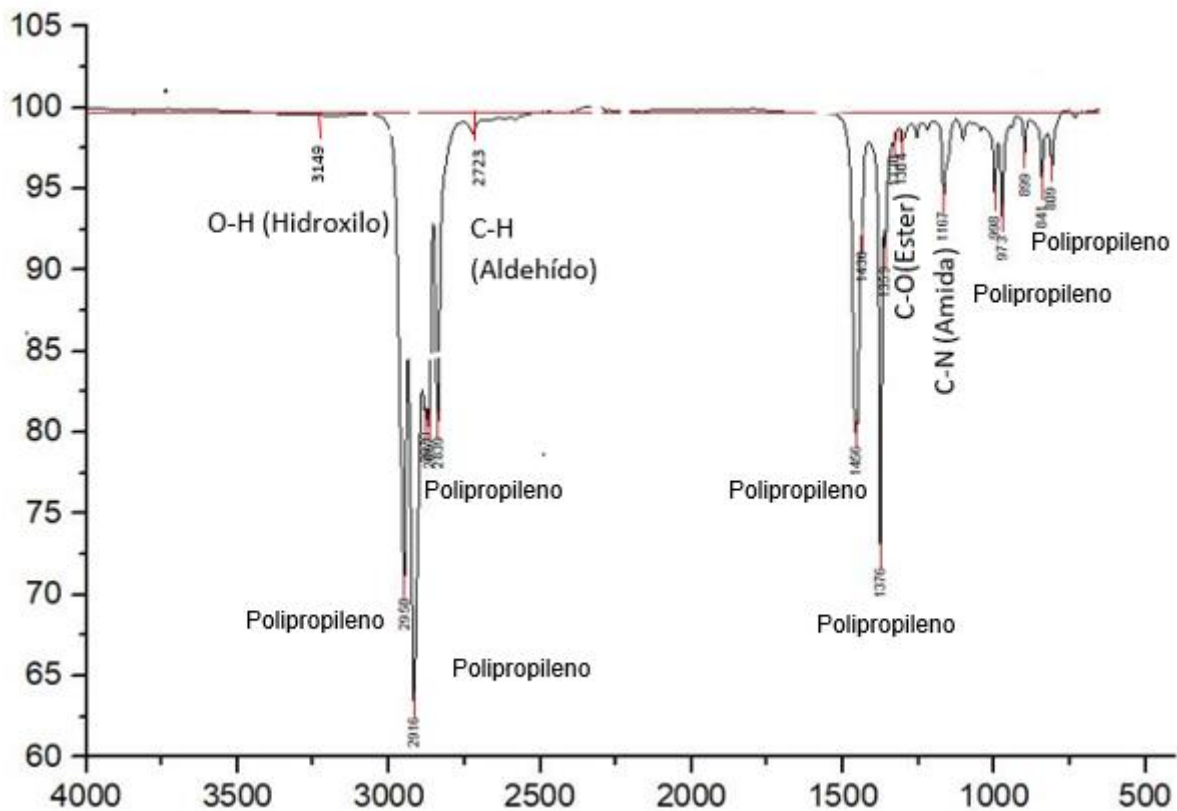
Anexo 6 Espectros de Infra Rojo (IR) de la muestra de agua con lixiviados de la semana 6, se aprecian sustancias químicas de la familia de los aldehídos y alquinos, así como alcanos.



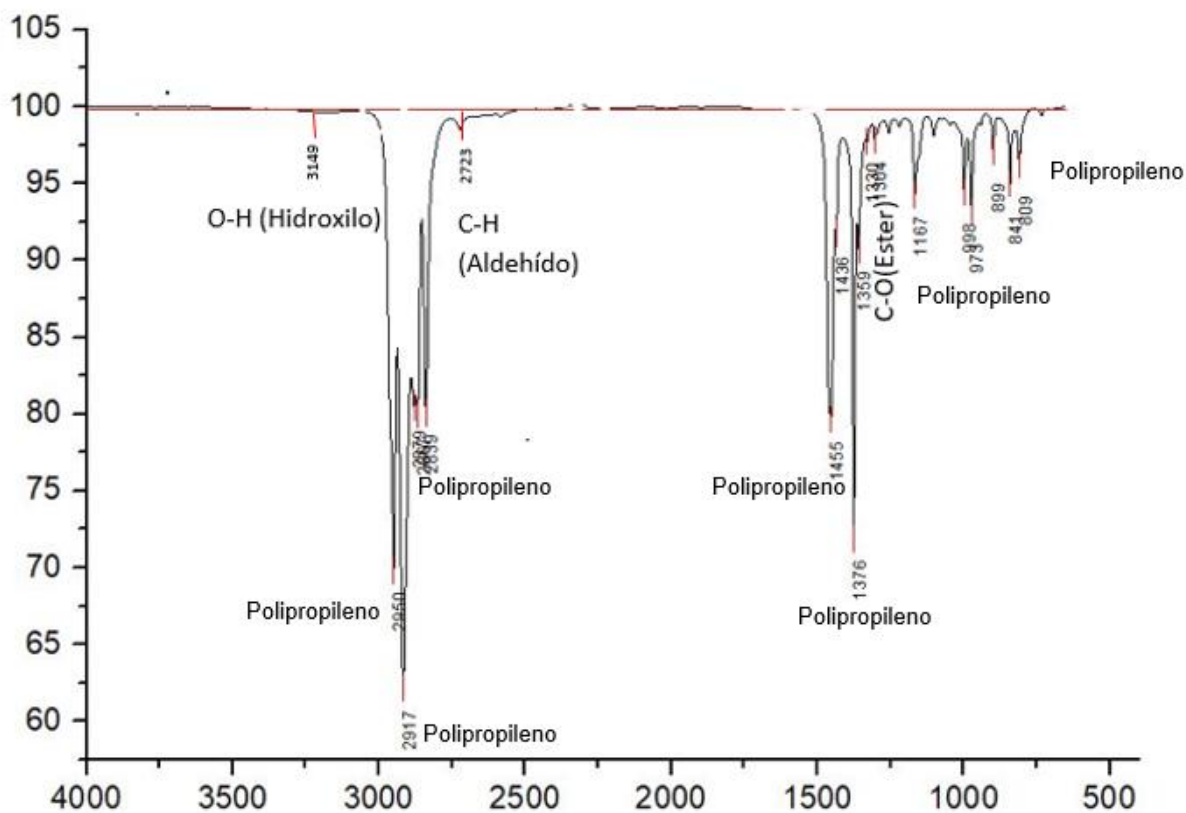
Anexo 7 Espectros de Infra Rojo (IR) de la muestra de agua con lixiviados de la semana 7, se aprecian sustancias químicas de la familia de los aldehídos y alquinos, así como alcanos.



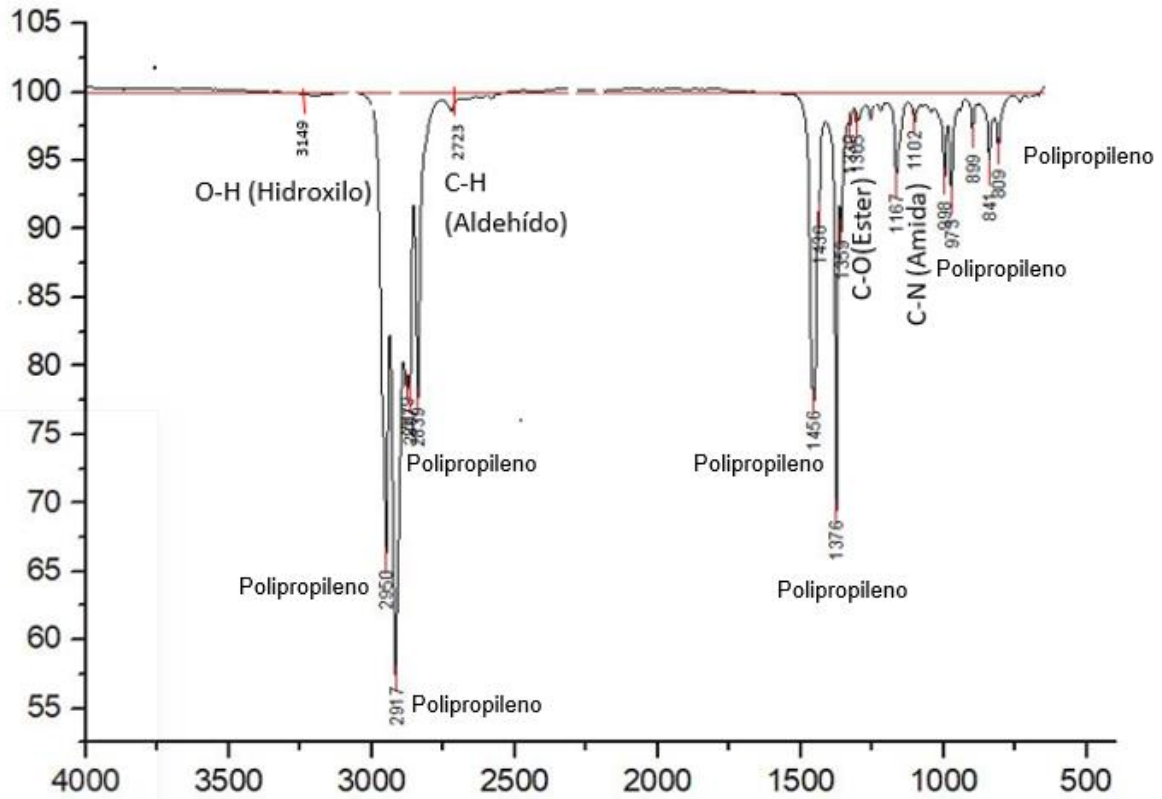
Anexo 8 Espectros de Infra Rojo (IR) de la muestra de agua con lixiviados de la semana 8, se aprecian sustancias químicas de la familia de los aldehídos y alquinos, así como alcanos.



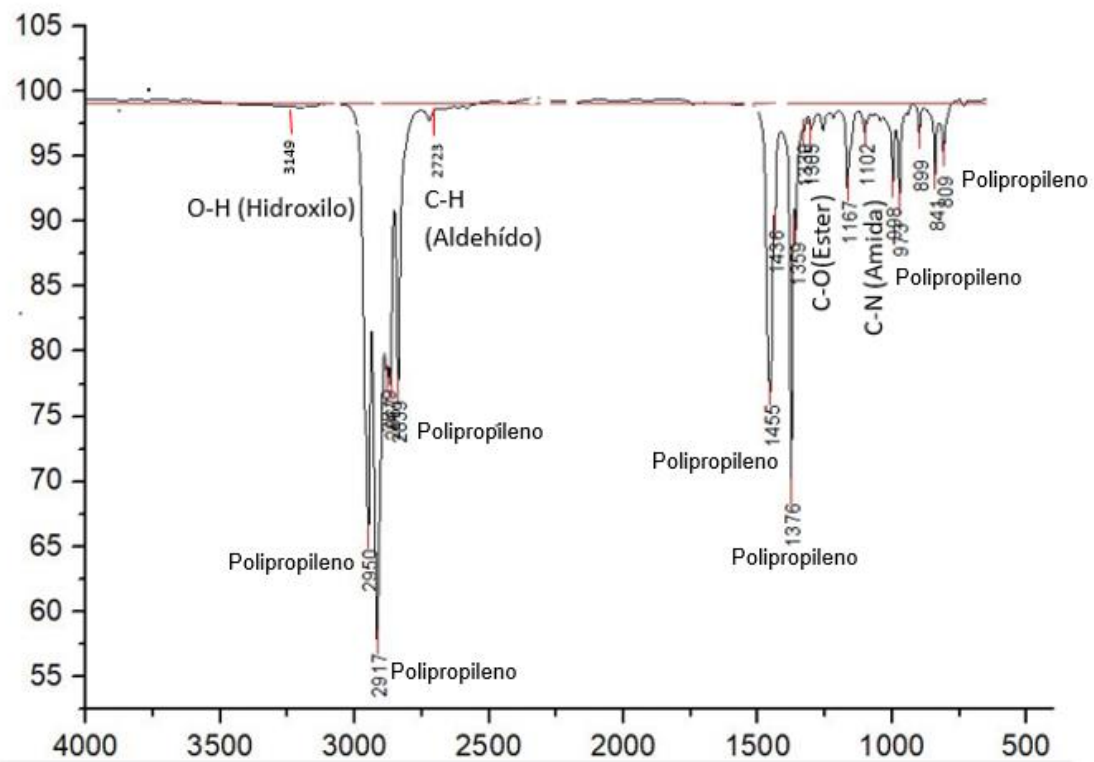
Anexo 9 Espectros de Infra Rojo (IR) de la muestra de polipropileno de la semana 1, se aprecian sustancias químicas de la familia de los hidroxilos, aldehídos, ester y amida.



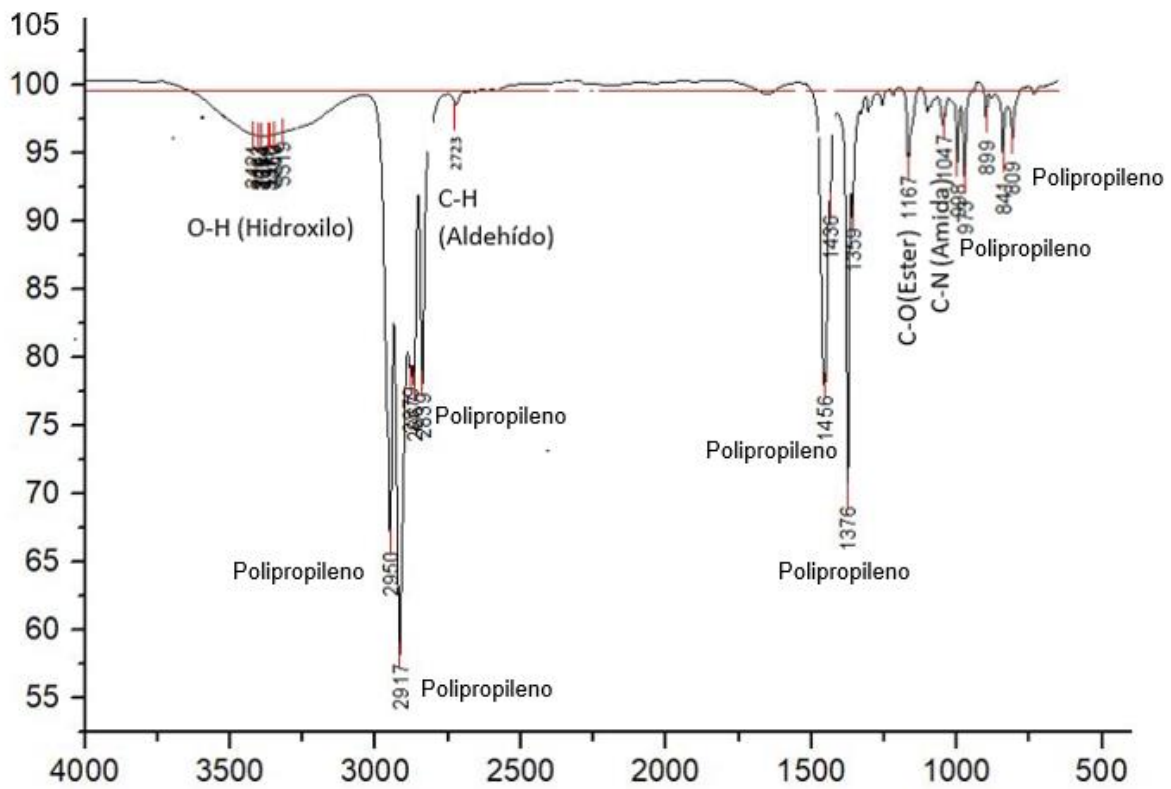
Anexo 10 Espectros de Infra Rojo (IR) de la muestra de polipropileno de la semana 2, se aprecian sustancias químicas de la familia de los hidroxilos, aldehídos y ester.



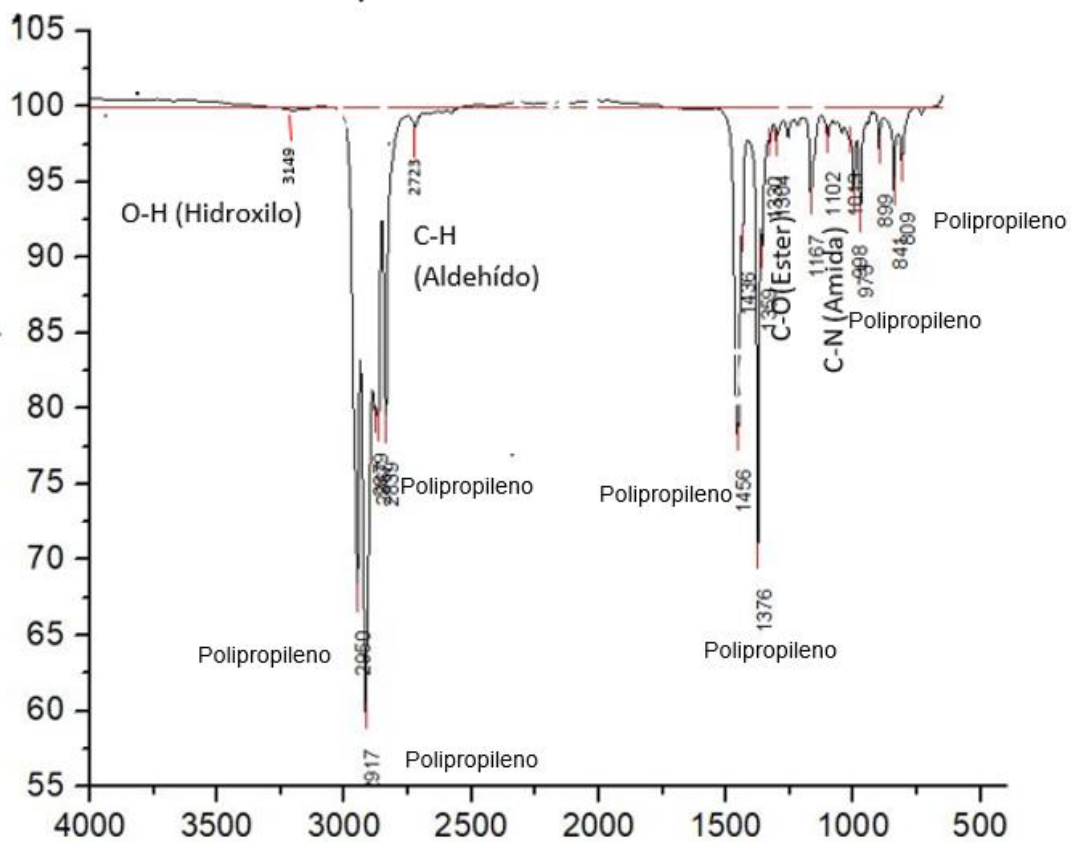
Anexo 11 Espectros de Infra Rojo (IR) de la muestra de polipropileno de la semana 3, se aprecian sustancias químicas de la familia de los hidroxilos, aldehídos, ester y amida.



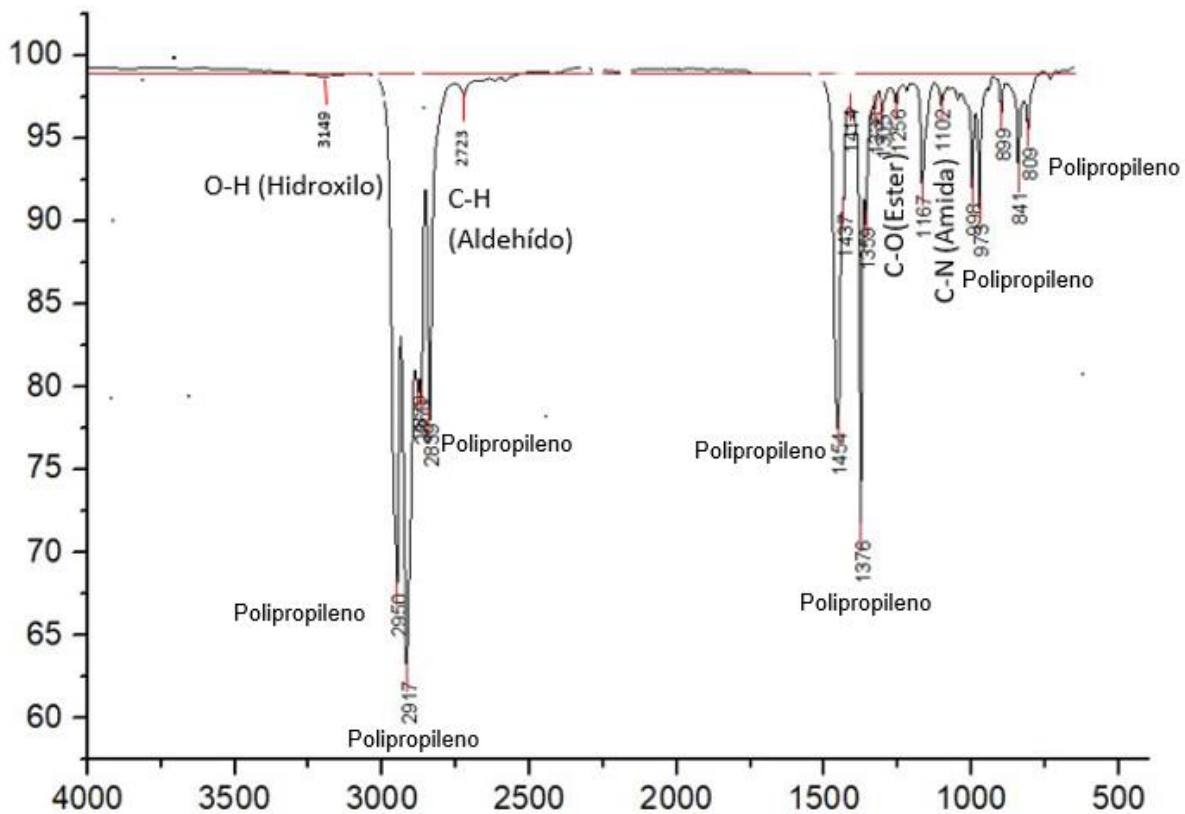
Anexo 12 Espectros de Infra Rojo (IR) de la muestra de polipropileno de la semana 4, se aprecian sustancias químicas de la familia de los hidroxilos, aldehídos, ester y amida.



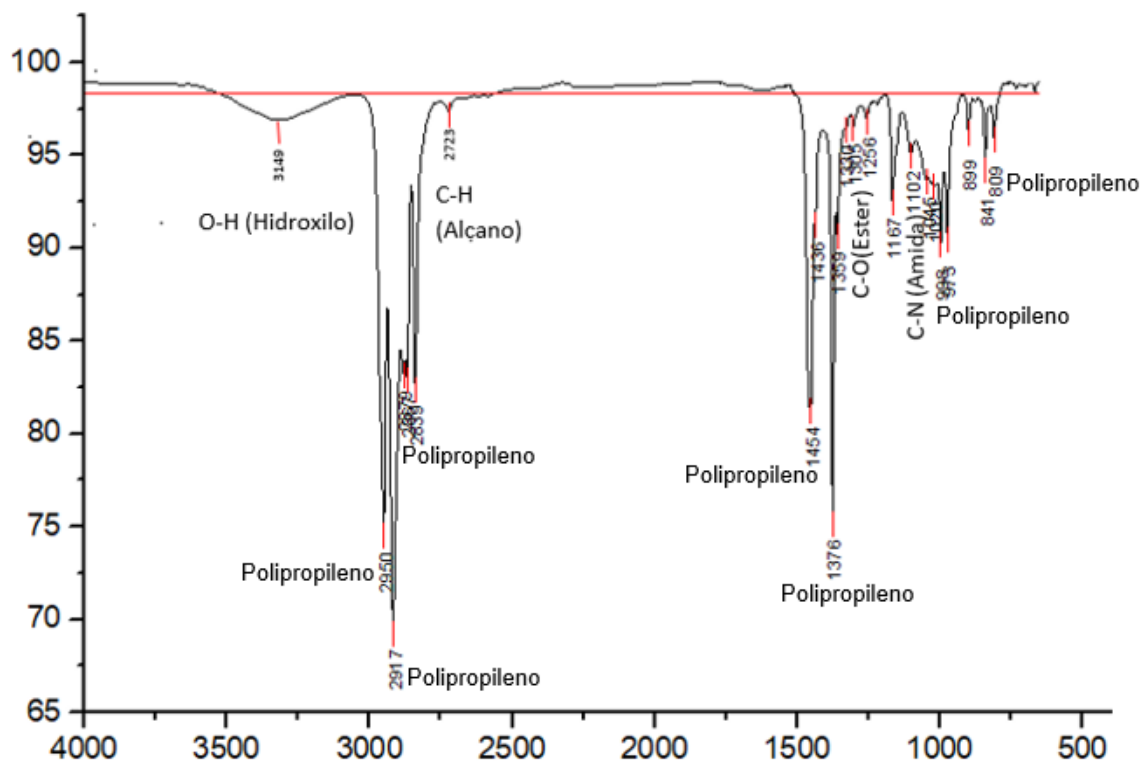
Anexo 13 Espectros de Infra Rojo (IR) de la muestra de polipropileno de la semana 5, se aprecian sustancias químicas de la familia de los hidroxilos, aldehídos, ester y amida.



Anexo 14 Espectros de Infra Rojo (IR) de la muestra de polipropileno de la semana 6, se aprecian sustancias químicas de la familia de los hidroxilos, aldehídos, ester y amida.



Anexo 15 Espectros de Infra Rojo (IR) de la muestra de polipropileno de la semana 7, se aprecian sustancias químicas de la familia de los hidroxilos, aldehídos, ester y amida.



Anexo 16 Espectros de Infra Rojo (IR) de la muestra de polipropileno de la semana 8, se aprecian sustancias químicas de la familia de los hidroxilos, aldehídos, ester y amida.

**EL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA
DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO OTORGA LA PRESENTE**

CONSTANCIA

A

Monica Sastre Muñoz

por su asistencia a las

***“4tas Jornadas de
Reproducción”***

Del 12 al 14 de octubre
de 2020, Con un total de
30 horas

Cuernavaca, Morelos a 15 de octubre de 2020

POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU


Dra. Ma. Del Carmen Beltrán Núñez
Zamora

Comité Organizador


Dr. Julio César Chávez

Comité Organizador