



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Departamento de Farmacología, Toxicología y Medicina Legal y Forense

Tesis doctoral

**CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES DEL BISFENOL A SOBRE EL  
TENDÓN Y LOS EFECTOS DE RECUPERACIÓN MEDIANTE LA APLICACIÓN DE  
PLAQUETAS (PRP) Y MONOCITOS MEDULARES**

***(CONTRIBUTION TO THE STUDY OF THE ALTERATIONS OF BISPHENOL TO THE TENDON AND  
THE EFFECTS OF RECOVERY THROUGH THE APPLICATION OF PLATELETS (PRP) AND  
MEDULAR MONOCYTES)***

Cristina Bellido Moyano

Programa de Doctorado de Biociencias y Ciencias Agroalimentarias

Córdoba, 2018

TITULO: *CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES DEL  
BISFENOL A SOBRE EL TENDÓN Y LOS EFECTOS DE  
RECUPERACIÓN MEDIANTE LA APLICACIÓN DE PLAQUETAS  
(PRP) Y MONOCITOS MEDULARES*

AUTOR: *Cristina Bellido Moyano*

---

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

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>  
[ucopress@uco.es](mailto:ucopress@uco.es)

---



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Departamento de Farmacología, Toxicología y Medicina Legal y Forense

Tesis doctoral

**CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES DEL BISFENOL A SOBRE EL  
TENDÓN Y LOS EFECTOS DE RECUPERACIÓN MEDIANTE LA APLICACIÓN DE  
PLAQUETAS (PRP) Y MONOCITOS MEDULARES**

Memoria presentada por la Lda. Cristina Bellido Moyano para optar al grado de Doctor en  
Medicina

Directora: Dra. Dña. M. Rosario Moyano  
Salvago. Catedrática del área de  
Toxicología

Directora: Dra. Dña. Ana M<sup>a</sup> Molina López.  
Contratada Doctora del área de Toxicología

V<sup>o</sup>B<sup>o</sup>: M. Rosario Moyano Salvago

V<sup>o</sup>B<sup>o</sup>: Ana M<sup>a</sup> Molina López

Fdo.: Cristina Bellido Moyano





## **TÍTULO DE LA TESIS: CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES DEL BISFENOL A SOBRE EL TENDÓN Y LOS EFECTOS DE RECUPERACIÓN MEDIANTE LA APLICACIÓN DE PLAQUETAS (PRP) Y MONOCITOS MEDULARES**

**DOCTORANDO:** Cristina Bellido Moyano

### **INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS**

En primer lugar la doctoranda, dentro de su especialidad, desarrolló los objetivos del trabajo, que consistieron en no sólo conocer la evolución de los tenocitos, sino también su incorporación de las fibras de colágeno, y la recuperación del tendón afectados por la acción del BPA mediante la aplicación de con tratamientos de plaquetas. Se utilizó como modelo cerdos *Minipig* procedentes del Servicio de Animales de Experimentación de la Universidad de Córdoba un grupo de experimentación, donde se llevó a cabo el estudio.

Se han utilizado numerosas técnicas experimentales tanto el microscopio óptico como electrónico, y técnicas inmunoenzimáticas en el Dpto. de Anatomía y Anatomía Comparadas, en el Dpto. Farmacología, Toxicología y Medicina Legal y Forense, en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) y las modificaciones encontradas fueron cuantificadas con los correspondientes programas estadísticos.

Se destaca que con las conclusiones obtenidas han quedado cubiertas las expectativas expuestas en los objetivos.

La publicación relacionada con dicha tesis está recogida en el Journal of the Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, Veterinaski Archiv (carta de aceptación) y se denomina: Histopathological study of the Achilles tendon after exposure to Bisphenol-A and its subsequent treatment with platelet growth factors. by Cristina Bellido\*, Carlos Abellán\*, Ana Molina, Alfonso Blanco, Rosario Moyano. ISSN 0372-5480

Tanto el trabajo experimental, como el de laboratorio los realizó el doctorando personalmente, y fueron supervisados conforme se llevaban a cabo.

Consideramos que el trabajo contiene todos los elementos de una investigación, con una metodología clara y se obtuvieron unos resultados muy aceptables.

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

Córdoba, 15 de diciembre de 2017

Firma de los directores



Fdo.: M. Rosario Moyano Salvago



Fdo.: Ana Mª Molina López

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







**A mi abuelo Tomás**



## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero mostrar mi más sentido agradecimiento al Departamento de Farmacología, Toxicología y Medicina Legal y Forense de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba, en especial a la Dra. Dña. Rosario Moyano Salvago y Dra. Dña. Ana Molina López, directoras de esta tesis doctoral, ya que sin su orientación y apoyo esta tesis no hubiera sido posible.

Me gustaría resaltar la labor de Dr. D. Alfonso Blanco Rodríguez por la forma tan entusiasta de transmitir sus conocimientos y la capacidad de interpretar todo lo que se puede ver a través de un microscopio extrapolándolo a cada área científica. Es un ejemplo a seguir ya que hace de su trabajo su forma de vida, y lo más importante, la pasión con lo que lo hace y ver como disfruta con ello.

A todo el personal del Servicio de Animales de Experimentación (SAEX), al personal del Dpto. de Farmacología, Toxicología y Medicina Legal y Forense, por su inestimable ayuda y orientación durante toda la fase experimental de esta Tesis.

Por otro lado agradecer a mi familia en general por su apoyo, y más concretamente a mis padres, Gabriel y Rosario, por ser ese impulso constante, que me ha ido

manteniendo desde pequeña, a ellos les debo todo lo que soy hoy en día. Como siempre me han dicho, “esto es una carrera de fondo”, y esta tesis es una de las metas más importantes. Y a Carlos, por estar a mi lado, por su apoyo y estímulo.

Muchas gracias a todos.

# Índice



# Índice

1. Introducción .....	1
2. Objetivos .....	11
3. Revisión bibliográfica .....	15
3.1. Bisfenol A .....	22
3.1.1. Usos .....	24
3.1.2. Migración a los alimentos .....	25
3.1.3. Exposición .....	28
3.1.4. Liberación al medioambiente .....	33
3.1.5. Metabolismo .....	34
3.1.6. Bioacumulación y biomagnificación.....	37
3.1.7. Efectos sobre la salud humana .....	38
3.1.8. Biomonitorización .....	43
3.1.9. Legislación .....	46
3.2. El tendón de Aquiles. Tendinopatías. Tratamientos. ....	48
3.3. El uso de plasma ricos en plaquetas y monocitos medulares ....	61
3.3.1. Procedimientos .....	66
3.3.2. Uso de Factores de crecimiento .....	67
4. Material y métodos .....	77
4.1. Animales utilizados .....	79
4.2. Protocolo y diseño experimental .....	81
4.3. Toma de muestras .....	82
4.4. Preparación de RPR .....	83
4.5. Estudio histopatológico estructural y ultraestructural .....	86
4.5.1. Microscopio óptico .....	86
4.5.2. Microscopio electrónico de transmisión (MET) .....	88
4.6. Inmunohistoquímica .....	92
4.7. Estudio morfométrico .....	95

4.8. Microfotografiado .....	95
4.9. Análisis estadístico .....	97
5. Resultados .....	99
5.1. Grupo control. ....	101
5.2. Grupo tratado con BPA. ....	109
5.3. Grupo tratado con BPA y posterior retirada. ....	116
5.4. Grupo tratado con PRP. ....	122
6. Discusión .....	129
7. Conclusiones .....	143
8. Resumen/ Summary.....	149
9. Bibliografía .....	153
Anexo .....	177





## 1. Introducción



## 1. Introducción

El Bisfenol A (BPA) es un compuesto, con actividad como disruptor endocrino, que es utilizado habitualmente como componente de plásticos y envases de alimentos. Cambios en el pH, abrasiones mecánicas y el calor pueden acelerar la hidrólisis del enlace éster que une las moléculas de BPA en el policarbonato plástico, pudiendo producir que se libere fácilmente llegando al alimento y/o ambiente. (Vandenberg et al., 2007; Mileva et al., 2014).

Existen distintas vías de exposición a los contaminantes que se encuentran en el medio ambiente siendo la vía inhalatoria y la ingesta alimentaria dos de las más estudiadas (Zhuang et al., 2016; Kan et al., 2017; Leysens et al., 2017; Lyu et al.,

2017; Xue et al., 2017). Parte de estos compuestos que participan activamente en la contaminación ambiental pueden actuar como disruptores endocrinos sobre los organismos vivos.

La importancia del BPA como contaminante medioambiental y el riesgo que conlleva debido a su baja tasa de biodegradación y su bioacumulación en la cadena trófica han llevado al Parlamento Europeo a incluirlo como una sustancia cuya toxicidad debería evaluarse.

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

La utilización del BPA en envases en contacto con los alimentos está permitida en el resto de la Unión Europea mediante el Reglamento Europeo (UE) 10/2011 de la Comisión de 14 de enero, relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a

entrar en contacto con los productos alimenticios, en el cual se establece un límite máximo de migración para esta sustancia de 0,6 mg/kg. El valor de la Ingesta Diaria Tolerable (IDT) del BPA ha sido modificado en el último informe realizado por la EFSA en el 2015, y ha pasado de 50 µg/kg pc/día a 4 µg/kg pc/día (EFSA, 2015). En referencia al análisis de la exposición del BPA realizado por la EFSA, éste concluye que la exposición dietética no supera el valor de IDT para ningún grupo de edad, ya que los niveles calculados se encuentran 34 veces por debajo del valor de IDT. Pero, por otro lado, también se hace referencia y se apunta a que la evaluación de incertidumbre y debe ser estudiada (EFSA, 2015). La IDT se ha hecho temporal para dar cuenta de la incertidumbre sobre los posibles efectos del BPA en la glándula mamaria, sistema reproductivo, neurológico, sistemas inmunológicos y metabólicos en animales de laboratorio.

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

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

## Introducción

---

que contengan BPA como tóxico para la reproducción, categoría 1B para el 1 de marzo de 2018.

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

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

Por otra parte, en abril del 2008 el Programa Nacional de Toxicología de los EEUU publicó un informe preliminar sobre el BPA en el que consideró prudente aumentar el margen de seguridad y establecer nuevos estudios sobre la evaluación del riesgo. La EFSA revisará su IDT después de evaluar todas las evidencias científicas-toxicológicas publicadas desde el 2012, y se estima que comience en 2017, cuando un estudio de dos años llevado a cabo por el Programa Nacional de Toxicología de Estados Unidos esté disponible.

El término disruptor endocrino, puede definirse como todo agente exógeno (químico o físico) capaz de inducir efectos adversos para la salud de un organismo intacto o su descendencia, como consecuencia de cambios en la función endocrina. (Diamanti-Kandarakis et al., 2009; Yeung et al., 2011). Para ello el perturbador hormonal interfiere con la síntesis, secreción, transporte, unión, o metabolismo de las

hormonas, que el organismo sintetiza fisiológicamente, y que son responsables del mantenimiento de la homeostasis y de la regulación de la reproducción, del desarrollo, y/o del comportamiento. Incluye a cualquier agente que induzca alteraciones sobre cualquier aspecto de la actividad y desarrollo del sistema endocrinológico.

Bajo este término se engloba un gran número de compuestos químicos (plaguicidas, metales pesados, polímeros sintéticos y plásticos, derivados industriales) y de agentes físicos, como son las radiaciones de baja frecuencia, por tanto, el catálogo de perturbadores endocrinos es muy amplio, comprendiendo desde sustancias que se encuentran de forma natural en el medio ambiente y/o en los alimentos, hasta productos químicos, resultado de la acción antropogénica (Olea-Serrano, 2006).

La actividad del BPA como disruptor neuroendocrino ha sido muy estudiada por diversos grupos de investigación en distintas especies (Mandich et al., 2007; Rodríguez et al., 2010; López-Casas et al., 2012; Molina et al., 2013; Lora et al., 2016), siendo fundamentalmente su interferencia en la reproducción la más ampliamente evaluada. Además de su acción deletérea a nivel gonadal se ha observado que puede tener, entre otros efectos, acción sobre la diabetes tipo 2, obesidad, función hepática, alteraciones cardiovasculares, estrés oxidativo e inflamación e incluso a nivel del sistema musculotendinoso (Vandenberg et al., 2013; Rochester, 2013; Giménez et al., 2016).

En los últimos años ha sido muy estudiado en proceso de recuperación de los tendones lesionados por traumatismo y cortes a los que se les ha aplicado factores de crecimiento, en cambio, apenas se han evaluado tratamientos paliativos de degeneraciones tendinosas con factores de crecimiento, tal y como existen en músculos (Cunha et al., 2014; Giménez et al., 2016). Cuando se producen procesos degenerativos en los tendones, suelen ir acompañados con fenómenos inflamatorios, por lo que pueden convivir conjuntamente las fibras de colágeno tipo I, propia de los tendones, y las fibras de colágeno tipo III que se produce en las inflamaciones. Esta mezcla resulta nociva ya que el colágeno tipo I se distribuye de forma longitudinal al eje de contracción y con unas ondulaciones que favorecen al estiramiento, en tanto que el colágeno tipo III tiene una disposición irregular en todos los sentidos del espacio.

El tratamiento con Plasma Rico en Plaquetas, PRP, y de monocitos medulares se ha extendido recientemente en diferentes especialidades médicas en todo el mundo, aunque se describió hace más de veinte años en cirugía maxilofacial y odontología. Consiste en la aplicación de plasma autólogo con una concentración suprafisiológica de las plaquetas, que son activadas para que liberen los factores de crecimiento y sustancias activas de sus gránulos  $\alpha$ . El objetivo de esta terapia es favorecer, estimular o iniciar el proceso de cicatrización, regeneración o curación del tejido dañado, aplicándose localmente de forma ambulatoria o bien como complemento a una técnica quirúrgica. En medicina y traumatología deportiva, donde

siempre se buscan los tratamientos más novedosos, se ha acogido con gran esperanza para el tratamiento de múltiples patologías. Es un tratamiento que ha recibido además gran atención por los medios de comunicación, creando expectativas sobredimensionadas en los pacientes que no siempre se corresponden con la realidad. Es un tema controvertido en la comunidad médica debido a que ha habido una amplia implantación de su uso clínico en diferentes especialidades a pesar de que no hay demasiados estudios de laboratorio previos, y son escasos los estudios clínicos con alto nivel de evidencia científica que demuestren su eficacia. Existen opiniones de expertos a favor y en contra del uso de esta terapia. La ausencia de regulación por ninguna normativa y la falta de estandarización del proceso es un hándicap en la investigación y comparación de resultados. No es un tratamiento incluido como tal en la lista de sustancias y métodos prohibidos en el deporte de la Agencia Mundial Antidopaje.

Los factores de crecimiento plaquetario, actúan con el propósito de estimular la regeneración de los tejidos dañados. Esta acción la realizan mediante tres mecanismos diferentes:

1. Estimulando la multiplicación de las células sanas que rodean a la lesión.
2. Aumentando el riego sanguíneo a la zona al estimular la formación de nuevos vasos.

3. Activando a las células madre que hay en la zona para que se diferencien y convirtiéndose así en células del tipo de las del tejido dañado.

Este es un mecanismo progresivo que va consiguiendo poco a poco que las lesiones sanen, y lo que es lo más importante, sin que quede tejido cicatricial y sustituyendo la lesión por tejido sano normal.

## 2. Objetivos



## 2. Objetivos

Debido al riesgo de exposición a través de la dieta, nos planteamos como **objetivo general** del estudio evaluar los posibles efectos del BPA sobre el tendón Aquiles, empleando como modelo experimental el *minipig*, y utilizando la histopatología e inmunohistoquímica como herramienta fundamental para investigarlo. Además de evaluar su capacidad de recuperación después de la retirada de la exposición a este compuesto, comprobando su posible reversión de las lesiones. Y por último, la efectividad de los tratamientos con PRP y monocitos medulares en los procesos degenerativos en el tendón de aquellos animales previamente expuestos a BPA.

Para ello nos planteamos como **objetivos específicos**:

1. Evaluar las modificaciones que se producen tanto en los tenocitos y fibras de colágeno, de los tendones debido a la acción del BPA.
2. Realizar el estudio histopatológico estructural y ultraestructural en los tendones alterados y posteriormente tratados con factores de crecimiento (PRP) y monocitos medulares.
3. Comprobar la eficacia de tratamientos con factores de crecimiento, en la recuperación tendinosa.
4. Relacionar la recuperación funcional de los tendones y su relación de la histopatología estructural y ultraestructural en los tendones tratados con BPA y recuperados con factores de crecimiento de las plaquetas.

Este estudio se realizarán mediante técnicas microscópicas, ultramicroscópicas, inmunohistoquímicas y morfométricas.

Este trabajo de Proyecto surgió como un planteamiento interdisciplinar, entre los Departamentos de Toxicología y de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, siendo una de sus líneas de investigación principal el estudio de los disruptores endocrinos, como contaminante alimentario y medioambiental.

### 3. Revisión bibliográfica



### 3. Revisión bibliográfica

En las últimas décadas, el empleo de productos agrícolas, fármacos y plásticos ha ido aumentando junto con la fabricación de productos químicos como herbicidas, insecticidas, biocidas o incluso drogas. El uso de este tipo de sustancias conlleva una contaminación del medio ambiente, y un posible daño en la salud humana y de los animales de vida silvestre, expuestos frecuentemente a través de la cadena alimentaria (Marococcia et al., 2017). Como posible efecto adverso se encuentra la interferencia en el sistema endocrino, que podría tener graves consecuencias sobre la salud difíciles de predecir normalmente. Esto ha provocado un aumento de la preocupación de la comunidad científica y ha generado un debate público en torno a

de los efectos potenciales que estas sustancias pueden tener sobre la vida humana y silvestre. Esta preocupación se debe en primer lugar a los efectos adversos observados en animales de vida libre como pueden ser ciertas aves, peces e incluso los ecosistemas. Un ejemplo de ello son los efectos producidos por compuestos como los insecticidas organoclorados y su relación con la disminución de la población de las aves rapaces, muchas de ellas actualmente en peligro de extinción, se ha demostrado que actúan interfiriendo en los niveles de estrógenos lo que provocaría la disminución de la deposición de calcio en la cáscara de los huevos y, por tanto, una disminución en la tasa de huevos viables. Por otro lado, el aumento de la incidencia de diversas enfermedades endocrinas de elevado índice epidemiológico en humanos, unido a los resultados de estudios laboratoriales de ciertas sustancias de actividad endocrina sobre animales de experimentación, han hecho que adquiera un elevado interés el estudio de compuestos que puedan actuar interfiriendo con el sistema endocrino (Kabir et al., 2015).

Las sustancias que tienen esta capacidad son denominadas disruptores endocrinos cuya definición aceptada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) es la de “sustancias o mezcla de sustancias exógenas que alteran una o varias funciones del sistema endocrino y en consecuencia causan efectos adversos en el organismo, o su descendencia, o (sub)poblaciones”. También pueden ser definidas como “sustancias exógenas al organismo que se encuentran en el medio ambiente, en los alimentos y en los productos destinados a los consumidores, que interfieren con la

biosíntesis de hormonas, el metabolismo y en las acciones resultantes de estas, provocando una alteración en la homeostasis normal del individuo expuesto o en la de sus descendientes” (Diamanti –Kandarakis et al., 2009).

De esta forma, las definiciones tienden a centrarse en el modo de acción de las sustancias e implican que la interferencia que ejercen se convierte en un riesgo según el nivel de exposición. De hecho, los potenciales efectos de los disruptores en la síntesis, secreción y acción hormonal pueden perjudicar a la homeostasis celular y tisular. Este hecho hace que la etapa del desarrollo del individuo durante la que está expuesto a este compuesto de actividad hormonal se considere de riesgo por los graves efectos que puedan desarrollarse en un futuro (Zoeller et al., 2012).

Los disruptores endocrinos incluyen un grupo muy heterogéneo de xenobióticos como productos químicos sintéticos usados como solventes industriales y sus subproductos (dioxinas), plastificantes (bisfenol A), aditivos alimentarios (semicarbacida), productos agrícolas como plaguicidas (insecticidas, herbicidas, fungicidas...), cosméticos (parabenos) y sustancias farmacológicas (anticonceptivos orales, entre otros). La principal vía de exposición es la oral, es decir, a través de la dieta tanto para las personas como para los animales, aunque también hay otras vías de exposición por las que los individuos pueden estar expuestos como puede ser el aire, el agua y suelo, productos de cuidado personal o incluso fármacos (Endocrine Society, 2009).

En estudios más recientes se han encontrado muchas evidencias de la capacidad estrogénica de bioactivos vegetales, como son la genisteína, quecetina, naringenina o reveratrol, los cuales pertenecen a grupos tan amplios como los lignanos, polifenoles o coumestroles. Estas sustancias se denominan actualmente con el término de fitoestrógenos y han sido incluidas en la lista de disruptores endocrinos (Marococcia et al., 2017).

Un aspecto de gran controversia que rodea a los disruptores es su dosis-respuesta. Esto se debe a que actúan mimetizando o antagonizando las acciones llevadas a cabo de manera fisiológica por las hormonas endógenas. Por lo tanto, las consideraciones sobre la dosis-respuesta de los disruptores deben ser diferentes a las de otros productos químicos que aparezcan como contaminantes ambientales, y que no actúen directamente sobre el sistema endocrino. Además, se tienen que tener en cuenta ciertos factores que van a influir en la dosis-respuesta como es el tipo de mecanismo sobre el que actúe una sustancia concreta y la propia sustancia, así como el momento de exposición. Éste último aspecto puede determinar qué tipo de efectos van a producirse sobre el organismo expuesto: neurológicos, inmunológicos, reproductivos, entre otros (OMS, 2002).

En cuanto a los efectos que producen, se han realizado múltiples estudios que muestran que estas sustancias han producido ciertos cambios en especies y poblaciones de vida salvaje, entre otras. Estos efectos pueden ser desde cambios

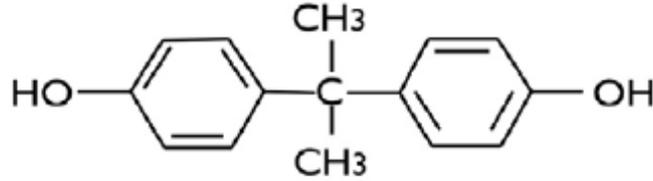
sutiles en el comportamiento fisiológico y sexual de las especies hasta alteraciones permanentes en la diferenciación sexual. Las especies acuáticas son de las más afectadas, pero no los únicos, ya que también se han encontrado especies terrestres dañadas (Mathieu-Denoncourt et al., 2016; Salgueiro-González et al., 2016). En los humanos, es difícil comparar e integrar los resultados de distintos estudios porque los datos a menudo son recogidos en distintos periodos de tiempo, usando diferentes condiciones de exposición. Un aspecto de gran preocupación es la falta de datos sobre la exposición durante periodos de exposición críticos, es decir, en neonatos y durante el embarazo que puede influir en la aparición de efectos en el individuo adulto. Aun así, existen numerosos estudios que demuestran los efectos de los disruptores sobre distintos sistemas orgánicos. Por ejemplo, se relacionan estas sustancias con la aparición de patologías como la endometriosis, el cáncer de mama, o la aparición de un desarrollo neuronal deficiente o pubertad precoz (OMS, 2002).

Debido a la importancia de la exposición inadvertida a este tipo de sustancias través de la dieta y/o contaminación ambiental, nos proponemos realizar una revisión bibliográfica de un compuesto con actividad como disruptor endocrino. En este trabajo hemos elegido el bisfenol A (BPA), debido a sus múltiples usos en la industria que hace que estemos diariamente expuestos a este compuesto, tanto por exposición alimenticia como por otro tipo de exposiciones. Para la realización de la presente revisión bibliográfica se han consultado diferentes fuentes, textos y documentos de

carácter científico utilizando distintos criterios de búsqueda. Se han consultado artículos científicos, bases de datos y documentos de carácter legislativo.

### **3.1. Bisfenol A**

El bisfenol A (4,4'-dihidroxi-2,2-difenilpropano) (Fig. 1) es una sustancia con actividad como disruptor endocrino que es ampliamente utilizado en el mundo. Esto se debe a sus múltiples usos en la industria como monómero o aditivo para la fabricación de plásticos policarbonados y resinas epoxi además de otros materiales poliméricos, se sintetiza por condensación de dos grupos fenol y una acetona. El BPA confiere propiedades como la rigidez, transparencia y resistencia, entre otras, características que lo han llevado a estar presente en objetos y recipientes alimentarios tan comunes en la vida cotidiana como las botellas, latas, platos, tazas, etc. Pero también tiene otros usos que no están relacionadas con la alimentación como pinturas, tintas de impresión o el PVC (EFSA, 2015). Además de todas estas aplicaciones, el BPA se encuentra frecuentemente presente como contaminante ambiental en ríos y agua de bebida, por lo que las personas y los animales estamos expuestos de forma cotidiana a esta sustancia.



**Figura 1.** Estructura química del bisfenol A

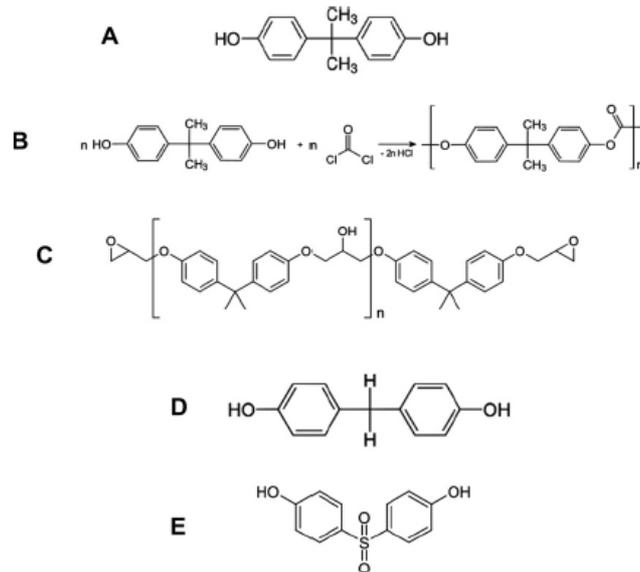
Aunque fue sintetizado por primera vez en 1891, no fue hasta 1930 cuando se comenzó a especular sobre sus posibles propiedades estrogénicas. El BPA presenta una estructura similar al estradiol, por lo que se une a los receptores estrogénicos actuando como un disruptor endocrino pudiendo afectar a la fertilidad de los individuos expuestos a él (Mileva et al., 2014). Además, hay diversos estudios que han indicado como grupos de riesgo a los niños y mujeres embarazadas (Braun et al., 2011; Giulivo et al., 2016). La exposición al BPA es casi universal: la mayoría de las personas presentan niveles cuantificables de este compuesto tanto en orina como en suero (Mileva et al., 2014). De hecho, en EEUU más del 90% de la población presenta niveles detectables de BPA en su orina (Calafat et al., 2008), lo que indica que la exposición en humana está muy generalizada. Actualmente, la ingesta estimada de BPA a través de la dieta según la FDA es de 0,2-0,5 µg/kg de peso vivo/día.

### 3.1.1. Usos

El BPA es utilizado desde 1940 como monómero en la fabricación de polímeros como los policarbonatos, resinas epoxi, polisulfona, o poliacrilato, como un antioxidante e inhibidor del fin de la polimerización en el policloruro de vinilo (PVC) y como un precursor para la síntesis del retardante de llama tetrabromobisphenol-A (Geens et al., 2011). Actualmente, el policarbonato se usa en materiales destinados a estar en contacto con los alimentos, por ejemplo, botellas de plástico reutilizables, platos o tazas, mientras que las resinas epoxi se utilizan para el recubrimiento interno de latas de conservas y bebidas (EFSA, 2006). Hay otros muchos usos para los policarbonatos, resinas epoxi, polisulfona y poliacrilato como gafas, materiales de construcción, CD-ROM, dispositivos médicos, materiales relacionados con la odontología, por lo que además de a través de la dieta estamos expuestos de forma cotidiana a este compuesto debido a sus múltiples usos (Geens et al., 2012).

Pueden obtenerse muchos análogos del bisfenol por condensación de una cetona o un aldehído con fenoles con sus variaciones en el derivado carbonilo o en los sustituyentes en el anillo aromático (Fig. 2). Sin embargo,

la mayoría de estos compuestos tienen un precio demasiado elevado para su aplicación industrial y la toxicidad no es tan conocida.



**Figura 2.** Estructura química de análogos del bisfenol. **A).** Estructura química del BPA; **B).** Síntesis del policarbonato desde BPA; **C).** Estructura química de la resina epoxi; **D).** Estructura química del bisfenol **E y F).** Estructura química del bisfenol S (Geens et al., 2012).

### 3.1.2. Migración a los alimentos

- **Migración desde policarbonatos**

Se han realizado diversos estudios para determinar la migración de BPA desde los materiales y, en el caso de los policarbonatos (PC), se ha concluido que se puede producir la migración desde los mismos durante la difusión e hidrólisis de los polímeros. Sin embargo, la difusión tiene una

menor relevancia. En el estudio realizado por Mercea et al. (2009), se observó que un descenso del pH en una solución se asociaba al aumento de la migración de BPA desde los policarbonatos al agua, mientras que la presencia de cationes en una solución (a temperatura ambiente) no afectaba de manera significativa a la hidrólisis. También se probó que la migración era más rápida en recipientes de policarbonato (como botellas de agua) que fueron agitadas durante unos años y se sometieron a temperaturas en aumento. Además, se descubrió que la tasa de migración hacia el contenido depende de las propiedades químicas del mismo. En una mezcla de etanol y agua, se produjo una migración más rápida en comparación con agua, mientras que en aceite de oliva (que no afecta a la hidrólisis del PC) la migración del BPA fue despreciable.

Otro estudio realizado por Nam et al. (2010) evaluó la tasa de migración de BPA desde biberones nuevos y usados de forma repetida. Se observó que el incremento de temperatura y el uso prolongado propiciaban la hidrólisis del polímero causando una mayor migración. También se observó migración desde botellas nuevas con una concentración de 0,03 y 0,13 $\mu\text{g} / \text{dm}^3$  a 40 y 95 $^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Tras 6 meses de uso, las concentraciones de BPA del agua aumentaron a 18 y 18,47  $\text{mg} / \text{dm}^3$  a 40 y 95  $^{\circ}$  respectivamente. Maia et al. (2011), mostró como los detergentes disueltos en agua afectaban a la migración de BPA en biberones,

retardando este efecto al lavar, cepillar o enjabonar los biberones de PC con agua con detergente.

Los resultados de estos estudios, entre otros, propiciaron que muchos países prohibieran el uso de materiales que contengan BPA para la fabricación de biberones. En el caso de España, esto se llevó a cabo con la modificación del Anexo II del Real Decreto 866 del 2008, mediante la Orden PRE/628/2011.

- **Migración del BPA desde el recubrimiento de las latas**

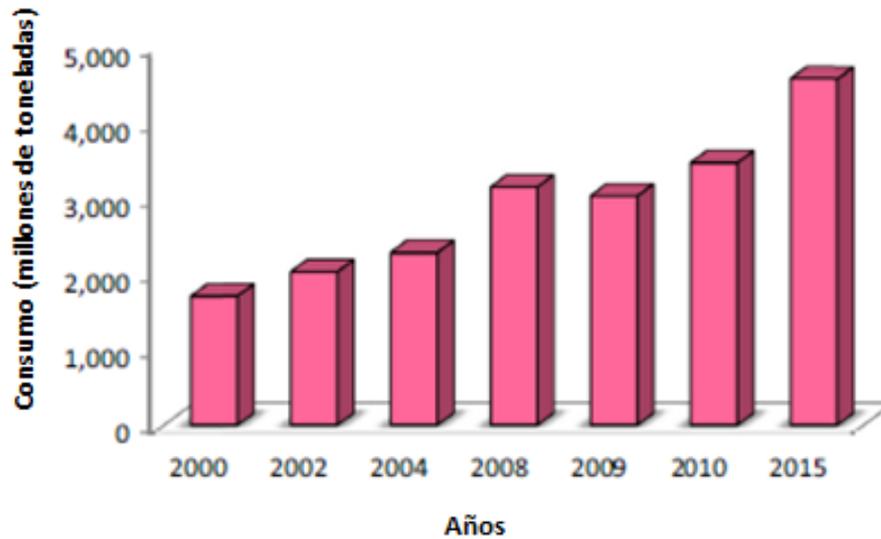
La comida enlatada presenta una exposición significativa al BPA ya que se libera de la laca de las latas, la resina que recubre el interior de la lata se usa para evitar la corrosión del metal. Estas lacas se fabrican con resinas epoxi, en las que se usa el diglicidil éter como componente prioritario. En estudios realizados se ha observado como la liberación de BPA era significativa y se estimó que iba desde 4 a 23  $\mu\text{g}$  por lata (Vandenberg et al., 2007). En el estudio de Takao et al. (2002) se demostró que la temperatura que se usa para la pasteurización térmica ( $100^{\circ}\text{C}$ ) provocaba la liberación 18 veces más rápida desde el polímero. Además, concluyó que existe una relación entre la concentración de BPA liberado

desde las latas y la temperatura de pasteurización de la comida enlatada. Se determinaron concentraciones bajas de BPA (0,06 ng/cm<sup>2</sup>) en comida enlatada que no había sido pasteurizada, mientras que cantidades significativamente superiores (21 y 32 ng/cm<sup>2</sup>) fueron halladas en latas que habían sido sometidas a temperaturas de 80 y 100°C, respectivamente. Por último, se demostró que la cantidad de BPA liberado está determinada por el grado de polimerización de las resinas epoxi de las lacas y el uso de BPA como componente de primer orden en su producción.

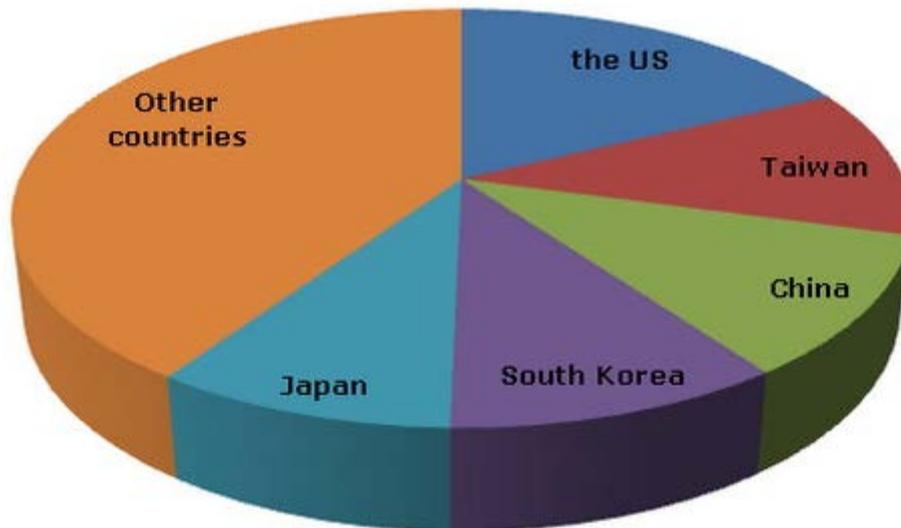
### **3.1.3. Exposición**

A medida que los países se han desarrollado, la demanda de equipamiento médico, objetos electrónicos, adhesivos, materiales de construcción, automóviles, etc... ha incrementado de forma global. Como resultado de esto, la producción y consumo de BPA, ha aumentado de forma continua en las últimas décadas (Fig. 3). La producción global en 2012 de BPA fue de 4,6 millones de toneladas, siendo Asia el productor predominante con casi el 53% del volumen producido total (2,4 millones). Los siguientes productores son Europa y Norte América con el 25 y 18%, respectivamente. En cuanto a países, Estados Unidos, Taiwán, China, Corea del Sur y Japón son los cinco mayores productores, cuya producción

conjunta supone más de 2,7 millones de toneladas (Fig. 4). Así, el crecimiento de la producción global anual se ha mantenido entre el 0 y el 5% (Flint et al., 2012; Corrales et al., 2015).



**Figura 3.** Consumo global de policarbonato desde 2000 al 2015 (Muhamad et al., 2016)

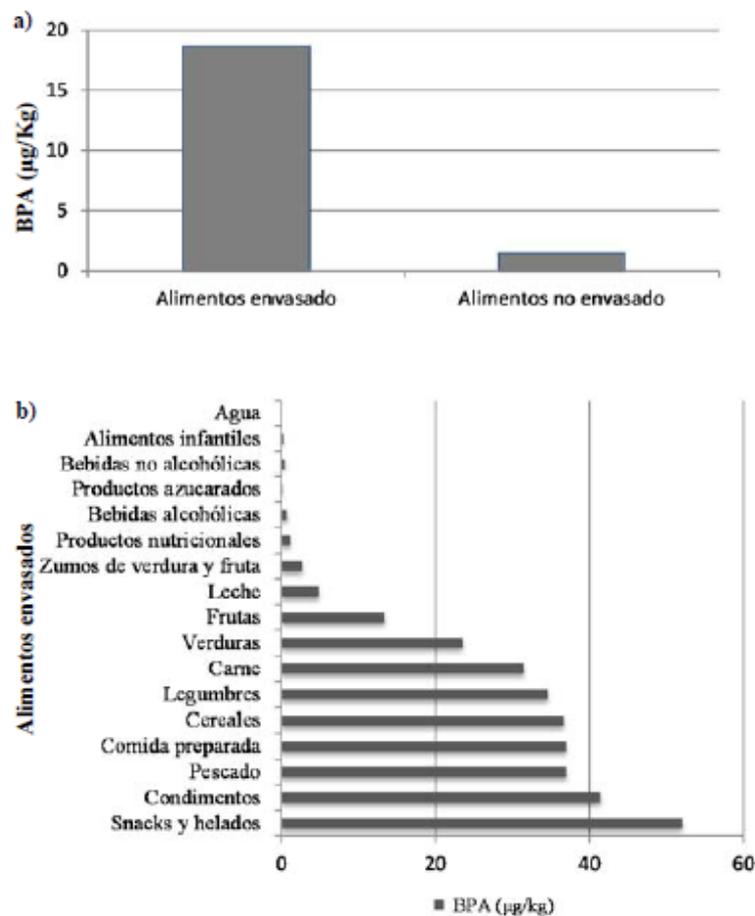


**Figura 4.** Producción global de BPA por países (Adaptado de Corrales et al., 2015)

El vertido directo del BPA al medio ambiente se produce durante el procesado y manipulación de éste llegando al aire, agua y suelo, y/o a través de vertido directo al suelo. De esta forma, se ha detectado BPA en aire, polvo, suelo, agua (tanto de bebida como agua libre), sedimento, residuos industriales y municipales, y comida (Flint et al., 2012).

En el último informe publicado por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en el 2015, se realizó una evaluación de la exposición dietética del BPA. Las concentraciones más elevadas de BPA se encontraron en los alimentos y productos envasados, en comparación con los alimentos no envasados, donde la media mostró concentraciones de 18,68  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 1,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de BPA, respectivamente (Fig. 5a). Las categorías

de los alimentos envasados donde se observaron las concentraciones más relevantes de BPA fueron cereales, legumbres, carnes, pescados, condimentos, comida preparada, snacks y helados. Estas 7 categorías alcanzaban valores superiores a 30  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de BPA (Fig. 5b) (Juan-García et al., 2015).



**Figura 5.** Presencia de BPA en productos envasados y no envasados (a); Grupos de alimentos envasados donde se observan las concentraciones más relevantes de BPA (b) (Juan-García et al., 2015).

- **Alimento y agua de bebida**

La ingesta se considera la vía predominante de exposición humana a esta sustancia y esto se debe fundamentalmente al contacto de la comida con polímeros que la contiene, aunque también podría estar relacionado con la acumulación de BPA en el medio ambiente, y la exposición de los animales y plantas a este compuesto. En un estudio realizado por Vandenberg et al. (2007) estimaron que la exposición al BPA a través de la dieta en el caso de los humanos es diaria y que se produce en concentraciones entre 0,16-0,48  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{peso}/\text{día}$ .

Como ya se ha mencionado previamente, el BPA tiene la capacidad de migrar desde los polímeros y resinas epoxi a la comida y agua de bebida. Algunos estudios detectaron concentraciones de BPA en distintos productos cárnicos (0,49-56  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), pescado (7,1-102,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), verduras y frutas (11,0-95,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) y cereales (1,0 – 3,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) (Yoshida et al., 2001; Munguia-Lopez et al., 2005; Shao et al., 2007; Niu et al., 2012).

### 3.1.4. Liberación al medioambiente

- **Atmósfera**

Como resultado de la actividad industrial, el BPA es liberado a la atmósfera en grandes cantidades estimándose alrededor de 100 toneladas por año. Por este motivo, se han realizado diversos estudios para determinar estas concentraciones, los cuales han obtenido resultados muy variables dependiendo de la zona en la que se han realizado dichos estudios. Como ejemplo, son los estudios de Berkner et al. (2004) y Matsumoto et al. (2005), en el primero estudiaron las concentraciones en Bavaria (Alemania) obteniendo unos niveles bajos de entre 5 y 15 pg/m<sup>3</sup>. Sin embargo, Matsumoto determinó los niveles en Osaka (Japón) obteniendo resultados bastante más altos y variables: de 10 a 1920 pg/m<sup>3</sup>. Observándose, por tanto, niveles mucho más elevados en la zona de Japón en comparación con Alemania.

Fu y Kawamura (2010) analizaron muestras de los 5 continentes y observaron que las concentraciones más bajas se encontraban en las zonas de costa mientras que las concentraciones más altas fueron obtenidas en las regiones urbanas de la India con 4,5 ng/m<sup>3</sup>. Este dato se debe probablemente a la intensa combustión de productos plásticos con fines domésticos en esta zona.

- **Agua y efluentes**

Normalmente, el BPA se encuentra en concentraciones bajas en la superficie del agua. Se han realizado diversas mediciones en distintos estudios obteniendo resultados muy diferentes. Por ejemplo, en Portugal se encontraron concentraciones entre 28,7-98,4 ng/dm<sup>3</sup> (Rocha et al., 2013), mientras que en Alemania los resultados fueron más elevados entre 4-92 µg/dm<sup>3</sup> en la superficie y entre 10-380 µg/kg en el sedimento (Stachel et al., 2003). En otros estudios realizados en el agua de los ríos y los efluentes de los mismos, se indicó que los efluentes que contenían el agua de fábricas relacionadas con BPA eran las fuentes predominantes de BPA de sus respectivos ríos (Lee et al., 2013).

En el caso del agua subterránea, se encontraron concentraciones elevadas de BPA en aquellas situadas cerca de vertederos contaminados con esta sustancia o en vertederos de residuos plásticos, obteniéndose concentraciones de 740 µg/dm<sup>3</sup> en Osaka (Japón) (Michalowicz, 2014).

### **3.1.5. Metabolismo**

De todas las rutas posibles de exposición al BPA, la más estudiada y de la que más información se tiene es de la vía oral. Se han realizado diversos estudios en animales de laboratorio (fundamentalmente ratas y

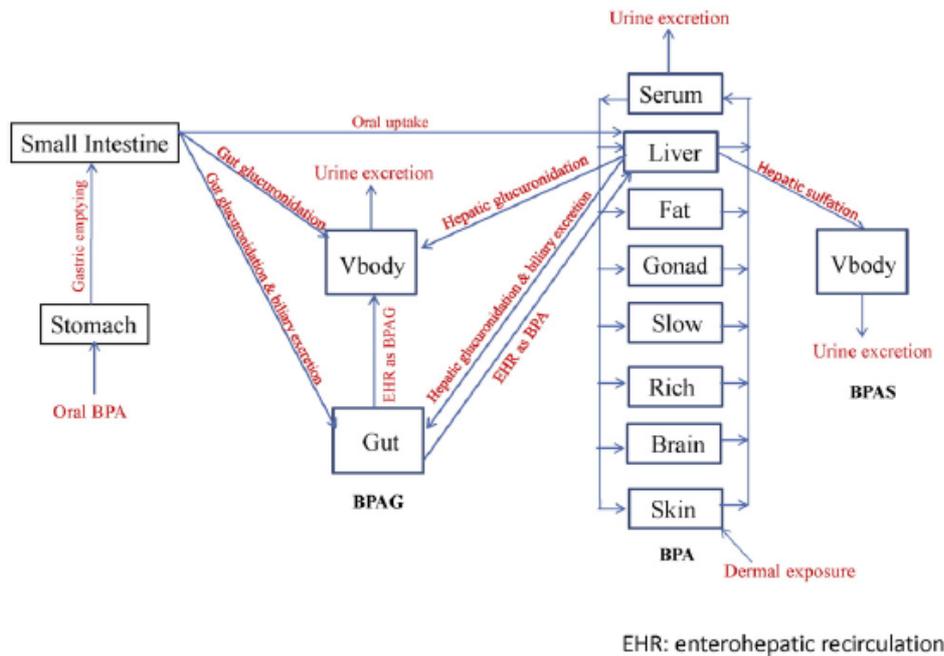
primates) obteniéndose diferencias en el metabolismo de esta sustancia (Inoue et al., 2016; VandeVoort et al., 2016).

Cuando se administra vía oral el BPA se absorbe rápidamente desde el tracto gastrointestinal, obteniéndose concentraciones en el plasma muy elevadas que demuestran una absorción del 86 % en ratas y primates. Una vez absorbido, el BPA se metaboliza por la udp-glucuronico transferasa en la pared del intestino y el hígado conjugándose con el ácido glucurónico (forma inactiva) antes de ser excretado. En roedores, el BPA administrado por vía oral también es glucuronizado rápidamente, pero un porcentaje alto se une a las proteínas plasmáticas, se excreta por la bilis, se escinde de nuevo como BPA libre y se reabsorbe desde el intestino hasta el torrente sanguíneo. Esta recirculación enterohepática puede ocurrir varias veces antes de que se excrete, mayoritariamente por heces, algunos días más tarde. Esto se traduce en una eliminación lenta en comparación con los primates, por lo que la exposición a BPA libre tras su administración va a ser más prolongada (INFOSAN, 2009).

En humanos, se han realizado estudios sobre el metabolismo tras la administración oral de BPA mediante cápsulas de gelatina (Vokel et al., 2005), se demostró que esta sustancia es absorbida rápida y completamente por esta vía (Fig. 6). Además, la ruta metabólica primaria

del BPA en el hígado es por la fase II de conjugación en la que se produce una gran cantidad de BPA-glucurónico y en pequeñas cantidades BPA sulfato (Kurebayashi et al., 2010). Debido al alto efecto de primer paso, los niveles en suero de BPA sin conjugar que se registran tras la ingestión son muy bajos, llegan incluso a no detectarse en el estudio original (Volkel et al., 2002), siendo la ruta predominante de excreción de BPA conjugado la orina (Volkel et al., 2005). En diversos estudios se ha encontrado la presencia de BPA en diferentes fluidos corporales como la orina, leche, y fluidos amnióticos y placentarios, además de en niños y neonatos (Ikezuki et al., 2002; Braun et al., 2011; Altamirano et al., 2015; Ferguson et al., 2015).

Debido a los efectos que el BPA puede tener sobre el desarrollo fetal se han realizado estudios sobre mujeres embarazadas. En el 90% de la orina de población estadounidense analizada se encontró BPA en concentraciones de 0,2-1,6 ng/mL (Calafat et al., 2005), además de detectarse en la mayoría de muestras de sangre, leche materna y líquido amniótico (Vanderberg et al., 2007), ya que el BPA tiene la capacidad de ser transportado a través de la placenta en su forma activa (no conjugada) (Balakrishnan et al., 2010).



**Figura 6.** Esquema del metabolismo del BPA (Yang et al., 2015).

### 3.1.6. Bioacumulación y biomagnificación

Se han realizado estudios sobre la posible bioacumulación y biomagnificación de BPA y otros disruptores endocrinos (ECDs) en organismos que se encuentran en un nivel elevado de la cadena trófica. Esto se debe a que ciertos ECDs son activados gracias a pequeños ligandos lipofílicos los cuales podrían bioacumularse en organismos acuáticos que son ingeridos por el consumidor (Evenset et al., 2016).

Diversos estudios laboratoriales han obtenido como resultado que el BPA tiene una capacidad muy baja de acumulación en los tejidos de los organismos estudiados. Los factores de bioconcentración obtenidos se encuentran en un rango entre 1,7 y 182, valores que están muy por debajo de los límites utilizados para identificar una sustancia como bioacumulativa (Corrales et al., 2015). Esto puede deberse a que muchos de estos estudios se han llevado a cabo en peces, los cuales tiene una gran capacidad de degradar el BPA a metabolitos fácilmente excretables (Lindholst et al., 2001). Por tanto, estos datos sugieren que para caracterizar mejor la acumulación potencial del BPA en especies acuáticas y en la cadena alimentaria, se necesitan más datos experimentales.

### **3.1.7. Efectos sobre la salud humana**

En el último informe de la EFSA (2015) sobre el BPA, se hace una revisión de los últimos estudios realizados en relación a los posibles efectos adversos sobre la salud humana (Tabla 1).

Respecto a los efectos a nivel neurológico, concluye que puede existir una asociación de alteraciones en el comportamiento de niños/as debido a la exposición de la madre a BPA durante la gestación. Sin

embargo, estas asociaciones no fueron constantes en todos los estudios realizados por lo que no se puede descartar que los resultados se debieran a otras causas como la exposición simultánea a otros compuestos. Además, otros estudios indican posibles efectos del BPA sobre el desarrollo cerebral (efectos sobre la neurogénesis, expresión genética o efectos neuroendocrinos, etc.) (Ferguson et al., 2012; Jasarevic et al., 2013).

También se han realizado estudios sobre los posibles efectos a nivel metabólico, los desórdenes metabólicos con los que se ha asociado el BPA podrían además estar relacionados con dietas pobres (elevada ingesta de azúcar, grasas y alimentos procesados). Como la dieta es la principal vía de exposición al BPA, se sugiere la posibilidad de que las dietas más pobres estén asociadas con una mayor exposición a BPA. Sin embargo, los resultados de los estudios están limitados debido a las dificultades que supone la medida de BPA en orina y el diseño de los estudios. Aun así, los estudios llevados a cabo indican que una mayor exposición a BPA supone el aumento de masa corporal en niños, y un estudio sugiere que la exposición prenatal puede asociarse con menor masa corporal y adiponectina en niñas y mayor leptina plasmática en niños (Lang et al., 2008; Volberg et al., 2013).

Por otro lado, se ha demostrado la capacidad del BPA de inducir aneuploidia en un estudio in vitro en células mamíferas, produciendo la inducción de micronúcleos como consecuencia de interferencias en los husos (Johnson et al., 2008). Sin embargo, el BPA no tiene efectos mutagénicos ni clastogénicos, y la posibilidad de producir aneuploidía sólo se ha demostrado in vitro, esto ha llevado a asignar como “no probable” la posibilidad de producir genotoxicidad del BPA. De esta forma, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) lo incluye en el grupo 3, en el cual se incluyen sustancias que “no pueden ser calificadas respecto a su carcinogenicidad para el ser humano”, debido a la falta de datos epidemiológicos relevantes y pruebas en animales de laboratorio (IARC, 1999).

En cuanto a su posible interferencia en la reproducción humana, en un estudio realizado por Ehrlich et al. (2012) se relacionaron niveles más elevados de BPA en orina con oocitos con un desarrollo disminuido, medidos por el número y porcentaje de oocitos maduros. Por otro lado, se han asociado concentraciones elevadas de BPA en madres con efectos adversos en bebés y niños, incluido un aumento del riesgo de partos prematuros (Cantonwine et al., 2010; Tang et al., 2013), además de efectos sobre las medidas antropométricas al nacimiento (Lee et al., 2014).

Por último, varios estudios epidemiológicos han investigado la posible relación con la incidencia de ciertos cánceres como el cáncer de mama y meningiomas, pero estos estudios no llegaron a ninguna conclusión. Por otro lado, se han realizado nuevos estudios en animales de laboratorio y primates sobre su relación con el cáncer de mama. Aunque los resultados fueron insuficientes para establecer una relación causal, parece ser que el BPA podría tener relación con el aumento de la susceptibilidad de la glándula mamaria a la carcinogénesis. Se trata de estudios muy complejos donde es muy difícil establecer la causa-efecto, hay que tener en cuenta que el desarrollo de tumores aparece a largo plazo, y que generalmente a lo largo de la vida se está expuesto a una multitud de compuestos con actividad endocrina, que además a muy bajas dosis de exposición podrían ser nocivos para la salud del consumidor o de la fauna a muy largo plazo. Esta situación hace que la evaluación del riesgo sea muy compleja y que se genere mucha incertidumbre al respecto.

La respuesta proliferativa y el posible aumento de la sensibilidad de la glándula al desarrollo de procesos cancerígenos observados en los estudios con animales de laboratorio, ha llevado a la EFSA a catalogar como “probable” la posibilidad de inducir cambios proliferativos en la glándula mamaria.

REPRODUCCIÓN	<ul style="list-style-type: none"> <li>•</li> <li>•</li> <li>masculina</li> <li>•</li> <li>espermatozoides</li> <li>•</li> <li>ovario poliquístico</li> <li>•</li> <li>•</li> <li>involuntario</li> <li>•</li> <li>prematureo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Fertilidad</li> <li>Función sexual</li> <li>Reducción calidad</li> <li>Síndrome de</li> <li>Cáncer de mama</li> <li>Aborto</li> <li>Nacimiento</li> </ul>
DESARROLLO	<ul style="list-style-type: none"> <li>•</li> <li>•</li> <li>los genitales masculinos</li> <li>•</li> <li>comportamiento en la infancia</li> <li>•</li> <li>respiratorios en la infancia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Peso de nacimiento</li> <li>Anormalidades en</li> <li>Anormalidades en</li> <li>Problemas</li> </ul>
METABOLISMO	<ul style="list-style-type: none"> <li>•</li> <li>•</li> <li>cardiovasculares e hipertensión</li> <li>•</li> <li>•</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diabetes tipo 2</li> <li>Alteraciones</li> <li>Función del hígado</li> <li>Obesidad</li> </ul>
OTROS	<ul style="list-style-type: none"> <li>•</li> <li>•</li> <li>inmunológica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Función tiroidea</li> <li>Función</li> </ul>

•	Albuminuria
•	Estrés oxidativo e
inflamación	
•	Expresión genética

**Tabla 1.** Posibles efectos del BPA sobre la salud humana (Juan-García et al., 2015)

### 3.1.8. Biomonitorización

La forma convencional de evaluación de la exposición al BPA es a través de la medición de BPA total y aglicona habitualmente en orina. La orina es utilizada ya que es la principal vía de excreción de BPA glucuroconjugado y la recogida de muestras es mínimamente invasiva (Andra et al., 2016). Sin embargo, debido a la corta vida media del BPA en humanos (alrededor de 6h), los niveles observados sólo reflejan una exposición reciente a BPA, limitando su uso como biomarcador (Calafat et al., 2015). Los métodos analíticos actuales determinan la concentración total de BPA tras su hidrólisis enzimática a 37 °C durante varias horas y en algunos casos durante la noche. Habitualmente se han usado solo enzimas  $\beta$ -glucuronidasas para el paso de desconjugación debido a la presencia

predominante de BPA conjugado con ácido glucurónico (BPAG), mientras que en menos ocasiones se ha usado enzima sulfatasa para la liberación de BPA de los conjugados con sulfato (BPAS), lo cual ocurre en menos ocasiones. Sin embargo, las mediciones se consideran imprecisas y subestimadas, debido a varias razones: baja concentración de enzimas, elección errónea de enzimas, desconjugación incompleta, condiciones no favorables y ante todo, un protocolo de desconjugación subóptimo (Andra et al., 2016).

Sin embargo, la cuantificación de BPA total en orina es solo válida si se mantiene controlada la posible contaminación externa. Esto se debe a que la introducción de BPA procedente de fuentes externas eleva la aglicona y también los niveles totales de BPA, por tanto, medir uno de ellos no es necesariamente un biomarcador fiable (Andra et al., 2016). Esto ha hecho que se considere cada vez más la cuantificación de BPAG y BPAS ya que los niveles no se ven afectados ni por la manipulación de las muestras ni por los procedimientos analíticos. La especificidad de BPA es similar al BPA aglicona en los estudios de evaluación de exposición; sin embargo, la frecuencia de detección de BPAG en orina es casi siempre mayor que las agliconas. En las poblaciones que han sido estudiadas, el BPAG se detectó casi en todas las matrices humanas (orina, plasma, suero y sangre de cordón umbilical).

Por otro lado, el BPAG se encontró con más frecuencia que el BPAS o BPADS. Las tasas de detección han sido variables en distintos estudios, con entre un 61% y 100% en orina (Nachman et al., 2013; Hauck et al., 2016) y entre el 0% y 100% en sangre (Volkel et al., 2005; Vandenberg et al., 2014). Las concentraciones de BPAG fueron comparativamente superiores a las de BPA aglicona en dichas matrices. Por ejemplo, el BPAG se encontraba en un rango de 0,05 a 65,2 ng/mL en orina y 0,05-11,9 ng/mL en suero mientras que el BPA aglicona se encontraba en unos rangos de 0,01-0,187 ng/mL y 0,01-0,59 ng/mL respectivamente en las muestras analizadas de la población de estudio (Liao et al., 2012). El BPA por su parte, se encontraba por encima de los niveles de estudio en suero de adultos (Liao et al., 2012), suero del cordón umbilical (Gerona et al., 2013) y orina (Provencher et al., 2014). El BPADS ha sido incluido en menos ocasiones entre los conjugados de BPA analizados, y raramente se encuentra por encima de los niveles de detección de los estudios en los que se ha incluido (Andra et al., 2016) (Fig. 7).

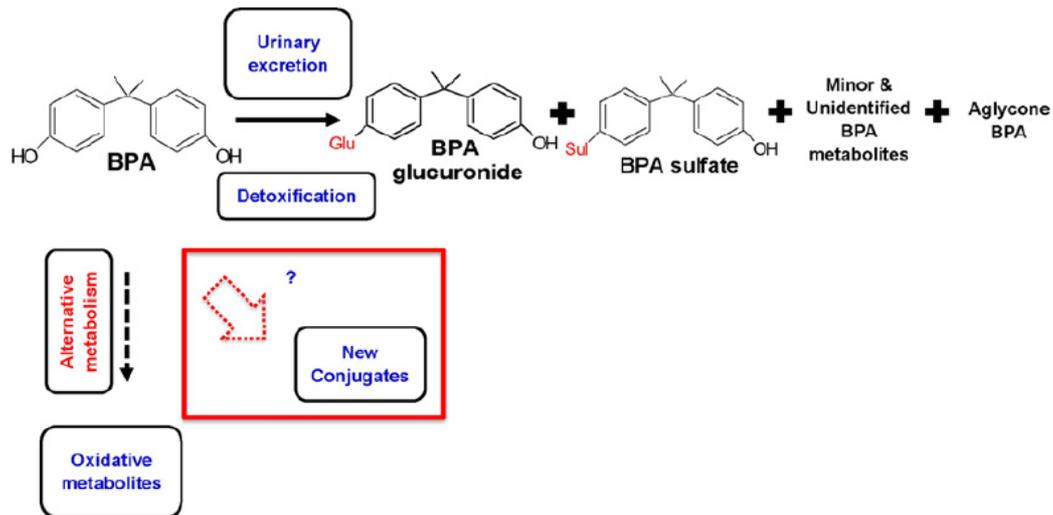


Figura 7. Metabolismo del BPA (Andra et al., 2016)

### 3.1.9. Legislación

Se autoriza el uso del BPA en Europa mediante la Directiva 2002/72 CE de la Comisión en Agosto de 2002 como monómero y aditivo para la fabricación de materiales plásticos que pueden estar en contacto con alimentos siempre que el BPA tuviera una migración de 0,6 mg/kg. Se enmienda esta directiva posteriormente el 28 de Enero de 2011 con la Directiva 2011/8/EU en la cual se establece una prohibición de su uso en biberones. Los análisis de los estudios presentados a la EFSA para la evaluación del riesgo, ha dado como resultado la modificación de la ingesta

diaria tolerable de BPA en los alimentos, pasando de 50,4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso/día a 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de peso/día. Esto se debió a las incertidumbres que rodean a los efectos potenciales para la salud de esta sustancia.

Francia fue pionera en prohibir la producción, comercio y marketing de recipientes de comida que contuvieran BPA. Esta decisión se llevó a cabo tras las recomendaciones de la Agencia de Seguridad Alimentaria y Ambiental francesa (ANSES) en septiembre del 2011 de disminuir la exposición de la población. Un año más tarde, en septiembre de 2012 la agencia propuso una clasificación más estricta para el BPA como “tóxico para la reproducción” (ANSES, 2016). Por ello, aunque ya estaba prohibido el uso de BPA en biberones a nivel europeo, Francia prohibió en 2013 el uso de esta sustancia en todos recipientes alimentarios para bebés y niños de corta edad y para el resto de productos en enero de 2015. Pero esta prohibición supone un reto, ya que encontrar sustitutos para el BPA en los recipientes puede ser difícil en el caso de alimentos ricos en grasas o ácidas como las bebidas gaseosas, tomate, mostazas, entre otros.

En cuanto a la legislación española, existe la restricción del uso de BPA en biberones mediante la Orden PRE/628/2011 (2011) que modifica el Anexo II del Real Decreto 866/2008 en el que se aprueban la lista de

sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos de plástico destinados a entrar en contacto con los alimentos.

En el último informe de la EFSA en 2015 se concluye que la exposición por dieta a BPA para los grupos de mayor exposición (incluyendo niños y adolescentes) es inferior a la IDA de 4 µg/kg de peso/día. El problema radica en que la exposición al BPA (independientemente de la vía de exposición), conjuntamente a otros compuestos de actividad endocrina podrían potenciar los efectos sobre el organismo expuesto, aunque esto aún está en evaluación.

Recientemente, la Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas (ECHA), apoyando la decisión tomada por Francia, ha incluido el BPA en la lista de químicos “altamente preocupantes debido a sus propiedades de alteración del sistema endocrino, que causan graves efectos en la salud humana” (ECHA, 2017).

### **3.2. El tendón de Aquiles. Tendinopatías. Tratamientos**

El tendón se define como parte esencial del aparato locomotor, cuya función principal es la de proporcionar la carga tensora a la musculatura, permitiendo así el movimiento o el mantenimiento de la postura corporal.

La tendinopatía del tendón de Aquiles es la enfermedad tendinosa más prevalente del miembro inferior. Es una patología muy relacionada con la práctica de deporte, llegando a afectar en un 50% a personas deportistas de élite. La etiología más frecuente es la sobrecarga excesiva y repetitiva en ejercicios relacionados con ella, como correr y saltar. Los hombres son los más afectados por esta patología, haciéndose más frecuente conforme aumenta la edad.

Clásicamente el tendón se define como tejido conjuntivo denso, modelado, caracterizado por tener células y fibras conectivas ordenadas en haces paralelos y muy juntos, con objeto de proveer la máxima resistencia.

Los tendones poseen tres zonas específicas en toda su longitud:

- La unión miotendinosa, punto de unión músculo-tendón.
- La zona media o cuerpo del tendón.
- La unión del tendón al hueso, llamada entesis o unión oseotendinosa.

- **Histología**

En su histología se puede ver que son tejidos escasamente vascularizados, con baja celularidad y actividad metabólica, y una matriz

extracelular abundante. Esta última está compuesta por fibras de colágeno alineadas y elastina, envueltos por una matriz hidratada de proteoglicanos. La función principal que aportan las fibras de colágeno son la de dar resistencia al tendón, mientras que la de los proteoglicanos, es la de servir las propiedades elásticas al tendón.

Las fibrillas de colágeno son la unidad estructural más pequeña. Cada una de ellas está compuesta por moléculas de procolágeno, que se cruzan entre sí para crear moléculas de tropocolágeno o microfibrillas, y se unen para formar fibrillas y fibras de colágeno. Estas últimas se agrupan en fascículos, unidas con tejido conectivo llamado peri-tendón (compuesto por epi- y endo-tendón) y que llevan los vasos sanguíneos, los nervios y los vasos linfáticos, permitiendo además, la mínima fricción entre los diferentes haces de fibras. El para-tendón es una fina capa de tejido conectivo que rodea todos los fascículos. Estas estructuras aparecen al microscopio como un patrón ondulado o “crimp patern”.

El tendón está formado por colágenos, proteoglicanos, agua y células. El colágeno tipo I aparece en un 60% de la materia seca del tendón y en un 95% del colágeno total (el 5% restante se compone de colágeno tipo III y V) (Riley et al. 1994 ). El colágeno tipo V se intercala con las fibrillas de colágeno tipo I, regulando el crecimiento de estas fibras. El tipo III forma fibrillas más

péqueñas y menos organizadas, dándole menos resistencia mecánica, por lo que es importante el equilibrio de ésta con el resto de fibrillas. En la histología del tendón, se encuentra además, la fibrilla tipo II, VI, IX, X y XI.

La matriz extracelular del tendón está formada por componentes como las fibras elásticas, que otorgan flexibilidad y elasticidad, permitiendo a los tendones que sean deformables y después vuelvan a su forma de reposo sin necesidad de aporte energético.

El hialurano, la fibromodulina, el tenomodulina y otros componentes minoritarios, también forman parte de la sustancia básica del tendón. El agregano retiene agua en el fibrocartílago, dándole resistencia a la compresión. La decorina facilita el desplazamiento de las fibras durante la deformación mecánica además de participar en el ensamblaje de las fibras de colágeno junto a la fibromodulina y otras proteínas. La fibronectina participa en la interacción de las células con la matriz extracelular (Berenson et al., 1996; Riley et al. 1996). El porcentaje de proteoglicanos y glicoproteínas, depende de la naturaleza del tendón y de la exposición a la fuerza que se ejerce sobre él.

Los tendones, son tejidos muy acelulares, y el 90-95% del contenido celular, se conforma de células específicas descritas como fibroblastos o tenocitos. Tienen morfología aplanada con prolongaciones delgadas debido a que se encuentran comprimidas entre las fibras de colágeno. El 5% restante

está compuesto por células sinoviales de los tejidos conectivos, células condroides del fibrocartílago y las células endoteliales de los vasos sanguíneos. Los tenocitos tienen la capacidad de producir todos los componentes de la matriz extracelular, y se ha visto que aumenta su actividad metabólica y de síntesis de colágeno en respuesta a estímulos mecánicos.

La baja densidad celular del tendón, junto a sus requerimientos de oxígeno y nutrientes, determinan su limitada vascularización. Esto produce, que tras un traumatismo en los tendones, cicatricen con gran lentitud. Los pequeños vasos y nervios del tendón se encuentran contenidos en el endotendón. Existen receptores propioceptivos que responden frente a las variaciones del tendón que ejercen los músculos sobre los tendones, y que se llaman órganos, corpúsculos o husos neurotendinosos o tendinosos de Golgi. Son estructuras cilíndricas encapsuladas que se encuentran ubicados en la vecindad de la unión miotendinosa. Se encargan de captar la información relativa a la diferencia de tensión transmitiéndola hacia el sistema nervioso central, donde es procesada para la coordinación de intensidad inhibitoria a la neurona motora  $\alpha$  del mismo músculo, lo que tiene como resultado la relajación del tendón del músculo en contracción. Estos corpúsculos están formados por un pequeño fascículo de fibras de colágeno del tendón encerradas en una cápsula, y que se continúa con las células perineurales que recubren a las fibras nerviosas aferentes; el nervio sensitivo mielínico atraviesa la cápsula

perdiendo la mielina dispuestas entre las fibras de colágeno. Cuando los músculos se contraen, los haces de colágeno se juntan comprimiendo las terminaciones nerviosas.

- **Histología de la unión miotendinosa**

Se trata de una de una zona especializada de la fibra muscular que requiere de una estabilidad estructural extrema, lo que determina sus características microscópicas. Mediante microscopía óptica es imposible apreciar los rasgos estructurales de dicha zona. Sin embargo, sí es posible hacerlo con la microscopía electrónica. Ultraestructuralmente, el extremo de la fibra muscular muestra evaginaciones e invaginaciones digitiformes de la membrana plasmática sobre las que se adapta la lámina basal configurando un aspecto en “dientes de sierra”. En la cara interna de la membrana plasmática de la fibra muscular, se pueden observar las placas de adhesión en las que se insertan los filamentos de actina de la primera sarcómera de las miofibrillas. El sarcoplasma de las fibras musculares de esta zona, contienen numerosos ribosomas y liposomas. En esta zona de unión es normal ver variabilidad en el tamaño de las fibras musculares y rasgos histológicos diferentes, y por esta razón, y para no dar lugar a la confusión, las biopsias musculares han de tomarse en la zona ventral del músculo y no en la zona de unión miotendinosa.

- **Histología de la unión osteotendinosa**

Las uniones osteotendinosas y osteoligamentosas, son conocidos como entesis. Las fibras de colágeno del tendón se irradian hacia el interior de hueso, fundiéndose por un lado con las fibras de colágeno al periostio y, por otro, mediante fibras de colágeno denominadas fibras de Sharpey, que se introducen en la corteza ósea. En este territorio se observa cartílago fibroso que se mineraliza y que le da potencialidad a las células condroprogenitoras y osteoprogenitoras.

- **Tendinopatías**

La tendinopatía de Aquiles se trata de una patología crónica degenerativa que afecta al tendón y que se manifiesta con dolor e incapacidad funcional del pie y tobillo.

Los tendones enfermos sufren cambios notables, las fibras de colágeno se desorganizan separándose y desempaquetándose, pierden su orientación paralela, y se observa una disminución tanto de la cantidad total de colágeno como del diámetro de sus fibras. En las zonas donde se aprecian las microrroturas de las fibras, se agrupan eritrocitos, fibrina y fibronectina, y se observa un aumento de colágeno tipo III, asociado con un mecanismo de reparación. También se aprecia mayor cantidad de concentraciones de

proteoglicanos localizadas en la base mucosa del tendón. La forma de los tenocitos cambia desapareciendo su forma de huso, y adquiriendo núcleos más activos, como consecuencia de un aumento de celularidad y del metabolismo de estas células. Aumenta la vascularización en el tejido enfermo y aparece un aumento en la expresión de metaloproteinasas y ciertas citoquinas proinflamatorias, que concuerda con un incremento del metabolismo del tejido. Ocasionalmente pueden aparecer en las tendinopatías calcificaciones, fibrocartílago o metaplasias óseas. En los tendones que sufren una rotura, se aprecian cambios histológicos similares sin observarse hipervascularización ni hiper celularidad, ya que aparece un aumento de la apoptosis y necrosis (Xu et al., 2008; Jafari et al., 2015).

- **Etiología de las tendinopatías**

Las causas de las tendinopatías aquéleas pueden ser tanto extrínsecas como intrínsecas, aunque su etiología más frecuente es la multifactorial. El factor extrínseco es más común que desarrolle tendinopatía por sobrecarga o por un esfuerzo anormal repetido del tendón, agotando la capacidad de las células de reparar los defectos estructurales y llegando a la rotura del tendón. Por esta razón, la enfermedad tendinosa se asocia a los factores mecánicos sobre el tendón y a su capacidad regenerativa.

Los factores intrínsecos son la edad afecta a la matriz extracelular, observándose una disminución progresiva de elasticidad y de la fuerza de tensión, debido al aumento de la cantidad y estabilidad del colágeno tipo I y a la disminución de la cantidad de proteoglicanos. Este hecho favorece la predisposición a sufrir microrroturas en relación con la edad. Muchas lesiones se han asociado a una perfusión vascular disminuida. Se ha observado que un estatus angiogénico anormal puede provocar que un tendón sufra una patología degenerativa, ya que una disminución de la perfusión tisular dificulta la capacidad de las células para responder ante una lesión. Las variantes anatómicas y la laxitud articular, pueden someter a los tendones a cargas anormales sobre ellas, provocando un desgaste en ciertas zonas de los tendones que pueden degenerar en una tendinopatía. Así mismo ocurre con las personas obesas. Además, se ha asociado a diversas enfermedades sistémicas, como la Diabetes Mellitus o enfermedades renales y endocrinas crónicas, con defectos en la síntesis, el metabolismo y la estructura de la matriz extracelular que comprometen las propiedades mecánicas de los tendones. Las alteraciones en los niveles de hormonas sexuales, también pueden afectar al metabolismo y, con ello, a la estructura y resistencia de los tendones (Bryant AL, et al 2008). El uso de fármacos que actúan a nivel sistémico como los corticosteroides se ha asociado a debilidad en tendones, en especial en tendón de Aquiles. También se ha valorado una asociación entre la tendinopatía de

Aquiles con el uso de anticonceptivos orales y fluorquinolonas, apoyando la teoría de que producen efectos a nivel sistémico y circulatorio.

Los factores extrínsecos son la carga anormal y repetida del tendón es el factor más común para producir una tendinopatía. Se ha probado que el deporte favorece la síntesis y la renovación de las fibras pero hay un umbral en el que deja de ser favorecedor. Este hecho suele estar producido por movimientos repetitivos o por mala técnica del ejercicio, que producen excesivas fuerzas sobre las fibras y se producen micro-roturas que pueden degenerar en tendinopatías.

En general, la tendinopatía se considera una patología multifactorial, cuyo punto de partida son las interacciones entre las sobrecargas, los factores intrínsecos y las condiciones mecánicas ambientales desfavorables. En base a estos hechos, la patogénesis puede ser considerada como un proceso de tres estadios consecutivos: la lesión, la curación fallida y la presentación clínica.

Los procesos generales de reparación y regeneración en el tendón normal pueden describirse como fases secuenciales que se superponen, y cuya duración depende de la severidad y la locación de la lesión. Estas fases son las siguientes:

Fase inflamatoria aguda inicial. Cuando el tejido tendinoso sufre una lesión, las células mueren por apoptosis o necrosis y la matriz resulta dañada liberando moléculas intracelulares llamadas DAMPs (Patrones Moleculares de Activación de Peligro). Dependiendo de la naturaleza y el tamaño de la lesión, las células mueren de forma agónica y se produce la liberación de estas moléculas celulares, dando lugar a un recambio tisular patológico que no se da en el tejido normal. Además de DAMPs, se forma un hematoma que contiene plaquetas activadas y leucocitos que liberan interleucinas y factores de crecimiento. En la zona de tejido afecto, también se acumulan polimorfonucleares y macrófagos. Estos últimos pueden producir un doble efecto, una función más inflamatoria y destructiva o una función “pro-regenerativa”, actuando en función de la necesidad del tejido receptor.

Fase de reconstrucción que se basa en la migración y proliferación tisular, la angiogénesis, la síntesis de la matriz extracelular, y la remodelación y cicatrización del tejido dañado.

Existen multitud de factores que pueden hacer que la curación del tendón sea ineficiente. Entre los factores locales se incluyen: el aporte sanguíneo deficiente, el hematoma formado tras la lesión y su mala reabsorción, una viabilidad celular reducida, la atrofia del tejido, las infecciones y el estrés mecánico repetitivo. Sin embargo, los factores sistemáticos se

refieren a la edad, la calidad de vida del paciente, la toma de medicamentos, los antecedentes personales, que pueden afectar a los mecanismos de curación tisular.

Existen cinco mecanismos de la remodelación tisular que se pueden ver afectados en la renovación del tejido tendinoso, produciendo así, una renovación deficiente.

Un fallo en la resolución de la inflamación en los tejidos sanos, proteínas y lípidos promueven la resolución de la inflamación, pero en determinados tendones, la respuesta inflamatoria inicial puede mantenerse produciendo una enfermedad crónica inflamatoria del tejido (Dakin et al. 2015; Zhou et al. 2010). La detención de la infiltración de leucocitos y la activación de macrófagos en su función proliferativa, promueve la reducción de la concentración de las moléculas pro-inflamatorias y así a la recuperación de la homeostasis tisular.

En los tendones dañados con una capacidad regenerativa intacta, los vasos sanguíneos crecen hacia los estímulos angiogénicos provistos por las células presentes en la lesión inflamada para proveerles de nutrientes y oxígeno para poder soportar su metabolismo y regenerar la zona de lesión. Cuando la inflamación del tendón es muy repetida y la capacidad regenerativa

se agota, se produce una regresión de los vasos promovida por un equilibrio entre factores pro y anti angiogénicos.

Los distintos tipos de tejidos adyacentes presentan una comunicación molecular entre ellos, mecanismo que se denomina reciprocidad dinámica. Esta característica hace que la tendinopatía tenga que ser abordada como una enfermedad del órgano completo, incluyendo los tejidos circulantes al tendón, y cuya afectación puede provocar fallos en el funcionamiento del tendón.

Las células madre progenitoras tienen un papel muy importante en la reparación tisular. Su activación, migración y proliferación puede verse comprometida por diversos factores como la edad.

La fibrosis, definida como un crecimiento desmedido del tejido por una alteración de la matriz extracelular, se ha vinculado con procesos inflamatorios crónicos que producen una disposición anormal de los componentes de la arquitectura de la matriz y sus componentes. La fibrosis ocurre cuando la cantidad de colágeno de nueva síntesis excede la tasa de degradación, por lo que el contenido total aumenta a lo largo del tiempo generándose una cicatriz fibrótica.

- **Tratamientos.**

Normalmente, los tratamientos clásicos como los analgésicos antiinflamatorios y la fisioterapia no suele ser suficiente. Existen tratamientos más avanzados que tienen un impacto mayor en la estructura del tendón y pueden aportar una curación definitiva. Los tratamientos se pueden dividir en dos categorías: quirúrgicos y no quirúrgicos. Dentro de los no quirúrgicos están los tratamientos clásicos o convencionales, que son el reposo relativo, el frío, las ortesis, la fisioterapia (mediante estiramientos excéntricos, terapia de ondas de choque extracorpóreas), la terapia tópica de gliceril trinitrato, las inyecciones esclerosantes, la electrolisis percutánea, la tenotomía ecoguiada y las infiltraciones de corticoides. Además de los tratamientos clásicos se encuentran las nuevas terapias entre los que se encuentran el plasma rico en plaquetas y la terapia celular.

### **3.3. El uso de plasma ricos en plaquetas y monocitos medulares**

El Plasma Rico en Factores de Crecimiento (PRGF, Plasma Rich in Growth Factors) o Plasma Rico en Plaquetas (PRP) es una técnica actual de regeneración celular que acelera el proceso de cura de las lesiones musculares, tendinosas y articulares (Im MJ, et al., 2009).

Los Factores de crecimiento o Plasma Rico en Proteínas son sustancias proteicas solubles comprendidas en el interior de las plaquetas. Estas sustancias estimulan a otras células que empiezan a crear una gran variedad de procesos tales como, formación de tejido nuevo, cicatrización, reparación de tejidos, curación de huesos, piel, ligamentos, etc. (Walls CM, et al., 1995).

Estos factores se fusionan únicamente a receptores de la superficie de la célula donde deben actuar. Químicamente son capaces de inducir, estimular y fomentar su multiplicación cuando existe lesión y reparar el tejido específico en cada ocasión. Las células madres adultas necesitan el estímulo de los factores de crecimiento para producir sustancias y células específicas del tejido que deben crear.

El plasma rico se adquiere de la sangre del mismo paciente. Una vez extraída la sangre, se separa el plasma rico en factores de crecimiento, proteínas esenciales en proceso de reformar, reparar y regenerar tejidos. Los factores de crecimiento se pueden encontrar tanto en el plasma sanguíneo como en las plaquetas (en los gránulos Alfa) (Im MJ, et al., 2009).

Las plaquetas son las células sanguíneas que tienen como función detener el sangrado si se produce lesión vascular. También, son fuente natural de factores de crecimiento y tienen la singularidad de liberar estas proteínas en

el lugar exacto de la lesión, siendo capaz de regenerar tejidos y reestructurar la matriz extracelular.

Esta singularidad plaquetaria de los factores de crecimiento hace posible que una lesión se cure incluso en la mitad de tiempo, ya que el tratamiento acelera el proceso de restauración de los tejidos implicados.

Puede ir asociada a intervenciones quirúrgicas, favoreciendo la cicatrización de tejidos, como en lesiones de tendones, ligamentos cruzados de rodilla, suturas y lesiones degenerativas.

Igualmente podemos utilizar los factores de crecimiento de forma aislada en el tratamiento de una patología muscular, tendinitis crónica, lesiones de ligamento o articulaciones.

En biología molecular, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (en inglés, PDGF, por platelet derived growth factor) es uno de los numerosos factores de crecimiento, o proteínas que regulan el crecimiento celular y la división celular. PDGF juega un rol significativo, en especial para la angiogénesis, que implica el crecimiento de vasos sanguíneos a partir de tejido vascular existente (Walls CM, et al., 1995). La angiogénesis incontrolada es característica del cáncer. Químicamente el PDGF es una glicoproteína dimérica

compuesta de dos cadenas A (-AA) o dos B (-BB) o una combinación de las dos (-AB).

Existen cinco isoformas diferentes de PDGF que activan la respuesta celular a través de dos receptores (Im MJ, et al., 2009). Ligandos conocidos incluyen A, B, C y D y un heterodímero AB y receptores alfa (PDGFRA) y beta (PDGFRB). El PDGF tiene unos pocos miembros en la familia, por ejemplo la sub familia del Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por vascular endothelial growth factor).

El receptor para el PDGF (PDGFR) pertenece a la clase de receptores con actividad tirosina quinasa intrínseca, dentro del grupo de receptores transmembrana. Dos tipos de PDGFR han sido identificados: el tipo alfa y el beta.

El PDGFR tipo alfa se une al PDGF-AA, PDGF-BB y PDGF-AB mientras el PDGFR tipo beta se une con alta afinidad al PDGF-BB y PDGF-AB. El PDGFR se une a sus ligandos mediante el bolsillo localizado dentro del segundo y tercer dominio de inmunoglobulina. Tras la activación por PDGF, estos receptores se dimerizan, colocándose en posición "on" por autofosforilación de algunos sitios de sus dominios citosolicos, los cuales sirven para mediar la unión de cofactores y activación subsiguiente de la transmisión de señales, por ejemplo, a través de la vía de la PI3K. El efecto cascada

subsiguiente incluye la regulación de la expresión genética y el ciclo celular (Walls CM, et al., 1995).

El papel del PI3K ha sido investigado por algunos laboratorios. Los datos acumulados sugieren que mientras esta molécula hace generalmente parte del complejo de señales de crecimiento, esta juega un papel más profundo en el control de la migración celular. Las diferentes isoformas tienen afinidad variable por el receptor, y el receptor puede tener formas variables, ya sean hetero u homodímeros. Esto permite la especificidad de las señales en cascada. Se ha demostrado que el *cis* oncogén es derivado de la cadena B del PDGF. El PDGF-BB es la proteína de unión con mayor afinidad para el PDGFR-beta. Este es un marcador de la activación de las células hepáticas estrelladas en el proceso de fibrogénesis.

El PDGF desempeña un rol en el desarrollo embriónico, proliferación celular, migración celular y angiogénesis. El PDGF también se ha asociado a algunas enfermedades tales como arterioesclerosis, fibrosis y enfermedades malignas.

Adicionalmente el PDGF es un elemento requerido en la división celular de los fibroblastos, una clase de célula del tejido conjuntivo (Im MJ, et al., 2009).

Esencialmente, el PDGF permite a las células saltar a la fase G1 del ciclo celular con el fin de dividirse.

También se sabe que PDGF mantiene la proliferación de las células progenitoras de oligodendrocitos.

Como uno de los muchos factores de crecimiento que han sido asociados a enfermedad, el PDGF ha proporcionado un marcador proteico de antagonistas de receptores para el tratamiento de enfermedades. Tales antagonistas usualmente incluyen anticuerpos específicos que apuntan a moléculas de interés, los cuales solo actúan como agentes.

### **3.3.1. Procedimientos.**

El procedimiento es sencillo y mínimamente invasivo, por lo que se realiza de forma ambulatoria. Después de extraer una pequeña dosis de sangre al paciente, similar a una analítica común (de 2 a 8 mililitros), se realiza un procedimiento específico a la sangre (Ishiguro N, et al., 2010) . Esta sangre se somete a un proceso de centrifugado que permite obtener el plasma rico en Factores de Crecimiento.

Seguidamente se separa la parte más rica en factores de crecimiento y se descarta el resto, añadiendo cloruro cálcico para liberar los

factores de crecimiento plaquetarios y se inyecta directamente en la zona lesionada por vía articular o muscular.

El tratamiento completo normalmente consiste en tres infiltraciones con un intervalo de descanso de una o dos semanas entre ellas. Una vez realizada la infiltración del plasma rico en factores de crecimiento el paciente tendrá que guardar reposo de 24 a 48 horas de actividad deportiva o esfuerzos intensos, pero después ya podrá hacer vida normal. Siempre siendo dictaminado por el médico que lleve el tratamiento, ya que dependerá de la lesión que se quiera tratar. Aconsejan poner hielo en la zona tratada después de la intervención, de 3 a 5 veces al día (Walls CM, et al., 1995).

### **3.3.2. Usos de Factores de crecimiento.**

Existen diferentes usos y aplicaciones para los factores de crecimiento. Son los siguientes:

- Consolidación de fracturas
- Injertos óseos
- Aceleración de cicatrización
- Pseudoartrosis

- Artrosis
- Lesiones tendinosas, musculares
- Rejuvenecimiento facial con factores de crecimiento
- Factores de crecimiento en rodilla, cadera, etc.
- Lesiones del cartílago

Su uso en traumatología, rehabilitación, reumatología y medicina deportiva se basa en su capacidad para la reparación y regeneración de “heridas” o daños sobre hueso, tendón, músculo o cartílago.

Las plaquetas, además de intervenir en la formación del trombo, intervienen en la reparación de tejidos dañados por inflamación, por degeneración, por desgaste e, incluso también, por rotura (Walls CM, et al., 1995).

En virtud de esta prioridad reparadora o “regeneradora” se aíslan y concentran de la propia sangre y se aplican en el tejido dañado. Allí liberan grandes cantidades de factores de crecimiento que son los verdaderos artífices de la reparación y regeneración del tejido dañado (Walls CM, et al., 1995).

- **Indicaciones del PRP**

En rehabilitación el PRP se aplica a dos grandes grupos de patologías: las tendinitis crónicas (codo de tenista, tendinitis aquílea, fascitis plantar, etc.) y la artrosis de rodilla. En ambos casos, el PRP se debe recomendar sólo a aquellos pacientes en los que han fracasado todas las medidas terapéuticas tradicionales y sólo les queda la cirugía como única opción.

El PRP es un tratamiento de notable actualidad debido a sonados éxitos en deportistas de renombre mundial. La literatura disponible sugiere que el PRP puede ser una alternativa más eficaz que los anti-inflamatorios, las infiltraciones de cortisona o, incluso, que las infiltraciones de ácido hialurónico. Sin embargo, todavía no está suficientemente aclarado cuáles son sus indicaciones y cuál es la manera más efectiva de aplicarlo (Ishiguro N, et al., 2010).

A pesar del elevado porcentaje de éxitos no todos los pacientes responden. Es recomendable recurrir a especialistas con solidez científica y experiencia en el uso del tratamiento.

El plasma rico en factores de plaquetas es una técnica de medicina regenerativa que permite usar los factores de crecimiento presentes de

forma natural en las plaquetas del paciente para estimular la regeneración de las estructuras de la piel (Walls CM, et al.,1995). Se trata de una técnica segura debido a su naturaleza autóloga: es decir, que las plaquetas y sus factores de crecimiento provienen del propio paciente.

Empezó a utilizarse en odontología y en traumatología por su capacidad de regeneración de tejidos. Recientemente se ha utilizado con éxito y seguridad en medicina estética. Es uno de los principales tratamientos de la Unidad de Dermatología Regenerativa.

Se usa con distintas indicaciones: mejorar las cicatrices quirúrgicas cuando son recientes, las cicatrices de acné (junto con otras técnicas, como el láser fraccionado) y mejorar en general la calidad de la piel, ya que la liberación de estos factores de crecimiento plaquetarios en la dermis acelera los mecanismos de reparación y estimula la producción de colágeno, lo que se traduce en una menor flaccidez, menos arrugas finas e hidratación profunda. Sus efectos no son inmediatos: empiezan a notarse unas semanas después (Ishiguro, et al., 2010).

El desarrollo de los preparados plasmáticos ha generado grandes expectativas en la reparación ósea y han alcanzado gran desarrollo comercial de los kits de obtención del Plasma Rico en Plaquetas (PRP), también conocido como concentrado rico en plaquetas (PRC), gel de

plaquetas autólogo, y plasma rico en factores de crecimiento (PRF) y su efecto sobre la regeneración esquelética. La generación de concentrados plasmáticos de plaquetas tiene como objetivo la liberación de factores de crecimiento sostenida en el tiempo de forma autóloga. Existe muy poca evidencia clínica de sus efectos, y una gran variabilidad a la hora de preparar los concentrados, con grandes diferencias en la cantidad de plaquetas y factores de crecimiento que contienen, lo que no permite protocolizar su uso clínico. No hay una relación directa entre el número de plaquetas del concentrado plaquetario obtenido y la concentración final de factores de crecimiento, por lo que PRP y el PRF no son exactamente el mismo producto. Hay que insistir en la importancia de diferenciar entre las funciones que desempeñan los factores de crecimiento "per se", y las que realiza el preparado plaquetario. En la literatura actual no se encuentra ninguna evidencia científica que demuestre la supuesta aceleración de la curación de las fracturas con la aplicación del PRP/PRF. Los buenos resultados de su aplicación en lesiones musculares, tendinosas, o en su empleo en cirugía artroscópica, son estudios clínicos preliminares que deben ser mejor evaluados (Ishiguro N, et al., 2010).

Es necesario profundizar en el estudio de estos concentrados, determinando y cuantificando los factores de crecimiento "in situ" tras su aplicación para poder valorar su verdadero efecto en la regeneración de los

distintos tejidos, incluido el óseo, para valorar su verdadera utilidad clínica y poder protocolizar su uso.

Para que las células diferenciadas mantengan las posiciones adecuadas, las proporciones adecuadas, se reconozcan entre sí y se mantengan unidas formando un tejido deben existir señales entre las mismas. Este sistema de comunicación intercelular está constituido por sustancias variadas entre las que se encuentran las citoquinas, las interleuquinas y los factores de crecimiento (Walls CM, et al., 1995).

Los factores de crecimiento participan en la formación de hueso y cartílago, en la reparación de fracturas óseas, tendones y ligamentos. Su uso terapéutico ha causado gran interés y desarrollo dentro de la medicina deportiva y la enfermedad por accidentes laborales.

A lo largo de estos últimos años la evidencia clínica ha acreditado la eficacia de la terapia con factores de crecimiento asociada en la promoción de respuestas reparativas en procedimientos de traumatología, odontología y cirugía maxilofacial, cirugía plástica, estética y cirugía reparadora (Ishiguro N, et al., 2010). El interés de estas sustancias es que favorecen el índice de reparación tisular tanto de tejidos blandos como de huesos, reducen el índice de infección, el dolor y las pérdidas hemáticas.

Los factores de crecimiento más conocidos e importantes son:

- HC (hormona del crecimiento).
- FCI-1 (factor del crecimiento insulinoide).
- FCDP (factor de crecimiento derivado de las plaquetas).
- FCVE (factor de crecimiento vascular endotelial).
- FTC-beta (factor transformador del crecimiento-beta).
- FCF a y FCF b (factor fibroblástico ácido y básico, además de otros).

Químicamente, los factores de crecimiento son péptidos o fragmentos proteicos ac

las células del organismo y que se acumulan en mayor cantidad en plaquetas, fibroblastos, glándulas salivares, osteoblastos, lágrimas y riñones. Cuando aparece una lesión a nivel de epidermis, dermis, hueso o cualquier otro tejido son activados y a medida que avanza la edad su actuación va disminuyendo (Walls CM, et al., 1995). La función de estas sustancias es mediar en la emisión de una serie de señales entre las que destacan la migración, la diferenciación, la activación y la mitosis celular. Las células receptoras pueden estar próximas o no a las células emisoras.

Entre este tipo de péptidos o proteínas se encuentran los factores de crecimiento plaquetario (FCDP, platelet derived growth factor). Ante la presencia de una herida, y transcurridos 10 minutos (tiempo necesario para que se haya producido el coágulo) las plaquetas liberan el 95% de los factores de crecimiento presintetizados y almacenados en forma de gránulos A, esta liberación se extiende a lo largo de aproximadamente una hora. A continuación, como consecuencia del estímulo de la angiogénesis inducido por las plaquetas aparecen los macrófagos que asumen la reparación tisular mediante la liberación de sus propios factores.

El factor de crecimiento plaquetario tiene capacidad para actuar sobre fibroblastos, células óseas, o mioblastos y por ello está cualificado como un factor de amplia especificidad (Ishiguro N, et al., 2010).

Es una proteína de 30 Kilo Dalton de peso molecular. Se trata de un dímero formado por dos cadenas de aminoácidos A y B con una similitud entre ellas del 60%. La cadena A tiene 121 aminoácidos y la cadena B tiene 125. Y de la combinación de estas cadenas surgen tres tipos de FCDP, el AA, el AB y el BB.

Estas distintas versiones del FCDP tienen distinto efecto sobre distintos tipos celulares. Pero lo primero que se comprobó es que tiene efecto quimiotáctico para monocitos y macrófagos. Su efectividad está

mediada por la interacción con los receptores de las membranas que se denominan alfa y beta.

Este factor tiene una gran influencia sobre los fibroblastos estimulando su multiplicación celular y su efecto quimiotáctico o de llamada. También estimula muy marcadamente la producción de fibras colágenas a nivel de la sustancia extracelular. Y como hemos dicho antes tiene efecto de llamada sobre monocitos y macrófagos (Walls CM, et al., 1995).



## 4. Material y métodos



## 4. Material y métodos

### 5.1. Animales utilizados

Se utilizaron 16 cerdos “*Minipig*” de 2 meses de edad, en buen estado de salud y sin historial de enfermedades previas (Fig. 8).

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

## Material y métodos

---

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

Los animales fueron alimentados una vez al día durante los meses de estudio (Nantaunic, Nantaporc PI®).



**Figura 8.** Modelo experimental: *Minipig*

## 5.2. Protocolo y diseño experimental.

Los *Minipig* se distribuyeron al azar a uno de los cuatro grupos experimentales: Grupo control (GC), (n=4), el grupo tratado con BPA (n=4) oralmente con 1 mg/kg/día (*Sigma Aldrich*®, St. Luis, EE.UU.) durante cuatro meses, un tercer grupo BPA-retirada (n=4) a los que tras dos meses de tratamiento se le retiró el BPA durante otros dos meses hasta la biopsia. Y un cuarto grupo tratados con plasma enriquecido de plaquetas (PRP) (n=4), a los animales de este último grupo se les trató con BPA durante 2 meses, después se le retiró y comenzó el tratamiento con PRP (Tabla 2).

El tratamiento con RPR se realizó mediante la inyección en el tendón de Aquiles mediante una aguja de biopsia percutánea (Fig. 9), una dosis semanal de plaquetas, durante dos meses.

Al acabar los distintos periodos de exposición, tratamiento y/o retirada según el grupo de estudio, se recogieron muestras mediante biopsia del tendón de Aquiles, para su posterior estudio.

<b>GRUPOS</b>	<b>TRATAMIENTOS</b>	<b>Nº <i>MINIPIG</i></b>
1	<b>CONTROL</b>	4
2	<b>GRUPO BPA</b> 1mg/kg/díaBPA durante 4 meses	4
3	<b>GRUPO RETIRADA BPA</b> 1mg/kg/día BPA durante 2 meses y retirada 2 meses	4
4	<b>GRUPO PRP</b> 1 mg/Kg./día BPA durante 2 meses y retirada 2 meses tratado con PRP	4

**Tabla 2.** Distribución de grupos y tratamientos

### 5.3. Toma de muestras

Para la toma de muestras de tejido se utilizaron aguja de biopsias desechable, *Agoram*® de 20 mm diámetro y 200 mm de larga con punta Franseen indicada para biopsias micro-histológicas con un nivel mínimo de

impasividad. Se obtiene una biopsia citológica por medio de aspiración conectando una jeringa a la cánula de la aguja es graduada para alcanzar el máximo nivel de precisión.



**Figura 9.** Aguja de biopsia *Agoram*<sup>®</sup>

#### **5.4. Preparación de PRP**

Se tomaron dos ml de sangre de la vena yugular usando tubos de PRP kit, que contenían 0,3 ml de anticoagulante y separador. Después de transferir el contenido del tubo a otro tubo que contenía sustancias que inhiben la activación de las plaquetas y centrifugación del tubo a 1700 rpm durante 12

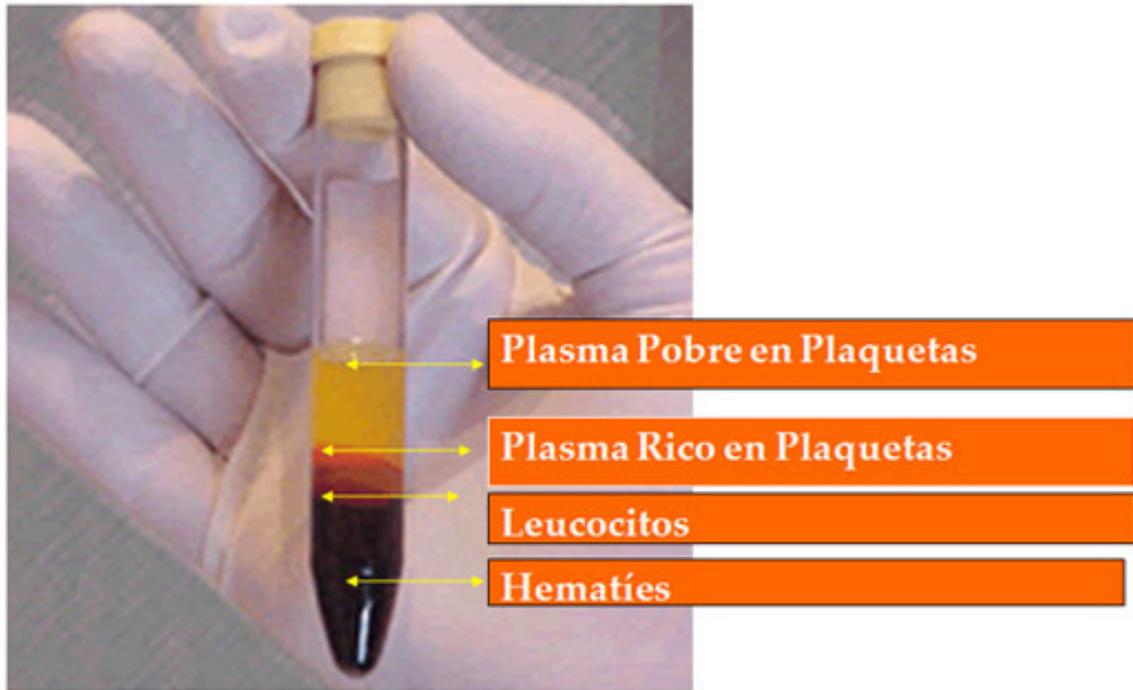
minutos, su componente superior, que contenía plaquetas y plasma, fue transferido a otro tubo que contenía sustancias conservantes. Después de esto, el tubo se centrifugó a 3500 rpm durante 7 min. Finalmente, la porción superior del contenido del tubo se descartó y, después de un tiempo de 30 minutos, la porción restante se inyectó en el animal.

- **Método de obtención de PRP:**

La obtención de los factores de crecimiento plaquetarios en forma de gel ( conocido como plasma rico en plaquetas ) , se realizó según el protocolo el siguiente protocolo:

- Se procede a la extracción de sangre, previa a la anestesia. Se extraen 10 ml de sangre de la vena auricular marginal posterior de cada uno de los animales.
- La sangre se deposita en unos tubos de 4,5 ml con citrato trisódico al 3,8% como anticoagulante. Se centrifugan los tubos a 1.500 rpm durante 7 minutos en la centrífuga, lo que permite definir en los tubos de extracción:
- Una zona en la base del tubo de color rojo oscuro y que corresponde a concentrado de hematíes.

- Un sobrenadante de color muy claro, que corresponde al plasma , y que se puede dividir a su vez en tres fracciones.
- El tercio superior se denomina plasma pobre en factores de crecimiento (PRP) y ocupa alrededor de 0,5 ml.
- En el tercio inmediatamente inferior al anterior, se encuentra el plasma con una concentración media de factores de crecimiento y ocupa también alrededor de 0,5 ml.
- El tercio por debajo del anterior e inmediatamente por encima del concentrado de hematíes se conoce como plasma rico en factores de crecimiento (PRP), con un volumen aproximado de 0,5 ml.
- Procedemos a separar cada fracción con unas micropipetas de 0,5 ml y las depositamos en unos tubos de cristal estériles previamente etiquetados.
- En este estudio se trabaja exclusivamente con la fracción denominada PRP. Posteriormente se procede a la activación del PRP, mediante  $Cl_2Ca$  al 30% para revertir la cascada de coagulación , y se añade en una proporción de 0,05 ml de  $Cl_2Ca$  por xS 1 ml de PRP.
- De este modo transcurridos entre 7 y 10 minutos, obtenemos un coágulo estable, que se comporta como un vehículo natural de los factores de crecimiento.



## 5.5. Estudio histopatológico estructural y ultraestructural.

### 4.5.1. Microscopio óptico

Una vez extraídas las muestras se dispusieron perpendicularmente sobre el portabloques a los que se le añadió previamente una gota de OCT-Compound. Posteriormente se recubrió toda la muestra con más cantidad de este producto para proceder a su congelación. Ésta se realizó en el interior de un vaso de precipitado de vidrio con 100 ml de 2-metilbutano,

que había sido previamente enfriado sobre nitrógeno líquido ( $-190^{\circ}\text{C}$ ), almacenado en un termo. Para ello introdujimos lentamente el vaso de precipitado en un termo, y lo mantuvimos hasta que el 2-metilbutano alcanzó la temperatura óptima de  $-160^{\circ}\text{C}$ , lo que se advierte al congelarse y quedar adherido a las paredes y fondo del vaso formando una fina capa de color blanco. Este es el momento adecuado para sumergir los portabloques en el 2-metilbutano durante 10-15 segundos. La muestra sufre así una congelación inmediata y mínimamente traumática, idónea para el mantenimiento íntegro de las estructuras histológicas e inmunohistoquímica.(Fig. 10)

Las muestras congeladas se protegieron con papel de aluminio, previamente refrigerado, y fueron almacenadas a  $-40^{\circ}\text{C}$  en recipiente de plástico, en un arcón congelado a esta temperatura, hasta el momento de proceder al corte de las mismas.

A continuación se procedió a realizar los cortes de las muestras. Estos cortes de 10  $\mu\text{m}$  de grosor se realizaron en un criostato Leica CM 1850 a  $-20^{\circ}\text{C}$  siendo recogidos sobre portaobjetos limpios y secos mediante contacto de éstos sobre la cuchilla del criostato. Los primeros cortes nos sirvieron para comprobar que la congelación haya sido correcta y verificar la disposición transversal de las fibras mediante una tinción

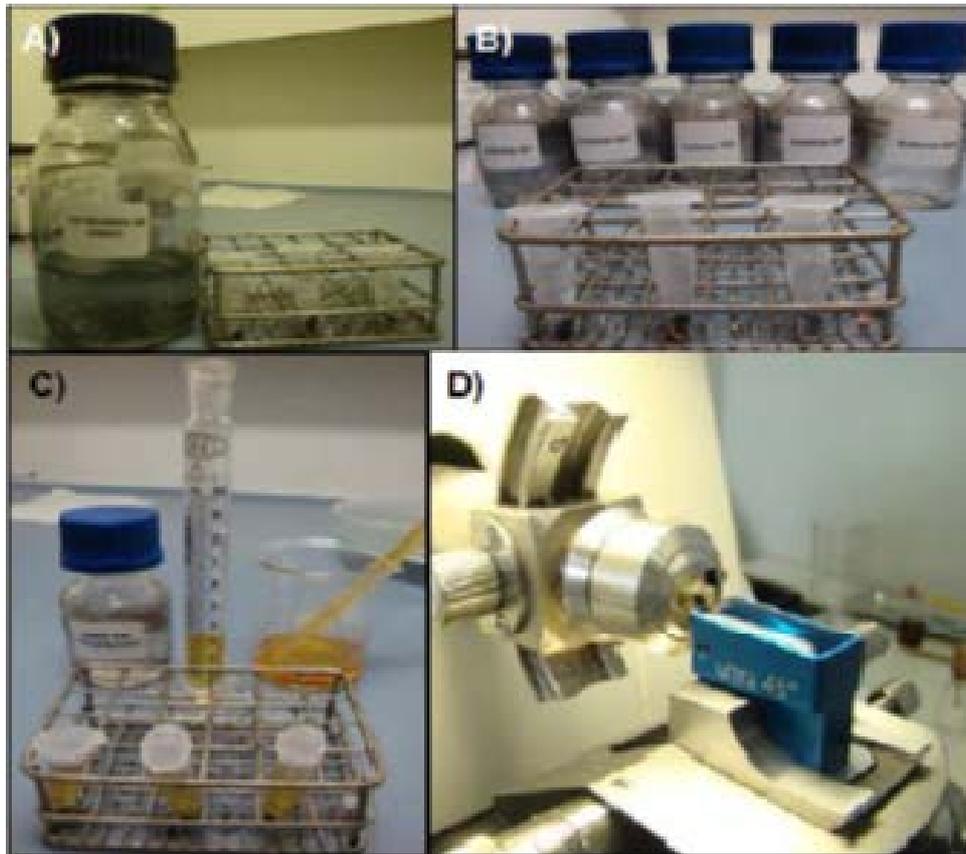
rápida de hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson. La tinción tricrómica de Masson colorea el colágeno en azul, proporcionando un excelente contraste de color que lo diferencia de otras estructuras.

Seguidamente, y por el procedimiento descrito anteriormente, se obtuvieron un total de 40 cortes seriados por muestra disponiéndolos de dos en dos en cada portaobjeto. Los cortes se almacenaron en cajas previamente refrigeradas a  $-40^{\circ}$  C para ser posteriormente sometidas a las técnicas inmunohistoquímicas.

### **4.5.2. Microscopio electrónico de transmisión (MET)**

Muestras de varios milímetros de tendón fueron tomadas para su estudio ultraestructural. Dichas muestras fueron fijadas en gltaladehido al 2% en solución 0,1 M de buffer fosfato (ph 7,4) a  $4^{\circ}$  C durante 12 horas y posteriormente se refijaron en tetróxido de osmio en solución 0,1 M de buffer fosfato (ph 7,4) durante 30 minutos, según el proceder de Sabattini y colaboradores (1964). Después se procedió a un lavado con solución buffer fosfato (ph 7,4) seguido de una deshidratación en escala ascendente de alcoholes finalizando con la inclusión de las piezas se incluyeron en Araldita.

Los cortes semifinos y ultrafinos se realizaron en un ultramicrotomo LKB. Los cortes semifinos se tiñeron con azul de toluidina, mientras que en los cortes ultrafinos se realizó un doble contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo. Para su estudio ultraestructural los cortes fueron observados y electronografiados en un microscopio electrónico de transmisión JEM 1400, del Servicio de Microscopia Electrónica de la Universidad de Córdoba (Fig. 11).



**Figura 10. Preparación de las muestras para su observación en el microscopio electrónico de transmisión:** A) Fijación de las muestras en tetróxido de osmio — solución 0.1 M de tampón fosfato (pH 7.4) — durante 30 min. B) Deshidratación en escala ascendente de alcoholes. C) Inclusión en araldita. D) Realización de cortes semifinos y ultrafinos en un ultramicrotomo LKB.



**Figura 11. MET empleado para el estudio y fotografía de los cortes.**

MET *JEOL JEM – 1400*. Del Área de Microscopía del Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba.

### 5.6. Inmunohistoquímica.

Para la detección de cadenas de colágeno tipo I y III del tendón emplearon los anticuerpos monoclonales anticolágeno I (Sigma M 8421) y anti-colageno III (Sigma M4276). Y se emplearon los siguientes protocolos:

#### **Protocolo de la técnica inmunocitoquímica en parafina de colágeno tipo I:**

Método Inmunohistoquímico Indirecto (protocolo estándar de 1 a 4):

1. Fijación del tejido o las células con paraformaldehído (PFA) 4% durante unas horas.
2. Crioprotección del tejido en sacarosa al 30% en tampón fosfato (PB) 0,1M a 4°C toda la noche (este paso sólo se realizará en el caso de secciones de criostato).
3. Secciones de 10 a 25 µm de grosor.
4. Inmunoreacción: Para eliminar la actividad de las peroxidases endógenas, el tejido se preincuba en una solución de 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in metanol durante 20 min (este paso no es necesario en el caso de técnicas de inmunofluorescencia).
  - a) Lavar 2x10 min en tampón fosfato salino (PBS) 0,1M a pH 7,4 conteniendo 0,25% Tritón (PBST).
  - b) Preincubar durante 30 min con PBST conteniendo 1% de suero de albumina bovina (BSA) a fin de reducir el marcaje inespecífico.
  - c) Incubar durante una noche a 4°C con el anticuerpo primario de suero anticolágeno I (los anticuerpos se diluyen en la solución PBST-BSA).
  - d) Lavar las secciones con PBST 2x10min.

- e) Incubar las secciones durante 1 hora en el anticuerpo secundario (biotinilado, unido a peroxidasa) a temperatura ambiente.
  - f) Lavar 2x10 min con PBS.
  - g) Incubar las secciones en el complejo ABC durante 1 hora a temperatura ambiente.
  - h) Lavar 1x10 min en PBST.
  - i) Lavar 1x10min con tampón Tris-HCl 0,1M pH. 7,2.
  - j) Incubar las secciones en una solución de 3,3'-diaminobezidina tetrahydrochloride (DAB) al 0,05% en tampón Tris-HCl conteniendo 0,025% de H2O2 durante 5 a 10 min.
5. Controles: -Omisión del anticuerpo en cada uno de los pasos. -Sustitución del anticuerpo primario por suero inmune. -Pre-incubación del antígeno con el anticuerpo primario diluido a la concentración a la que se usa en la reacción. Todos los experimentos control tienen que dar como resultado la eliminación del marcaje.

### **Protocolo de la técnica inmunocitoquímica en parafina de colágeno tipo III:**

Cortes en parafina:

- Incubar cortes a 55° C durante 30 min.
- Xylól, 2 baños de 2 min.
- Deshidratación galería de alcoholes:100% , 95%, 80%, 75% y 50%, cada baño de dos min.
- Baño de agua corriente.
- Incubar cortes en 1µg/ml Proteinase K/10mM Tris solución, 15 min., RT. (7.5µl of 20µg/µl PK in 150 ml 10mM Tris, pH 7.4-8.0).

## Material y métodos

---

- Lavado cortes: 1x PBS rinse, 2 tiempos de 10 min.
- Positivar corte control: en DNase I solución (100µl of 200µg/ml), 10 min., lavado RT. 1x PBS Wipe around tissue.
- Marcar el control negativo con solución control (conjugar con solución FITC) y solución anticólageno III:
  - A. Remover en dos tubos de 100 µl (solución conjugada) para control negativos (50µl).
  - B. Tratar con TdT los positivos
    - Tratar a los cortes con 100 µl reactivo anticólageno III.
    - Incubar en cámara húmeda, 60 min., 37°C.
    - Lavar tres veces con 1x PBS.
    - Aplicar 100µl anti-FITC-AP.
    - Incubar en cámara húmeda, 30 min., 37°C.
    - Lavar tres veces 1x PBS.
    - Tratar con buffer a 100mM Tris, pH 8.2, 5 min.
    - Teñir con Vector Blue o Vector Red):
    - Colorantes:
      - 5ml 100 mM Tris, pH 8.2
      - Solución acuosa del sustrato vector.
      - Incubar los cortes con RT. Vector Blue - 10 min.; Vector Red - 5-8 min.
      - Lavar con agua hasta que tome el color la reacción.
      - Montaje con Clycergel (glicerol gelatina, Sigma GG-1).

## **5.7. Estudio morfométrico.**

### **Evaluación cuantitativa de las fibras**

Los porcentajes fibrilares obtuvimos tras el recuento de entre 500 y 1000 fibras de campos transversales y longitudinales elegidos al azar (Latorre, 1990), incluías en fascículos completos, empleando las secuencias fotográficas que reconstruyen la sección completa de los diferentes fibras.

Los valores correspondientes a porcentajes se exportaron al programa HARVARD GRAPHICS 2.0 para Windows con el fin de obtener los diferentes diagramas de sectores.

Los estudios realizados al microscopio electrónico, han sido fundamentalmente descriptivo por lo que no se le ha realizado ningún estudio estadístico.

## **5.8. Microfotografiado.**

Se realizó con la mayor celeridad posible ya que la intensidad y calidad de las reacciones enzimáticas e inmunohistoquímicas disminuyen con el tiempo. Utilizamos un microscopio Leitz Dialux 20 con equipo

fotográfico automático incorporado. Las preparaciones fueron fotografiadas a 4x, 10x, 20x, 40x, utilizando películas en color y blanco y negro.

Las fotografías a 4x y 10x fueron empleadas para realizar una reconstrucción lo más completa posible de las secciones fibrilares obtenidas. Las fotografías a mayores aumentos nos permiten obtener imágenes de un mismo campo histológico sometido a las distintas técnicas, con el fin de analizar el comportamiento de un mismo grupo de fibras y proceder a su identificación y catalogación.

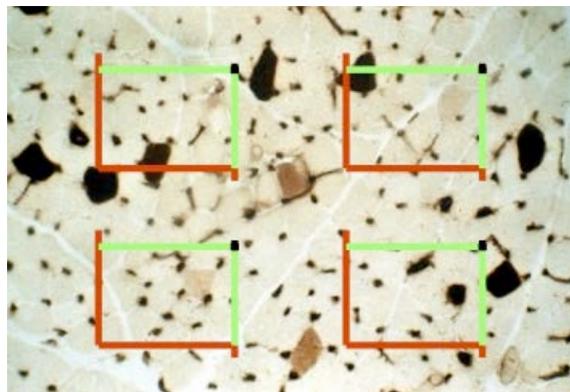
- **Estimación de la densidad numérica.**

Se estimó la densidad numérica de las fibras de colágeno tipo I y tipo III, en un corte transversal y longitudinal, en un plano superponiendo un sistema de test constituido por cuatro áreas de contaje sobre las imágenes microscópicas (Fig. 12).

De este modo el número de perfiles fibrilares por unidad de área fue calculado de acuerdo con la fórmula siguiente (Gundersen et al. 1988):

$$\text{est QA(fibl/tis)} = \Sigma Q\text{fibl} / (\Sigma P\text{(tis)} \cdot a/p)$$

Donde  $QA(\text{nucl}/\text{tis})$  es la densidad numérica de las fibras por unidad de área del tejido,  $\Sigma Q(\text{fib})$  es el número total de perfiles fibrilares contados dentro de las áreas de contaje;  $\Sigma P(\text{tis})$  es el número de puntos que cayeron en el tejido;  $a/p$  es el área asociada con un punto del sistema test (en nuestro estudio,  $a/p = 125 \mu\text{m}^2$ ).



**Figura 12** .Imagen con escalas de sistema test, superpuestas sobre cortes histológicos.

### 5.9. Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el programa estadístico Statgraphic (Centurión XVI®), a través de diferentes pruebas estadísticas y gráficas. Para ver si existían diferencias significativas entre las medias se usó la prueba- F en la tabla ANOVA. Las Pruebas de Múltiples Rangos se utilizaron para comprobar si las medias son

## Material y métodos

---

significativamente diferentes unas de otras, usando el método de LSD de Fisher para discriminar entre las medias. Los resultados se expresan como media  $\pm$  desviación típica y un valor de  $p < 0,05$  fue considerado significativo.

## 5. Resultados



## 5. Resultados

Durante nuestro estudio se evaluaron en todos los grupos los tres componentes esenciales: las células, las fibras de colágeno y la vascularización.

### **5.1. Grupo control.**

Los estudios que hemos realizado en este grupo de investigación, los tres componentes esenciales, las células, las fibras de colágeno y la vascularización, están aparentemente normales.

Las células o tenocitos, son las responsables de dirigir el metabolismo del tejido tendinoso, y fundamentalmente el de las fibras de

colágeno. Estas células se disponen en hileras paralelas entre si, dispuestas en el sentido longitudinal del tendón.

- **Microscopio óptico**

Al M.O. son células muy alargadas, con núcleo localizado en su centro del citoplasma. El borde celular es poco nítido, y el citoplasma es muy alargado, escaso y con una clara basófilia. En los estudios al M.E., hemos podido comprobar la estrecha relación existente entre los tenocitos y las fibras de colágeno, las fibras presionan a las células, modificando su morfología, de tal manera que el citoplasma muestra unas expansiones citoplasmáticas a modo de alas, por lo que los tenocitos también se les conocen como células aladas. Tanto el núcleo como el citoplasma muestran una morfología de células fibrocíticas en fase de reposo, por lo que los organoides citoplasmáticos tienen escaso desarrollo y se evidencia ribosomas que es el motivo de la basófilia.

El colágeno pertenece al tipo I, de ahí que de negativo la reacción al tipo III o cicatricial. Este componente se dispone en gruesos fascículos paralelos entre si y dispuestos siguiendo el eje longitudinal del mismo, para soportar la fuerzas de tensión que se producen sobre él. Pero para soportar

un mínimo de tracción longitudinal, hemos podido comprobar con la tinción del tricrómico, que los fascículos colágenos muestran un cierto grado de ondulaciones, que serán las responsables de poder producir un pequeño estiramiento y su posterior recuperación. (Fig. 13).

- **Microscopio Electrónico**

Al M.E. los fascículos de fibras son homogéneos, y sobre todo que la composición íntima de las fibras de colágeno son muy uniformes, con las clásicas estrías transversales claras y oscuras, presentando un periodo muy regular y uniforme.

El tendón al ser un tejido conectivo denso y modelado, se caracteriza por tener poseer una escasa vascularización, que proviene de un fino mesotendón. Las arterias y venas tienen una mínima expresión, y el componente que más se aprecia son los capilares. Estos vasos muestran una composición de vaso maduro, donde la luz está envuelta por las células endoteliales, y lo que es más importante, tienen bien desarrolladas los pericitos o células de Rouget, con presencia de actina citoplasmática (Figs. 14, 15).

- **Morfometría**

Las medidas de las fibras de colágeno del grupo control fueron aparente normales para los distintos tipos (Tipo I y III) (Fig.16).

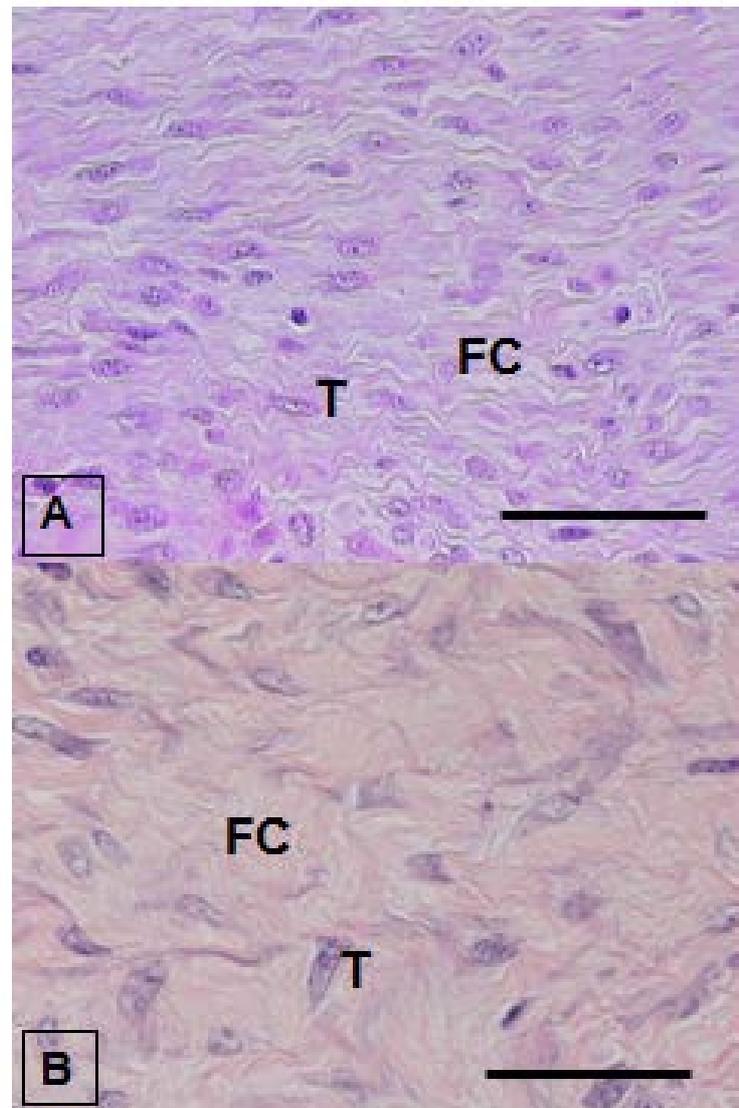


Figura 13. Grupo Control. Microscopio Óptico. Barras de escala 10  $\mu$ m (A), (B).

A. Detalle de tendón normal con los fascículos de colágeno de las fibras normales (CF) y tendocitos normales (T). Tinción H&E.

B. Detalle de tendón normal, con finos fascículos ondulados uniformes (CF) y tendocitos normales (T). Tinción Tricrómico de Masson.

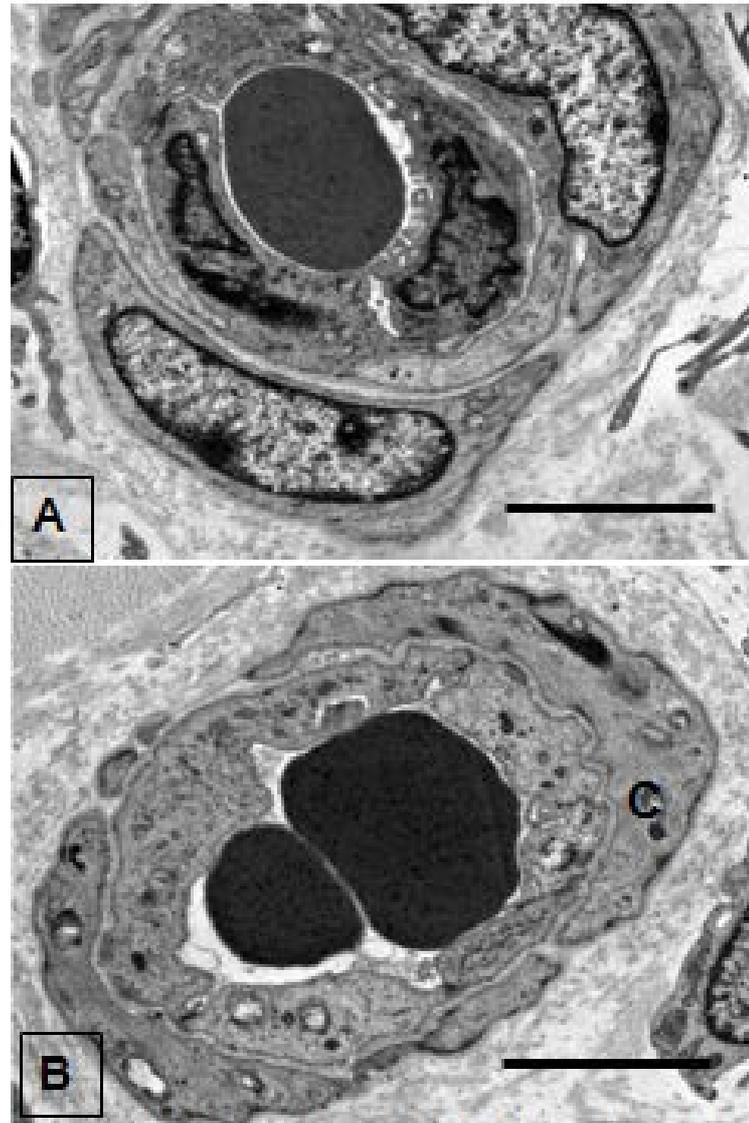


Figura 14. Grupo Control. Observaciones ultraestructurales. Barras de escala 10  $\mu$ m (A), (B).  
A. Detalle de tendón normal.  
B. Detalle de capilar maduro (C).

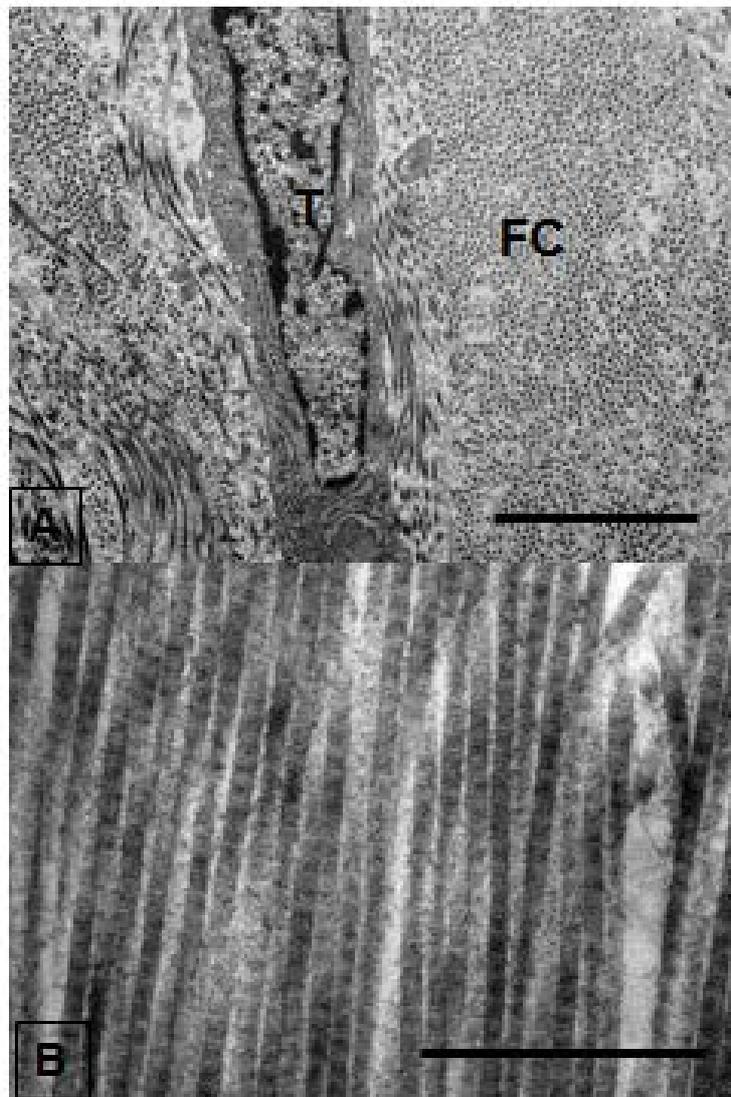
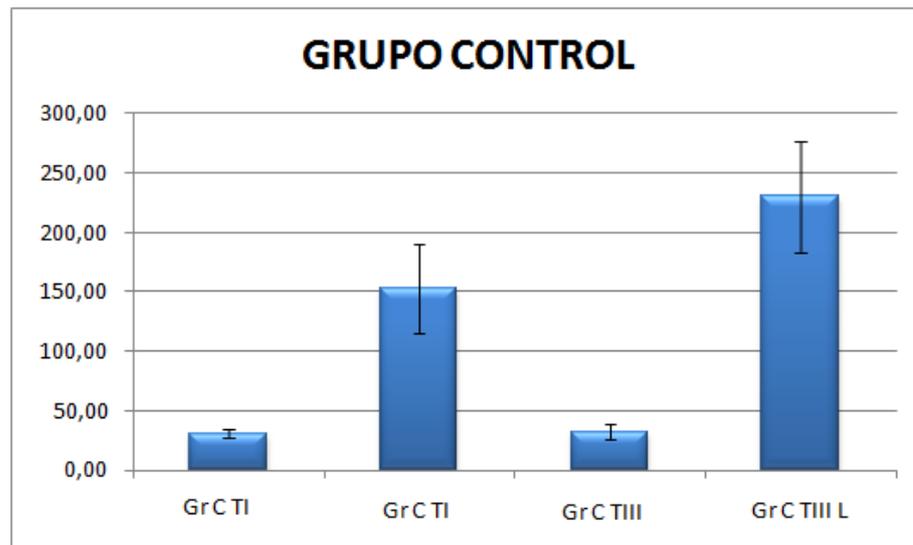


Figura 15. Grupo Control. Observaciones ultraestructurales. Barras de escala 10  $\mu\text{m}$  (A),(B).  
A. Tendón normal con tendocitos (T) con prolongaciones citoplasmáticas y fibras de colágeno (CF).  
B. Tendón normal. Inserto de fibras de colágeno con estrias organizadas.



**Figura 16. Grupo Control.** Porcentaje de las fibras de colágeno (Tipo I y III), corte transversal y longitudinal, del grupo control ( $\pm$ SD).

## **5.2. Grupo tratado con BPA.**

Para conocer si se alteraron tras la exposición al BPA tenemos que tener en cuenta los tenocitos, las fibras de colágeno y, de gran importancia, su vascularización. Debido a que acontecieron procesos inflamatorios en el tendón, se presentaron dos tipos de células por una parte los tenocitos y en segundo lugar, participando en procesos inflamatorios y cicatriciales se observaron células productoras de fibras denominadas fibroblastos.

- **Microscopio óptico**

Los tenocitos se dispusieron en hileras paralelas entre sí, y entre ellas se presentó una neovascularización que las separaban. Estas células fueron alargadas, basófilas de núcleos alargados y bordes citoplasmático poco nítidos (Fig. 17).

- **Microscopio electrónico**

Al M.E. los tenocitos presentaron una morfología de células fibroblástica, con núcleo alargado con cromatina densa, y el citoplasma tenía escasos organoides citoplasmáticos, como correspondían a células fibroblásticas maduras. Aparecieron escasos ribosomas, retículo rugoso y complejo de Golgi. En las células inflamatorias destacó las células fibroblásticas, que se encontraron en el seno del tendón y próximo a los lechos vasculares, tenían una morfología irregular y lo que lo definió fue un amplio retículo rugoso de cisternas irregulares, dispuestas por toda la superficie celular, por lo que las fibras neoformadas se podían liberar en todos los sentidos. Se encontraron algunas células inflamatorias como macrófagos, linfocitos y glóbulos rojos. De los aspectos que destacaron fue un aumento de su vascularización, existiendo en el seno del tendón neovasos que fueron desde metaarteriolas, vénulas y sobre todo abundantes capilares, que solían estar hiperémicas.

En relación de las fibras de colágeno, aparecieron alteraciones, destacándose en primer lugar con la técnica inmunocitoquímica que estas fibras eran del tipo III, colágeno cicatricial. Y por otro lado perdió en parte su distribución en fascículos paralelos, siguiendo recorridos irregulares,

perdiendo parcialmente su relación de los tenocitos. De forma difusa o en pequeños depósitos, las fibras de colágeno, en su constitución y al M.E., mostraron engrosamientos, manteniéndose sus estrías, que se correspondían con microqueloides (Figs.18, 19)

- **Morfometría**

Se produce un aumento de fibras de colágeno tipo III, colágeno cicatricial (Fig.20).

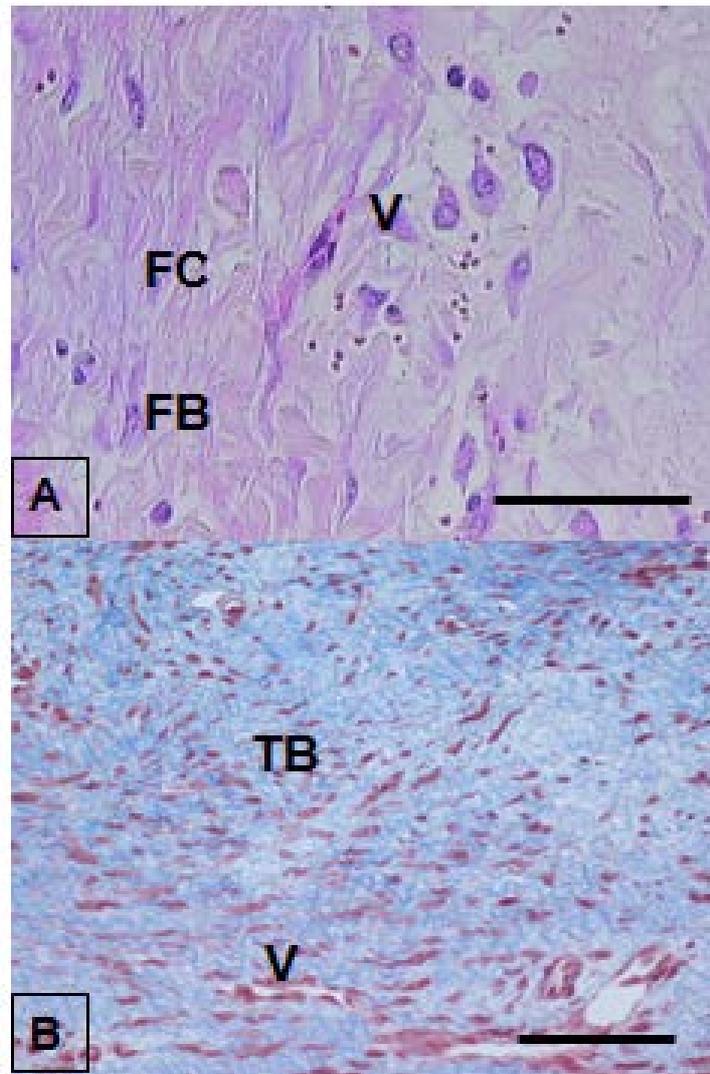


Figure 17. Grupo BPA. Microscopio Optico. Barras de escala 10 µm (A),(B).

A. Detalle de tendón con fibras de colágeno desorganizadas (FC) y vasos abundantes (V). Tendocitoblastos (TB). Tinción H & E.

B. Presencia de tendocitoblastos (TB) y vasos abundantes (V). Tinción tricrómica de Masson.

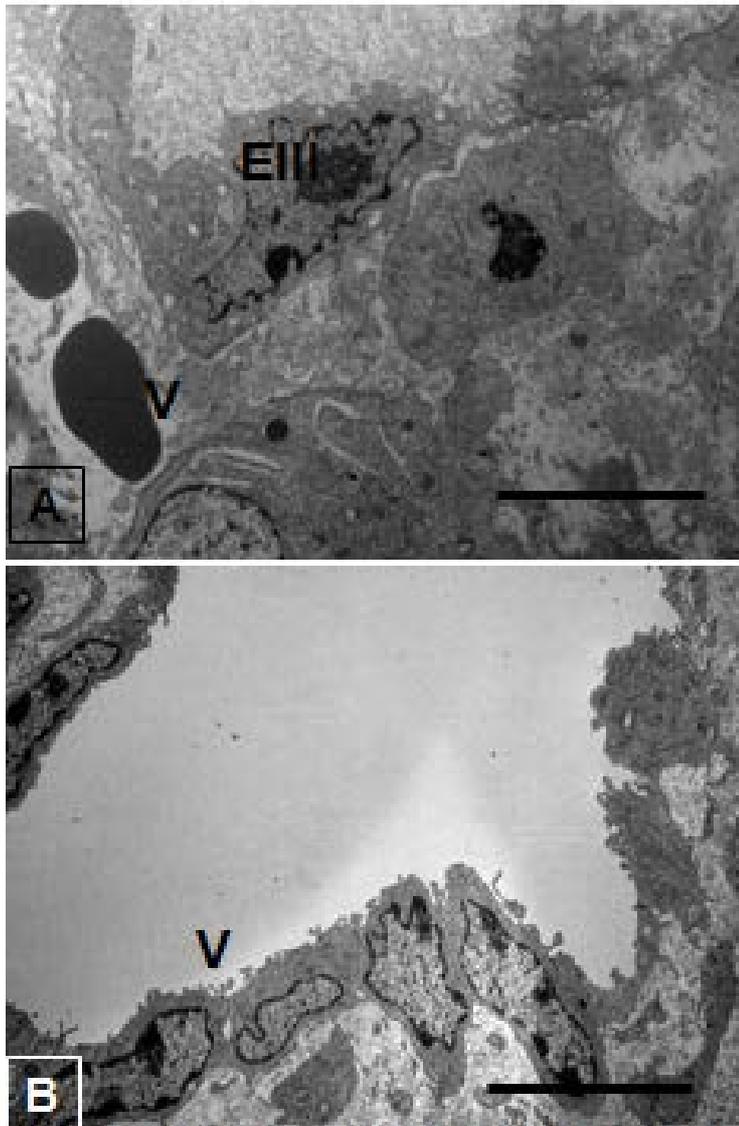
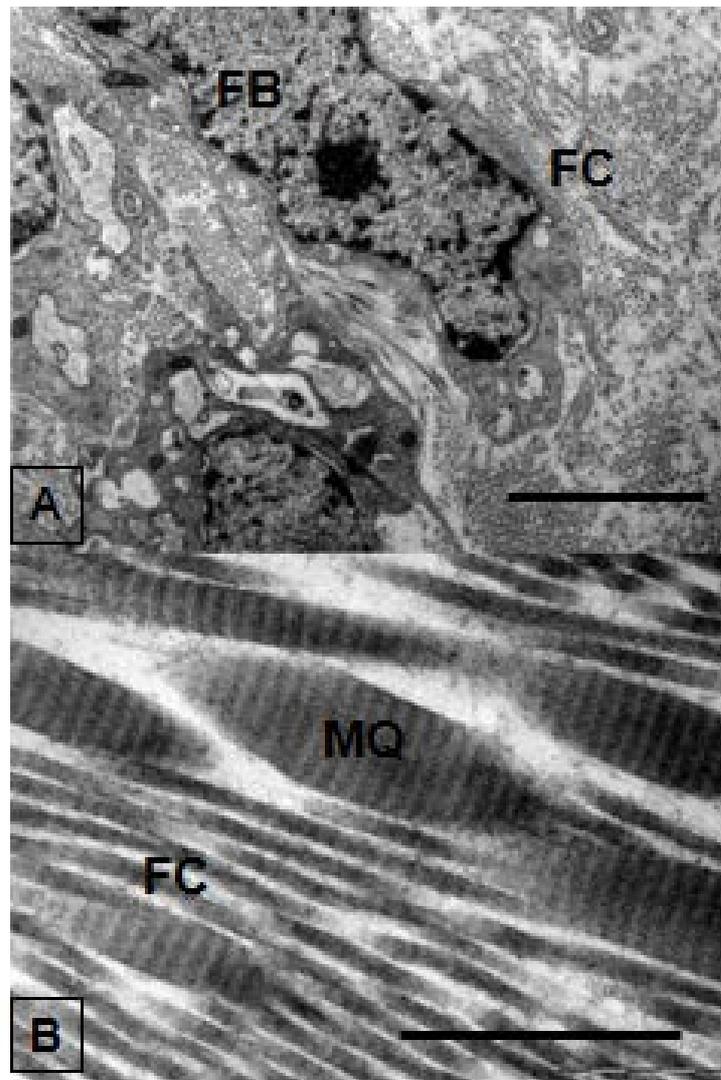


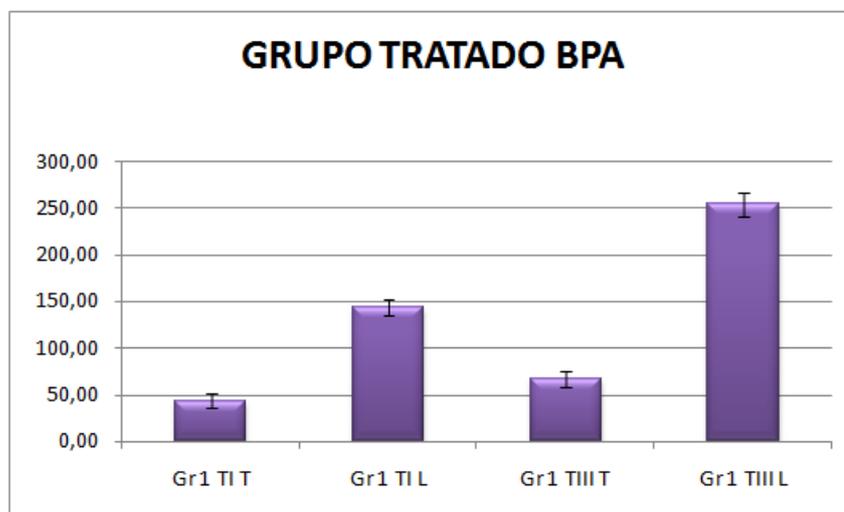
Figura 18. Grupo BPA. Microscopio Electrónico. Barra de escala 10 µm (B)  
A. Capilares neoformados con luces altamente dilatadas (V) y células endoteliales hinchadas (E).  
B. Capilares neoformados con luces muy dilatadas (V).



**Figura 19. Grupo BPA. Microscopio Electrónico. Barra de escala 10  $\mu$ m (A), (B)**

**A. Desorganización de los fascículos de colágeno tipo III de las fibras (CF) y tendocitoblasto (TB)**

**B. Detalle de fibras de colágeno (CF), en el que se observa engrosamiento por microqueloides (MQ)**



**Figura 20. Grupo tratado con BPA.** Porcentaje de las fibras de colágeno (Tipo I y III), corte transversal y longitudinal, del grupo tratado con BPA ( $\pm$ SD).

### 5.3. Grupo tratado con BPA y posterior retirada

En relación a las células se identificaron por una parte los tenocitos, y por otra los fibroblastos. Los tenocitos mantuvieron su morfología de célula fibroblástica madura, alargada con núcleos alargados y densos, y escaso citoplasma basófilo y de escasos organoides citoplasmáticos. Se mantuvo una célula fibroblástica que correspondía a fibroblastos, de morfología irregular, destacándose un retículo rugoso, muy desarrollado, y de luces dilatadas con un contenido homogéneo y claro. La eliminación de las fibras se realizó por toda la superficie celular. Se mantuvo una clara vascularización, sobre todo capilares, aunque menor que en el grupo anterior, y en bridas fibrosas aparecieron vasos de mayor calibre.

En relación a las fibras de colágeno, se caracterizaron porque la mayoría de ellas eran del tipo III, colágeno cicatricial, que coexistían con las fibras de colágeno tipo I, y al M.O. se apreció una distribución muy irregular guardando una escasa relación con los tenocitos (Fig. 21)

Al M.E. la mayoría de las fibras tendinosas eran irregulares, e incluso aparecieron hipertróficas con las estrías muy marcadas (Figs. 22, 23).

- **Morfometría**

En relación a las fibras de colágeno, se caracteriza porque la mayoría de ellas eran del tipo III, colágeno cicatricial, que coexistían con las fibras de colágeno tipo I (Fig. 24).

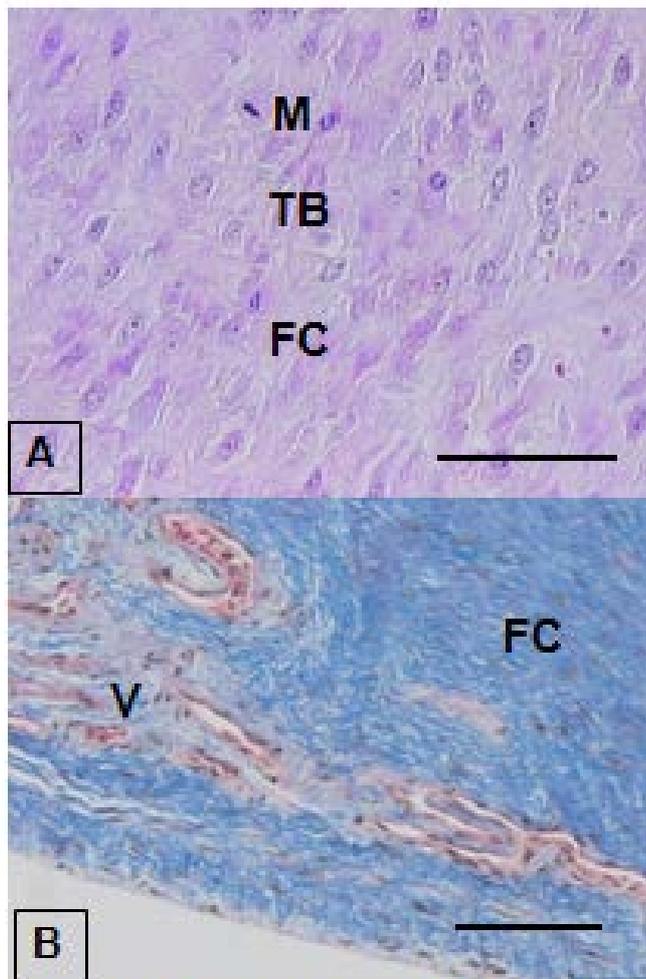


Figura 21. Grupo retirada-BPA. Microscopio Óptico. Barra de escala 10 µm (A), (B).  
A. Presencia de fibrosis de los fascículos de colágeno de la fibra (FC), tenonciotoblasto (TB) y algunas mitosis (M). Tinción H & E.  
B. Detalle de fascículos de colágeno (FC) ondulados y vasos (V). Tinción tricrómica de Masson.

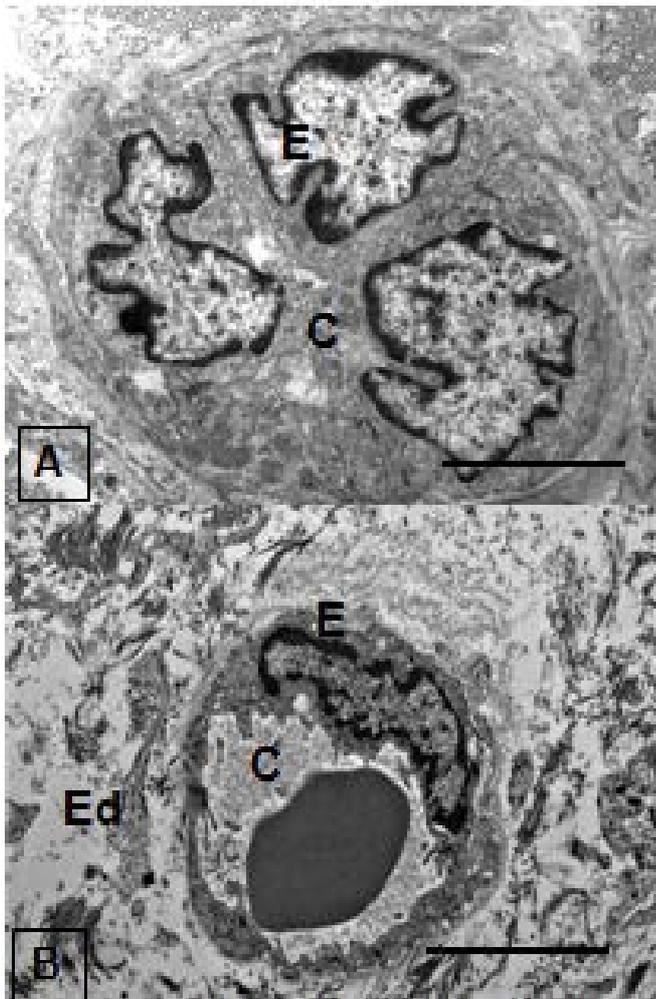


Figura 22. Grupo retirada-BPA. Microscopio Electrónico. Barra de escala = 10  $\mu$ m (A), (B).  
A. Capilares jóvenes (V), con células endoteliales hinchadas (E).  
B. Capilares jóvenes (C), con células endoteliales hinchadas y edemas (Ed).

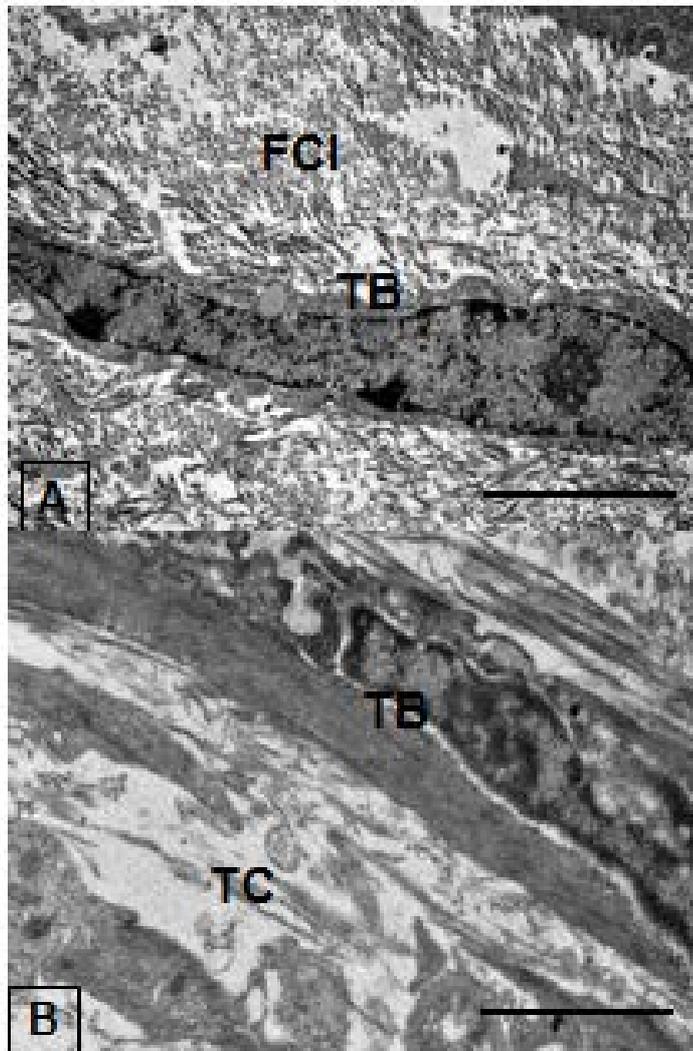
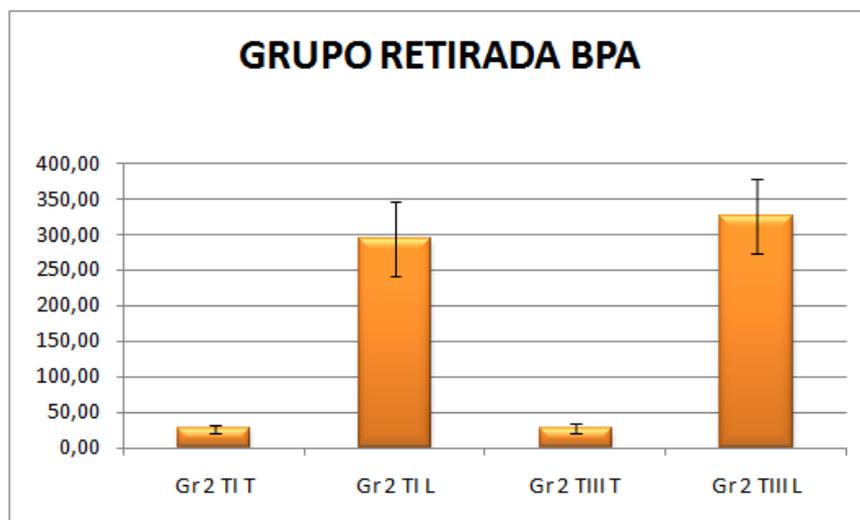


Figura 23. Grupo retirada-BPA. Microscopio Óptico.  
Barra de escala 10  $\mu$ m (A), (B).  
A. Presencia de abundantes fascículos de colágeno tipo I (FCI) con fibras desorganizadas y tendocitoblastos (TB).  
B. Detalle de fibras con tendocitoblastos (TB) y topocolágeno (TC).



**Figura 24. Grupo retirada BPA.** Porcentaje de las fibras de colágeno (Tipo I y III), corte transversal y longitudinal, del grupo retirada BPA ( $\pm$ SD).

### **5.4. Grupo tratado con PRP**

Considerando que las células son el componente esencial, sobre el que actuarán los factores de crecimiento, y su activación es la responsable de la recuperación tendinosa, hay que indicar que las células estudiadas se encuadraron en dos tipos, en primer lugar tenocitos, y en segundo lugar los tenocitos muy activados a modo de células fibroblásticas que se denominaron tenocitoblastos, al ser las responsables de la formación de fibras de colágeno (Fig. 25).

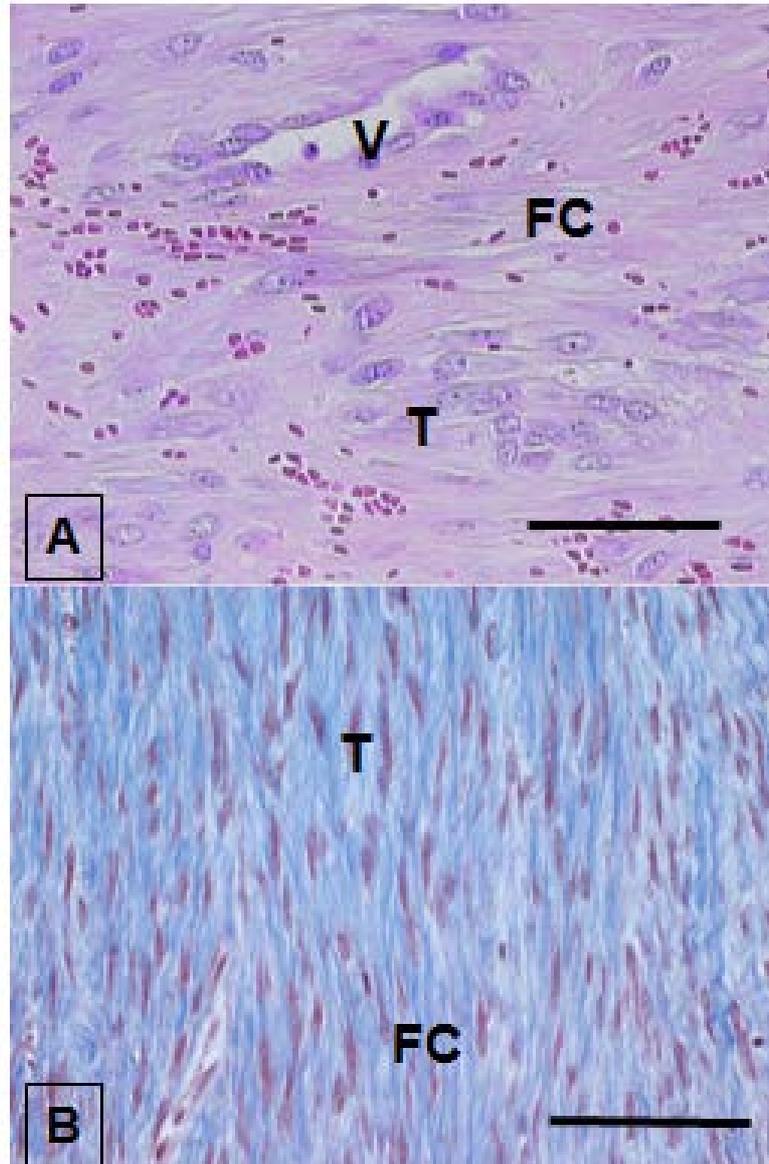
Los procesos inflamatorios y degenerativos prácticamente desaparecieron, y en su lugar los tenocitos se mostraron como células maduras, que se relacionaron con las fibras y se dispusieron en hileras paralelas unas a otra, de morfología alargada y núcleos densos y con organoides citoplasmáticos evidentes. Sin embargo, las células que resultaron de interés fueron los tenocitoblastos, que ocupaban el lugar de los fibroblastos, que no sólo eran las responsables de formar las fibras sino también su orientación posterior en el seno del tendón. Las fibras que formaban estas células pertenecían a colágeno tipo I y no formaban el de tipo III, que es que se correspondía a los procesos cicatriciales. Los tenocitoblastos se mostraron como células alargadas, grandes y muy basófilas, al M.E. se observó gran cantidad de organoides, complejo de

Golgi, y sobre todo retículo rugoso, cuyas luces no estaban dilatadas y mostraban un revestimiento de ribosomas muy evidente.

En este grupo ha disminuido el lecho vascular, quedando prácticamente sólo capilares correctamente formados y maduros con revestimiento de pericitos, y con escaso tejido fibrilar asociado. Las fibras de colágeno dieron negativo la reacción al colágeno tipo III, y al formarse mostraron la trayectoria longitudinal, que le marcó los tenocitoblastos. Junto a su orientación longitudinal se apreció la suave ondulación clásica en estos componentes. Finalmente, al M.E. las fibras son homogéneas con estrías uniformes, sin mostrar en ningún momento engrosamientos o estructuras atípicas (Figs. 26, 27).

### **Morfometría**

Las fibras de colágeno tipo I aumentan, y no se forman fibras de tipo III, que es que se corresponde a los procesos cicatriciales (Fig. 28).



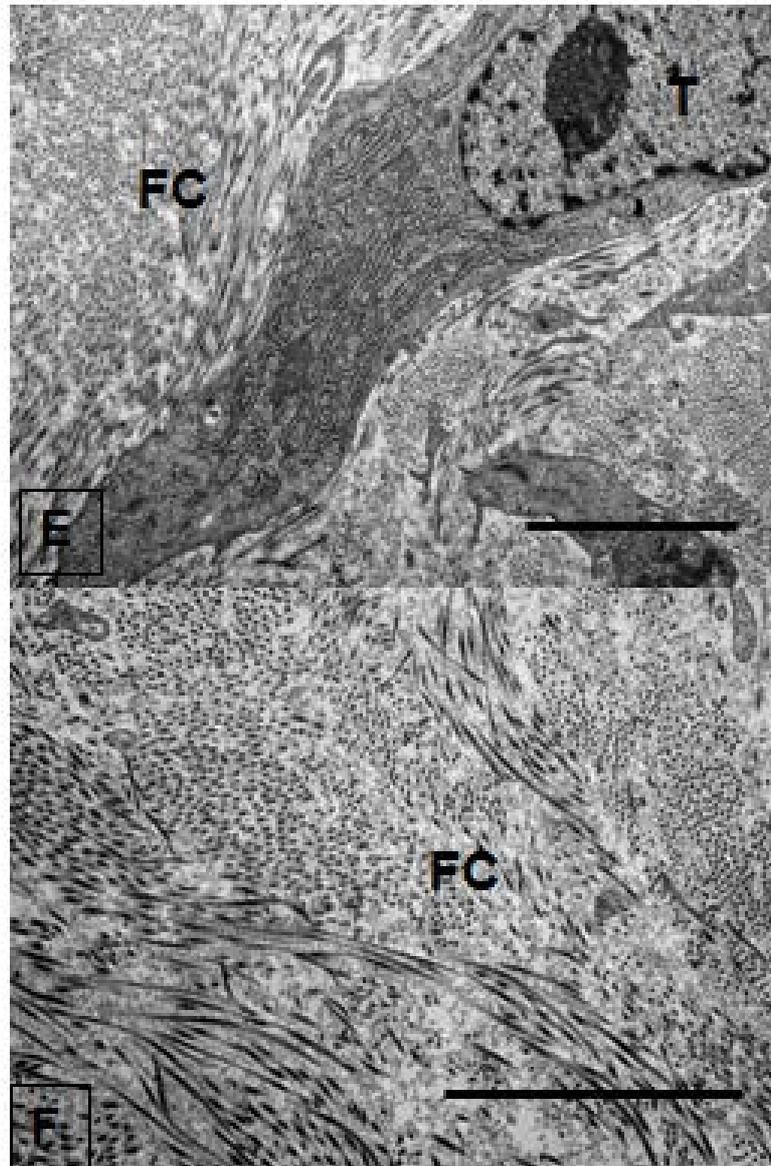
**Figura 25. Grupo tratado con PRP. Microscopio Optico**  
.Barras de escala 10 µm (A), (B).  
A.Presencia de fascículos de colágeno de la fibra (FC),  
capilares (V) y tendocitoblasto (TB). Tinción H & E  
B.Fibras de colágeno (FC) y tendocitoblastos (TB).  
Tinción tricrómica de Masson.



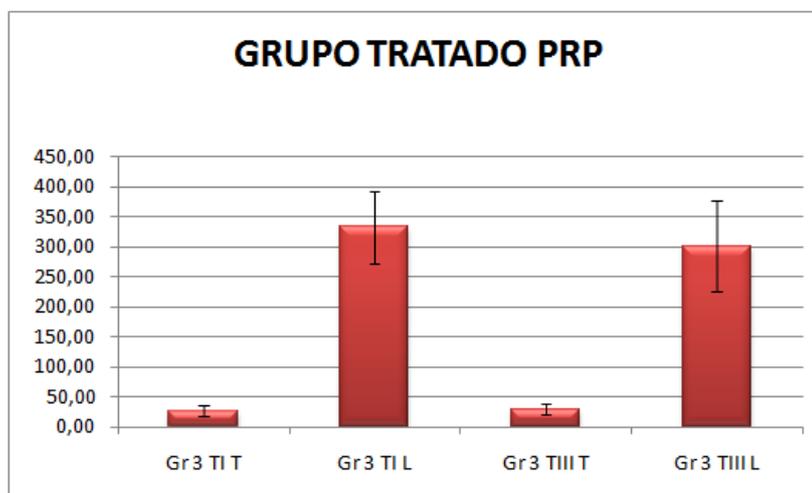
Figura 26. Grupo tratado con PRP. Microscopio Electrónico. Barra de escala 10  $\mu$ m (B).

A. Capilares (C) organizados con endotelio (E) y pericitos (P).

B. Capilares (C) organizados con endotelio (E).



**Figura 27. Grupo tratado con PRP. Microscopio Electrónico. Barras de escala 10  $\mu$ m (A), (B).**  
A.Presencia de fibroblastos con un retículo altamente activo (TB) y fibras de colágeno organizadas (FC).  
B.Detalle de fibras maduras (FC), con estrías muy definidas.



**Figura 28. Grupo tratado con PRP.** Porcentaje de las fibras de colágeno (Tipo I y III), corte transversal y longitudinal, del grupo tratado con PRP ( $\pm$ SD).



## 6. Discusión



## 6. Discusión

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

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

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

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

de las cuales el BPA puede estimular una respuesta celular a muy bajas dosis (Welshons et al., 2006). Los efectos de dosis bajas de disruptores endocrinos como el BPA están mediados por las vías de señalización endocrina que han evolucionado para actuar como potentes amplificadores, teniendo como resultado la aparición de cambios importantes en la función celular (Welshons et al., 2003).

La acción del BPA como disruptor neuroendocrino ha sido ampliamente estudiada (Molina et al., 2013; Jedeon et al., 2016; Lora et al., 2016; Rhaman et al., 2016; Barasona et al., 2017), debido a su importancia como contaminante medioambiental y alimentario.

En estudios previos de nuestro grupo de investigación, hemos podido comprobar como exposiciones a compuestos con actividad disruptora producen procesos degenerativos a nivel gonadal (Blanco et al., 2007; Blanco et al., 2009; Patrignani et al., 2014), y en concreto como el BPA produce importantes efectos a nivel ovárico y testicular que podrían interferir en la fertilidad (Molina et al., 2013; Lora et al., 2016), además de modificaciones en otros sistemas como el musculoesquelético (Giménez et al., 2016).

La acción estrogenizante del BPA produce un aumento en la producción endógena de 17- $\beta$ -estradiol y de otras hormonas, que se sintetizan naturalmente en el organismo, pero al ser expuestas al disruptor, su producción aumenta (YANG et al., 2014). Este hecho podría indicarnos que los efectos generados en el tejido

musculoesquelético podrían ser producidos como secundarios a la acción de la BPA, ya que estas hormonas endógenas podrían actuar de forma anabolizante (HUANG et al., 2000).

En el presente trabajo de investigación, pretendemos analizar las lesiones que se producen en el tendón de Aquiles de cerdos tratados con disruptores, como es el BPA.

Como planteamiento general, en este capítulo de discusión de nuestras investigaciones, queremos significar que nuestro trabajo ha consistido en conocer las alteraciones que sufren los tendones mediante parámetros microscópicos tanto normales como modificados, con el uso del BPA. Para nosotros el motivo fundamental que nos ha llevado a realizar este trabajo es conocer los fenómenos íntimos que acontecen sobre las fibras tendinosas para facilitar la comprensión de los resultados que posteriormente se pueden obtener del estudio de las uniones musculo tendinosas.

Desarrollaremos el análisis de los hallazgos siguiendo el mismo orden establecido en los resultados; en primer lugar realizaremos un estudio de todas las modificaciones manifestadas en los tendones de cerdos tratados con BPA, en segundo lugar analizaremos las lesiones morfológicas que presentan en dichos tendones, y finalmente realizaremos un estudio comparativo del cuadro lesional en los animales de los tres grupos de experimentación.

En nuestro estudio hemos observado en el grupo control, hemos podido comprobar, que los tenocito o células aladas, su citoplasma se encuentra presionado por los fascículos de fibras, modificando su morfología, presentando unas prolongaciones planas y alargadas. Además el hecho de carecer prácticamente de organoides citoplasmáticos, solo participa en el metabolismo general del tendón, con una paralización de la formación del colágeno. Estas células tendinosas, modifican su morfología al ser tratado el tendón por factores de crecimiento plaquetarios, aumentando todos sus organoides citoplasmáticos, sobre todo los que se relacionan con la síntesis del colágeno, como son el retículo rugoso y el complejo de Golgi. Este tipo de tenocito se transforma en un tenocitoblasto, y se relaciona con la producción del las fibras de colágeno tipo I.

En el grupo que estuvo expuesto de forma permanente al BPA se produjeron procesos degenerativos que afectaron tanto a las células como a los fascículos de fibras de colágeno de los tendones. Estas alteraciones se agravaron por injerencias inflamatorias que alteraron gravemente las degeneraciones, y que fueron la causa no sólo de pérdida de funcionalidad sino también de posibles roturas tendinosas siendo este tipo de lesiones similares a las producidas debido a enfermedades metabólicas descritas previamente por Abate et al. (2013). Los procesos inflamatorios se pudieron considerar como vicariantes para contrarrestar las degeneraciones, pero estos procesos defensivos podrían ser negativos, ya que uno de los fenómenos que conllevó fue la llegada de vasos sanguíneos al territorio tendinoso, lo que transformó a los

mesotendones en gruesos cordones conectivos con los neovasos. Esta situación hace que se generen adherencias del tendón a las vainas con lo que se podría perder movilidad. Estos puntos de fijación tendinosa se intensificaron al producirse indiscriminadamente colágeno III por parte de los fibroblastos cicatriciales, a problema que podría afectar el atletismo. Si existe un cambio en la organización estructural del tejido colágeno, sus propiedades biomecánicas podrían ser modificadas (Jeffrey & Jeffrey, 1991).

Por los resultados obtenidos, hemos comprobado que los efectos producidos por la acción del bisfenol son reversibles, por lo que al dejar de estar expuestos al BPA se detuvo la acción degenerativa, pero debido al tipo de tejido conectivo fibroso formado en los tendones, la recuperación total de los mismos fue incompleta, sobre todo por mantenerse los puntos de adherencia del tendón a la vaina, que produjo una zona de anclaje que les disminuyó el movimiento de deslizamiento, y también porque el colágeno tipo III formado por la cicatrización, carecía de la capacidad de organizarse en gruesos fascículos longitudinales, y se solía disponer como zonas fibrosas en el seno del tendón, con lo que perdería su capacidad de tracción.

Normalmente las fibras de colágeno tipo III, muestran una morfología estriada, pero cuando se forman en el seno de tejidos fibrosos, se sintetizan anormalmente y se producen unos engrosamientos atípicos conocidos como microqueloides, y se convirtiéndose en lugares sensibles a las roturas (Abate et al., 2013; Rochester et al.,

2013). En la actualidad no existen referencias en cuanto a la acción directa del BPA a nivel tendinoso, y muy pocas las relacionadas con su acción a nivel muscular (Mortavazi et al., 2013; Wang et al., 2013; Giménez et al., 2016), si bien en este sentido las modificaciones observadas por Giménez et al. (2016) podían ser compatibles con las originadas por tratamientos exógenos con compuestos hormonales coincidiendo en este punto con estudios previos en los que se informó un aumento de la fibra de colágeno anormal después de la administración de esteroides anabólicos (Jeffrey & Jeffrey, 1991). En nuestro estudio, observamos que tanto en el grupo BPA como en el grupo de retirada de BPA se mantuvo el colágeno III inmerso en el colágeno I, situación que produjo que el colágeno III aumentara la polimerización del tropocolágeno, y en lugar de formar colágeno homogéneo con estrías, se detectaran microqueloides que podrían transformarse en zonas de rotura.

En el grupo PRP se detuvieron los procesos inflamatorios, al aplicarse sobre el tendón los factores de crecimiento plaquetarios, comprobamos una drástica disminución de los vasos, con lo que se detuvo la llegada de componentes inflamatorios, destacándose la pérdida de las adherencias tendinosas y el mesotendón se hizo más fino y flexible. En procesos de cicatrización normales los fibroblastos producirían fibrosis, pero en estudios de roturas de tendones tratados con factores de crecimiento, los propios tenocitos se transforman en tenocitoblastos, y en lugar de sintetizar fibras de colágeno tipo III, forman colágeno tipo I, que se orientan en

fascículos distribuidos longitudinalmente (Molloy et al., 2003; Hsu et al., 2004; Gaweda et al., 2010).

En nuestro estudio hemos podido comprobar procesos compatibles con otros de diversa índole descritos en rotura tendinosa tratadas con plaquetas, los fibroblastos cicatriciales disminuyeron e incluso desaparecieron, y por otra parte una activación celular del tenocito, que aumentó el tamaño y desarrolló los organoides formadores de proteínas que fueron fundamentalmente el retículo rugoso y el complejo de Golgi, y además presentaron una orientación longitudinal, paralelos a los fascículos colágenos. Por una parte, la disminución de los fibroblastos cicatriciales fue la responsable de que disminuyera notablemente el colágeno III, y gracias a la activación de los tenocitos se favoreció la formación del colágeno I, y debido a la disposición longitudinal de las células tendinosas este colágeno I, se dispuso longitudinalmente al eje del tendón, favoreciéndose la formación de los fascículos fibrosos que incluso hemos podido comprobar mostró ondulaciones en sentido longitudinal al eje tendinoso, demostrándose la capacidad regeneradora de las PRP en lesiones inducidas por la exposición al BPA que garantizaría la funcionalidad del tendón.

Debido a los procesos degenerativos producidos por la acción del bifenolA sobre los tejidos tendinosos, los tenocitos se transforman en células blásticas, similares a los fibroblastos, lo que facilita la producción de fibras de colágeno tipo III, que corresponden al colágenos cicatricial, y junto a esta transformación aparecen por

todo el territorio tendinoso, células blásticas similares a los fibroblastos, favoreciendo un cambio del colágeno tipo I al tipo III, con lo que se desorganiza los fascículos del colágeno.

Hemos podido comprobar cómo los tenocitos, regresan a su estado inicial, con los tratamientos plaquetarios, quedando en el seno del tendón como células maduras a modo de fibrocitos en el tejido conectivo.

Sin duda algunas, la morfología y función de los tendones, se deben a los fascículos de fibras de colágeno. Este colágeno, que corresponde al tipo I, distribuye sus fibras en gruesos fascículos, paralelos entre sí. Los fascículos paralelos, muestran en su recorrido longitudinal, una ondulación, que permite un estiramiento en su eje mayor en el momento de su tracción, y una recuperación de su tamaño, al cesar las fuerzas que motivaron el desplazamiento.

Pero por motivos anormales, existe un cambio de colágeno tipo I, por el tipo III o inflamatorio, se pierde tanto la organización longitudinal y fundamentalmente las ondulaciones fibrilares, lo que lleva a presentar graves problemas en el estiramiento de sus fascículos, de ahí la gravedad que tiene los procesos inflamatorios tanto agudos como crónicos en los tendones.

La transformación final de los tenocitos en tenocitoblastos, por la acción de los factores de crecimiento plaquetarios, facilita la recuperación de los fascículos de fibras

de colágeno tipo I, por lo que se revierten los fascículos de colágeno, reorganizándose en su eje longitudinal del tendón, y en su mayor parte recuperan la ondulación que los definen.

Por definición, el tendón es un tejido fibroso organizado, con un mínimo de vasos sanguíneos, para que apenas lleguen a esta zona sangre y no se transformen el colágeno tipo I en colágeno tipo III y modifique su morfología y función. La escasa vascularización procede de los finos cordones conectivos que unen el tendón a su vaina y que se denomina mesotendón. Pero biológicamente en procesos degenerativos, para recuperar su entidad, sufren procesos inflamatorios que llevaran a estas zonas afectadas mayor cantidad de vasos sanguíneos, con un aumento en el grosor del mesotendón, con grave peligro que se produzcan adherencias entre la vaina y el tendón, imposibilitando el normal deslizamiento del tendón dentro de su vaina. Hemos podido comprobar que la acción del BPA, favorece la aparición de células inflamatorias en los focos degenerados, y el consecuente aumento vascular, que termina por fijar por microadherencias el tendón a su vaina, perdiendo parcialmente su movilidad. Estos procesos pueden ser reversibles, ya que con los factores de crecimiento plaquetarios, interrumpen la llegada masiva de vasos, y además maduran los existentes, como hemos podido comprobar con la diferenciación de los pericitos envolviendo a la luz del capilar.

Uno de los riesgos que se producen en los procesos degenerativos, producidos por el BPA en el tendón, es la continua polimerización de topocolágeno, en la formación de la fibra de colágeno. Este fenómeno conlleva una modificación en la morfología de las fibras de colágeno, con un claro engrosamiento puntual de los fascículos de colágeno, que se denominan microqueloides. Estas modificaciones morfológicas alteran fundamentalmente el funcionamiento de tracción del tendón, formándose zonas que pueden sufrir microroturas en el funcionamiento normal del tendón, que pueden terminar en roturas totales del tendón.

Los factores de crecimiento plaquetarios por tanto, no solo detienen los procesos de polimerización, sino que recuperan la estructuras de los microqueloides, devolviéndole al tendón su función.



## 7. Conclusiones



## 7. Conclusiones

### **Primera**

Las modificaciones producidas en los tendones de Aquiles con por la acción del BPA en *minipig*, permiten obtener un patrón patológico, que permite obtener como prototipo de alteraciones y poder estudiar posteriormente su recuperación del tratamientos con factores de crecimiento plaquetarios.

### **Segunda**

La acción del BPA sobre el tendón de Aquiles, modifica gravemente los componentes celulares, los tenocitos se transforman en fibroblastos, y estas células blásticas producen fibras de colágeno del tipo III o cicatriciales, perdiéndose parcialmente las fibras de colágeno tipo I.

### **Tercera**

La vascularización de los tendones del grupo control se realiza, de forma fisiológica, por escasos vasos que proceden del mesotendón, mientras que la acción del BPA producen en los grupos tratados, una hiperplasia e hipertrofia que conlleva una llegada masiva de neovasos, que provocan una tendinitis.

### **Cuarta**

La hipertrofia de las fibras colágenopor la acción del BPA, se debe principalmente a un aumento del material fibroso. Este fenómeno se ha podido detectar incluso al microscopio óptico por un aumento del tamaño de las fibras, observada con mas claridad mediante el estudio ultraestructural.

### **Quinta**

En el grupo tratado con factores de crecimiento, los fibroblastos, se configuran como tenocitoblastos, y actúan siguiendo dos patrones, en primer lugar un aumento organizado del número de las células germinales, y en

segundo lugar reproduciendo las fibras de colágeno, su distribución espacial, de forma similar a las fibras tendinosas normales.

### **Sexta**

En la recuperación de las fibras tendinosas alteradas por degeneración, en el tendón de los animales los tratamientos con factores de crecimiento, se activan las células tendinosas propias de tendón, y apenas actúan las células fibroblásticas que provienen del territorio vascular.

### **Séptima**

Los organoides que participan en la síntesis de proteínas fibrosas, en los grupos tratados con factores de crecimiento, se hacen más evidentes, con un amplio desarrollo de las vesículas de transferencia y ribosomas, y sobretodo polirribosomas. Este aumento de actividad lleva a que en una primera fase comiencen a producir filamentos de colágeno de forma indiscriminada, y posteriormente los nuevos filamentos, en la segunda fase, se reorganicen formando los nuevos fascículos tendinosos.

### **Octava**

Tanto con el microscopio óptico como electrónico, se comprueba la recuperación de los fascículos de fibras de colágeno, en los tratamientos con PRP, en tendones tratados previamente con BPA. De ahí que encontremos profundas diferencias entre los grupo de recuperación sin tratamiento, sólo con la retirada del BPA, y el del posterior tratamiento con factores de crecimiento tras la retirada del BPA.

### **Novena**

Con el microscopio electrónico, hemos podido comprobar, que la acción del BPA, produce un defecto de la polimerización del tropocolágeno, que produce graves alteraciones de las fibras de colágeno, produciendo microqueloides, zonas que frecuentemente son asiento de microroturas tendinosas.

### **Decima**

Los factores de crecimiento plaquetarios por tanto, no solo detienen los procesos de polimerización, sino que recuperan la estructuras de los microqueloides, devolviéndole al tendón su función.

## 8. Resumen/Summary



## 8. Resumen/Summary

### Resumen

El bisfenol A es un conocido compuesto de actividad estrogénica que se produce por toneladas en el mundo, y que es ampliamente utilizado como componente de los envases de alimentos, siendo frecuente su migración al alimento y su aparición como contaminante ambiental. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos a nivel tendinoso del bisfenol A, su posible reversión tras la retirada de la exposición, y su recuperación tras la aplicación de plasma enriquecido con plaquetas y monocitos medulares. Para ello, se utilizó la histología como herramienta fundamental en la evaluación del tendón tras la exposición al bisfenol A. Nuestros resultados mostraron como tras la retirada del BPA existió una recuperación de las lesiones originadas disminuyendo las fibras de colágeno de tipo III así como los procesos de vascularización tendinosa, y que en el grupo al que se les aplicó PRP apareció una recuperación casi total de las lesiones ocasionadas, dando negativo la inmunocitoquímica a las fibras de colágeno tipo III. Sin embargo, el empleo de monocitos medulares se descartó dado el escaso efecto sobre el tendón.

**Palabras clave:** Bisfenol-A, tendón, histopatología, colágeno, plasma rico en plaquetas, monocitos medulares.

## Summary

Bisphenol-A is a known compound with estrogenic activity, which is produced in tonnes world-wide and is abundantly used as a component of food containers, so that it frequently migrates into food and appears as an environmental pollutant. This study aimed to assess the effects of Bisphenol-A at a tendon level, its possible reversal after withdrawing it from exposure, and its recovery after the application of plate-enriched plasma. For this purpose, histopathology employment was a fundamental tool in the evaluation of the tendon after exposure to Bisphenol-A. Our results showed how, after withdrawal of BPA, there was a recovery from the lesions caused, with a diminution in the type III collagen fibres along with tendon vascularization processes; in the group to which PRP and medullary monocytes was applied, an almost complete recovery from the lesions caused appeared, and the immunocytochemistry was negative at the type III collagen fibres. However, the use of medullary monocytes was discarded given the limited effect on the tendon.

**Keywords:** Bisphenol-A, muscle, histopathology, collagen, platelet-rich plasma, medullary monocytes

## 9. Bibliografía



## 9. Bibliografía

- Abate M., Schiavone V., Salini I., Andia I. (2013). Occurrence of tendon pathologies in metabolic disorders. *Rheumatology (Oxford)*. Apr;52(4):599-608
- Altamirano G. A., Muñoz-de-Toro M., Luque E. H., Gómez A. L., Delconte M. B., Kass L. (2015). Milk lipid composition is modified by perinatal exposure to bisphenol A. *Molecular and Cellular Endocrinology* 411, 258-267.
- Andersen I. S., Lindeman L. C., Reiner A. H., Ostrup O., Aanes H., Aleström P., Collas P. (2013). Epigenetic marking of the zebrafish developmental program. *Current Topics in Developmental Biology* 104, 85-112.
- Andia I, Sanchez M, Maffulli N. Tendon healing and platelet-rich plasma therapies. (2010). *Expert Opin Biol Ther*. Oct;10(10):1415-26.
- Andra S. S., Charisiadis P., Arora M., van Vliet-Ostapchuk J. V., Makris K. C. (2015). Biomonitoring of human exposures to chlorinated

- derivatives and structural analogs of bisphenol A. *Environment International* 85, 352-379.
- Andra S. S, Austin C., Yang J., Patel D., Arora M. (2016). Recent advances in simultaneous analysis of bisphenol A and its conjugates in human matrices: Exposure biomarker perspectives. *Science of the Environment* 572, 770-781.
  - Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. (2004). Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost. Jan*; 91(1):4-15.
  - Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, Zalduendo M, de la Fuente M, Orive G, Azofra J, Andia I. (2006). Autologous fibrin matrices: a potential source of biological mediators that modulate tendon cell activities. *J Biomed Mater Res A. May*;77(2):285-93.
  - Anitua E, Sanchez M, Orive G, Andia I. Shedding light in the controversial terminology for platelet rich products. (2009). *J Biomed Mater Res A. Sep 15*;90(4): 1262-3.
  - Anitua E, Sanchez M, Merayo-Lloves J, De la Fuente M, Muruzabal F, Orive G. (2011). Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates proliferation and migration of primary keratocytes and conjunctival fibroblasts and inhibits and reverts TGF-beta1-Induced myodifferentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci. Aug 1*; 52(9):6066-73.
  - Aspenberg P, Virchenko O. Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. (2004). *Acta Orthop Scand. Feb*;75(1):93-9.
  - Ankley G. T. , Johnson R. D. (2016). Small fish models for identifying and assessing the Effects of Endocrine-disrupting chemicals. *ILAR journal* 57, 469-483.
  - ANSES (20/06/2016). Recuperada 22 de junio, 2017 de <https://www.anses.fr/en/content/bisphenol>.

- Balakrishnan B., Henare K., Thorstensen E. B., Ponnampalam A. P., Mitchell M. D. (2010). Transfer of bisphenol A across the human placenta. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 202, 393.
- Berenson MC, Blevins FT, Plaas AH, Vogel KG. Proteoglycans of human rotator cuff tendons. 1(996). *J Orthop Res.* Jul;14(4):518-25.
- Berkner S., Streck G., Hermann R. (2004). Development and validation of a method for determination of trace levels of alkylphenols and bisphenol A in atmospheric samples. *Chemosphere* 54, 575-584.
- Blanco A., Moyano R., Molina A., Blanco C., Flores-Acuña R., García-Flores, M., Espada M., Monterde J.G. (2009): Quantitative study of Leydig cell populations in mice exposed to low doses of cadmium. *Bull Environ Contam Toxicol* 82, 756-760
- Blanco A., Moyano R., Vivo J., Flores-Acuña R., Molina A., Blanco C., Agüera, E. Monterde J.G. (2007). Quantitative changes in the testicular structure in mice exposed to low doses of cadmium. *Environ Tox Pharm* 23, 96-101
- Bosch G, van Schie HT, de Groot MW, Cadby JA, van de Lest CH, Barneveld A, van Weeren PR. Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: a placebocontrolled experimental study. (2010). *J Orthop Res.* Feb;28(2):211-7.
- Braun J.M., Hauser R. (2011). Bisphenol A and children's health. *Current opinion in pediatrics* 23, 233-239.
- Brion F., Page Y. L., Piccini B., Cardoso O., Tong S. K., Chung B. y Kah O. (2012). Screening Estrogenic Activities of Chemicals or Mixtures in vivo using Transgenic (cyp19a1b-GFP) Zebrafish Embryos. *PLoS ONE* 7(5): e36069. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036069>

- Bryant AL,. (2008). Effects of estrogen on the mechanical behavior of the human Achilles tendon in vivo. *J Appl Physiol* 105:1035-43.
- Calafat A. M., Kuklennyik Z., Reidy J. A., Caudill S. P., Needham L. L. (2005). Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environmental Health Perspective* 113, 391-395.
- Calafat A. M., Longnecker M. P., Koch H. M., Swan S. H., Hauser R., Goldman L. R., Lanphear B. P., Rudel R. A., Engel S. M., Teitelbaum S. L., Whyatt R. M., Wolff M. S. (2015). Optimal exposure biomarkers for nonpersistent chemicals in environmental epidemiology. *Environmental Health Perspective* 123, 166-168.
- Calafat A. M., Ye X. Y., Wong L. Y., Reidy J. A., Needham L. L. (2008). Exposure of the US population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environmental Health Perspective* 116, 39-44.
- Cantonwine D., Meeker J. D., Hu H., Sánchez B. N., Lamadrid-Figueroa H., Mercado-García A., Fortenberry G. Z., Calafat A. M., Téllez-Rojo M. M. (2010). Bisphenol A exposure in Mexico City and risk of prematurity: a pilot nested case control study. *Environmental Health* 9, 62.
- Cao N., Wei H., Wu L. G., Wu T. T., Li G. P. (2010). Effects of bisphenol A on zebrafish (*Danio rerio*) liver and gonad. *Chin. J. Ecol.* 29, 2129-2198.
- Carnevali O., Notarstefano V., Olivotto I., Graziano M., Gallo P., Di Marco Pisciotano I., Vaccari L., Mandich A., Giorgini E., Maradonna F. (2017). Dietary administration of EDC mixtures: A focus on fish lipid metabolism. *Aquatic Toxicology* 185, 95-104.
- Castricini R, Longo UG, De Benedetto M, Panfoli N, Pirani P, Zini R, Maffulli N, Denaro V. (2011). Platelet-rich plasma augmentation for arthroscopic rotator cuff repair: a randomized controlled trial. *Am J Sports Med.* Feb; 39(2):258-65.

- Cheschenko K., Pakdel F., Segner H., Kah O., Eggen R. (2008). Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. *General and Comparative Endocrinology* 155, 31-62.
  
- Chung E., Genco M. C., Megrelis L., Ruderman J. V. (2011). Effects of bisphenol A and triclocarban on brain-specific expression of aromatase in early zebrafish embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 108, 17732-17737.
  
- Corrales J., Kristofco L. A., Steele W. B., Yates B. S., Breed C. S., Williams E. S., Brooks B. W. (2015). Global Assessment of Bisphenol A in the Environment: Review and Analysis of Its Occurrence and Bioaccumulation. *Dose-Response*. Jul; 29; 13 (3).
  
- Cunha R.C., J.C. Francisco M.A., Cardoso, M.A., Matos, L.F., Matos D., Lino R.B., Simeoni, G., Pereira A.C., Iroida P.R., Simeoni L.C., Guanita-Souza K.A. Carvalho C. (2014): Effect of platelet rich plasma therapy associated with exercise training in musculoskeletal healing in rats. *Transplant Proc* 46, 1879-81.
  
- Da K., M. Tarczyska, W. Krzyzanowski (2010): Treatment of Achilles tendinopathy with platelet-rich plasma. *Int J Sports Med.* 31, 577-83.
  
- Dakin SG, Martinez FO, Yapp C, Wells G, Oppermann U, Dean BJ, Smith RD, Wheway K, Watkins B, Roche L, Carr AJ. (2015). Inflammation activation and resolution in human tendon disease. *Sci Transl Med.* Oct 28;7(311):311ra173.
  
- De Vos RJ, Weir A, Tol JL, Verhaar JA, Weinans H, van Schie HT. (2011). No effects of PRP on ultrasonographic tendon structure and neovascularisation in chronic midportion Achilles tendinopathy. *Br J Sports Med.* Apr;45(5):387-92.

- De Vos RJ, Weir A, van Schie HT, Bierma-Zeinstra SM, Verhaar JA, Weinans H, Tol JL. (2010). Platelet-rich plasma injection for chronic Achilles tendinopathy: a randomized controlled trial. *JAMA*. Jan 13;303(2):144-9.
- Diamanti –Kandarakis E., Bourguignon J. P., Giudice L. C., Hauser R., Prins G. S., Soto A. M., Zoeller R. T., Gore A. C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine reviews* 30, 293-342.
- Directiva 2002/72/CE de la Comisión, relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios.
- Directiva 2011/8/UE de la Comisión, que modifica la Directiva 2002/72/CE por lo que se refiere a la restricción del uso de bisfenol A en biberones de plástico para lactantes.
- Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. (2009). Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*. Mar;27(3):158-67.
- Engebretsen L, Steffen K, Alsousou J, Anitua E, Bachl N, Devilee R, Everts P, Hamilton B, Huard J, Jenoure P, Kelberine F, Kon E, Maffulli N, Matheson G, Mei-Dan O, Menetrey J, Philippon M, Randelli P, Schamasch P, Schweltnus M, Vernece A, Verrall G. (2010). IOC consensus paper on the use of platelet-rich plasma in sports medicine. *Br J Sports Med*. Dec;44(15):1072-81.
- EFSA 2015, Scientific opinion on the risk to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuff.
- Ehrlich S., Williams P. L., Missmer S. A., Flaws J. A., Ye X., Calafat A. M., Petrozza J. C., Wright D., Hauser R. (2012). Urinary bisphenol A concentrations and early reproductive health outcomes among women undergoing IVF. *Hum. Reprod*. 27, 3583-3592.

- ECHA (16 de Junio, 2017). MSC unanimously agrees that Bisphenol A is an endocrine disruptor. <https://echa.europa.eu/es/-/msc-unanimously-agrees-that-bisphenol-a-is-an-endocrine-disruptor>.
- Evenset A., Hallanger I. G., Tessmann M., Warmes N., Ruus A., Borgä K., Gabrielsen G. W., Christensen G., Renaud P. E. (2016). Seasonal variation in accumulation of persistent organic pollutants in an Arctic marine benthic food web. *Science of The Total Environment* 542, 108-120.
- Fang X., Dong W., Thornton C., Willett K. L. (2010). Benzo[a]pyrene effects on glycine N-methyltransferase mRNA expression and enzyme activity in *Fundulus heteroclitus* embryos. *Aquatic Toxicology*. 98, 130-138.
- Fang X., Thornton C., Scheffler B. E., Willet K. L. (2013). Benzo[a]pyrene decreases global and gene specific DNA methylation during zebrafish development. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36, 40-50.
- Fenwick SA, Hazleman BL, Riley GP. (2002). The vasculature and its role in the damaged and healing tendon. *Arthritis Res.* 4(4):252-60.
- Ferguson K. K., McElrath T. F., Cantonwine D. E., Mukherjee B., Meeker J. D. (2015). Phthalate metabolites and bisphenol-A in association with circulating angiogenic biomarkers across pregnancy. *Placenta* 36, 699-703.
- Ferguson S.A., Law C.D., Abshire J.S. (2012). Developmental treatment with bisphenol A causes few alterations on measures of postweaning activity and learning. *Neurotoxicology and Teratology* 34, 598-606.
- Filardo G, Kon E, Della Villa S, Vincentelli F, Fornasari PM, Marcacci M. (2010). Use of platelet-rich plasma for the treatment of refractory jumper's knee. *Int Orthop.* Aug;34(6):909-15.

## Bibliografía

---

- Flint S., Markle T., Thompson S. y Wallace E. (2012). Bisphenol A exposure, effects, and policy: a wildlife perspective. *Journal of environmental management* 104, 19-34.
- Fu P. Q., Kawamura K., Pavuluri C. M., Swaminathan T. y Chen J. (2010). Molecular characterization of urban organic aerosol in tropical India: contributions of primary emissions and secondary photooxidation. *Atmospheric Chemistry and Physics* 10, 2663-2689.
- Garcia A.J., Gallego C. y Font G. (2015). Toxicidad del Bisfenol. *Rev. Toxicol* 32, 144-160.
- Giménez, M., Molina A., Blanco A., Ayala M., Moyano R, (2016): Structural and ultrastructural evaluation of fibre muscles after exposure to Bisphenol-A, and a study of their possible recovery after treatment with platelet-rich plasma. *Veterinarski Arhiv* 86, 49-64
- Graselli, F., L. Baratta, L. Baioni, S. Bussaloti, R. Ramini, S. Grolli, G. Basini I. (2010): Bisphenol A disrupts granulosa cell function. *Domestic Animal Endocrinology* 39 34-39.
- Geens T., Aerts D., Berthot C., Bourguignon J.P., Goeyens L., Lecomte P., Maghuin-Rogister G., Pironnet A. M., Pussemier L., Scippo M. L., Covaci A. (2012). A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food and chemical toxicology* 50, 3725-3740.
- Geens T., Goeyens L., Covaci A. (2011). Are potential sources for human exposure to bisphenol-A overlooked?. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 214, 339-347.
- Gerona R. R., Woodruff T. J., Dickenson C. A., Pan J., Schwartz J. M., Sen S., Friesen M. W., Fujimoto V. Y., Hunt P. A. (2013). Bisphenol A (BPA), BPA glucuronide, and BPA sulfate in midgestion umbilical cord serum in a northern and central California population. *Environmental Science and Technology* 47, 12477-1248.

- Giulivo M., Lopez de Alba M., Capri E., Barceló D. (2016). Human exposure to endocrine disrupting compound: Their role in reproducing systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review. *Environmental review* 151, 251-264.
- Hauck Z. Z., Huang K., Li G., Van Breemen R. B. (2016). Determination of bisphenol A-glucuronide in human urine using ultrahigh-pressure liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 30, 400-406.
- Hope M, Saxby TS. (2007). Tendon healing. *Foot Ankle Clin. Dec;12(4):553-67, v.*
- Hou Y, Mao Z, Wei X, Lin L, Chen L, Wang H, Fu X, Zhang J, Yu C. (2009). Effects of transforming growth factor-beta1 and vascular endothelial growth factor 165 gene transfer on Achilles tendon healing. *Matrix Biol. Jul;28(6):324-35.*
- Huang H., Sillence N. (2000): Differential effect of dexamethasone and clenbuterol on rat growth and on beta 2-adrenoceptors in lung and skeletal muscle. *J Anim Sci* 78,604-608
- Hsu, C., J. Chang (2004): Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. *J Hand Surg Am.* 29, 551-63.
- Hsu C, Chang J. (2004). Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. *J Hand Surg Am. Jul;29(4):551-63.*
- IARC, IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks, Volumen 71 (1999).

## Bibliografia

---

- Ikezuki Y., Tsutsumi O., Takai Y., Kamei Y. y Taketani Y. (2002). Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Human Reproduction* 17, 2839-2841.
- Inoue H., Kemanai S., Sano C., Kato S., Yokota H., Iwano H. (2016). Bisphenol A glucuronide/sulfate diconjugate in perfused liver of rats. *Journal of Veterinary Medical Science* 78, 733-737.
- Jafari L, Vachon P, Beaudry F, Langelier E. (2015). Histopathological, biomechanical, and behavioral pain findings of Achilles tendinopathy using an animal model of overuse injury. *Physiol Rep.* Jan 19;3(1).
- Jasarevic E., Williams S. A., Vandas G. M., Ellersieck M. R., Liao C., Kannan K., Roberts R. M., Geary D.C., Rosenfeld C. S. (2013). Sex and dose-dependent effects of developmental exposure to bisphenol A on anxiety and spatial learning in deer mice (*Peromyscus maniculatus bairdii*) offspring. *Hormones and Behavior* 63, 180-189.
- Jeffery, T.L., A.R. Jeffrey (1991): Anabolic steroid-induced tendon pathology: a review of the literature. *Clinical Sciences. Clinical review*, 23 (1):1-3
- Johnson G.E., Parry E.M. (2008). Mechanistic investigations of low dose exposures to the genotoxic compounds bisphenol-A and rotenone. *Mutation Research* 651, 56-63.
- Kabir E. R., Rahman M. R., Rahman I. (2015). A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 40, 241-258.
- Kader D, Saxena A, Movin T, Maffulli N. (2002). Achilles tendinopathy: some aspects of basic science and clinical management. *Br J Sports Med.* Aug;36(4): 239-49.

- Kallivretaji E., Eggen R., Neuhauss S., Alberti M., Kaush U., Segner H. (2006). Aromatase in zebrafish: A potential target for endocrine disrupting chemicals. *Marine Environmental Research* 62, 187-190.
- Kazeko Y., Place A. R., Trant J. M. (2004). Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish 8Danio rerio) juveniles. *Aquatic Toxicology* 69, 25-34.
- Kon E, Filardo G, Di Martino A, Marcacci M. (2011). Platelet-rich plasma (PRP) to treat sports injuries: evidence to support its use. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* Apr;19(4):516-27.
- Kurebayashi, H., Okudaira, K. y Ohno, Y. (2010). Species difference of metabolic clearance of bisphenol A using cryopreserved hepatocytes from rats, monkeys and humans. *Toxicology Letters.* 198, 210–215.
- Lang I.A., Galloway T.S., Scarlett A., Henley W. E., Depledge M., Wallace R.B., Melzer D. (2008). Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *Jama-Journal of the American Medical Association* 300, 1303-1310.
- Le Fol V., Ait-Aïssa S., Sonavane M., Porcher J.M., Balaguer P., Cravedi J. P., Zalko D., Brion F. (2017). In vitro and in vivo estrogenic activity of BPA, BPF and BPS in zebrafish-specific assays. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 142, 150-156.
- Lee C-C., Jiang L-Y., Kuo Y-L., Hsieh C. Y., Chen C., Tien C. J. (2013). The potential role of water quality parameters on occurrence of nonylphenol and bisphenol A and identification of their discharge sources in the river ecosystems. *Chemosphere* 91, 904-911.
- Lee S. G., Kim J. K., Chung J. Y., Kim Y. J., Park J. E., Oh S., Yoon Y. D., Yoo K. S., Yoo Y. H., Kim J. M. (2013). Bisphenol A Exposure during Adulthood Causes Augmentation of Follicular Atresia and Luteal Regression by

Decreasing  $17\beta$ -Estradiol Synthesis via Downregulation of Aromatase in Rat Ovary. *Environmental Health Perspectives*; DOI:10.1289/ehp.1205823.

- Lee M. R., Park H., Bae S., Lim Y. H., Kim J. H., Cho S. H. y Hong Y. C. (2014). Urinary bisphenol A concentrations are associated with abnormal liver function in elderly: a repeated panel study. *Journal of Epidemiology & Community Health* 68, 312-317.
- Liao C. y Kannan K. (2012). Determination of free and conjugates forms of bisphenol A in human urine and serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environmental Science and Technology* 46, 5003-5009.
- Lindholst C., Pedersen S. N. y Bjerregaard P. (2001). Uptake, metabolism and excretion of bisphenol A in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 55, 75-84.
- Lopez-Casas P., S.C. Mizrak L.A. López- Fernandez M., Paz, D.G. Dee Roig, J., Del Mazo M., (2012). The effects of different endocrine disruptors defining compound-specific alterations of gene expression profiles in the developing testis. *Reproductive Toxicology* 33, 106-115.
- Lyras DN, Kazakos K, Verettas D, Polychronidis A, Tryfonidis M, Botaitis S, Agrogiannis G, Simopoulos C, Kokka A, Patsouris E. (2009). The influence of platelet-rich plasma on angiogenesis during the early phase of tendon healing. *Foot Ankle Int.* Nov;30(11):1101-6.
- Lyras DN, Kazakos K, Tryfonidis M, Agrogiannis G, Botaitis S, Kokka A, Drosos G, Tilkeridis K, Verettas D. (2010). Temporal and spatial expression of TGF-beta1 in an Achilles tendon section model after application of platelet-rich plasma. *Foot Ankle Surg.* Sep;16(3):137-41.
- Lyras DN, Kazakos K, Verettas D, Botaitis S, Agrogiannis G, Kokka A, Pitiakoudis M, Kotzakarlis A. (2009). The effect of platelet-rich plasma gel in the

early phase of patellar tendon healing. Arch Orthop Trauma Surg. Nov;129(11):1577-82.

- Lyras DN, Kazakos K, Agrogiannis G, Verettas D, Kokka A, Kiziridis G, Chronopoulos E, Tryfonidis M. (2010). Experimental study of tendon healing early phase: is IGF-1 expression influenced by platelet rich plasma gel? Orthop Traumatol Surg Res. Jun; 96(4):381-7.
- Maffulli N, Moller HD, Evans CH. (2002). Tendon healing: can it be optimised? Br J Sports Med. Oct; 36(5):315-6.
- Maia J., Cruz J., Sendón R., Bustos J., Sanchez J., Paseiro P. (2009). Effect of detergents in the release of bisphenol A from polycarbonate baby bottles. Food Research international 42, 1410-1414.
- Mandich A., Bottero A., Benfenati E., Cevasco E., Erratico C., Maggioni S., Massari A., Pedemonte F., Viganò L. (2007). In vivo exposure of carp to graded concentrations of bisphenol A. General and Comparative Endocrinology 153, 15-24.
- Marococcia D., Pellegrini M., Fiocchetti M., Lorenzetti M., Marino. M. (2017). Food components and contaminants as (anti)androgenic molecules. Genes & Nutrition 12:6.
- Mathieu-Denoncourt J., Wallace A.J., de Solla S. R., Langlois V. S. (2016). Influence of Lipophilicity on the Toxicity of Bisphenol A and Phtalates to Aquatic Organisms. Bulletin Environmental Contamination and Toxicology 97, 4-10.
- Matsumoto H., Adachi S., Suzuki Y. (2005). Bisphenol A in ambient air particulates responsible for the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells and its concentration changes over 6 months. Archives Environmental Contamination and Toxicology 48, 459-466.

## Bibliografía

---

- Mercea P. (2009). Physicochemical processes involved in migration of bisphenol A from polycarbonate. *Journal of Applied Polymer Science* 112,579-593.
- Merchant Research & Consulting Ltd (n.f.). Recuperada 31 de Mayo 2017 de <https://mcgroup.co.uk/news/20131108/bpa-production-grew-372000-tonnes.html>.
- Michalowicz J. (2014). Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. *Environmental toxicology and pharmacology* 37, 738-758.
- Mileva G., Baker S. L., Konkle A., Bielajew C. (2014). Bisphenol-A: epigenetic reprogramming and effects on reproduction and behavior. *International journal of environmental research and public health* 11, 7537-7561.
- Mishra A, Pavelko T. (2006). Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered plateletrich plasma. *Am J Sports Med.* Nov; 34(11):1774-8.
- Molina A. M., Lora A. J., Blanco A., Monterde J. G., Ayala N., Moyano R. (2013). Endocrine-active compound evaluation: Qualitative and quantitative histomorphological assessment of zebrafish gonads after bisphenol-A exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 88, 155-162.
- Molloy, T., Y. Wang, G. Murrell G. (2003): The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med.* 33, 381-94.
- Mortavazi S, A.R. Bakhtiari, A.E. Sari, N. Bahramifar, F. Rabaridazeh (2013). Occurrence of endocrine disruption chemicals (Bispheol A, 4-Nonyphenol, and Octylphenol) in muscle and liver of, *Cyprinus Carpio* Common, from Anzali Wetland, Iran. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 90, 578-584

- Muhamad M. S., Salim M. R., Lau W. J., Yusop Z. (2016). A review on bisphenol A occurrences, health effects and treatment process via membrane technology for drinking water. *Environmental Science Pollution Res* 23, 11549-11567.
- Munguia-Lopez E., Gerardo-Lugo S., Peralta E., Bolumen S., Soto-Valdez H. (2005). Migration of bisphenol A (BPA) from can coatings into fatty-food simulant and tuna fish. *Food Additives & Contaminants* 22, 892-8987.
- Murray MM, Spindler KP, Ballard P, Welch TP, Zurakowski D, Nanney LB. (2007). Enhanced histologic repair in a central wound in the anterior cruciate ligament with a collagen-platelet-rich plasma scaffold. *J Orthop Res.* Aug;25(8):1007-17.
- Nam S. H., Seo Y.M. y Kim M. G., (2010). Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottle with repeated use. *Chemosphere* 79, 949-952.
- Niu Y., Zhang J., Wu Y., Shao B. (2012). Analysis of bisphenol A and Alkylphenols in cereals by automates on-line solid-phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 6116-6122.
- OECD, 2009. OECD Guidance Document for the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads.
- OMS, 2002. Global assesement of the state-of-the-science of endocrine disrutors.
- Omeroglu S, Peker T, Turkozkan N, Omeroglu H. (2009). High-dose vitamin C supple- mentation accelerates the Achilles tendon healing in healthy rats. *Arch Orthop Trauma Surg.* Feb;129(2):281-6.
- Orden PRE/628/2011, por la que se modifica el Anexo II del Real Decreto 866/2008, de 23 de mayo, por el que se aprueba la lista de sustancias

permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo.

- Paoloni J, De Vos RJ, Hamilton B, Murrell GA, Orchard J. (2011). Platelet-rich plasma treatment for ligament and tendon injuries. *Clin J Sport Med.* Jan;21(1):37-45.
- Patrignani, N., A. Molina, A. Blanco, M. Ayala, R. Moyano (2014): Structural and ultrastructural evaluations of zebrafish ovaries after exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Acta Adriat* 54, 3-12
- Peerbooms JC, Sluimer J, Bruijn DJ, Gosens T. (2010). Positive effect of an autologous platelet concentrate in lateral epicondylitis in a double-blind randomized controlled trial: platelet-rich plasma versus corticosteroid injection with a 1-year follow-up. *Am J Sports Med.* Feb;38(2):255-62.
- Provencher G., Bérubé R., Dumas P., Bienvenu J. F., Gaudreau E., Bélanger P. y Ayotte P. (2014). *Journal of Chromatography A* 1348, 97-104.
- Querat B., Sellouk A. y Salmon C. (2000). Phylogenetic analysis of the vertebrate glycoprotein hormone family including new sequences of sturgeon (*Acipenser baeri*) beta subunits of the two gonadotropins and the thyroid-stimulating hormone. *Biology and Reproduction* 63, 222-228.
- Randelli PS, Arrigoni P, Cabitza P, Volpi P, Maffulli N. (2008). Autologous platelet rich plasma for arthroscopic rotator cuff repair. A pilot study. *Disabil Rehabil.*; 30(20-22):1584-9.
- Real Decreto 866/2008, por el que se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo (2008).

- Riley GP, Harrall RL, Constant CR, Chard MD, Cawston TE, Hazleman BL. (1994). Tendon degeneration and chronic shoulder pain: changes in the collagen composition of the human rotator cuff tendons in rotator cuff tendinitis. *Ann Rheum Dis.* Jun;53(6):359-66.
- Riley GP, Harrall RL, Constant CR, Chard MD, Cawston TE, (1994). Hazleman B. Glycosaminoglycans of human rotator cuff tendons: changes with age and in chronic rotator cuff tendinitis. *Ann Rheum Dis.* 1994 Jun;53(6):367-76.
- Rocha S., Domingues V., Pinho C., Fernandes V., Delerue-Matos C., Gameiro P., Mansilha C. (2013). Occurrence of bisphenol A, estrone, 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in Portuguese Rivers. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 90,73-78.
- Rochester J.R. (2013): Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reprod. Toxicol.* 42, 132-155
- Rodríguez, H.A., N. Santambrosio, C.G. Santamaría, M. Muñoz de Toro, E.H. Luque (2010). Neonatal exposure to bisphenol A reduces the pool of primordial follicles in the rat ovary. *Reprod Toxicol* 30, 550-517.
- Saili K. S., Corvi M. M., Weber D. N., Patel A. U., Das S. R., Przybyla J., Anderdon K. A. y Tanguay R. L. (2012). Neurodevelopmental low-dos bisphenol A exposure leads to early life-stage hyperactivity and learning deficits in adult zebrafish. *Toxicology* 294, 83-92.
- Salgueiro-González, N., Turnes-Carou I., Viñas L., Besada V., Muniategui-Lorenzo S., López-Mahía P. y Prada-Rodríguez D. (2016). Occurrence of alkylphenols and bisphenol A in wild mussel samples from the Spanish Atlantic coast and Bay of Biscay, *Marine Pollution Bulletin*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.03.003>.
- Sanchez M, Anitua E, Azofra J, Andia I, Padilla S, Mujika I. (2007). Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med.* Feb;35(2):245-51.

- Sarrafian TL, Wang H, Hackett ES, Yao JQ, Shih MS, Ramsay HL, Turner AS. (2010). Comparison of Achilles tendon repair techniques in a sheep model using a crosslinked acellular porcine dermal patch and platelet-rich plasma fibrin matrix for augmentation. *J Foot Ankle Surg.* Mar-Apr;49(2):128-34.
- Schepull T, Kvist J, Norrman H, Trinks M, Berlin G, Aspenberg P. (2011). Autologous platelets have no effect on the healing of human achilles tendon ruptures: a randomized single-blind study. *Am J Sports Med.* Jan;39(1):38-47. Epub 2010 Nov 3.
- Schnabel LV, Mohammed HO, Miller BJ, McDermott WG, Jacobson MS, Santangelo KS, Fortier LA. (2007). Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. *J Orthop Res.* Feb;25(2):230-40.
- Segner H. (2009). Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 149, 187-195.
- Shao B., Han H., Li D., Ma Y., Tu X., Wu Y. (2007). Analysis of alkylphenol and bisphenol A in meat by accelerated solvent extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 105, 1236-1241.
- Sharma P, Maffulli N. (2005). Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *J Bone Joint Surg Am.* Jan;87(1):187-202.
- Skerry TM, Lanyon LE. Immobilisation induced bone loss in the sheep is not modulated by calcitonin treatment. *Bone.* 1993 May-Jun;14(3):511-6.
- Skerry TM, Lanyon LE. (1995). Interruption of disuse by short duration walking exercise does not prevent bone loss in the sheep calcaneus. *Bone.* 1995 Feb;16(2):269-74.

- Stachel B., Ehrhorn U., Heemken O., Lepom P., Reinckle H., Sawal G., Theobald N. (2003). Xenoestrogens in the River Elbe and its tributaries. *Environmental Pollution* 124, 497-504.
- Stromqvist M., Tooke N., Brunstrom B. (2010). DNA methylation levels in the 5' flanking region of the vitellogenin I gene in liver and brain of adultzebrafish (*Danio rerio*) sex and tissue differences and effects of 17alpha-ethinylestradiol exposure. *Aquatic Toxicology*. 98, 275-281.
- Takao Y., Lee H. C., Kohra S., Arizono K. (2002). Release of bisphenol A from food can lining upon heating. *Journal of Health Science* 48, 331-334.
- Tang R., Chen M. J., Ding G. D., Chen X. J., Han X. M., Zhou K., Chen L. M., Xia L. M., Tian Y., Wang X. R. (2013). Associations of prenatal exposure to phenols with birth outcomes. *Environmental Pollution*. 178, 115-120.
- Vandenberg, L.N., S. Ehrlich, S.M. Belcher, N. Ben-Jonathan, D.C. Dolinoy, P.A. Hugo, R.R. Newbold, B.S. Rubin, K.S. Saili, A. Soto, H. Wang, F.S. Vom Saal (2013): Low dose effects of bisphenol A: An integrated review of in vitro, laboratory, animal, and epidemiology studies. *Endocrine disruptors*. E26490
- VandeVoort C., Gerona R. R., vom Saal F. S., Tarantal A., Hunt P. A., Hillenweck A. Zalko D. (2016). Maternal and fetal Pharmacokinetics of Oral Radiolabeled and Authentic Bisphenol A in the Rhesus Monkey. *PLoS One* 11: e0165410.
- Vandenberg L. N., Hauser R., Marcus M., Olea N. y Welshons W. V. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive toxicology* 24, 139-177.
- Virchenko O, Aspenberg P. (2006). How can one platelet injection after tendon injury lead to a stronger tendon after 4 weeks? Interplay between early regeneration and mechanical stimulation. *Acta Orthop*. Oct;77(5):806-12.

- Virchenko O, Grenegård M, Aspenberg P. (2006). Independent and additive stimulation of tendon repair by thrombin and platelets. *Acta Orthop. Dec;*77(6): 960-6.
- Vökel W., Colnot T., Csanády G. A., Filser J. G. Dekant W. (2002). Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. *Chemical research in toxicology* 15, 1281-1287.
- Volberg V., Harley K., Calafat A. M., Dave V., McFadden J., Eskenazi B., Holland N. (2013). Maternal bisphenol A exposure during pregnancy and its association with adipokines in Mexican-American children. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 54, 621-628.
- Volkel W., Bittner N., Dekant W. (2005). Quantification of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Metabolism and Disposition* 33, 1748-1757.
- Wang, X., Q. Don, Y. Chen, H. Jiang, Q. Xiao, Y. Wang (2013): Bisphenol A affects axonal growth, musculature and motor behavior in developing zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 142-143, 104-113
- Weber D. N., Hoffmann R. G., Hoke E. S. y Tanguay R. L. (2015). Bisphenol A exposure during early development induces sex-specific changes in adult zebrafish social interactions. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 78, 50-66.
- Xu Y, Murrell GAC. (2008). The Basic Science of Tendinopathy. *Clinical Orthopaedics and Related Research.*;466(7):1528-1538.
- Yang X. Y., Liu J., Li M., Chen, D., Peng, Y., Liang, M. Song J., Zhang, G. Jian G. (2014). Exposure to Bisphenol AF Disrupts Sex Hormone Levels and Vitellogenin Expression in Zebrafish. *Environmental Toxicology* DOI 10.1002/tox

- Yang J., Chang K. M. (2015). Evaluation of the toxic effects of brominated compounds (BDE-47, 99, 209, TBBPA) and bisphenol A (BPA) using zebrafish liver cell line, ZFL. *Aquatic Toxicology* 159, 138-147.
- Yoshida T., Horie M., Hoshino Y., Nakazawa H. (2001). Determination of bisphenol A in canned vegetables and fruit by high performance liquid chromatography. *Food Additives & Contaminants* 18, 69-75.
- Zhou Z, Akinbiyi T, Xu L, Ramcharan M, Leong DJ, Ros SJ, Colvin AC, Schaffler MB, Majeska RJ, Flatow EL, Sun HB. (2010). Tendon-derived stem/progenitor cell aging: defective self-renewal and altered fate. *Aging Cell*. Oct;9(5):911-5.
- Zoeller R. T., Brown T. R., Doan L. L., Gore A. C., Skakkebaek N. E., Soto A. M., Woodruff T. J., Vom Saal F. S. (2012). Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society. *Endocrinology* 153, 4097-4110.



## Anexo

Veterinaski Archiv (carta de aceptación): Histopathological study of the Achilles tendon after xposure to Bisphenol-A and its subsequen treatment with platelet growth factors.

by Cristina Bellido\*, Carlos Abellán\*, Ana Molina, Alfonso Blanco, Rosario Moyano.

ISSN 0372-5480



# VETERINARSKI ARHIV

JOURNAL OF THE FACULTY OF VETERINARY MEDICINE, UNIVERSITY OF ZAGREB

Founder and Publisher: University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine  
Editor's office and administration: 10000 ZAGREB, Heinzelova 55, CROATIA  
Phone: +385-1 23 90 213; Fax: +385-1 24 41 390; E-mail: [veterinarski.arhiv@vef.hr](mailto:veterinarski.arhiv@vef.hr)  
Editor-in-Chief: J. Madić, 10000 ZAGREB, Heinzelova 55, CROATIA  
Phone 385-1 23 90 206; E-mail: [jmadic@vef.hr](mailto:jmadic@vef.hr)

Zagreb, 06-09-2017

No of paper: VA 160920

Re: Acceptance of manuscript for publication

Dr. Rosario Moyano Salvago

Dr. Ana Maria Molina López

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

Dear Dr. Rosario Moyano Salvago,

Dear Dr. Ana Maria Molina López,

I am pleased to be able to inform you that the manuscript you submitted for publication in *Veterinarski arhiv* entitled:

**Histopathological study of the Achilles tendon after exposure to Bisphenol-A and its subsequent treatment with platelet growth factors** by Cristina Bellido\*, Carlos Abellán\*, Ana Molina, Alfonso Blanco, Rosario Moyano

has been accepted for publication in *Veterinarski arhiv*, after you have made all corrections as per reviewers' advice.

The manuscript will be published in *Veterinarski arhiv* volume 88, issue 1.

Yours sincerely,

Editor-in-Chief

