

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
Facultat de Medicina
Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques
Unitat de Fisiologia



**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA
EXPOSICIÓN A BDE-99 SOBRE LA FUNCIÓN
COGNITIVA Y REPRODUCTIVA EN RATAS
MACHO ADULTAS**

Tesis doctoral de:

Virginia Alonso Guerra

Reus, 2009

Aquel que sabe y sabe que sabe, es un sabio, seguidlo
Aquel que sabe y no sabe que sabe, está dormido, despertadlo
Aquel que no sabe y sabe que no sabe, es un ignorante, instruidlo
Aquel que no sabe y no sabe que no sabe, es un necio, evitadlo.
Proverbio árabe.

AGRADECIMIENTOS

Muy especialmente a mis tres directoras de tesis Luisa, Montse y Vicky por el tiempo y esfuerzo invertidos en este trabajo y por compartir sus conocimientos, por su apoyo y amistad.

Al Dr. Domènec Sánchez y el Dr. José Luís Domingo por confiar en mi y darme la oportunidad de realizar este trabajo.

Al Departamento de Ciencias Médicas Básicas por darme la oportunidad de investigar y realizar este trabajo.

A la Unidad de Farmacología por su paciencia y ayuda.

A Amparo, Juan y Esperanza por su ayuda técnica en todo momento.

A Carme S y Silvia O por compartir esos momentos en el laboratorio.

Al resto de compañeros de la facultad que en algún momento me han prestado su ayuda.

Al los servicios de Anatomía Patológica y Medicina Nuclear del Hospital Joan XIII de Tarragona por su colaboración profesional. Especialmente al Dr. Juan José Sirvent y al Dr. Andreu Pujol.

A mis padres por su apoyo incondicional y su confianza en mí. Sin ellos no habría llegado hasta aquí.

A Bernabé por enseñarme que hay que ser paciente para llegar a la meta. Por contagiarme su optimismo y por su apoyo y ayuda incondicionales.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A BDE-99 SOBRE LA FUNCIÓN COGNITIVA
Y REPRODUCTIVA EN RATAS MACHO ADULTAS
Virginia Alonso Guerra
ISBN: 978-84-692-5925-2/DL: T-1664-2009

ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. GENERALIDADES	1
1.1 ESTRUCTURA QUÍMICA Y PROPIEDADES FÍSICAS	1
1.2 PRODUCCIÓN Y USOS	3
2. ÉTERES DE PENTABROMODIFENILO (penta-BDEs)	4
2.1 FUENTES AMBIENTALES DE EXPOSICIÓN A PENTA-BDEs	5
2.1.1 Aire	6
2.1.2 Agua y sedimentos	7
2.1.3 Dieta	8
2.2 TOXICOCINÉTICA	9
2.2.1 Absorción	10
2.2.2 Distribución	10
2.2.3 Metabolismo	12
2.2.4 Excreción	14
2.3 EFECTOS ADVERSOS	14
2.3.1 Efectos hepáticos y renales	14
2.3.2 Efectos neurológicos	15
2.3.3 Efectos sobre reproducción y desarrollo	16
2.3.4 Efectos endocrinos	17
3. DISRUPTORES ENDOCRINOS	20
3.1 ACTUACIÓN DE LOS DISRUPTORES ENDOCRINOS	21
3.2 EXPOSICIÓN HUMANA A DISRUPTORES ENDOCRINOS	23
3.3 EFECTOS ADVERSOS DE LA EXPOSICIÓN A DISRUPTORES ENDOCRINOS	25

3.3.1 Alteraciones de los parámetros de calidad espermática	25
3.3.2 Alteraciones del sistema genitourinario	25
3.3.3 Efectos sobre la función tiroidea	26
3.3.4 Efectos neuroendocrinos	27
4. ESTRÉS OXIDATIVO (EO)	28
4.1 RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (EROs)	28
4.2 ORIGEN DE LAS EROs	30
4.2.1 Fuentes endógenas	30
4.2.2 Fuentes exógenas	32
4.3 CONCEPTO DE EO	33
4.4 SISTEMAS ANTIOXIDANTES	35
4.4.1 Sistema antioxidante enzimático	35
4.4.2 Sistema antioxidante no enzimático	37
4.5 DAÑO OXIDATIVO A BIOMOLÉCULAS	37
4.5.1 Lípidos	37
4.5.2 Proteínas	39
4.5.3 ADN	40
4.6 EFECTOS DEL EO SOBRE EL ORGANISMO	41
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	47
1. INTERÉS DEL TRABAJO	47
2. HIPÓTESIS	47
3. OBJETIVOS	48
3.1 OBJETIVO GENERAL	48
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48

MATERIALES Y MÉTODOS	49
1. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	49
2. MATERIALES	50
2.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	50
2.2 REACTIVOS	51
2.3 APARATOS PARA LA REALIZACIÓN DE TESTS DE NEUROCOMPORTEMIENTO	53
2.4 OTROS MATERIALES E INSTRUMENTOS	56
3. MÉTODOS	56
3.1 BATERÍA DE OBSERVACIÓN FUNCIONAL (FOB)	56
3.2 TESTS DE NEUROCOMPORTEMIENTO	62
3.3 OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS	64
3.4 ESTUDIO DE PARÁMETROS SEMINALES	68
3.5 BIOQUÍMICA DE ORINA	69
3.6 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y HORMONALES DE SANGRE	73
3.7 ESTUDIO DE PARÁMETROS INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO	78
3.8 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO	84
3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	85
RESULTADOS	87
1. BATERÍA DE OBSERVACIÓN FUNCIONAL	87
2. EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS DE LA EXPOSICIÓN A BDE-99	88
3. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A BDE-99 SOBRE PARÁMETROS SEMINALES	96
4. EVALUACIÓN DEL ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE ORINA	99
5. EVALUACIÓN DEL ANÁLISIS BIOQUÍMICO Y HORMONAL DE SANGRE	101
6. EVALUACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA Y DEL ESTADO OXIDATIVO	106

6.1 Orina	106
6.2 Sangre	106
6.3 Tejidos	108
7. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO	122
DISCUSIÓN	133
1. BATERÍA DE OBSERVACIÓN FUNCIONAL	133
2. EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS DE LA EXPOSICIÓN A BDE-99	133
3. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A BDE-99 SOBRE PARÁMETROS SEMINALES	135
4. EVALUACIÓN DEL ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE ORINA	136
5. EVALUACIÓN DEL ANÁLISIS BIOQUÍMICO Y HORMONAL DE SANGRE	136
6. EVALUACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA Y DEL ESTADO OXIDATIVO	138
7. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO	143
8. DISCUSIÓN GLOBAL	143
CONCLUSIONES	147
BIBLIOGRAFÍA	149
ABREVIATURAS	185

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A BDE-99 SOBRE LA FUNCIÓN COGNITIVA
Y REPRODUCTIVA EN RATAS MACHO ADULTAS
Virginia Alonso Guerra
ISBN: 978-84-692-5925-2/DL: T-1664-2009

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. GENERALIDADES

En los últimos años, la preocupación por la exposición a ciertos productos químicos, introducidos en el medio ambiente por el hombre, ha adquirido una gran importancia. Estos compuestos tienen orígenes diversos y entran en contacto con los humanos por diferentes vías de exposición. Además están relacionados con la aparición de nuevos síndromes y enfermedades específicas de causa desconocida.

Entre una amplia variedad de contaminantes ambientales encontramos a los éteres difenólicos polibromados (PBDEs), que son compuestos químicos manufacturados que se añaden a una amplia variedad de productos de consumo (plásticos, poliéster, espumas, textiles, etc.) para incrementar su resistencia al fuego. Por ello, forman parte de los compuestos retardantes de llama.

1.1 ESTRUCTURA QUÍMICA Y PROPIEDADES FÍSICAS

La fórmula general de los PBDEs es $C_{12}H_{(0-9)}-Br_{(1-10)} O$ (Figura 1). Estructuralmente, estas sustancias consisten en dos anillos bencénicos unidos por un enlace éter (C-O-C), y con el resto de posiciones (1-10) ocupadas por uno o más átomos de bromo (Br). En consecuencia, existen 209 congéneres teóricos posibles aunque el número de PBDEs utilizados en productos comerciales es limitado (IPCS, 1994).

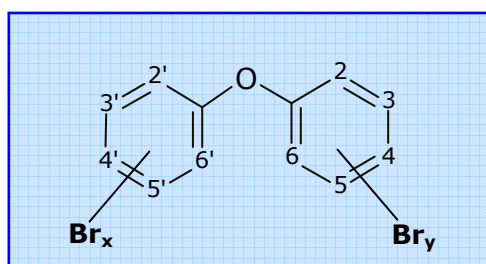


Figura 1. Estructura general de los PBDEs.

Los PBDEs se clasifican según el grado de bromación. El término homólogo se utiliza para referirse a los PBDEs con un mismo número de átomos de Br. Existen 10 grupos de homólogos basándonos en el número de bromos (desde el mono-bromo al deca-bromo). Cada grupo de homólogos está formado por uno o varios congéneres según las posiciones ocupadas por los bromos en la estructura (por ejemplo, dentro de los penta-BDEs podemos encontrar el BDE-99 y BDE-100) (**Tabla 1**). Los diferentes tipos de PBDEs se clasifican según el sistema IUPAC utilizado para los difenilos, con base a la posición de los halógenos en los anillos (Ballschmiter y cols., 1993).

Tabla 1. Composición general de los congéneres mayoritarios y mezclas comerciales.

No. IUPAC	Sustitución	Tipo de homólogo
Congéneres individuales		
47	2,2',4,4'	Tetra-BDE
49	2,2',4,5	Tetra-BDE
99	2,2',4,4',5	Penta-BDE
100	2,2',4,4',6	Penta-BDE
153	2,2',4,4',5,5'	Hexa-BDE
154	2,2',4,4',5,6'	Hexa-BDE
209	2,2',4,4',5,5',6,6'	Deca-BDE
Mezclas comerciales		
	Composición	Tipo de mezcla
DE-71	44 % BDE-99, 32 % BDE-47, 9 % BDE-100, 4 % BDE-153	Penta-BDE
DE-79	37 % BDE-183, 22 % BDE-197, 14 % BDE-207, 9 % BDE-196	Octa-BDE
DE-83	97-98 % BDE-209, ≤3 % BDE-206, 207 o 208	Deca-BDE

Los PBDEs con interés comercial son tres: penta-BDE, octa-BDE y deca-BDE. Estos productos no son sustancias puras, sino una mezcla de distintos congéneres de PBDEs. La mezcla comercial penta-BDE (DE-71)

está formada principalmente por congéneres pertenecientes a las familias de homólogos de tetra, penta y hexa-BDE. En el caso de la mezcla comercial octa-BDE (DE-79), los congéneres que la forman pertenecen principalmente a las familias de homólogos hepta, octa y nona-BDE. No ocurre lo mismo con la mezcla deca-BDE (DE-83), que puede considerarse BDE-209 (único congener decabromado) prácticamente puro (> 98 %) (Costa y Giordano, 2007).

Los PBDEs tienen una presión de vapor (Pv) baja a temperatura ambiente y son altamente lipofílicos. Además se caracterizan por una alta resistencia a la degradación ya sea química, física o biológica. Su punto de ebullición está entre 310 y 425 °C y su solubilidad en agua es baja (**Tabla 2**) (Darnerud y cols., 2001; de Wit, 2002).

Tabla 2. Propiedades físicas de algunos congéneres.

	Tetra-BDE	Penta-BDE	Octa-BDE	Deca-BDE
Fórmula química	C ₁₂ H ₆ OBr ₄	C ₁₂ H ₆ OBr ₅	C ₁₂ H ₆ OBr ₈	C ₁₂ H ₆ OBr ₁₀
Peso molecular	485,8	564,8	801,5	959,2
Presión de vapor (Pv)	2,7-3,3×10 ⁻⁴	2,9-7,3×10 ⁻⁵	1,2-2,7×10 ⁻⁷	<1×10 ⁻⁴
Punto de fusión (°C)	79-82(BDE-47)	92 (BDE-99)	~ 200	290-306
Punto de ebullición (°C)	---	>300(d)	---	d
Solubilidad en agua (µg/l)	---	0,0009(20 °C)	---	20-30
Log K _{ow}	5,9-6,2	6,5-7,0	8,4-8,9	10

--- no información. d descompone

1.2 PRODUCCIÓN Y USOS

Los principales países productores de PBDEs son Estados Unidos, Reino Unido, Israel, Holanda, Bélgica, Japón y, en menor medida, China y la India (**Tabla 3**). La producción comercial de PBDEs empezó el año 1970 en Alemania (WHO, 1994; BSEF, 2003). Las mezclas comerciales de penta-BDE y octa-BDE dejaron de producirse desde 2004 como

consecuencia de las restricciones legales, reglamentarias y administrativas derivadas de la Directiva 2003/11/CE, por la que se prohíbe la comercialización o empleo de estas sustancias, así como la comercialización de artículos que las contengan. Sin embargo, la mezcla deca-BDE todavía se sigue produciendo y utilizando prácticamente en todas las zonas desarrolladas del planeta.

Tabla 3. Demandas mundiales de PBDEs.

Año	Toneladas métricas
1999	204.325
2001	203.740
2002	237.727
2003	223.482

Los PBDEs se han utilizado como aditivos pirorretardantes en una amplia sección de productos industriales y de consumo. El penta-BDE se ha utilizado principalmente como retardantes de llama en espumas de poliuretano para muebles y colchones, y en interiores automotrices. El octa-BDE se utilizó en una variedad de termoplásticos, también en equipos eléctricos, tapicería automotriz, teléfonos y equipos de cocina. Por último, los deca-BDEs se emplean fundamentalmente en textiles y plásticos duros para la fabricación de sistemas electrónicos tales como televisores y ordenadores (Hale y cols., 2001; Hardy, 2002; ATSDR, 2004).

2. ÉTERES DE PENTABROMODIFENILO (penta-BDEs)

Desde principio de los años 70 hasta finales de los noventa ha habido un rápido incremento en las concentraciones de penta-BDEs tanto en el medio ambiente como en seres humanos. Éstos podrían verse expuestos a través de diversas fuentes como los alimentos, el uso de los productos de consumo, y por el contacto con el aire y el polvo en interiores.

El penta-BDE es uno de los 10 homólogos posibles de los PBDEs. El número posible de congéneres del penta-BDE es 46 (**Figura 2, Tabla 4**).

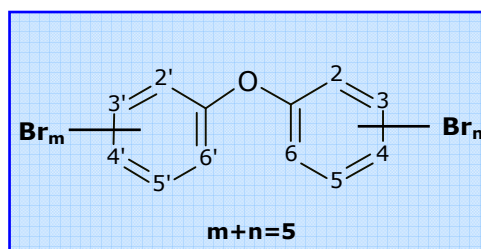


Figura 2. Estructura básica de los penta-BDEs.

Tabla 4. Patrón de sustitución de algunos congéneres penta-BDEs.

Número IUPAC	Patrón de sustitución
BDE-85	2,2',3,4,4'-pentaBDE
BDE-99	2,2',4,4',5-pentaBDE
BDE-100	2,2',4,4',6-pentaBDE
BDE-105	2,3,3',4,4'-pentaBDE
BDE-119	2,3,4,4',5-pentaBDE
BDE-126	3,3',4,4',5-pentaBDE

A pesar de la variabilidad de congéneres dentro de los penta-BDEs, el mayoritario en muestras ambientales, biota y tejidos humanos es el BDE-99 (US EPA, 2008).

2.1 FUENTES AMBIENTALES DE EXPOSICIÓN A PENTA-BDEs

El penta-BDE entra en contacto con el medio ambiente durante su fabricación así como, durante el proceso de fabricación de los productos que lo incluyen como aditivo. También durante el uso de esos productos, después de haber sido desechados y por desbromación de congéneres de alto grado de bromación. Se han detectado penta-BDE en diversas matrices ambientales, incluyendo aire, agua, sedimentos, suelo y biota. La

distribución del penta-BDE entre los diversos compartimentos ambientales es por orden creciente: aire, agua y suelo. En su mayor parte, el penta-BDE se halla en el medio ambiente unido a partículas; sólo una pequeña cantidad se transporta en su fase gaseosa, o diluido en agua. Sin embargo, este transporte, a lo largo de períodos prolongados, puede ser eficaz para distribuir el penta-BDE ampliamente en el medio ambiente (UNEP, 2006).

2.1.1 Aire

El uso más común del penta-BDE, que representa el 95-98 %, ha sido como aditivo en espuma de poliuretano (Hale y cols., 2002). Esta espuma puede contener entre un 10 y un 18 % de penta-BDE.

La liberación de penta-BDE al aire puede tener lugar durante la fase de curado en la producción de la espuma, en la cual permanece a temperaturas elevadas (160 °C) durante varias horas. Se estima que por cada tonelada métrica de penta-BDE utilizada en la producción de espuma de poliuretano se liberan 0,5 kg de penta-BDE al aire (EU, 2001). El polvo del aire en interiores, es otra fuente de exposición a penta-BDEs. Éstos se volatilizan de la espuma de poliuretano en niveles medibles. Concretamente, para los congéneres BDE-99 y BDE-100, las tasas de pérdida fueron de 85 y 30 ng/m³/g de espuma, respectivamente. El rango de temperatura promedio durante el muestreo fue de 30 a 34 °C (Shoeib y cols., 2004, Wilford y cols., 2005). En hogares, oficinas o industrias se han detectado niveles de penta-BDEs en el polvo del aire (Pettersson, 2004; Cetin, 2008). Las concentraciones más altas se han encontrado en plantas de reciclado de productos electrónicos (ng/m³). Diversos autores coinciden en que el congener dominante dentro de los penta-BDEs es el BDE-99 (Darnerud y cols., 2001; Pettersson, 2004; Stapleton y cols., 2005).

La exposición a penta-BDEs en interiores aunque no es la vía principal, en determinadas circunstancias puede ser prioritaria. Así que, mientras para algunos adultos esta vía supone menos del 10 % de la exposición total,

para otros grupos más vulnerables puede constituir la vía principal (Jones-Otazo y cols., 2005; Mandalakis y cols., 2007).

Se estima que aproximadamente el 3,9 % del penta-BDE presente en los artículos se libera cada año por volatilización durante una vida útil hipotética de 10 años; no obstante, cada congénere tendrá su propia migración característica y sus coeficientes de volatilidad. Puede estimarse una liberación anual, entre 585 y 1053 toneladas métricas de penta-BDE de esta forma (EU, 2001).

2.1.2 Agua y sedimentos

Parece ser que uno de los congéneres mayoritarios en este tipo de muestras es el BDE-99 (**Tabla 5**). Se han detectado diferencias importantes en las concentraciones de penta-BDEs según el país y según la procedencia de la muestra (rural, urbana o industrial) (Sellström, 1999; Hale y cols., 2002; Palm y cols., 2002; Hassanin y cols., 2004).

Tabla 5. Niveles de BDE-99 en distintas partes del mundo.

País/región	Compartimento	Niveles
Suecia	sedimentos	<0,7-51,4 ng/g ps
Reino Unido	suelo	0,078-3,2 ng/g ps
Europa Occidental	sedimentos	<0,2-6,9 ng/g ps
Japón, Osaka	sedimentos	9-28 ng/g ps

ps=peso seco.

Durante el proceso de producción de la espuma de poliuretano, se estima que aproximadamente el 0.01 % (es decir, 100 g/tonelada métrica) se libera a las aguas residuales (COM, 2001). Se cree que su presencia en el agua no supone un riesgo para la salud debido a su baja solubilidad en este medio. Sin embargo los penta-BDEs son fuertemente retenidos en sedimentos, tierra y lodos (Allchin y cols., 1999; de Wit, 2002). Diversos

estudios que utilizaron núcleos de sedimento muestran que los congéneres de penta-BDE depositados a principios de los años setenta aún se encuentran presentes en cantidades significativas indicando una elevada persistencia en este compartimento (Nylund y cols., 1992; Zegers y cols., 2000; Law y cols., 2006; Zegers y cols., 2003).

2.1.3 Dieta

Una de las principales vías de exposición humana a penta-BDEs es a través de la ingesta de alimentos (Domingo, 2004; Darnerud y cols., 2006). Como ya se ha mencionado anteriormente, los lodos de aguas residuales son uno de los principales receptores de penta-BDEs. La aplicación de lodos residuales a las tierras agrícolas es una de las causas de los niveles detectados de penta-BDEs en alimentos (Hale, 2002; Matscheko y cols., 2002; Fabrellas y cols., 2004; Moche y Tanner, 2004; Sjödin y cols., 2003). Los niveles hallados en peces y raíces comestibles pueden ser la fuente de la exposición para los animales domésticos como pollos y cerdos, y consecuentemente para los humanos (Burniston y cols., 2003).

Estudios realizados en alimentos revelan que las principales fuentes alimentarias de penta-BDEs son el pescado, productos agrícolas y la leche materna (Bocio y cols., 2003; VKM, 2005). De forma general, las concentraciones más altas se encuentran en el pescado y marisco, seguidos de aceites y grasas, así como, en productos de bollería (**Tabla 6**) (Domingo y cols., 2008).

Tabla 6. Concentraciones de penta-BDEs (ng/kg peso fresco) en productos alimentarios de Cataluña.

Alimento	BDE-99	BDE-100
Carne y productos cárnicos	9	1,6
Pescado y marisco	52,7	85,9
Vegetales	1,5	0,8
Frutas	2,1	0,7
Leche	1,2	0,4
Cereales	4,1	1,3
Aceites y grasas	36,1	12,6
Productos de bollería	12,6	3,5

Los peces grasos de las áreas contaminadas son una de las principales fuentes (Sjödin y cols., 2003). Esta afinidad por las grasas viene dada por las sus propiedades lipofílicas (WHO, 1994).

En particular, los congéneres mayoritarios encontrados en la mayoría de grupos de alimentos corresponden BDE-99 (Kiviranta y cols., 2004; Schecter y cols., 2004; Gómara y cols., 2007).

2.2 TOXICOCINÉTICA

La información sobre la toxicocinética de los penta-BDEs en humanos está limitada a los niveles encontrados en diversos tejidos y en la leche materna, lo cual demuestra que son absorbidos del medio ambiente y distribuidos por los tejidos. La mayoría de la información disponible sobre la toxicocinética de los penta-BDEs proviene de estudios realizados en roedores (ATSDR, 2004).

2.2.1 Absorción

La principal vía de exposición a penta-BDEs es la dieta (Alaee y cols., 1999; Wenning, 2002). Gracias a la técnica de radiomarcaje se ha demostrado que la absorción del BDE-99 se produce a través del tracto gastrointestinal (Darnerud y Risberg, 2006). Además, más de un 80 % de la dosis administrada es absorbida a las 24 horas de la exposición oral (Hakk y cols., 2002; Chen y cols., 2006).

2.2.2 Distribución

Los penta-BDEs, debido a su alto coeficiente de partición octanol-agua (K_{ow}) pueden permanecer almacenados en la grasa del cuerpo humano durante años (US EPA, 2008). Los congéneres predominantes encontrados en muestras humanas corresponden a los PBDEs de baja bromación: el tetra BDE-47, el penta BDE-99 y el hexa BDE-153 (Sjodin y cols., 2003, 2008). Este hecho sugiere que los PBDEs de bajo grado de bromación son más tóxicos y bioacumulativos comparados con los congéneres octa y deca (Siddiqi, 2003).

En humanos, se han detectado niveles de penta-BDEs en muestras de sangre, tejido adiposo, leche materna y tejido placentario (Meneses y cols., 1999; Strandman y cols., 2000). Estudios realizados en diferentes países sobre el contenido de penta-BDEs en tejido adiposo humano encontraron niveles similares, indicando un incremento y una bioacumulación a nivel mundial (Stanley y cols., 1991; Meneses y cols., 1999; Gómara y cols., 2007). Los niveles de penta-BDEs han incrementado exponencialmente en muestras de leche materna durante los últimos 25 años aumentando así la exposición del lactante (Hooper y cols., 2000; Schuhmacher y cols., 2007). Además, las concentraciones de penta-BDEs están altamente correlacionadas entre la madre y el feto. Este hecho sugiere que los penta-BDEs atraviesan la barrera placentaria y entran en la corriente sanguínea fetal (Gruenewald y cols., 2003; Mazdai y cols., 2003) (**Tabla 7**).

Tabla 7. Concentraciones de BDE-99 en muestras humanas.

Matriz	ng BDE-99/g lípidos	Referencias
Tejido adiposo mamario	7	She y cols., 2002
Tejido adiposo	10	Jonson-Restrepo y cols., 2005
Tejido adiposo	0,5	Meneses y cols., 1999
Leche materna	6	Schecter y cols., 2003
Leche materna	0,6	She y cols., 2007
Suero materno	6	Mazdai y cols., 2003
Suero materno	2,9	Bradman y cols., 2007
Suero fetal	7	Mazdai y cols., 2003

En roedores, el BDE-99 también se concentran en diversos órganos como el epidídimo, las glándulas adrenales, el tracto gastrointestinal, la piel, el hígado, el cerebro, los pulmones y los ovarios (**Figura 3**) (Eriksson y cols., 2002; Hakk y cols., 2002; Gill y cols., 2004; Darnerud y Risberg, 2006).

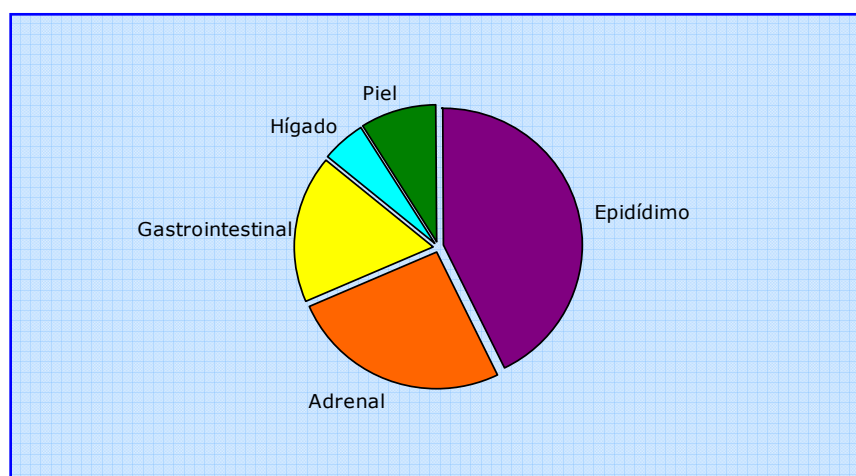


Figura 3. Distribución del BDE-99 en diferentes órganos de rata.

El BDE-99 tiene preferencia por los tejidos lipofílicos (Hakk y cols., 2002). Se estima que el 21 % de la dosis administrada se deposita en la piel al tercer día de la exposición. Al cabo de 6 días, el 18 % de la dosis todavía permanece en la piel, bajando al 12 % al duodécimo día tras la exposición. Una fracción importante de la dosis permanece en el tejido adiposo (14 y 10 % para los días 6 y 12 respectivamente). Basándose en estos

resultados, se estima el tiempo de vida media ($t_{1/2}$), que es el tiempo que tarda el organismo en reducir a la mitad la concentración de un tóxico. En el caso del BDE-99 se estima el $t_{1/2}$ para ratas macho en 6 días, indicando su potencial para bioacumularse.

En humanos, se estima que el $t_{1/2}$ es de 2.9 años. Esta estimación se realizó a partir de datos sobre el consumo diario de BDE-99 y a partir de valores encontrados en tejido adiposo, leche materna y suero (Geyer y cols., 2004).

2.2.3 Metabolismo

Los diferentes estudios realizados sobre el metabolismo del penta-BDE, en particular el BDE-99, coinciden en que el primer paso es la formación de un intermedio epóxido catalizado por el citocromo P450 (Chen y cols., 2006; Hakk y cols 2002, 2006; Staskal y cols., 2006) (**Figura 4**). El anillo 2,4-dibromo (**A**) tiene preferencia por la oxidación debido a que al tener menor número de átomos de Br presenta menos impedimentos estéricos. Este intermedio es bastante reactivo y puede producir diferentes metabolitos mediante diversas vías:

1. la **hidroxilación aromática** generalmente sucede a través del anillo epóxido con preferencia por los lugares orto y meta respecto al enlace éter (**1a**).
2. el **ataque nucleófilo** de GSH al intermedio epóxido dando un conjugado. Después de una serie de reacciones relacionadas con la vía del ácido mercaptúrico, resulta en un intermedio conjugado con cisteína (**2a**) que finalmente resultara en un producto tiol (**2b**).
3. una **desbromación oxidativa** del BDE-99 dando como producto tetra-BDE hidroxilado (**3a**).

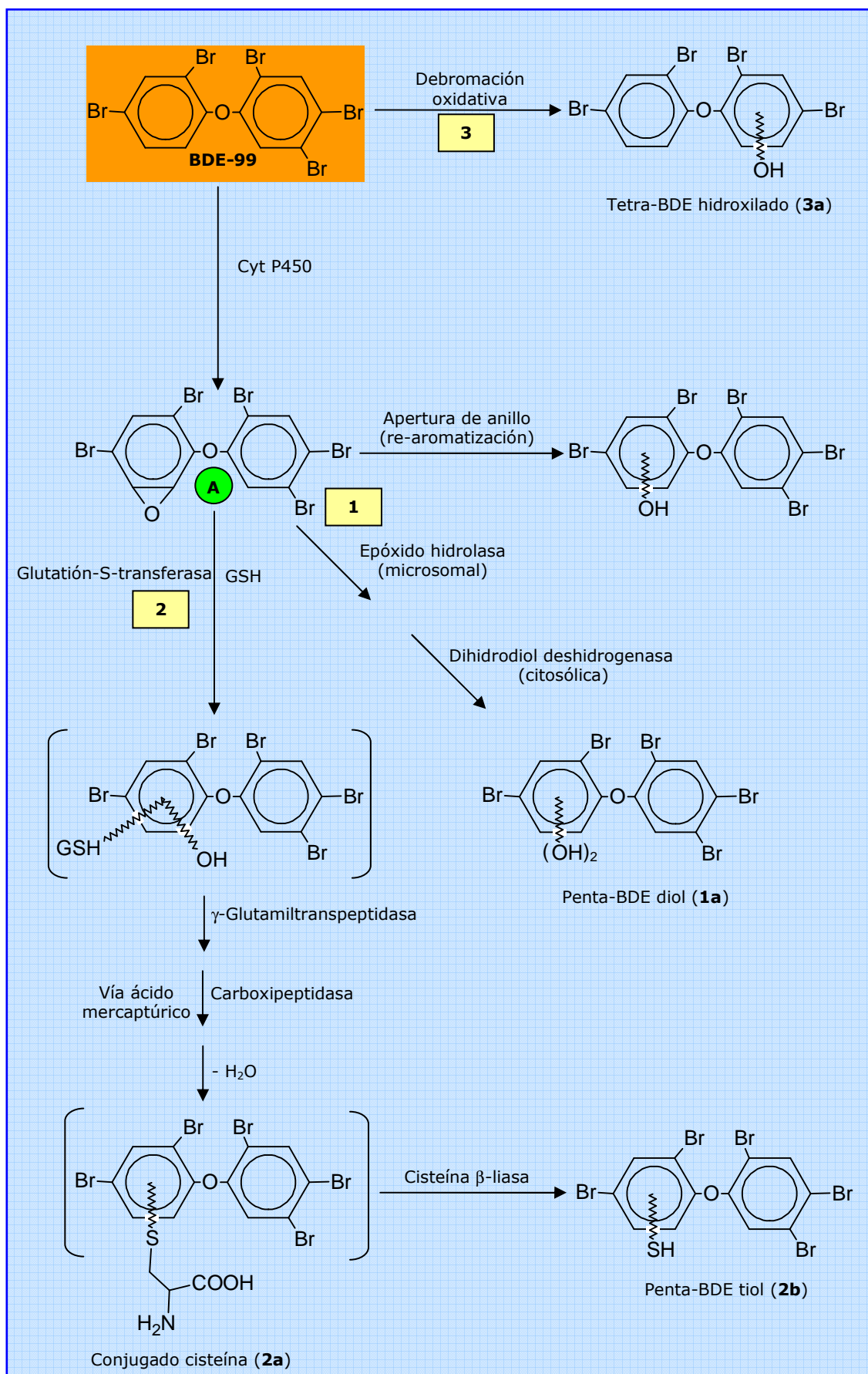


Figura 4. Metabolismo del BDE-99.

Todos estos pasos metabólicos, se confirmaron al encontrar los diferentes conjugados en la bilis y las heces de ratas a las que se le administró BDE-99 (Hakk y cols., 2002; Chen y cols., 2006).

2.2.4 Excreción

Para el congénere BDE-99 la vía principal de excreción es mediante las heces (43 %) y en menor grado la urinaria (inferior al 1 %) (Hakk y cols., 2002). Ésta última vía parece tener más importancia en ratones que en ratas.

2.3 EFECTOS ADVERSOS

Hasta el momento, los estudios llevados a cabo fundamentalmente en roedores, se han centrado en efectos sobre la reproducción, así como sobre el desarrollo pre y postnatal. También se sugiere que puedan alterar las funciones hepática, renal y tiroidea (US EPA, 2008).

No se han realizado estudios toxicológicos por inhalación de penta-BDEs. La dosis letal LD₅₀ (dosis a la que se espera una mortalidad del 50 % de una población) para la exposición oral a BDE-99 se ha estimado entre 0.5-5g/kg para ratas (Gill y cols., 2004).

2.3.1 Efectos hepáticos y renales

La exposición subcrónica y crónica a penta-BDEs indica que el hígado es uno de los órganos diana de su toxicidad. La exposición oral indujo un incremento en el peso del hígado y una hepatomegalia (IRDC, 1975; WIL Research Laboratories 1984).

Por otro lado, la exposición a penta-BDEs parece inducir un incremento en las actividades enzimáticas microsomales hepáticas implicadas en el

metabolismo de xenobióticos (etoxiresorufin-O-dietilasa (EROD), pentoxiresorufin-O-dietilasa (PROD), uridina difosfato-glucoronosil transferasa (UDGPT), citocromo P450, etc.) (Fowles y cols., 1994; Hallgren y cols., 2001; Zhou y cols., 2001; Szabo y cols., 2009). Este aumento en la actividad microsomal hepática también se observó en la descendencia de ratas gestantes intoxicadas con la mezcla penta-BDE DE-71 (Zhou y cols., 2002).

Hasta el momento, los estudios experimentales realizados no han mostrado efectos renales tras la exposición oral a la mezcla comercial penta-BDE (IRDC, 1975; ATSDR, 2004).

2.3.2 Efectos neurológicos

Son numerosos los estudios experimentales con ratones que han evaluado los efectos a nivel de neurocomportamiento tras la exposición prenatal o postnatal a PBDEs individuales. Estos estudios indican, de forma colectiva, que el sistema nervioso en desarrollo es diana de algunos congéneres, provocando alteraciones motoras, de aprendizaje y memoria en el ratón adulto. Estas alteraciones en el comportamiento motor persisten y empeoran con la edad.

La exposición a BDE-99 durante el período crítico (día postnatal 10) de desarrollo del cerebro produce trastornos en el comportamiento motor en edad adulta de una forma dependiente de la dosis. La actividad motora evaluada en el *open field* mostró una hipoactividad seguido de hiperactividad (Eriksson y cols., 1998, 2002). Este mismo comportamiento fue observado por Viberg y colaboradores (2002, 2005) que lo atribuyeron a cambios en el sistema colinérgico ya que los ratones expuestos a BDE-99 durante el desarrollo postnatal (días postnatales 10-14) mostraron una disminución de receptores de acetilcolina en el hipocampo.

Estudios *in vitro* en neuronas de cerebelo preparadas a partir de ratas expuestas prenatalmente a BDE-99 mostraron un incremento de la vía glutamato-óxido nítrico-cGMP. Esta activación puede desencadenar

alteraciones en procesos cerebrales modulados por esta vía como por ejemplo algunos tipos de aprendizaje y memoria realizados en roedores (Llansola y cols., 2007).

Más recientemente, Alm y colaboradores (2008) encontraron que los niveles de la proteína asociada al crecimiento neuronal (Gap43) estaban incrementados en el córtex de ratas tratadas. Este hecho parece indicar efectos en la regulación del citoesqueleto y en la maduración neuronal de la corteza cerebral.

2.3.3 Efectos sobre reproducción y desarrollo

La información disponible sobre los efectos de los penta-BDEs en la reproducción y el desarrollo es limitada. A pesar de ello, parece ser que hay indicios de toxicidad reproductiva tanto en machos como en hembras. La exposición in útero provoca la interrupción del desarrollo neuroconductual y causa efectos permanentes sobre el sistema reproductivo que se manifiestan en la edad adulta.

La exposición oral postnatal a la mezcla DE-71 durante 5 ó 31 días produjo retrasos en la retracción del prepucio así como una reducción de los pesos de la vesícula seminal y la próstata. Este retraso de la pubertad también se observó en ratas hembra expuestas a la misma mezcla. En este caso, las hembras mostraron un retraso de 1.8 días en la apertura vaginal respecto a las control (Stoker y cols., 2004).

La evaluación de los efectos de la exposición a BDE-99, durante la gestación, sobre el sistema reproductivo en ratas, mostró cambios ultraestructurales en los ovarios de las crías. Particularmente se observaron cambios degenerativos que incluían vacuolización y acumulación de vesículas en el citoplasma de la células del estroma y necrosis del epitelio vaginal (Talsness y cols., 2005). Los efectos en la descendencia masculina incluían un descenso significativo del número de espermátidas y de espermatozoides, así como de la producción diaria de esperma (Kuriyama y cols, 2005; Talsness y cols., 2005).

Kuriyama y colaboradores (2005) evaluaron también los efectos de la exposición prenatal a BDE-99 durante el desarrollo. Las crías mostraron alteraciones en marcadores de desarrollo como un retraso en la erupción de los incisivos así como, del reflejo espontáneo a girarse. En otro estudio realizado por Lilienthal y colaboradores (2006), la exposición a BDE-99 redujo significativamente la distancia ano-genital (marcador de desarrollo sexual) en la descendencia masculina. Además, los niveles de estradiol y testosterona circulantes disminuyeron significativamente en adultos. Estos animales presentaron un incremento en el consumo de agua azucarada lo que indica feminización. En las hembras se observó un retraso de la pubertad marcado por un descenso en el número de folículos ováricos secundarios. Estos mismos autores sugirieron una actividad moduladora endocrina por parte del BDE-99 debido a la persistencia de los efectos tras la exposición. Esta actividad ha sido confirmada por Ceccatelli y colaboradores (2006) tras observar cambios en la expresión genética del receptor de progesterona, receptores estrogénicos (ER α y ER β) y el factor de crecimiento insulínico encontrados en rata.

2.3.4 Efectos endocrinos

Estudios *in vitro* sugieren que hay un potencial comportamiento como disruptores de algunos PBDEs sobre funciones endocrinas (Meerts y cols., 2001; Ceccatelli y cols., 2006).

Desde los años 80 se ha relacionado el papel de los estrógenos y andrógenos con el desarrollo de las diferentes áreas del cerebro implicadas en la reproducción (Mac Lusky y Naftolin, 1981). La exposición temprana a estrógenos y andrógenos tiene efectos en el hipocampo, el cual juega un papel importante en el aprendizaje espacial y la memoria (Mc Ewen y cols., 1995). El hipocampo de rata muestra un incremento de ER α y ER β durante un corto periodo del desarrollo perinatal (O'Keefe y Handa, 1990). Este hecho coincide con una expresión pasajera de la aromatasa que convierte la testosterona en estrógeno (Mac Lusky y cols., 1987). Esta interacción de los receptores con sus estrógenos parece intervenir en la

diferenciación sexual, así como, en la estructura y función del hipocampo. La exposición a sustancias tóxicas que perturben el equilibrio de las hormonas gonadales en esta etapa puede producir cambios en la morfología del hipocampo y alterar ese patrón normal de diferenciación en el aprendizaje espacial. Además, la exposición a estas sustancias con propiedades estrogénicas o antiestrogénicas pueden afectar a la función cognitiva durante la edad adulta y la vejez (Schantz y Widholm, 2001).

Un estudio realizado en células embrionarias de riñón sobre el potencial estrogénico de los PBDEs en ER α y ER β , reveló que algunos congéneres (incluidos los penta-BDEs) pueden ser agonistas de ambos receptores y que sus metabolitos hidroxilados incrementan este potencial estrogénico (Meerts y cols., 2001).

Otras hormonas que intervienen en el desarrollo normal del cerebro son las tiroideas. Éstas están involucradas en la regulación de varios aspectos del desarrollo del sistema nervioso incluyendo la proliferación neuronal, migración celular y diferenciación. Un hipotiroidismo produce cambios morfológicos y neuroquímicos con daños permanentes en el neurocomportamiento que se reflejan en cambios en la actividad motora, emocional y déficit en aprendizaje y memoria (Akaike y cols., 1991; Stein y cols., 1991).

Los penta-BDEs pueden interferir especialmente en la función tiroidea. Sus metabolitos hidroxilados tienen una estructura similar a las hormonas tiroideas 3,5-diiidotironina (T₂), 3,3,5-triiodotironina (T₃) y 3,3,5,5-tetraiodotironina o tiroxina (T₄). El mecanismo de disrupción de los penta-BDEs sobre la función tiroidea no se ha establecido. Una hipótesis sería que alteran la enzima UDPGT que regula la velocidad de conjugación y excreción de la T₄ (Hooper y McDonald, 2000). Algunos estudios sugieren la unión a los receptores hormonales (TR α 1 y TR β) en humanos (Marsh y cols., 1998). Además, pueden interferir con el transporte de las hormonas compitiendo por la unión a su proteína transportadora, la transtiretina (TTR) (Meerts y cols., 2000).

La exposición a la mezcla DE-71 en ratas produjo un descenso de los niveles séricos de T3 dependiente de la dosis (Zhou y cols., 2001). Además, redujo los niveles de T4 tanto en ratas expuestas oralmente durante la gestación como en su descendencia (Zhou y cols., 2002). Esta misma mezcla fue estudiada por El Programa de Investigación de Disruptores Endocrinos de la EPA (*EPAs Endocrine Disruptor Screening Program, EDSP*) que utilizó ratas macho y hembra en la pubertad con el fin de encontrar agentes activadores de la glándula tiroides. Ambos sexos mostraron retraso en el desarrollo de los órganos reproductores (retracción del prepucio en machos y apertura vaginal en hembras) acompañado de cambios en los niveles de T4, T3 y tirotropina (TSH) e inducción de actividades enzimáticas microsomales hepáticas (EROD, PROD y UDPGT) (Stoker y cols., 2004).

Hakk y colaboradores (2002) examinaron los efectos de la exposición oral al congénere BDE-99 mediante una dosis única sobre los niveles totales de T4 en plasma de ratas macho adultas. Los resultados del experimento mostraron que los niveles de T4 incrementaron el doble respecto a las ratas control a los tres y seis días mientras que los niveles se recuperaron a los 12 días.

Un estudio más actual realizado en ratas a las que se les administraron BDE-99 reveló efectos dependientes del tiempo en los niveles de T4, T3 y TSH. Estos efectos se vieron acompañados de daños en el epitelio de la glándula tiroidea (Du y cols., 2008). Kuriyama y colaboradores (2007) demostraron disrupción endocrina del BDE-99 a dosis muy bajas encontrando que los niveles de T4 disminuyeron significativamente en crías de ratas expuestas durante la gestación.

3. DISRUPTORES ENDOCRINOS

El término disruptores endocrinos (DE) define hoy día a un grupo de sustancias químicas de muy diferente origen, estructura y uso. Los DE actúan a dosis muy bajas y en muchos casos guardan semejanza con la estructura molecular de las hormonas esteroideas (**Figura 5**).

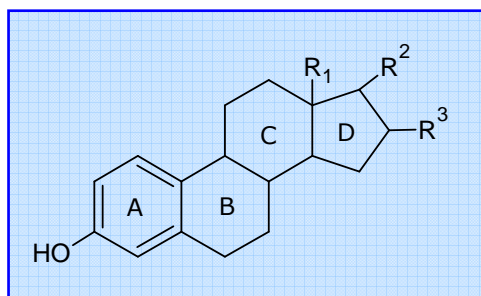


Figura 5. Estructura básica de una hormona esteroidea.

Se trata de sustancias exógenas al organismo, naturales o sintéticas, que interfieren con la producción, liberación, transporte, metabolismo, unión, acción biológica o eliminación de las hormonas responsables del mantenimiento de la homeostasis y regulación del desarrollo (COM, 1999). En algunas ocasiones se trata de compuestos a los que los tests habituales de toxicidad no habían atribuido efecto tóxico alguno. Además, muchos de ellos presentan gran estabilidad e inercia para reaccionar químicamente, por lo que reúnen características óptimas para haber sido, y ser empleados, en grandes cantidades y con gran libertad sin protección medioambiental especial. En otras ocasiones, se trata de compuestos bien conocidos por su capacidad para acumularse y persistir en las cadenas tróficas, como es el caso de los conocidos y caracterizados contaminantes orgánicos persistentes (POPs), sobre los que se han establecido medidas de control adecuadas.

3.1 ACTUACIÓN DE LOS DE

Los DE alteran el mensaje endocrino de varias formas. Pueden mimetizar la hormona ocupando su lugar (agonistas), pueden bloquear su acción compitiendo por el receptor hormonal (antagonistas), o pueden modificar la síntesis de la hormona o del receptor correspondiente (Fernández y cols., 1998; Sonnenschein y Soto, 1998) (**Figura 6**). Como consecuencia, se produce una alteración del sistema hormonal que puede tener entre otros, efectos neurológicos o reproductivos.

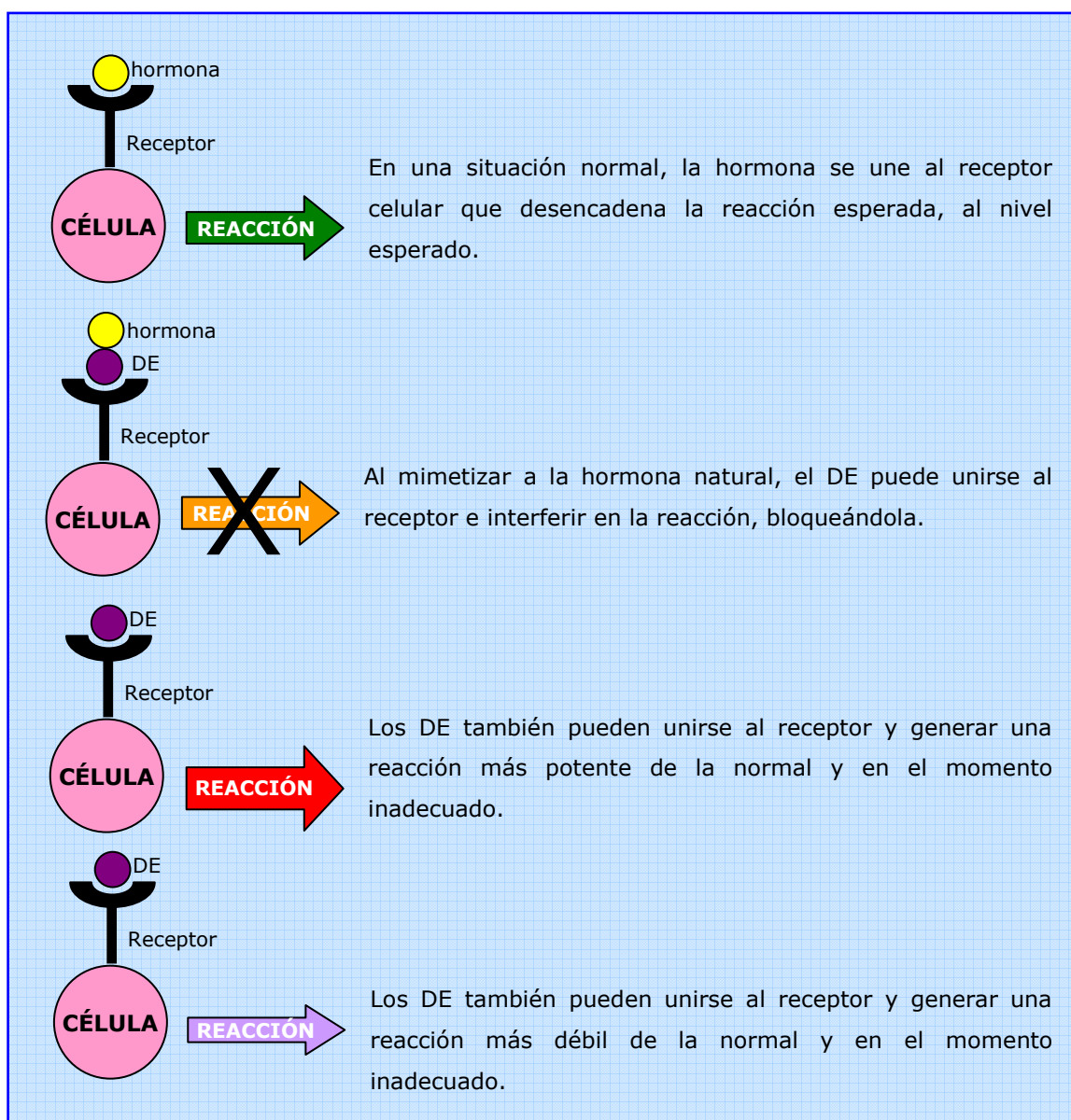


Figura 6. Acciones de los DE.

Se ha sugerido que los DE presentan características particulares que los hacen distintos a otros tóxicos medioambientales y que condicionan cualquier aproximación a la relación de causalidad buscada entre exposición y enfermedad (Colborn y cols., 1993). Esta forma especial de toxicidad podría deberse a que:

1. El momento de la exposición es decisivo para determinar el carácter, la gravedad y la evolución posterior del efecto. Los efectos son distintos sobre el embrión, el feto, las crías o el adulto. Si actúan durante un periodo crítico, como por ejemplo en los estadios tempranos de la vida, caracterizados por una rápida diferenciación celular y organogénesis, producen lesiones como deformaciones en órganos reproductores o problemas en el desarrollo del sistema nervioso central.
2. La exposición embrionaria puede tener consecuencias que no son evidentes hasta la madurez del individuo. El desarrollo anormal no se expresa necesariamente en el nacimiento; sus efectos pueden permanecer latentes durante años o hacerse patentes en la descendencia en lugar de en los individuos expuestos.
3. No existe una concentración exacta que produzca un efecto toxicológico. Además, esa concentración es muy inferior al límite de seguridad para otros aspectos toxicológicos distintos de la disrupción endocrina.
4. Presentan una relación dosis-efecto no necesariamente lineal que, en algunos casos, es aparentemente paradójica con curvas en forma de U y U invertida. Es posible que la acción combinada de los disruptores puedan producir un efecto sinérgico, antagónico o simplemente aditivo.

3.2 EXPOSICIÓN HUMANA A DE

El rango de compuestos químicos considerados DE es muy amplio y crece día a día (**Tabla 8**). La exposición de los seres vivos a los DE es universal, ya que se encuentran distribuidos por todo el mundo como consecuencia de un empleo generalizado. Contribuye a ello su baja biodegradabilidad, el transporte a otros lugares por el aire, el agua y la bioacumulación en la cadena trófica. Además, los compuestos acumulados en la grasa son transmitidos a la descendencia a través de la madre durante la gestación y la lactancia (IPCS, 2002).

Tabla 8. Compuestos químicos considerados DE.

Compuestos	Usos
DDT y sus metabolitos: DDD y DDE	Pesticidas prohibidos
Dieldrín	Pesticida prohibido
Endosulfan y compuestos relacionados:	
α -endosulfán	
β -endosulfán	Pesticidas en uso
Endosulfán éter	
Endosulfán diol	
Metoxicloro e hidroximetabolitos	Pesticida estructura similar al DDT
Toxafeno	Pesticida prohibido
Alquilfenol polietoxilatos:	Surfactantes industriales presentes en detergentes y plásticos
p-nonilfenol	
p-octilfenol	
Ftalatos	Plastificantes de PVC y cosméticos
Bisfenol A	Precursor de resinas epoxi
BHA	Antioxidante
PCB	Transformadores eléctricos, prohibido
Fenilfenol	Desinfectantes
PBB	Retardantes de llama
PBDE	Retardantes de llama

DDD: diclorodifenildicloroetano; DDE: diclorofenildicloroetano; DDT: clofenotano; PBB: bifenoles polibromados; BHA: Butilhidroxianisol; PBDE: éteres de difenilo polibromados; PCB: bifenilos policlorados; PVC: cloruro de polivinilo.

La mayor parte de los DE *clásicos* fueron de gran interés para toxicólogos y expertos medioambientales ya que muchos de ellos estaban incluidos en las listas de los POPs. Este es el caso de los pesticidas organoclorados (ejemplo paradigmático del DDT y sus metabolitos) y los bifenilos policlorados (PCBs), usados hasta hace poco en los transformadores eléctricos, como aceites refrigerantes o en la formulación de pesticidas. Ambos fueron identificados como mimetizadores endocrinos y bajo sospecha de ser causa de enfermedades en las especies animales, e incluso en humanos (Colborn y cols., 1993; Maroni y Fait, 1993).

Los *nuevos* DE están siendo utilizados en muchos productos de uso cotidiano. El grupo de los alquilfenoles (*p*nonilfenol), utilizados en los detergentes industriales, como espermicida, como aditivo en la fabricación del plástico, como agentes de secado o como humectantes en la formulación de pesticidas (Sonnenschein y Soto 1998; Rudel y cols., 2003). El bisfenol A y compuestos relacionados, empleados en la fabricación del plástico policarbonato (envases alimentarios y biberones), en resinas epoxi (en el interior de latas de conserva), selladores dentales y en la composición de pegamentos de uso habitual, entre otros (Olea y cols., 1996; Pulgar y cols., 2000).

Recientemente se ha expandido la lista de los *nuevos* DE, que incluye ahora compuestos con múltiples aplicaciones como los ftalatos (*n*-butilftalato, benzibutilftalato) usados en la industria del envasado de alimentos, tratamientos de suelos, antioxidantes alimentarios, y como aditivos en el plástico proporcionándole elasticidad, en productos tales como bolsas de transfusión de sangre, tetinas y mordedores infantiles (Hoppin y cols., 2002). También pertenecen a este último grupo los parabens utilizados en formulaciones cosméticas y filtros solares (Schlumpf y cols., 2001, 2004).

Unas 550 sustancias constituyen la lista de sustancias objeto de evaluación de la estrategia comunitaria sobre DE (COM, 2001). De ellas, la Comisión Europea considera que está suficientemente probada la

capacidad de disrupción endocrina de aproximadamente una cuarta parte. Sin embargo, todavía se necesita más información de la mayoría de estas sustancias. Entre ellas, se encuentran los PBDEs, aditivos retardantes de llama con una estructura química similar a las dioxinas y a los PCBs.

3.3 EFECTOS ADVERSOS DE LA EXPOSICIÓN A DE

En los últimos años ha surgido a nivel mundial preocupación sobre los potenciales efectos adversos que podrían resultar de la exposición a DE.

3.3.1 Alteraciones de los parámetros de calidad espermática

Investigadores daneses hicieron saltar las alarmas al publicar un estudio pionero sobre el descenso de la calidad del semen. Este hecho empezó a preocupar a los expertos en 1992 (Carlsen y cols., 1992). Inicialmente, los factores asociados al descenso de calidad seminal eran el tabaco, el estrés, el sedentarismo, el consumo de drogas, hábitos alimenticios y el uso de ropa ajustada. A estos factores se unen los compuestos químicos ambientales. El efecto combinado de ciertos contaminantes, como los pesticidas organoclorados persistentes (DDT, metoxicloro, las drinas, etc.), los PCBs o los PBDEs que se comportan como DE son una de las causas de esta pérdida de la calidad seminal (López-Teijón y cols., 2007; Olea y Fernández, 2007).

3.3.2 Alteraciones del sistema genitourinario

Las alteraciones en el desarrollo del sistema genitourinario, entre ellas la criptorquidia (testículos no descendidos), frecuente en el hombre y asociado con el cáncer de testículo y con infertilidad, así como hipospadias (anomalía de la abertura del pene), son cada vez más frecuentes. Estas alteraciones parecen tener una etiología común. Se ha sugerido la

hipótesis de que la exposición a compuestos con propiedades estrogénicas durante la etapa fetal de desarrollo, puede dar lugar a una distribución anómala de células funcionales y parenquimatosas que conducen a una disfunción orgánica, y, en última instancia, a una enfermedad clínica (Brucker-Davis y cols., 2003; Skakkebaek, 2003).

Estudios de investigación clínica y epidemiológica, sugieren que el origen de las enfermedades del tracto genitourinario masculino puede encontrarse una alteración significativa en la diferenciación de las células germinales. Los compuestos que actúan como estrógenos inhiben la replicación de las células de Leydig y como consecuencia, la producción de testosterona. Ésta es la responsable de la masculinización del tracto reproductor masculino y del descenso de los testículos. Por ello, una disminución en el número de células de Leydig es causa de hipospadias y criptorquidia (Jensen y cols., 1995).

3.3.3 Efectos sobre la función tiroidea

Las hormonas tiroideas son fundamentales durante la etapa del crecimiento y desarrollo, especialmente para la maduración del cerebro. Diferentes agentes presentes en el medio ambiente pueden alterar su producción tanto en los animales como en los humanos (Capen, 1992; Tilson y Kodavanti, 1997, Crisp y cols., 1998). Niveles elevados de policlorodibenzodioxinas (PCDD), policlorodibenzofuranos (PCDF) y PCBs en la leche materna se correlacionan con niveles plasmáticos bajos de hormonas tiroideas en la madre y TSH en su descendencia (Koopman-Esseboom y cols., 1994). Recientemente, se ha señalado que cada uno de los DE condicionaría su propio espectro de alteraciones en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-glándula tiroidea (**Figura 7**) (Schmutzler y cols., 2004).

3.3.4 Efectos neuroendocrinos

La descendencia de mujeres expuestas mediante la dieta a dosis altas de PCB y PCDF presenta retrasos en el desarrollo mental con coeficientes intelectuales bajos, disfunción cognitiva y dificultades de memoria y comportamiento. La exposición pre y postnatal a dosis bajas de contaminantes ambientales como PCBs, PCDDs y PCDFs, produjo retrasos en el desarrollo psicomotor en niños (Jacobson y Jacobson, 1996). La exposición neonatal a algunos PBDEs produjo efectos en el comportamiento similares a los vistos tras la exposición a PCBs (Eriksson y cols., 1997). De todas formas, faltan estudios que confirmen que la neurotoxicidad de estos compuestos sea por su papel como DE.

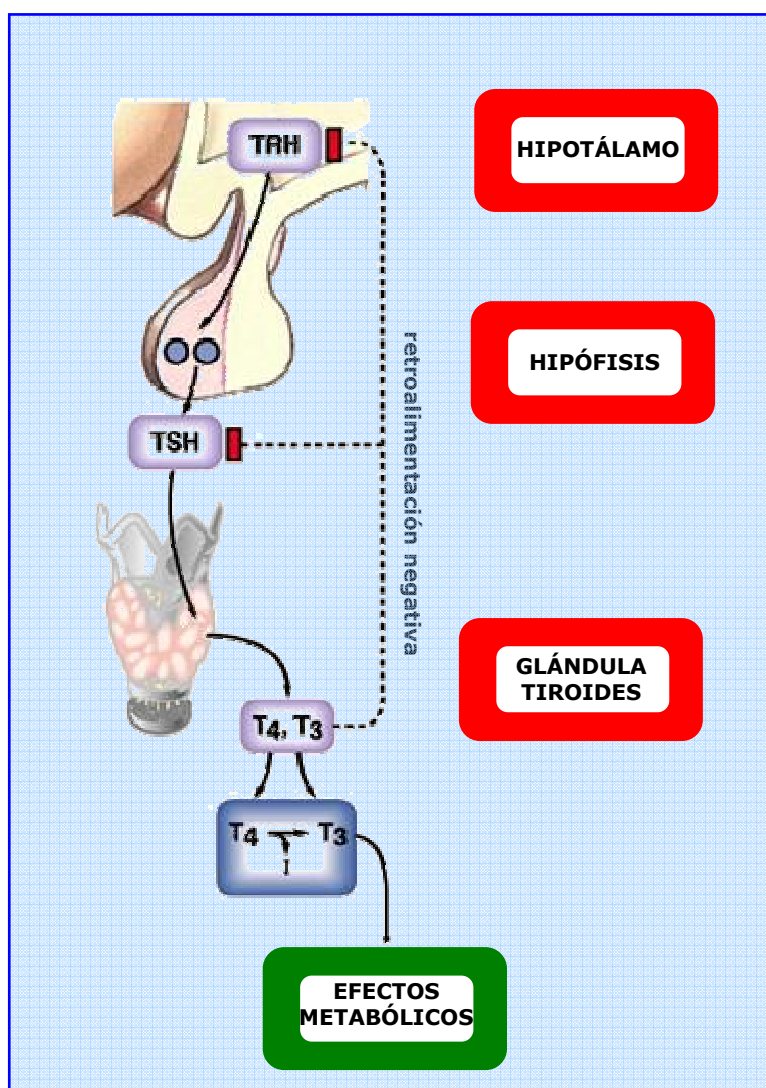


Figura 7. Representación del eje hipotálamo-hipófisis-glándula tiroides.

4. ESTRÉS OXIDATIVO (EO)

El daño celular inducido por la exposición a algunos tóxicos, entre ellos los PBDEs, se manifiesta con cambios en el estatus oxidativo que pueden asociarse a una serie de procesos patológicos.

4.1 RADICALES LIBRES Y ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

El conocimiento de los efectos biológicos de las especies de oxígeno reactivas corre paralelo al estudio del metabolismo energético de los seres vivos, proceso en el que la presencia de oxígeno es imprescindible. En efecto, hoy sabemos que el oxígeno (uno de los elementos gaseosos más abundantes de la naturaleza) se presenta en forma de gas diatómico (O_2). El oxígeno molecular, a pesar de contener un número par de electrones (16), se presenta como una molécula paramagnética donde dos de sus electrones están localizados en orbitales diferentes y girando en un mismo sentido con espines paralelos (**Figura 8**). Esto tiene un gran interés en relación con su mecanismo de acción molecular y, especialmente, con su papel oxidativo.

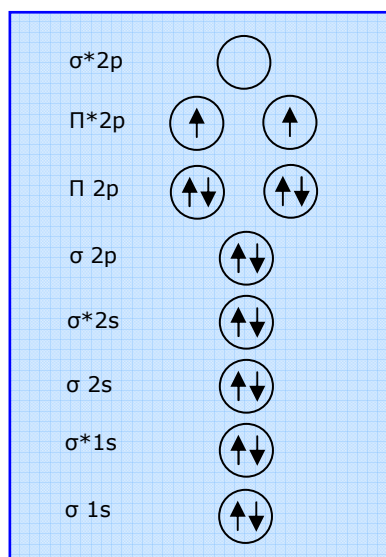


Figura 8. Orbitales del oxígeno molecular (O_2) en estado basal.

Los organismos superiores como el ser humano, no pueden existir sin oxígeno, a su vez éste es peligroso para su existencia ya que puede formar radicales libres de oxígeno (RLOs): es la gran paradoja del oxígeno (Davis, 1995).

Se denomina RLO a toda forma molecular o atómica del oxígeno que posee uno o más electrones no apareados girando en su orbital más externo. Esta condición, químicamente muy inestable, lo vuelve muy activo puesto que el electrón impar busca otro electrón para salir del desequilibrio atómico. Con este fin, sustrae un electrón a cualquier molécula vecina, es decir que "oxida" la molécula, alterando su estructura y convirtiéndola a su vez en otro radical libre deseoso por captar un electrón. Se genera así una reacción en cadena (Fridovich, 1978).

A menudo, el término "radical de oxígeno" se utiliza de forma errónea ya que se asigna a todos los reactivos intermediarios de las especies de oxígeno, incluyendo aquellas formas moleculares que no son radicales. Por este motivo, sería más indicado hablar de *especies reactivas de oxígeno* (EROs) en lugar de radicales libres de oxígeno (**Tabla 9**) (Sies, 1991; Abuja y Albertini, 2001).

Tabla 9. Especies reactivas de oxígeno (EROs).

Radicales		No radicales	
$O_2^{\bullet -}$	Anión superóxido	1O_2	Oxígeno singlete
HO_2^{\bullet}	Radical hidropéroxilo	H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
HO^{\bullet}	Radical hidroxilo	$ONOO^{\bullet}$	Peroxinitrito
RO^{\bullet}	Radical alcoxilo	$ROOH$	Hidropéroxido
ROO^{\bullet}	Radical peroxilo		

4.2 ORIGEN DE LAS EROs

Se sabe que los RLOs y las EROs se producen de forma natural como intermediarios o productos de numerosas reacciones oxidativas de las células, así como a través de diversos procesos físico-químicos o de biotransformación. Dado que también existen fuentes externas, se ha considerado el origen tanto endógeno como exógeno de las EROs.

4.2.1 Fuentes endógenas

Entre las fuentes endógenas destacan:

- La cadena respiratoria (Balaban y cols., 2005), donde la reducción monovalente de la molécula de oxígeno da lugar a la formación de la mayoría de estos compuestos. Debe señalarse que el 95 % del oxígeno que respiramos es reducido a H_2O por la acción de la citocromo oxidasa-a-3, último eslabón de la cadena de transporte electrónico. Además, a nivel del complejo quinona-semiquinona-ubiquinol, la coenzima Q (CoQ) actúa como aceptor de electrones dando origen a la formación de radicales $O_2^{\bullet-}$ (**Figura 9**).

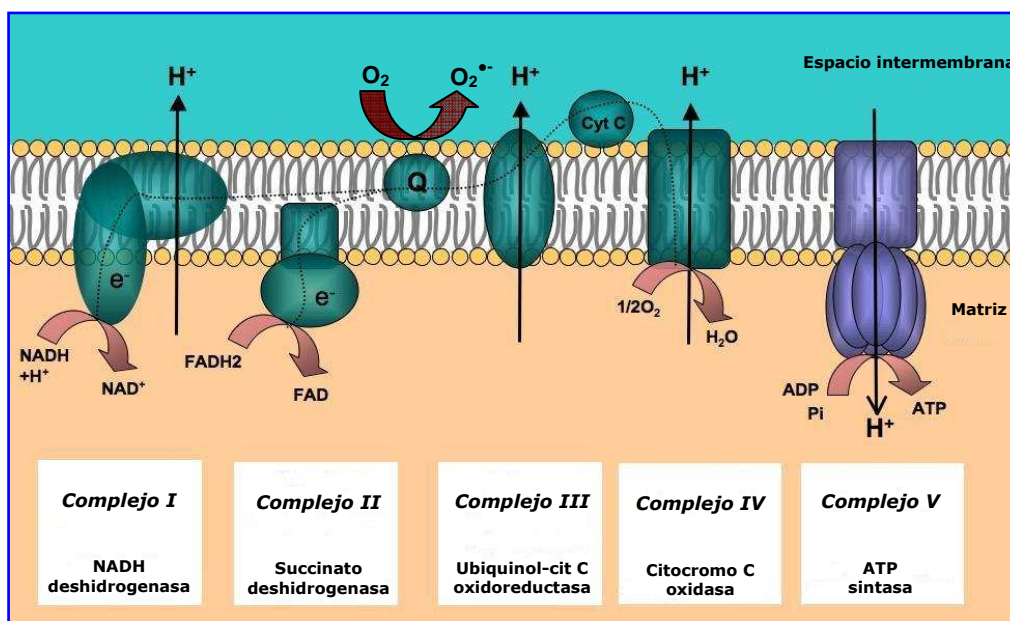


Figura 9. Oxidación del oxígeno a través de la cadena respiratoria.

- Las células fagocitarias (neutrófilos, monocitos o macrófagos), utilizan el sistema de la NADPH oxidasa generando directamente ión superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Quinn y Gauss, 2004). Por otra parte, como mecanismo de defensa, dichas células también generan óxido de nitrógeno (NO^{\bullet}), por acción de la oxido-nítrico-sintasa (NOS) sobre la arginina intracelular. La combinación del $O_2^{\bullet-}$ con el NO^{\bullet} da lugar a la formación del $ONOO^-$ capaz de inducir peroxidación lipídica en las lipoproteínas (**Figura 10**).

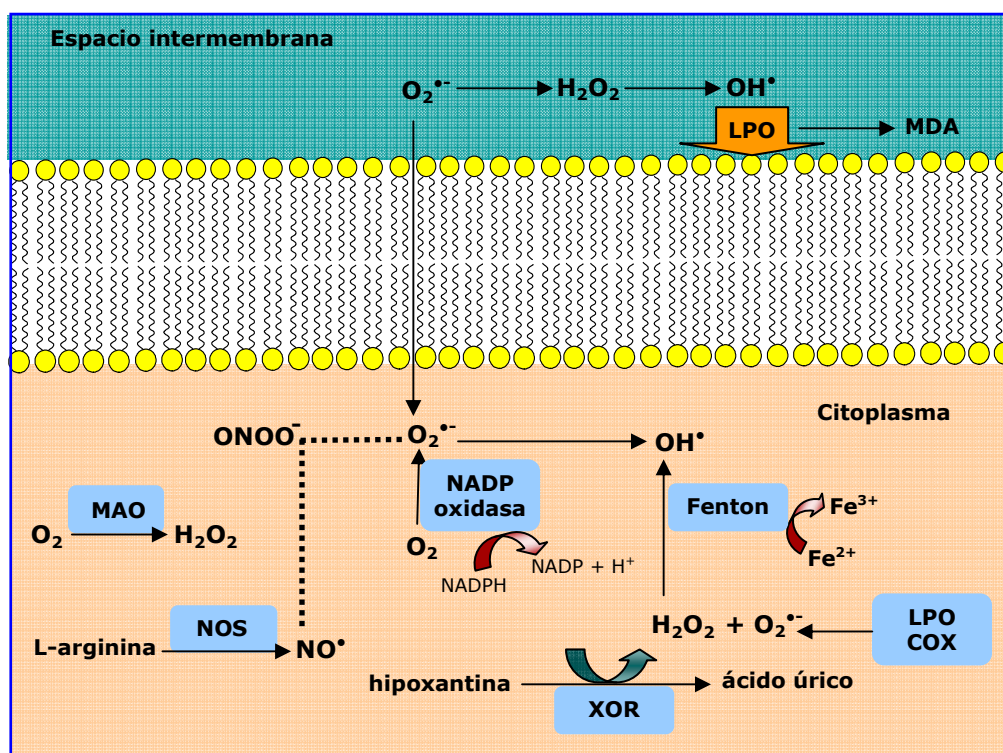


Figura 10. Fuentes endógenas de EROs.

- La autooxidación de compuestos de carbono reducido (RH) como aminoácidos, proteínas, lípidos, glúcidos y ácidos nucleicos dan lugar también a la formación de estas EROs.
- La activación catalítica de diversos enzimas del metabolismo intermediario como la hipoxantina y xantina oxidasa, aldehído oxidasa, monoamino oxidasa (MAO), ciclooxigenasa (COX) y lipoxigenasa (LPO), son fuentes representativas de esta producción (Beckman y Ames, 1998; Lindsay y Astley, 2002).

4.2.2 Fuentes exógenas

Los factores exógenos que incrementan la producción de EROs son:

- Químicos:
 - Metales pesados (Pb, Cd, Hg y As). El mecanismo de acción tóxica fundamental de los metales ocurre a nivel de la membrana celular, donde éstos se fijan sobre la superficie externa por ligandos esenciales y afectan tanto los fenómenos de permeabilidad, como el funcionamiento normal de las enzimas implicadas en el transporte activo de numerosos constituyentes. Un aumento de metales pesados, implicados en reacciones tipo Fenton (**Figura 11**), son fuente de radicales $O_2^{\bullet-}$ y HO^{\bullet} (Stohs y Bagchi, 1995; Valko y cols., 2005).

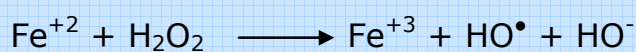


Figura 11. Reacción de Fenton.

- Algunos fármacos como antibióticos y antineoplásicos, que en su mecanismo de acción tóxica está involucrada la cascada radicalaria (Sener y cols., 2002; Linares y cols., 2009).
- Xenobióticos o moléculas extrañas al organismo son origen de una producción indirecta de EROs. La exposición a algunos pesticidas (paraquat, malation) (Djukicmuestra y cols., 2007; Réus y cols., 2008) muestra la inducción de EO con un aumento de la peroxidación lipídica y una disminución de la capacidad antioxidante. En este último grupo se incluyen también una serie de aditivos industriales (PCBs, PBDEs) que pueden inducir EO, daño al ADN y apoptosis (Zhang, 2005; Venkataraman y cols., 2007; Giordano y cols., 2008; Shao y cols., 2008).

- Físicos:
 - Las radiaciones ultravioleta y visible constituyen el principal factor generador de EO ya que estimulan la formación de radicales sobretodo en la piel (McMillan y cols., 2008).
 - La hiperoxia. Una presión parcial de oxígeno elevada, incrementa significativamente la formación de $O_2^{\bullet-}$. En este sentido, durante la recuperación de la anoxia, una reoxigenación masiva de un órgano isquémico se acompaña de un empeoramiento del daño celular (paradoja del oxígeno) (Maffei y cols., 1999).
 - Las radiaciones ionizantes que producen grandes cantidades de EROs, que son responsables de anomalías cromosómicas resultantes de su efecto sobre el ADN (Karbownik y Reiter, 2000).
- Orgánicos y metabólicos:
 - Una dieta hipercalórica o insuficiente en antioxidantes.
 - Algunas patologías como la diabetes, cáncer y enfermedades cardiovasculares (Lonn y Yusuf, 1997). En procesos inflamatorios, traumatismos y fenómenos de isquemia-reperusión.
 - El ejercicio extenuante (Viña y cols., 2000; Skenderi y cols., 2008).

4.3 CONCEPTO DE EO

Frente a la acción tóxica de los radicales libres, los organismos han desarrollado mecanismos de defensa que permiten su eliminación o transformación en moléculas estables (Davis, 1995). La formación de un gran número de EROs derivadas del O_2 debe ser contrarrestada por

agentes antioxidantes. Si no es así, las EROs provocan lesiones intra y extracelulares (Davis, 1987; Cerruti y Trump, 1991). Para contrarrestar los efectos nocivos de las EROs, el organismo posee sus propios mecanismos de defensa antioxidante. Al conjunto de estos mecanismos se le llama *Capacidad antioxidante del organismo*.

Todos los sistemas biológicos están en un estado de equilibrio aproximado entre las fuerzas prooxidantes y la capacidad antioxidante (Sies, 1985). Cuando la producción de EROs por las células excede su capacidad de interceptarlos y eliminarlos alcanzando unos niveles tóxicos, se produce un desequilibrio oxidativo que se conoce como **estrés oxidativo** (Figura 12).

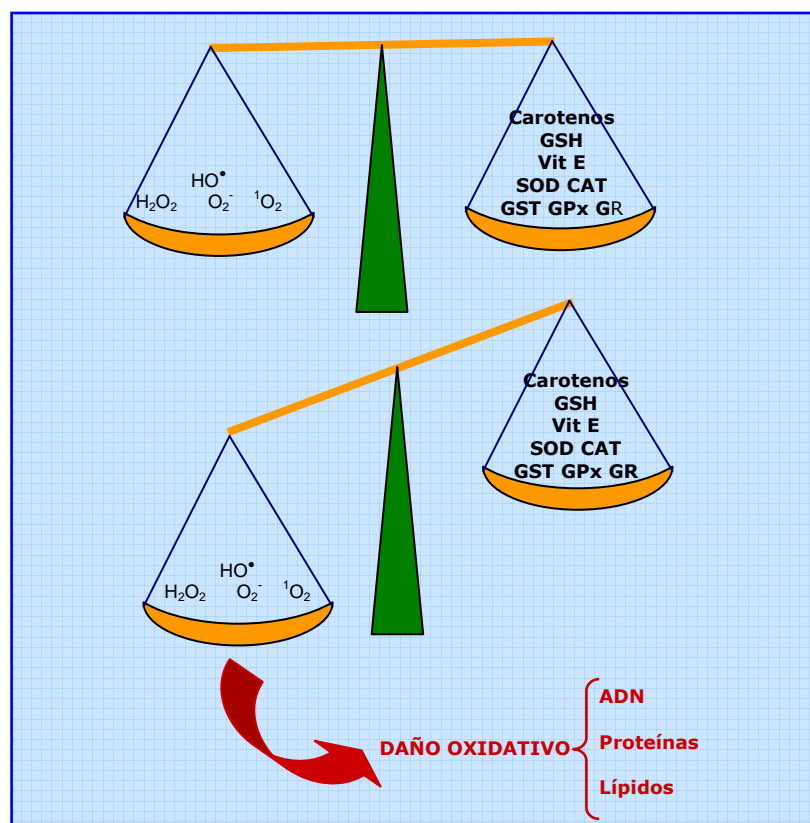


Figura 12. Balanza prooxidante-antioxidante en situación de equilibrio (arriba) y desequilibrio a favor del daño oxidativo (abajo).

4.4 SISTEMAS ANTIOXIDANTES

Según Halliwell y Gutteridge (1989), antioxidante es cualquier sustancia que en presencia del sustrato oxidable retrasa considerablemente o inhibe la oxidación de tal sustrato. Un buen antioxidante se caracteriza por su alta efectividad, su variabilidad operativa y su versatilidad para combinarse con una importante variedad de EROs. Así pues, entre los sistemas antioxidantes cabe destacar:

- a) A nivel fisiológico: El sistema microvascular, cuya función es mantener los niveles tisulares de O_2 , siempre dentro de presiones parciales relativamente bajas.
- b) A nivel bioquímico: La defensa antioxidante puede ser enzimática y no enzimática.

4.4.1 Sistema antioxidante enzimático

El sistema antioxidante enzimático está formado por una serie de enzimas con capacidad antioxidante de origen endógeno, no se consumen al reaccionar con las EROs y dependen de ciertos cofactores, generalmente de metales como Cu, Fe, Mn, Zn o Se. El sistema antioxidante enzimático constituye la primera y mejor línea de defensa contra las EROs (**Figura 13**). Está integrado por tres enzimas principales que trabajan en cadena para desactivar selectivamente radicales libres: la superóxido dismutasa, (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GPx). Otras dos enzimas, glutatión reductasa (GR) y glutatión-S-transferasa (GST), sin ser estrictamente enzimas antioxidantes, colaboran indirectamente con la GPx ya que contribuyen a regular el pool intracelular de glutatión reducido (GSH), uno de los principales antioxidantes celulares no enzimáticos.

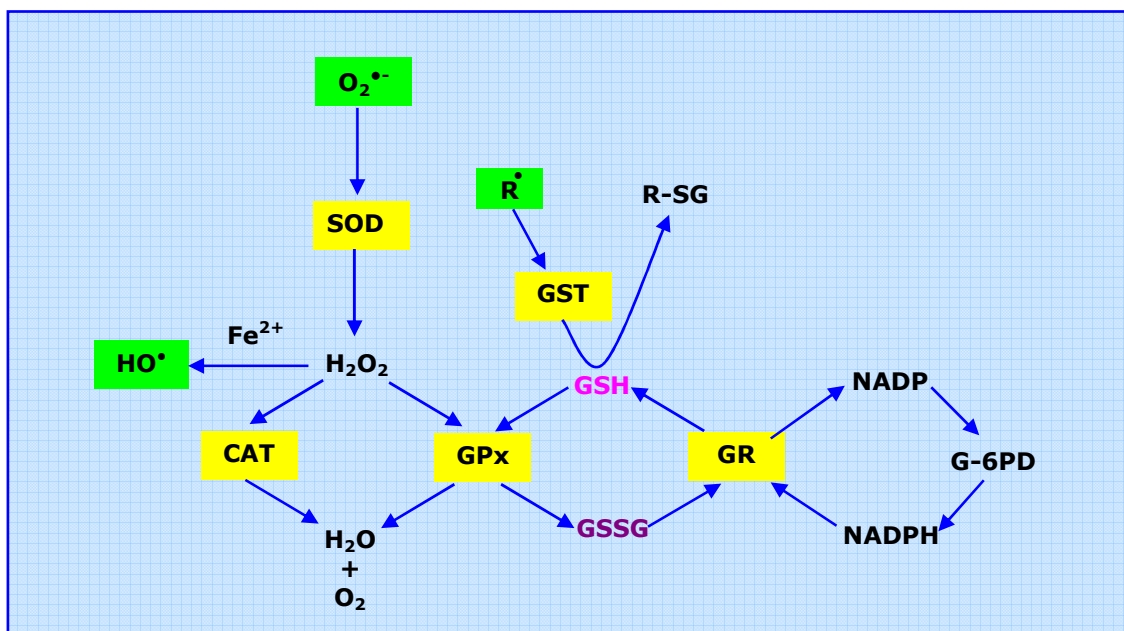


Figura 13. Esquema básico de formación y eliminación de EROs en las células.

La SOD cataliza la destrucción del radical $O_2^{\bullet-}$, formando H_2O_2 como producto de una reacción que es acelerada unas diez mil veces por la SOD (Mc Cord y Fridovich, 1969). La CAT y GPx neutralizan H_2O_2 y los peróxidos lipídicos (LOOH) formados durante la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en una molécula de ácido graso hidroxilo (LOH), que no es tóxica y es estable (Nohl y Hegner, 1978; Ursini y cols., 1982).

Finalmente, la GR regenera los depósitos intracelulares de GSH, a partir de GSSG y NADPH. La GST cataliza la conjugación de xenobióticos, RLOS y toxinas con GSH. A pesar de que, por sí mismas, ninguna de las enzimas es capaz de impedir la acción de uno de los radicales libres más agresivos y nocivos que se conocen, el radical HO^{\bullet} , su acción conjunta sí puede hacerlo, al evitar que la combinación o acción de otros radicales generen este último.

4.4.2 Sistema antioxidante no enzimático

El sistema no enzimático está formado por una serie de compuestos de bajo peso molecular y mayoritariamente de origen exógeno. Estos compuestos, a diferencia de los enzimáticos se consumen durante su acción antioxidante y deben ser reemplazados. Algunos provienen principalmente de la dieta a través de aportes de vitamina E, vitamina C, betacarotenos, polifenoles, flavonoides y oligoelementos. Además existen algunos componentes de origen endógeno como el GSH, la melatonina, el ácido úrico, la bilirrubina, la CoQ y ciertas proteínas plasmáticas que ejercen un rol protector (Sies y Stahl, 1995).

4.5 DAÑO OXIDATIVO A BIOMOLÉCULAS

Los RLOs y EROs a bajas concentraciones son indispensables para muchos procesos bioquímicos ya que actúan como mensajeros en varias vías de señalización durante el metabolismo celular normal. Por el contrario, a elevadas dosis los RLOs y EROs son capaces de reaccionar con macromoléculas biológicas y producir inactivación de proteínas, peroxidación de lípidos de membrana y daños al ADN.

4.5.1 Lípidos

Todas las células están rodeadas por una membrana celular que las separa del medio extracelular. La estructura básica de todas las membranas biológicas es la bicapa lipídica, la cual funciona como una barrera de permeabilidad selectiva (Kutchai, 1998).

Los RLOs atacan sobre todo a nivel de dobles enlaces (altamente reactivos) de las cadenas hidrofóbicas de fosfolípidos que forman la bicapa de las membranas biológicas. Éstos actúan eliminando un átomo de hidrógeno de los ácidos grasos poliinsaturados o PUFAs (*polyunsaturated fatty acids*) (**Figura 14**) y generando radicales peroxil (ROO•) y otros

productos como aldehídos (malondialdehído o MDA) e hidrocarburos (etano y etileno).

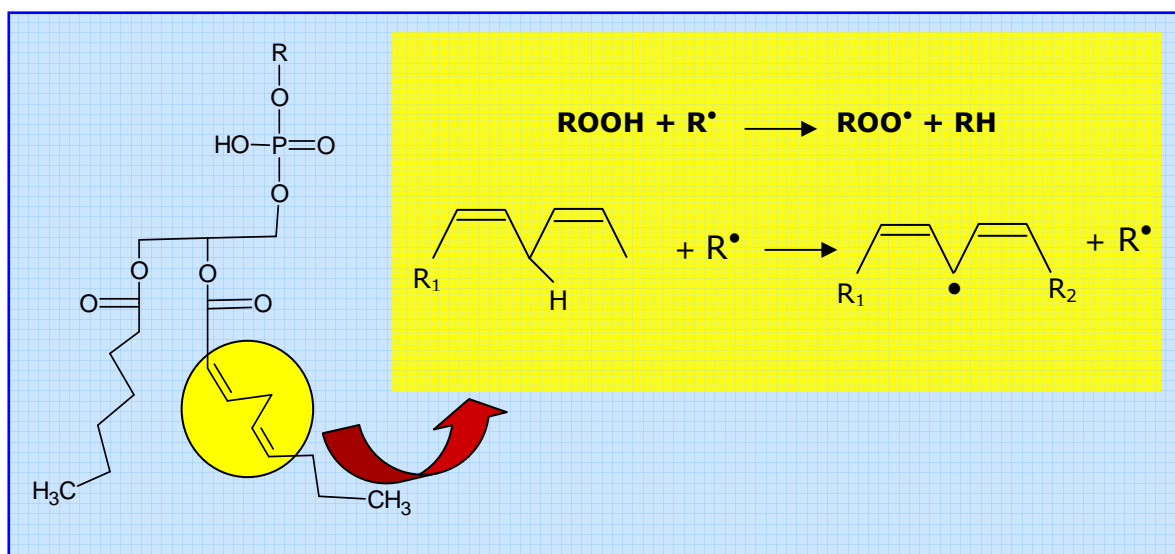
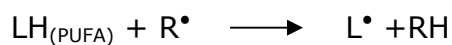


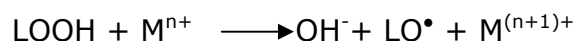
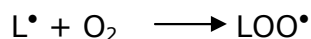
Figura 14. Eliminación de un átomo de hidrógeno de los PUFAs.

La peroxidación lipídica implica tres etapas:

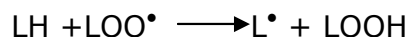
- **Iniciación:** la peroxidación lipídica se inicia por un radical (R^\bullet), el cual extrae un H del grupo metileno ($-CH_2-$) de un PUFA (Minotti y Aust, 1992). El radical iniciador más destacado es el radical HO^\bullet que sustrae un hidrógeno a la cadena lateral de un ácido graso formando un radical carbonado (L^\bullet) (Minotti y Aust, 1989).



- **Propagación:** el radical de ácido graso formado anteriormente (L^\bullet) reacciona con O_2 para formar peróxidos cíclicos y radicales hidroperóxidos (LOO^\bullet), éstos eliminan un hidrógeno de un segundo ácido graso y así sucesivamente se propaga esta reacción en cadena. La peroxidación lipídica puede reiniciarse en presencia de metales de transición (M^{n+}) existentes en el plasma, que son catalizadores oxidativos ($Fe^{II/III}$, $Cu^{I/II}$), formándose radicales alcoxílicos (LO^\bullet) como productos (Ivanov, 1985).



- Terminación: la propagación termina con la formación de un producto estable de peroxidación. Ya sea por la unión de dos radicales o por reacción con algún antioxidante disponible. Uno de los productos es el hidroperóxido lipídico (LOOH), pero implica la posible conversión de numerosos PUFAs en hidroperóxidos que en presencia de metales de transición pueden generar radicales capaces de reiniciar la peroxidación lipídica.



4.5.2 Proteínas

El daño, al azar, por parte de las EROs a proteínas es poco probable, solo si los radicales libres se acumulan, cosa que no es normal en una célula sana, o si el daño va dirigido a un lugar concreto de la proteína, se produce el daño oxidativo. En especial, el radical HO^{\bullet} interactúa con muchos aminoácidos y en ocasiones genera daños puntuales a proteínas que están unidas a metales de transición. Debido a que las proteínas unen con frecuencia metales de transición, este hecho las hace un blanco perfecto del ataque del radical HO^{\bullet} (Stadtman y Oliver, 1991).

Las proteínas pueden sufrir oxidación de una zona del residuo aminoácido, unido a HO^{\bullet} , que altera la estructura de la proteína. Los RLOs son capaces de peroxidar las cadenas de aminoácidos que constituyen las proteínas. Muchas EROs son capaces de oxidar los grupos sulfhidrilos ($-SH-$) de las proteínas alterando su conformación espacial y como consecuencia su función (**Figura 15**).

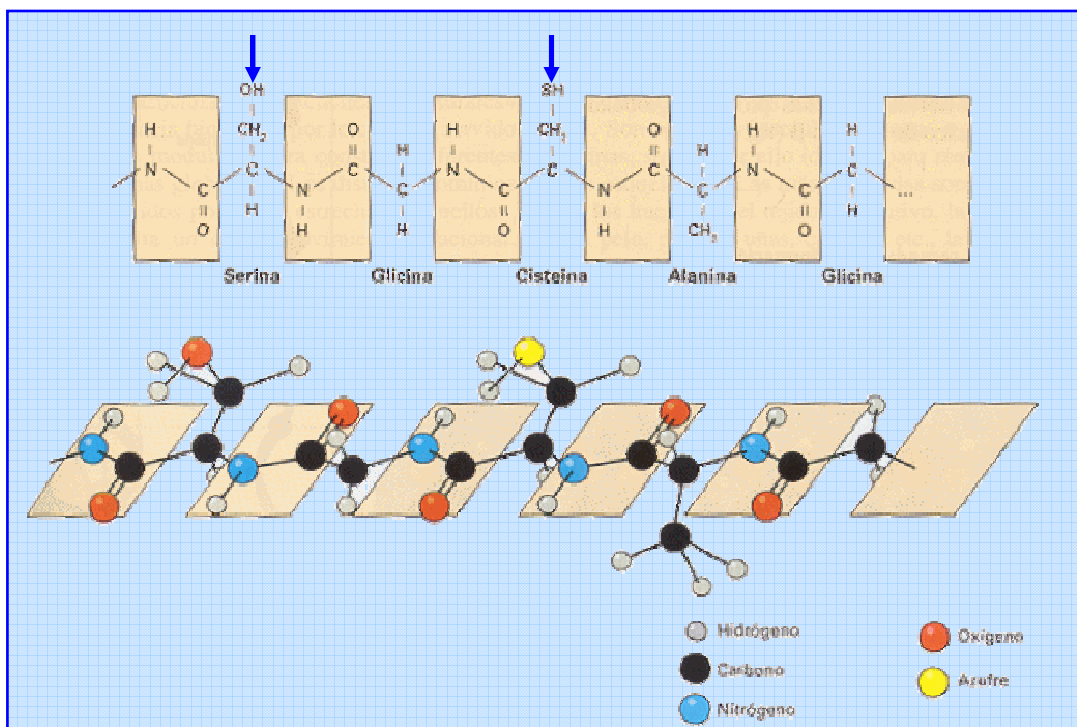


Figura 15. Estructura primaria de las proteínas.

Los cambios en la estructura de las proteínas también pueden ser debidas a errores en la síntesis de las mismas, y el origen de estos errores pueden ser los RLOs. La nueva estructura molecular formada puede provocar la pérdida de funcionalidad e iniciar una cadena de alteraciones en el metabolismo celular. La mayoría de proteínas dañadas son eliminadas rápidamente por enzimas proteolíticos presentes en la célula.

El grado de afectación de la célula por el ataque de las EROs a proteínas es muy amplio. Si el organismo no responde de manera adecuada, y teniendo en cuenta que las proteínas regulan multitud de funciones, las EROs pueden favorecer la aparición de patologías graves.

4.5.3 ADN

Las EROs reaccionan con el ADN, oxidando el esqueleto azúcar-fosfato y las bases nitrogenadas. En concreto, el radical HO^\bullet ataca cualquier posición del azúcar desoxiribosa del ADN provocando la ruptura de una o las dos cadenas. La oxidación de las bases nitrogenadas del ADN por

acción de las EROs da lugar a diversos productos. Tres de las bases modificadas más importantes son: la guanina que se oxida a 8-hidroxiguanina; la adenina que se oxida a 8-hidroxiadenina; y la timina que se oxida a timina glicol. Estos productos de oxidación pueden ser usados para determinar el grado de ataque de las EROs al ADN (Cathcart y cols., 1984; Shigenaga y cols., 1989).

En el organismo existen enzimas que reparan el ADN de posibles alteraciones. Sin embargo, si el daño es muy extenso, estas enzimas no alcanzan a reparar todo el ADN. Durante la replicación de ese ADN dañado, las ADN polimerasas incorporan bases equivocadas al leer la base oxidada, perpetuando la mutación. Así, durante el proceso de replicación se altera la estructura del material genético, estructura alterada que se transmite a las futuras generaciones celulares. Estas alteraciones están relacionadas con el envejecimiento y con algunas patologías como el cáncer, el Alzheimer y la diabetes (Van Houten y cols., 2006; Moreira y cols., 2008).

4.6 EFECTOS DEL EO SOBRE EL ORGANISMO

Todas las células de nuestro organismo producen RLOs y EROs como consecuencia de su metabolismo aeróbico. Además, esta producción puede verse incrementada por agentes externos (radiaciones, fármacos, contaminantes, etc.).

En las últimas décadas, cada vez son más frecuentes las consultas médicas sobre problemas de infertilidad y esterilidad. Además, se estima que el 40 % de los problemas de infertilidad son atribuibles al hombre. Los espermatozoides producen y exportan EROs al medio extracelular (Álvarez y Storey, 1982, 1984a; 1985; Álvarez y cols., 1987). La mayoría de estas EROs son producidas en la mitocondria y son el producto de la reducción monovalente del O₂ durante la fosforilación oxidativa (Holland y cols., 1982). Asimismo, Álvarez y Storey (1984b, 1995) demostraron que las EROs inducen peroxidación de ácidos grasos poli-insaturados esterificados

a fosfolípidos de membrana e inactivan enzimas glucolíticas. La peroxidación de los ácidos grasos produce una permeabilización de las membranas plasmática y acrosomial conduciendo a una pérdida de la viabilidad, motilidad y capacidad fecundante del espermatozoide. Por otra parte, la inactivación de enzimas glucolíticas conlleva un bloqueo en la biosíntesis de ATP y la consiguiente pérdida de motilidad, que en este caso es por falta de energía necesaria para la contracción de los microtúbulos flagelares y no por pérdida de ATP a través de la membrana, como en el caso de la peroxidación lipídica (Álvarez y Storey, 1984b) que produce verdaderos agujeros en las membranas espermáticas.

Numerosos estudios han demostrado la relevancia clínica del EO en la etiología de la infertilidad masculina (Fujii y cols., 2003; Garrido y cols., 2004). Estos estudios demuestran que los niveles de EROs producidos en pacientes de infertilidad son significativamente más altos que en hombres fértiles (Aitken y cols., 1994). Esto parece estar relacionado con lo que se ha designado como espermiogénesis defectuosa, en la cual los espermatozoides no experimentan el proceso de maduración normal, saliendo a los túbulos seminíferos o "graduándose" espermatozoides inmaduros que producen niveles altos de EROs (Aitken y Clarkson 1987).

La mayoría de los estudios realizados hasta ahora sobre EO en infertilidad masculina se han centrado únicamente en espermatozoides eyaculados. Si bien estos estudios han contribuido a mejorar nuestro conocimiento sobre los efectos de las EROs en la función espermática, no han tenido en cuenta el daño que se puede producir en el epitelio de los túbulos seminíferos y durante el transporte de los espermatozoides desde los túbulos seminíferos al epidídimo (Latchoumycandane y cols., 2002). Un ejemplo sería el daño del acrosoma. La inducción de peroxidación lipídica por EROs no sólo puede resultar en la permeabilización de la membrana plasmática sino también de la membrana acrosomial. Se ha demostrado que el H₂O₂ induce daño del acrosoma e inhibe la inducción de la reacción acrosómica (Oehninger y cols., 1995).

Los espermatozoides están equipados con sistemas antioxidantes para contrarrestar los efectos tóxicos de las EROs. Disponen de enzimas antioxidantes, como la SOD (Álvarez y Storey, 1983), la GR y la GPx (Álvarez y Storey 1989; Storey y cols., 1998; Meseguer y cols., 2004).

Por otra parte, los túbulos seminíferos también están protegidos contra el EO. De hecho, muestran una expresión estadio-dependiente de la enzima antioxidante SOD (Jow y cols., 1993). Además, la temperatura más baja a la que está expuesto el testículo contribuye a disminuir el riesgo de peroxidación lipídica y de daño de ADN (Álvarez y Storey 1987). Esto es especialmente relevante, ya que de todas las células corporales, las células germinales son las que tienen un mayor contenido de ácido docosahexaenoico (DHA), el ácido graso más sensible a la peroxidación lipídica (Álvarez y Storey 1995; Ollero y cols., 2000).

La exposición a ciertos contaminantes se ha relacionado con patologías del sistema nervioso periférico y alteraciones neuropsicológicas (Pilkington y cols., 2001; Ray y Richards, 2001). Estos contaminantes como hemos visto pueden aumentar la producción de EROs. Los científicos han implicado a las EROs en desórdenes neurodegenerativos como la enfermedad del Parkinson, Huntington o Alzheimer (Smythies, 1999).

El cerebro es especialmente vulnerable al EO debido a varios factores: el elevado requerimiento energético, el elevado consumo de oxígeno, la riqueza del cerebro en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) susceptibles a peroxidación, los elevados niveles de metales de transición (p. ej., Fe, Cu) presentes en ciertas partes del cerebro (Hill y Switzer, 1984) y por último las defensas antioxidantes relativamente bajas del cerebro (Pajovic y cols., 2003). Todos estos factores parecen incrementar el riesgo de desarrollar enfermedades neurodegenerativas.

Estudios experimentales sugieren que muchos compuestos persistentes como los PBDEs causan neurotoxicidad durante el desarrollo pero el mecanismo es todavía desconocido. Algunos autores demostraron *in vitro* que los PBDEs causan EO y muerte celular por apoptosis en neuronas (He

y cols., 2008; Yu y cols., 2008). Además, parece que la neurotoxicidad de los PBDEs está modulada por los niveles intracelulares de GSH y existe un polimorfismo genético que aumenta la susceptibilidad a sus efectos adversos (Giordano y cols., 2008).

Las EROs han sido implicadas en la patogénesis de diversas formas de enfermedad hepática. Cuando las células hepáticas son expuestas a un exceso de estas especies reactivas, se produce el daño oxidativo y se afectan muchas funciones celulares (Kaplowitz, 2000). Este proceso puede alterar la expresión de determinados genes a través de la activación de factores de transcripción que conduce a una activación de citoquinas, moléculas de adhesión, genes de supervivencia, etc., o pueden inducir alteración de la permeabilidad de la membrana mitocondrial con consecuencias letales (Kaplowitz y Tsukamoto, 1996).

La expresión génica está modulada tanto por señales fisiológicas (hormonas, citoquinas, etc.) como por factores ambientales (parámetros físicos, xenobióticos, etc.). El EO es un modulador de la expresión génica implicado en ambas vías expuestas. De hecho, los RLOs y las EROs han sido descritos como segundos mensajeros para varios factores de crecimiento y citoquinas, pero también han sido implicados en el metabolismo de xenobióticos o deficiencia enzimática (Morel y Barouki, 1999).

El estado redox de la célula puede controlar la activación del factor de transcripción NF- κ B. El EO, incluyendo los productos de la peroxidación lipídica (Bowie y cols., 1997), o la depleción de GSH y su consecuente aumento de GSSG citosólico en respuesta al EO, causan una rápida activación de NF- κ B (Rahman, 2000). Este factor está implicado en numerosos procesos como son la respuesta adaptativa a cambios en el balance redox celular (Mercurio y Manning, 1999), inflamación, respuesta celular inmune, regulación del ciclo celular, diferenciación y protección frente a la apoptosis (Baeuerle y Baltimore, 1996; Joyce y cols., 2001).

Estudios realizados en roedores demostraron que algunos contaminantes orgánicos incrementan el EO en hígado, incluyendo peroxidación lipídica,

daño oxidativo al ADN y activación del factor de transcripción sensible al estado redox NF- κ B (Fernie y cols., 2005; Tharappel y cols., 2008). Asimismo, estudios realizados en humanos apoyan el daño oxidativo al ADN ya que la exposición a contaminantes en su área de trabajo aumentó significativamente los niveles de 8-hidroxi-2' deoxiguanosina (8-OHdG) en orina (Wen y cols., 2008).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. INTERÉS DEL TRABAJO

Los PBDEs son compuestos químicos orgánicos que se usan como retardantes de llama utilizados en una amplia sección de productos industriales y de consumo. Como consecuencia de su uso comercial, los niveles de PBDEs en el medioambiente se han incrementado en las últimas décadas. Uno de los congéneres mayoritarios encontrados en muestras biológicas es el BDE-99.

La mayor parte de estudios experimentales realizados hasta el momento han evaluado los efectos de los PBDEs en el desarrollo de las crías tras una exposición prenatal/perinatal pero no en adultos. Todavía falta mucha información acerca de su toxicidad, sobre todo teniendo en cuenta que se ha descrito su comportamiento como disruptores endocrinos.

Se desconoce hasta el momento los mecanismos a través de los cuales los PBDEs actúan. El daño celular inducido por algunos tóxicos y/o contaminantes ambientales se manifiesta con cambios en el estado oxidativo. El estrés oxidativo es un desequilibrio entre los sistemas oxidantes y antioxidantes. Estos sistemas se pueden alterar en diferentes situaciones fisiológicas y patológicas a causa de los radicales libres.

2. HIPÓTESIS

Según lo descrito en los antecedentes y teniendo en cuenta que el PBDE mayoritario en las muestras biológicas es el BDE-99, la hipótesis de este trabajo supone que:

Los daños a nivel fisiológico derivados de la exposición a BDE-99 podrían deberse a un desequilibrio en el balance de los agentes oxidantes y mecanismos antioxidantes, así como a una interacción en la respuesta hormonal.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos de la exposición oral a BDE-99 sobre la función cognitiva y reproductiva en ratas macho adultas.

Para llevar a cabo dicho objetivo principal se han desarrollado los siguientes objetivos específicos:

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar los efectos neuroconductuales derivados de la exposición oral a BDE-99.
2. Determinar el peso del testículo y epidídimo y relacionarlos con el número de espermátidas y espermatozoides. Asimismo, evaluar parámetros seminales como movilidad y morfología.
3. Estudiar los efectos de la exposición a BDE-99 sobre la respuesta hormonal así como sobre parámetros bioquímicos en sangre y orina.
4. Valorar los biomarcadores de estrés oxidativo en epidídimo, testículo, hígado, riñón, corteza, hipocampo y cerebelo tras la exposición a BDE-99 y relacionarlos con las respuestas fisiológicas observadas.
5. Realizar un estudio histopatológico de los tejidos mencionados anteriormente para valorar los efectos a nivel tisular.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron ratas como animales de experimentación. Éstas se distribuyeron en tres grupos de 10 animales cada uno: un grupo control al que se le administró el vehículo aceite de maíz y dos grupos de tratamiento a los que se les administró BDE-99 a las dosis de 0.6 y 1.2 mg/kg vía intragástrica (*gavage*) en una dosis única. A los 3, 22 y 44 días se realizó una batería de observación funcional (FOB). Tras 45 días de la exposición, se realizaron una serie de tests de neurocomportamiento. Una vez finalizadas éstos, se ubicaron los animales en jaulas metabólicas donde permanecieron 24 horas con el fin de obtener orina para el análisis bioquímico y la determinación de isoprostanos (Jones y cols., 1995). Finalmente, se anestesiaron mediante ketamina-xilazina (80 mg/kg-10 mg/kg) y se procedió a la extracción de sangre para la determinación de marcadores de estrés oxidativo, parámetros bioquímicos y niveles hormonales. Tras el sacrificio, se extrajeron los testículos, epidídimos, hígado, riñones y el cerebro. De este último se separaron las áreas: córtex, cerebelo e hipocampo. De los tejidos mencionados anteriormente, se obtuvieron las fracciones solubles para el estudio de los diferentes parámetros indicadores de estrés oxidativo. En el caso de testículo y epidídimo, se guardó una fracción para la evaluación de los parámetros seminales. Una fracción de todos los tejidos se conservó para su posterior evaluación histopatológica (**Figura 16**).

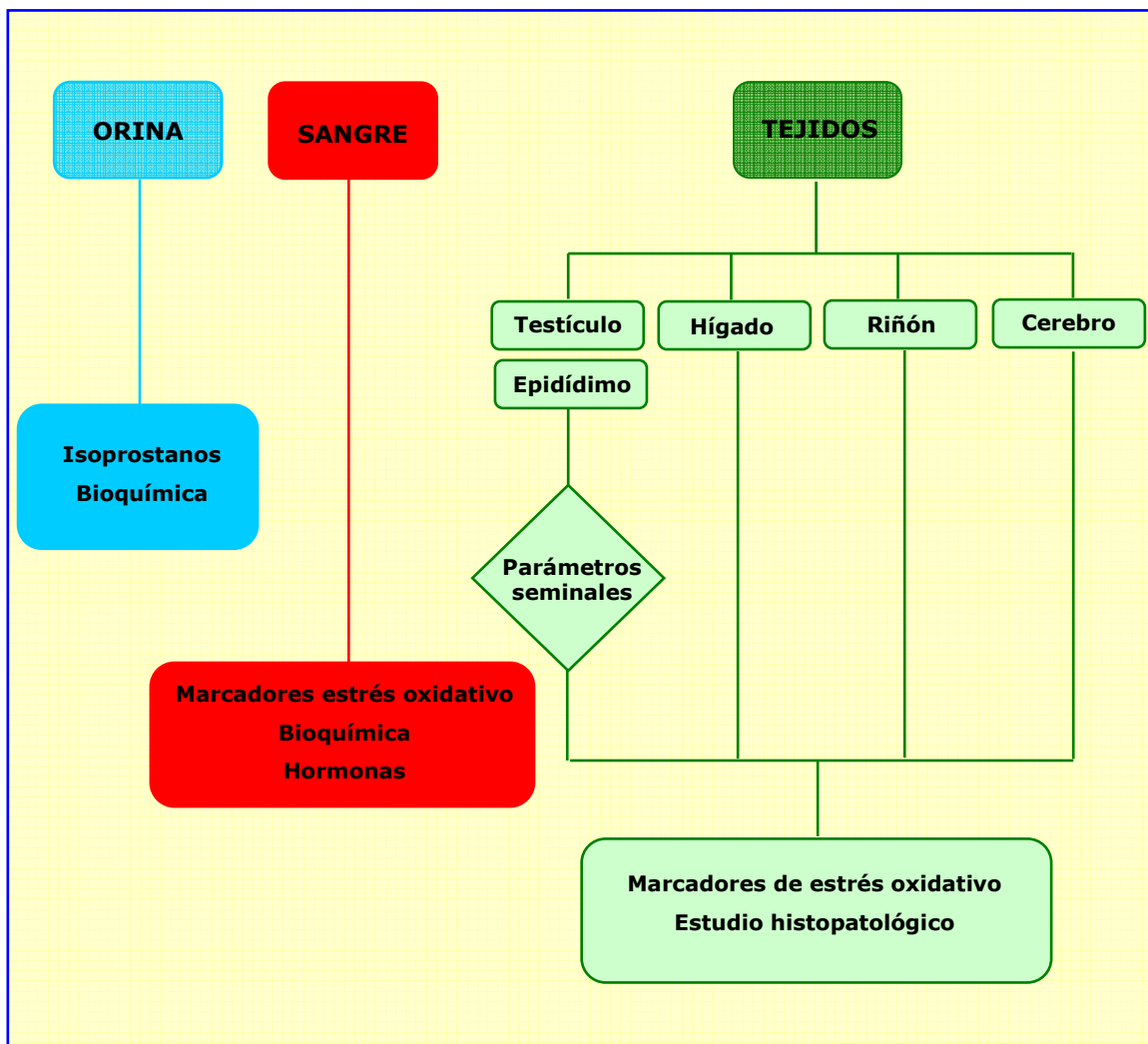


Figura 16. Esquema de las muestras obtenidas y determinaciones realizadas.

2. MATERIALES

2.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (Charles River), con un peso medio entre 250-300 g. Los animales fueron acomodados en jaulas Makrolon en el estabulario bajo condiciones estándar de temperatura (22 ± 2 °C), humedad relativa (50 ± 10 %) y un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas diarias (luz 8:00-20:00). En todo momento los animales recibieron agua del grifo y pienso *ad libitum* (dieta estándar Panlab, A04 para roedores, Barcelona). Se dejaron los animales un periodo de aclimatación de 14 días antes de empezar el experimento.

En todo momento se siguieron las normas aprobadas por la Generalitat de Catalunya para la manipulación de animales de experimentación. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético de animales de experimentación de la Universidad Rovira i Virgili.

2.2 REACTIVOS

- **Tratamiento**
 - BDE-99 (2,2',4,4',5-pentabromodifenil éter): LGC Standards S.L.U CIL BDE-99-CS-0
 - Aceite de maíz: ARSUA

- **Estudio de parámetros seminales**
 - Solución de Hank's: Sigma-Aldrich H9269
 - Panóptico Rápido: QCA soluciones 1-991681, 2-994239 y 3-992426
 - Solución de tritón: 0.01 % Tritón X-100, Panreac 212314 con 0.9 % NaCl, Panreac 131659
 - Formaldehído al 3.7-4 % peso/volumen: QCA 991005
 - Solución de Richardson (Hematoxilina de Harris 50 %): QCA 992232

- **Estudio histopatológico**
 - Formaldehído al 3.7-4 % peso/volumen: QCA 991005
 - Hematoxilina-Eosina: QCA 992232-Merk 15939

- **Análisis bioquímico**
 - N-Acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG): Roche 875406
 - Creatinina: QCA 998891
 - Urea: QCA 991305
 - Ácido úrico: QCA 990796
 - Reactivo Biuret: QCA 997171
 - Transaminasa glutamicooxalacética (GOT): QCA 999500
 - Transaminasa glutamicopirúvica (GPT): QCA 999200

- Gamma-GT (GGT): QCA 995666
- Lactato deshidrogenasa (LDH): QCA 990035
- Colinesterasa (CE): QCA 990878
- Fosfatasa alcalina (FA): QCA 990516

- **Valoración del estrés oxidativo**
 - Reactivo de Bradford: Sigma B6916
 - Albúmina sérica bovina (BSA): Sigma A9647
 - Glutati6n oxidado (GSSG): Sigma G4501
 - Glutati6n reducido (GSH): Sigma G4251
 - Epinefrina: Sigma E4375
 - Glutati6n reductasa (GR): Sigma G3664
 - Fosfato potásico bási6o (K_2HPO_4): Panreac 121512
 - Fosfato potásico á6ido (KH_2PO_4): Panreac 131509
 - Á6ido etildiaminotetracético (EDTA): Merck 1084180100
 - Fosfato de dinucle6tido de nicotinamida y adenina reducido (NADPH): Sigma N 7505
 - T-butilhidroper6xido (T-BuOOH): Sigma T9889
 - Á6ido tricloroacético (TCA): Panreac 131067
 - Fosfato s6dico bási6o (Na_2HPO_4): Panreac 131679
 - Fosfato s6dico á6ido (NaH_2PO_4): Panreac 121677
 - N-etil-maleimida (NEM): Merck 101308
 - O-phtalaldehido (OPT): Merck 111452
 - Hidr6xido s6dico (NaOH): Panreac 171561
 - Per6xido de hidr6geno (H_2O_2): Merck 8599, 30 %
 - Carbonato s6dico bási6o (Na_2CO_3): Merck 6392
 - Á6ido clorhídrico (HCl): Panreac 131020
 - Á6ido tiobarbitúrico (TBA): Sigma T5500
 - Butil hidroxil tolueno (BHT): Sigma W218405
 - Kit inmunoensayo para isoprostanos: Cayman Chemical 516351

- **Anestesia y sacrificio de los animales**
 - Ketamina: Ketolar®/Xilazina: Sigma: X 1251

2.3 APARATOS PARA LA REALIZACIÓN DE TESTS DE NEUROCOMPORAMIENTO

- **Evitación pasiva (*Passive avoidance*)**

El aparato utilizado para el test de evitación pasiva consiste en una caja (40×20×20 cm) fabricada con láminas de perspex y dividida en dos secciones: un compartimento de salida y uno de escape. El compartimento de salida es blanco y está iluminado (bombilla 24V-10 W). El compartimento de escape es oscuro. Entre los dos compartimentos hay una puerta de guillotina. La base es una rejilla, a través de la que se administra una descarga eléctrica al animal cuando cambia del compartimento claro al oscuro (**Figura 17**). El aparato está conectado a un controlador que registra la latencia de entrada del animal al compartimento oscuro. En el controlador se puede fijar el tiempo que transcurre desde que introducimos el animal hasta la apertura de la puerta, la duración y la intensidad de la descarga, además del tiempo de latencia máximo para cada ensayo. (Passive Avoidance Apparatus, Panlab SL, Ugo Basile, Italia).

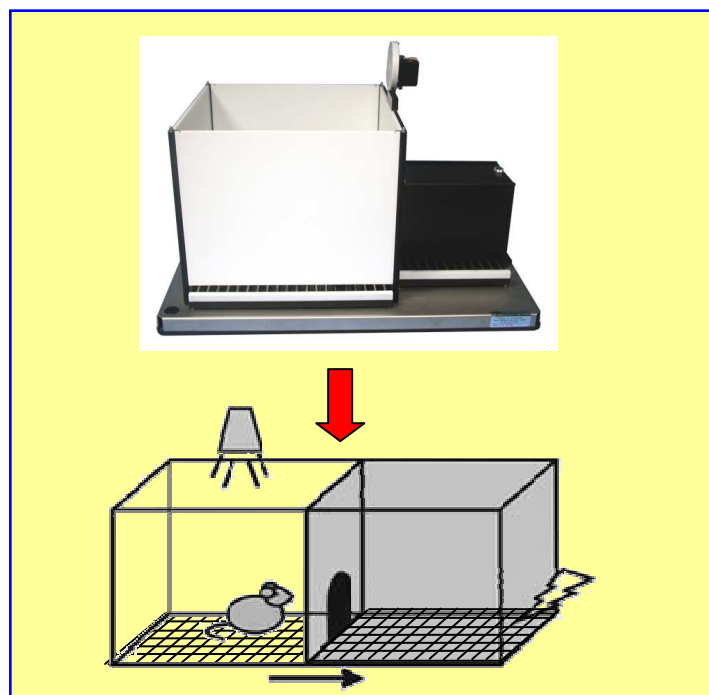


Figura 17. Test de evitación pasiva.

- **Campo abierto (*Open field*)**

Para la realización de este test el recinto utilizado es de madera plastificada (80×80×47 cm) y abierto por la parte superior. Su interior puede estar iluminado de forma indirecta por luz blanca de 60 W de potencia. En el suelo del recinto se distinguen dos zonas: el centro y la periferia. La periferia ocupa desde las paredes del recinto hasta 15 cm hacia el centro. La zona restante se define como centro (**Figura 18**) (Colomina y cols., 1999; Bellés y cols., 2005).

Para el registro de todas las acciones se utiliza el equipo Ethovision, versión 1.70, de Noldus Technology para PC, y una cámara de video modelo Sony CCD-IRIS. Este equipo es un sistema integrado de grabación en video, análisis de movimiento y reconocimiento de patrones de conducta.

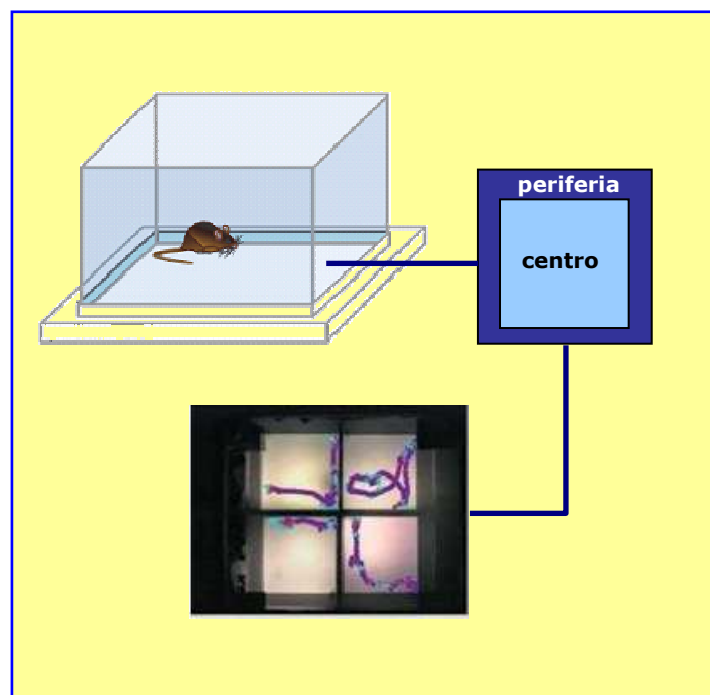


Figura 18. Test de campo abierto.

- **Laberinto de agua de Morris (*Water maze*)**

Para la realización del test del laberinto de agua, descrito por primera vez por Morris (1984), se utiliza una piscina de 160×60 cm. Dentro de la piscina y sumergida a 1 cm del nivel del agua, hay una plataforma cilíndrica de plástico transparente de dimensiones: 12 cm de diámetro y 20 cm de altura (**Figura 19**). Las paredes del habitáculo donde se ubica la piscina disponen de una serie de señales geométricas diferentes para la orientación de los animales (una cruz, un círculo, un cuadrado, etc.). La temperatura del agua durante el test es de 23 ± 2 °C.

Para el registro de todas las acciones se utiliza el equipo Ethovision, versión 1.70, de Noldus Technology para PC, y una cámara de video modelo Sony CCD-IRIS. Este equipo es un sistema integrado de grabación en video, análisis de movimiento y reconocimiento de patrones de conducta.

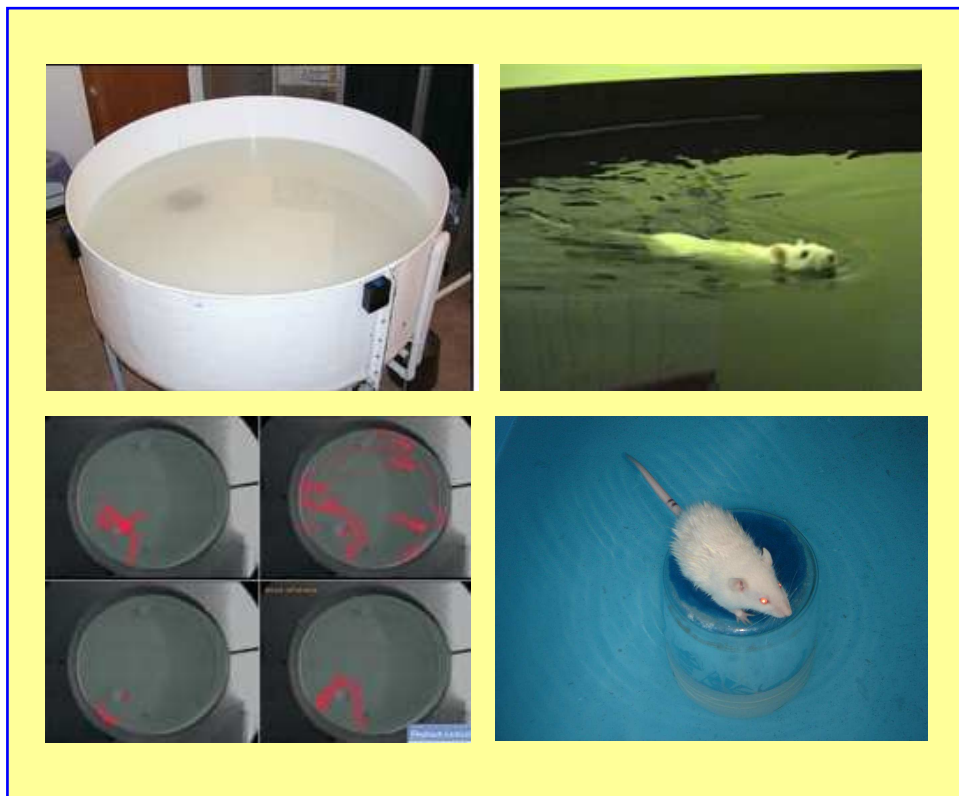


Figura 19. Test del laberinto de agua.

2.4 OTROS MATERIALES E INSTRUMENTOS

- Analizador automático: Cobas Fara Mira
- Balanza de precisión: Sartorius Analytic
- Homogenizador :Politron PCU Kinematica
- Centrífuga: Kokusan H-103N
- Ultracentrífuga: Control Centrikon T-1045
- Contador de espermatozoides: Crisol-Leucoesperm 84
- Espectrofluorímetro: Perkin Elmer LS 50 B
- Espectrofotómetro: Perkin Elmer Lambda 25, UV/VIS
- Incubadora: P-Selecta 2001248
- Microscopio óptico: Olympus
- Microcentrífuga: P-Selecta Centrolit II
- Medidor de pH: Crisol Micro pH 2001
- Jaulas metabólicas
- Analizador de inmunoensayos: Advia Centaur

3. MÉTODOS

3.1 BATERÍA DE OBSERVACIÓN FUNCIONAL "FOB"

El protocolo de la FOB es una adaptación del diseñado originalmente por Moser (2000) con el fin de detectar efectos neurotóxicos en ratas. Esta evaluación permite obtener un índice del estado general, muy útil para evaluar si los animales presentan signos de toxicidad debidos a un tratamiento o exposición a algún compuesto. En este estudio, el protocolo de la FOB consiste en 21 puntos para evaluar la actividad y excitabilidad del sistema nervioso central, efectos neuromusculares y autónomos, así como la reactividad sensorial y motora (Fuentes y cols., 2007). Las variables que forman parte de la FOB se describen a continuación.

A. Observaciones realizadas en una jaula individual (2 minutos)

1. Postura inicial:

- a) (puntuación 1): sentado o de pie a cuatro patas, dos patas (*"rearing"*) o dormido.
- b) (puntuación 2): acurrucado o tumbado.
- c) (puntuación 3): de pie con ligero balanceo.
- d) (puntuación 4): de pie con balanceo exagerado o cabizbajo.
- e) (puntuación 5): tumbado boca abajo con las extremidades abiertas.
- f) (puntuación 6): tumbado boca arriba con las extremidades hacia arriba.

2. Estado de vigilancia:

- a) (puntuación 1): muy bajo (en coma o estupor).
- b) (puntuación 2): bajo, presencia de algún movimiento de cabeza o cuerpo.
- c) (puntuación 3): deprimido, algunos movimientos exploratorios están presentes con periodos de inmovilidad.
- d) (puntuación 4): normal
- e) (puntuación 5): alta (excitado, tenso, temblores espontáneos).
- f) (puntuación 6): muy alta (saltos bruscos, muy excitado).

B. Observaciones al manipular el animal (2 minutos)

1. Respuesta inicial al coger el animal de su jaula y depositarlo en la caja de experimentación.

- a) (puntuación 1): muy fácil, el animal permanece quieto.
- b) (puntuación 2): fácil, sin demasiada resistencia ni huir del experimentador.
- c) (puntuación 3): moderadamente difícil, se levanta sobre dos patas y sigue con frecuencia la mano del investigador.

- d) (puntuación 4): huye, retrocede, se agacha con o sin vocalizaciones.
 - e) (puntuación 5): difícil, el animal corre por el perímetro del recinto.
2. Reacción a la mano del experimentador
- a) (puntuación 1): baja, fácil de manipular con poca resistencia.
 - b) (puntuación 2): moderadamente baja, alguna resistencia con o sin vocalizaciones.
 - c) (puntuación 3): moderadamente alta, temblores o está rígido en la mano, con o sin vocalizaciones.
 - d) (puntuación 5): alta, intenta morder, trepar.
3. Salivación
- a) (puntuación 1): ausencia.
 - b) (puntuación 2): leve.
 - c) (puntuación 3): severa.
4. Lagrimeo
- a) (puntuación 1): ausencia.
 - b) (puntuación 2): leve.
 - c) (puntuación 3): severa.
5. Pilo erección
- a) (puntuación 0): ausencia.
 - b) (puntuación +): leve.
6. Falta de pelo ("*grooming*")
- a) (puntuación 0): ausencia.
 - b) (puntuación +): leve.
7. Parpadeo
- a) (puntuación 1): ojos abiertos.
 - b) (puntuación 2): párpados algo caídos.
 - c) (puntuación 3): ojos casi cerrados

d) (puntuación 4): ojos totalmente cerrados.

C. Observaciones en el campo abierto ("open field")

1. Marcha

- a) (puntuación 1): normal.
- b) (puntuación 2): ataxia, excesivo balanceo.
- c) (puntuación 3): excesivo movimiento en las patas traseras, arrastrándolas, sobrecompensación.
- d) (puntuación 4): extremidades anteriores extendidas o incapaces de soportar el peso corporal.
- e) (puntuación 5): marcha de puntillas.
- f) (puntuación 6): marcha encorvado o agachado.
- g) (puntuación 7): arrastrando el cuerpo o plano por la superficie.

2. Anormalidades en la marcha

- a) (puntuación 1): normal.
- b) (puntuación 2): ligeramente anormal.
- c) (puntuación 3): moderadamente anormal.
- d) (puntuación 4): severamente anormal.

3. Estado de vigilancia

- a) (puntuación 1): muy bajo (en coma o estupor).
- b) (puntuación 2): bajo, presencia de algún movimiento de cabeza o cuerpo.
- c) (puntuación 3): deprimido, algunos movimientos exploratorios están presentes con periodos de inmovilidad.
- d) (puntuación 4): normal
- e) (puntuación 5): alta (excitado, tenso, temblores espontáneos).
- f) (puntuación 6): muy alta (saltos bruscos, muy excitado).

4. Movimientos tónicos involuntarios (caracterizados por una contracción muscular)

- a) (puntuación 1): ausencia.
 - b) (puntuación 2): contracción de los extensores (extremidades rígidas y estiraras).
 - c) (puntuación 3): opistótonos (arqueo de la espalda con la cabeza hacia atrás).
 - d) (puntuación 4): emprostótonos (arqueo del cuerpo hacia abajo).
 - e) (puntuación 5): saltos explosivos (las cuatro patas abandonan la superficie).
 - f) (puntuación 6): convulsiones tónico-clónicas que resultan en disnea o muerte.
5. Movimientos clónicos involuntarios
- a) (puntuación 1): ausencia.
 - b) (puntuación 2): temblores en extremidades, orejas, cabeza o piel.
 - c) (puntuación 3): movimientos repetitivos de boca o mandíbulas.
 - d) (puntuación 4): temblores ligeros del cuerpo.
 - e) (puntuación 5): temblores severos del cuerpo.
 - f) (puntuación 6): sacudidas secas.
 - g) (puntuación 7): sacudidas mioclónicas.
 - h) (puntuación 8): convulsiones clónicas.
6. Posición de la cola
- a) (puntuación 1): arrastrándola floja por la superficie.
 - b) (puntuación 2): rígida cerca de la superficie.
 - c) (puntuación 3): rígida alta en el aire.
7. Vocalizaciones
- a) (puntuación 0): ausencia de vocalizaciones espontáneas.
 - b) (puntuación +): presencia de vocalizaciones espontáneas.

D. Respuestas a la manipulación (evaluación sensorial y motora)

1. Respuesta a la aproximación de un objeto
 - a) (puntuación 1): ausencia de reacción.
 - b) (puntuación 2): se acerca lentamente o lo huele o se gira.
 - c) (puntuación 3): tiembla ("*freezing*", inmóvil, paralizado).
 - d) (puntuación 4): respuesta más enérgica que la b o la c.
 - e) (puntuación 5): respuesta exagerada (salta, muerde, ataca).

2. Respuesta al contacto con un bastoncillo
 - a) (puntuación 1): ausencia de reacción.
 - b) (puntuación 2): se gira lentamente o se va o vocaliza sin movimiento.
 - c) (puntuación 3): tiembla ("*freezing*").
 - d) (puntuación 4): respuesta más enérgica que la b o la c.
 - e) (puntuación 5): respuesta exagerada (salta, muerde, ataca).

3. Respuesta al ruido
 - a) (puntuación 1): ausencia de reacción.
 - b) (puntuación 2): reacción ligera conforme ha oído el ruido.
 - c) (puntuación 3): tiembla ("*freezing*") asustado.
 - d) (puntuación 4): respuesta más enérgica que la b o la c.
 - e) (puntuación 5): respuesta exagerada (salta, muerde, ataca).

4. Respuesta al girarse ("*righting reflex*")
 - a) (puntuación 1): normal, se gira en 1 segundo o menos.
 - b) (puntuación 2): lento, se gira en 2 segundos.
 - c) (puntuación 3): muy lento, tarda más de 2 segundos en girarse.

5. Pantalla invertida
 - a) (puntuación 1): se cae.
 - b) (puntuación 2): permanece en la posición de inicio (colocado en el centro de la pantalla mirando hacia abajo).

- c) (puntuación 3): se gira y sube hasta arriba en 20 segundos o menos.

E. Medidas fisiológicas

1. Diarrea/ defecaciones claras
 - a) (puntuación 0): ausencia.
 - b) (puntuación +): presencia.

2. Exceso de orina
 - a) (puntuación 0): ausencia.
 - b) (puntuación +): presencia.

3.2 TESTS DE NEUROCOMPORTEMIENTO

- **Evitación pasiva (*Passive avoidance*)**

Con este test se puede evaluar la memoria reciente de los animales. La rata se sitúa en el compartimento claro o de salida y después de un periodo de tiempo de 60 segundos, se abre la puerta de separación entre compartimentos, de manera que el animal puede acceder al compartimento oscuro (por el que se siente atraído debido a su condición de animal nocturno). Transcurridos unos segundos, el animal entra de forma espontánea al compartimento oscuro. El tiempo que tarda en acceder a este compartimento se conoce como periodo de latencia de la adquisición (T1). Tras unos segundos y de forma automática, se cierra la puerta de separación y se produce una descarga eléctrica de 1 mA durante 3 segundos. Transcurridas 24 horas, se somete al animal al mismo test pero con la diferencia que no se produce la descarga eléctrica. La valoración de la memoria se realiza calculando el tiempo que tarda el animal en acceder al compartimento oscuro, latencia de retención (T2). El periodo de latencia es mayor en animales que recuerdan que el acceso al compartimento oscuro supone una situación aversiva

(descarga eléctrica), en la fase de recuerdo. Si el periodo de latencia supera los 5 minutos, se considera que el animal ha aprendido la tarea de forma significativa (Colomina y cols., 2002; Albina y cols., 2005).

- **Campo abierto (*Open-field*)**

Este test permite estudiar diferentes parámetros de la actividad motora. Se valoran la distancia total recorrida (actividad horizontal) y el número de levantamientos realizados (actividad vertical) en periodos de tiempo determinados. El animal se coloca en el centro del recinto y se observa su actividad durante 15 minutos, que subdividimos en periodos de 5 minutos para la valoración de la habituación. En nuestros estudios registramos la distancia recorrida como indicador de actividad horizontal y el número de levantamientos como indicador de actividad vertical.

- **Laberinto de agua (*Water-maze*)**

El laberinto de agua fue diseñado por primera vez por Morris (1984), para valorar el aprendizaje y la memoria espacial en ratas. Este test implica una tarea de navegación en la que la rata debe encontrar un objetivo invisible, la plataforma, y orientarse respecto a otros estímulos que se encuentran a una cierta distancia del objetivo pero que guardan una relación espacial con él. Parece ser que los animales utilizan un mapa cognitivo como representación de su entorno cuando resuelven esta tarea.

En nuestro trabajo, el laberinto se divide en 4 cuadrantes, situándose la plataforma en el centro del cuadrante objetivo. Cada animal realiza 4 intentos o *trials* durante 3 días consecutivos (adquisición). Al inicio de cada intento, la rata se introduce en la piscina, mirando hacia la pared, desde una de las 4 posiciones de

salida. Estas posiciones son cambiadas diariamente de manera pseudoaleatoria. La duración máxima de cada intento es de 60 segundos. Los animales que no logran alcanzar la plataforma durante este tiempo, son situados por el experimentador sobre la misma donde permanecen 30 segundos. Tras un periodo entre intentos de 30 segundos, la rata se sitúa en la siguiente posición de salida y así sucesivamente hasta finalizar los 4 intentos.

Al cuarto día, se valora la retención de la tarea mediante un test de retención (*trial probe*), el cual consiste en dejar nadar al animal libremente durante 60 segundos, sin la plataforma.

Se analizan la distancia recorrida, la velocidad de nado y el tiempo que tardan los animales en encontrar la plataforma durante el periodo de adquisición. Estas mismas variables son analizadas para cada animal, en el cuadrante objetivo durante el *trial probe*. Con el objeto de evaluar los resultados provenientes del periodo de adquisición, se realiza la media de los diferentes intentos por día y por animal (Nagahara y cols., 1995; Almaguer-Melián y cols., 2003; Albina y cols., 2005).

3.3 OBTENCIÓN Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

- **Orina**

Para el análisis bioquímico de orina, ésta se recoge tras permanecer cada rata 24 horas en una jaula metabólica (Jones y cols., 1995). A continuación, se mide el volumen obtenido y se purifica la orina centrifugando durante 10 minutos a 2000 rpm y 4 °C. De la orina obtenida, una parte se utiliza para la determinación en fresco de lactato deshidrogenasa (LDH), n-acetil- β -D-glucosaminidasa (NAG) y gamma-GT (GGT). Parte de la orina obtenida, se congela a -80 °C con butil hidroxil tolueno (BHT) como antioxidante para la determinación de isoprostanos. El resto de la fracción se congela a -

20 °C hasta el momento de realizar las determinaciones restantes (proteínas, ácido úrico, urea y creatinina).

- **Sangre**

De cada animal se obtiene sangre en tres tubos diferenciados: suero, heparina-litio (HL) y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), para la determinación de los diferentes parámetros.

- a. Parámetros bioquímicos y hormonales**

Estos análisis se realizan en muestras de suero. Para su obtención se deja en reposo la sangre tras su extracción durante 1 hora a 4 °C. A continuación, se centrifuga durante 15 minutos a 2000 rpm y 4 °C. Del suero obtenido, una parte se utiliza para la determinación en fresco de LDH y GGT. El resto de la fracción se congela a -20 °C hasta el momento de realizar las determinaciones bioquímicas: fosfatasa alcalina (FA), transaminasas glutamicooxalacética (GOT) y glutamicopirúvica (GPT), creatinina, urea, ácido úrico y colinesterasa (CE); así como, los niveles hormonales de tirotrópina (TSH), tiroxina total y libre (T4, T4L), triyodotironina total (T3), testosterona, progesterona y androstenediona.

- b. Marcadores de estrés oxidativo**

Para la obtención de los diferentes marcadores de estrés oxidativo el plasma y los eritrocitos se separan centrifugando durante 15 minutos a 2000 rpm y a 4 °C.

b.1 Tubo de HL

Del plasma sobrenadante obtenido se toma 1 ml y se precipita con ácido tricloroacético (TCA) al 70 % y 4 °C, a una concentración final del 10 % con la finalidad de extraer las proteínas y conservar la muestra en un medio ácido y evitar su oxidación. La mezcla se agita y se deja reposar a 4 °C durante 20 minutos. Pasado este tiempo, se separa el precipitado centrifugando 10 minutos a 2000 rpm a 4 °C. El sobrenadante se guarda a -20 °C para determinar los niveles de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG).

Los eritrocitos se lavan con suero fisiológico centrifugando 5 minutos a 2500 rpm y a 4 °C. Después, se realiza una dilución 1:20 con tampón fosfato sódico 10 mM ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$), pH 6.25, EDTA 1 mM. A continuación, a ese hemolizado se le añade TCA y se deja reposar 20 minutos a 4 °C. Pasado este tiempo, se separa el precipitado centrifugando 10 minutos a 2000 rpm a 4 °C. El sobrenadante se alícuota y se congela a -20 °C para la posterior determinación de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) y GSSG/GSH en eritrocitos.

b.2 Tubo de EDTA

El plasma sobrenadante obtenido se congela a -20 °C para determinar posteriormente los productos de peroxidación lipídica o TBARS.

Los eritrocitos se lavan según el protocolo descrito en el tubo de HL. En primer lugar, se congelan y descongelan dos veces a -20 °C, después se añaden 5 volúmenes de agua destilada fría para acabar de lisar los eritrocitos. Se extrae la hemoglobina con una solución de etanol:cloroformo (1:1/2). Después de agitar la mezcla y centrifugarla 5 minutos a 3000 rpm y 4 °C, la superóxido dismutasa (SOD) se encuentra en la fase sobrenadante que se guarda a -20 °C para su posterior determinación.

En segundo lugar, una alícuota de los eritrocitos anteriormente lavados se diluyen 1:20 con agua bidestilada fría para obtener el producto hemolizado que contiene las enzimas CAT, GR y GPx. De este producto se separa una parte para determinar la CAT y el resto para determinar GR y GPx. Las dos muestras se congelan a -20 °C hasta el momento de ser procesadas.

- **Tejidos**

Se obtienen las fracciones solubles de epidídimo, testículo, hígado, riñón, córtex, cerebelo e hipocampo para el estudio de los diferentes parámetros indicadores de estrés oxidativo. Para ello, se homogeniza una fracción de los diferentes tejidos con tampón fosfato sódico 200 mM pH 6.25, en una proporción 1:10 (peso/volumen). El homogenizado resultante se centrifuga a 10.000 g durante 1 hora a 4 °C.

Otra fracción de testículo se conserva en una solución de NaCl-Tritón a 4 °C, un máximo de 24 horas para el contaje de espermátidas resistentes a la homogenización. El epidídimo restante se congela a -20 °C para la evaluación posterior de la movilidad y morfología de los espermatozoides.

Una fracción de todos los tejidos mencionados se fija con formaldehído durante dos días para su conservación hasta el momento del estudio histopatológico.

3.4 ESTUDIO DE PARÁMETROS SEMINALES

- **Valoración de la movilidad del esperma**

En una placa de Petri precalentada a 37 °C, con 5 ml de solución de Hank's, se deposita el epidídimo izquierdo. Con un bisturí se secciona la cauda (parte final o cola del epidídimo) y se deja incubar 10 minutos a 37 °C en una estufa. Después de la incubación, 20 µl de la suspensión se colocan en un portaobjetos precalentado a 37 °C y se cubre con un cubreobjetos de 22×22 mm. Esta preparación se observa en un microscopio óptico a 40x, donde se valoran un mínimo de diez campos. De cada campo se anotan los espermatozoides móviles, los inmóviles y los diferentes grados de movilidad (movilidad muy alta, alta, moderada y débil). A partir de estos datos se calcula el porcentaje de movilidad del esperma (Linares y cols., 2005; Alonso y cols., 2009).

- **Análisis morfológico del esperma**

Después de la valoración de la movilidad del esperma, se retira el cubreobjetos y se deja secar la muestra a temperatura ambiente. Posteriormente, se tiñe la preparación con panóptico rápido (Gurr, 1971). Una vez seco, se observa en el microscopio óptico a 40x la morfología de los espermatozoides. La clasificación morfológica se realizó de acuerdo con estudios previos realizados por Wyrobeck y Bruce (1975). A partir de esta clasificación se calcula el porcentaje de formas anormales y el porcentaje relativo de cada anomalía (Linares y cols., 2005).

- **Evaluación de la producción de esperma**

Para evaluar la producción de esperma, se descongela una fracción de epidídimo a temperatura ambiente y se homogeneiza con 0.5 ml

de solución tritón mediante diez golpes del homogenizador manual. El homogenizado resultante, se diluye con 4.5 ml de la misma solución y se observa en el microscopio mediante una cámara de Neubauer a 40x con el fin de realizar el recuento del número de espermatozoides. Se realizan tres recuentos por cada muestra.

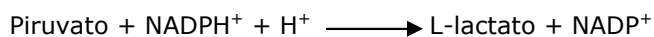
De una fracción del testículo derecho se retira la túnica albugínea, y el parénquima testicular se homogeniza en 1 ml de la solución de tritón. Una alícuota de esta suspensión se tiñe con una solución de Richardson y a continuación, se observa en el microscopio mediante la cámara de Neubauer con el fin de realizar un recuento de espermátidas resistentes a la homogenización (Linares y cols., 2006; Alonso y cols., 2009).

3.5 BIOQUÍMICA DE ORINA

Todas las determinaciones se realizaron en el auto-analizador Cobas Fara-Mira. Excepto las proteínas que se determinaron en un espectrofotómetro Cary 1 de Varian.

- **Determinación de la actividad enzimática LDH**

Esta técnica se basa en la medida de la transformación de NADPH⁺ a NADP⁺ debido a la acción de LDH que transforma el piruvato en L-lactato a 340 nm según la reacción (Gay y cols., 1968):

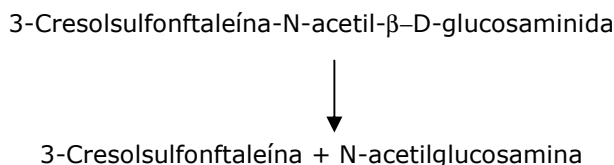


10 µl de orina, previamente diluida, se mezclan con 150 µl de la mezcla: tampón tris-HCl pH= 7.2 80 mM, piruvato sódico 1.6 mM, NaCl 200 mM y NADPH 0.2 mM.

Los resultados se expresan en U LDH/orina 24h/kg.

- **Determinación de la actividad enzimática NAG**

La actividad enzimática de la NAG se determina según describieron Yakata y colaboradores (1983). El fundamento de esta técnica es medir la formación de un complejo liliáceo (3-cresolsulfonftaleína) a 580nm que se forma por la acción de la NAG según la reacción:

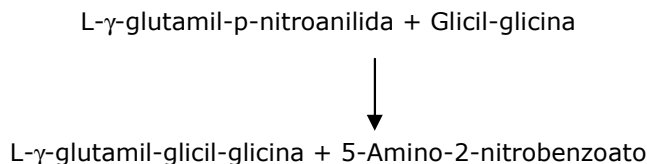


8 μl de orina, previamente diluida, se mezclan con 100 μl de sustrato. A continuación, se incuba la mezcla 15 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$. Finalmente se añaden 90 μl de NAG y se esperan 10 minutos para la lectura.

Los resultados se expresan en U/mg creatinina.

- **Determinación de la actividad enzimática GGT**

La actividad enzimática de la GGT se determina según describió Szasz (1969). El fundamento de esta técnica es medir la formación de un complejo (5-amino-2-nitrobenzoato) a 405 nm que se forma por la acción de la GGT según la reacción:



Se toman 10 μl de orina, previamente diluida, y se mezclan con 150 μl de la mezcla: tampón pipes pH= 8.25 25 mM, L- γ -glutamil-p-nitroanilida 5 mM y glicil-glicina 75 mM.

Los resultados se expresan en U GGT/24h/kg.

- **Determinación del nivel de creatinina**

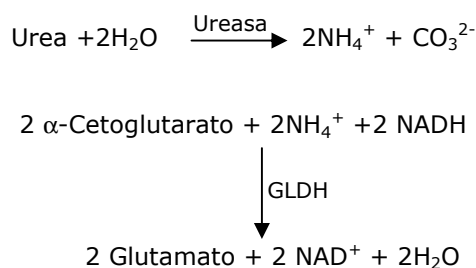
El fundamento de esta técnica es medir la formación de un compuesto coloreado: el picrato alcalino de creatinina. Éste se forma como resultado de la reacción entre la creatinina y el ácido pícrico en medio alcalino y se cuantifica espectrofotométricamente a 510 nm (Spierto y cols., 1979).

A 20 µl de orina, previamente diluida, se le añaden 160 µl de la mezcla: ácido pícrico 55 mM, carbonato sódico 50 mM y NaOH 0.4 M.

Los resultados se expresan en mg creatinina/orina 24h

- **Determinación del nivel de urea**

La urea presente en las muestras consume NADPH según las reacciones acopladas descritas a continuación. Esta disminución se cuantifica espectrofotométricamente a 340 nm (Sampson y cols., 1980).

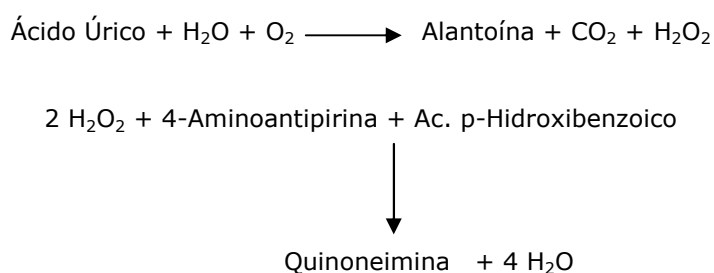


8 µl de orina, previamente diluida, se mezclan con 350 µl de la mezcla: tampón tris-HCl pH 7.8 100 mM, α-cetoglutaratato sódico 6 mM, ADP 2 mM, NADH 0.2 mM, EDTA 4 mM, ureasa ≥4000 U/L, glutamato deshidrogenasa (GLDH) ≥9000 U/L. A continuación, se realizan lecturas espectrofotométricas a los 30 segundos y al minuto.

Los resultados se expresan en mg urea/ orina 24h

- **Determinación del nivel de ácido úrico**

El ácido úrico presente en la muestra es oxidado enzimáticamente por acción de la uricasa (UOD) y transformado en alantoína y H_2O_2 . Éste último reacciona con el ácido p-hidroxibenzoico y la 4-aminoantipirina, en presencia de peroxidasa (POX), para formar un complejo de quinoneimina de color rojo. La intensidad de color medida espectrofotométricamente a 510 nm permite cuantificar el ácido úrico presente en las muestras (Sanders y Plasman, 1980).



A 4 μl de orina, previamente diluida, se le añaden 180 μl de la mezcla: tampón fosfato pH 7.2 75 mM, ácido p-hidroxibenzoico 4 mM, 4-aminoantipirina 0.4 mM, EDTA $\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$ 0.1 mM, uricasa ≥ 90 U/L, ascorbato oxidasa ≥ 190 U/L, ascorbato oxidasa ≥ 9000 U/L. A continuación se incuban las muestras 5 minutos a 37 °C y se realizan las lecturas espectrofotométricas.

Los resultados se expresan en mg ácido úrico/orina 24h

- **Determinación de la concentración de proteínas**

La concentración de proteínas en muestras de orina se determina por el método directo del Biuret. En disolución alcalina, las proteínas forman con los iones cobre (II) un complejo coloreado, de gran estabilidad, cuantificable espectrofotométricamente (Peters, 1968).

Se toman 50 μl de orina y se le añaden 350 μl de la mezcla: NaOH 0.47 M, yoduro potásico 23.3 mM, sulfato de cobre (II) 6.5 mM y tartrato Na-K 22.1 mM. A continuación se incuban las muestras 10

minutos a temperatura ambiente y se realizan las lecturas espectrofotométricas a 540 nm.

Los resultados se expresan en mg proteína/orina 24h

3.6 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y HORMONALES DE SANGRE

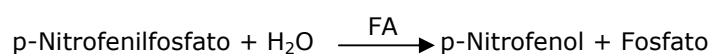
Todas las determinaciones se realizaron en el auto-analizador Cobas Fara-Mira. Excepto la concentración de hemoglobina que se determinó en un espectrofotómetro Cary 1 de Varian.

Los niveles de creatinina, urea y ácido úrico así como la actividad LDH se determinan según lo descrito anteriormente en muestras de orina.

a. Parámetros bioquímicos

- **Determinación de la actividad FA**

El fundamento de esta técnica es medir la formación de un compuesto coloreado, el p-Nitrofenol resultado de la reacción entre la FA y el p-Nitrofenilfosfato según la reacción (Hausamen y cols., 1967):

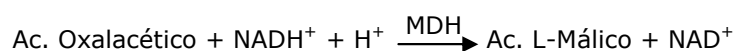
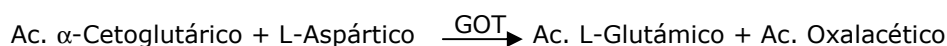


4 µl de muestra se mezclan con 180 µl de la mezcla: tampón dietanolamina /HCl pH=9.8 1 M, p-Nitrofenilfosfato 10 mM y MgCl₂ 0.5 mM. A continuación se realizan lecturas espectrofotométrica a 405 nm a los 1, 2, 3 y 4 minutos.

Los resultados se expresan en U/L

- **Determinación de la transaminasa GOT**

La enzima GOT cataliza la reacción entre el ácido L-aspártico y el α -cetoglutarico, dando oxalacético y L-glutámico. El ácido oxalacético formado reacciona inmediatamente con el NADH en presencia de la enzima malato dehidrogenasa (MDH) para dar ácido L-málico y NAD (Bergmeyer y cols., 1986).



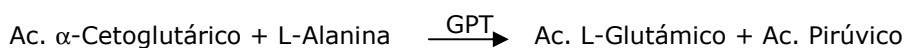
La velocidad de consumo del NADH se determina espectrofotométricamente a 340 nm y es proporcional a la actividad de la GOT en la muestra.

20 μ l de muestra se mezclan con 180 μ l de la mezcla: tampón tris-HCl pH=7.8 80 mM, ácido L-aspártico 240 mM, ácido α -cetoglutarico 12 mM, NADH 0.18 mM, MDH \geq 600 U/L y LDH \geq 800 U/L. A continuación, se realizan lecturas espectrofotométricas a 340 nm a los 1, 2, 3 minutos.

Los resultados se expresan en U/L

- **Determinación de la transaminasa GPT**

La enzima GPT cataliza la reacción entre el ácido L-aspártico y el ácido α -cetoglutarico, dando ácido pirúvico y L-glutámico. El ácido pirúvico formado reacciona inmediatamente con el NADH en presencia de la enzima lactato dehidrogenasa (LDH) para dar ácido L-láctico y NAD (Bergmeyer y cols., 1986).



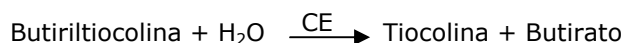
La velocidad de consumo del NADH se determina espectrofotométricamente a 340 nm y es proporcional a la actividad de la GOT en la muestra.

20 μl de muestra se mezclan con 180 μl de la mezcla: tampón tris-HCl pH=7.8 90 mM, alanina 500 mM, ácido α -cetoglutarico 15 mM, NADH 0.18 mM y LDH ≥ 800 U/L. A continuación, se realizan lecturas espectrofotométricas a 340 nm a los 1, 2, 3 minutos.

Los resultados se expresan en U/L

- **Determinación de la actividad CE**

La CE es una enzima que hidroliza la butiriltiocolina para dar tiocolina y butirato. La reacción que se produce entre la tiocolina y el ditiobis-nitrobenzoato (DTNB) da lugar a un compuesto amarillo cuantificable a 405 nm (Den Blawen y cols., 1983).



2 μl de muestra se mezclan con 300 μl de la mezcla: tampón fosfato pH=7.4 50 mM, DTNB 0.26 mM y ioduro de butiriltiocolina 6 mM. A continuación, se realizan lecturas espectrofotométricas a 405 nm a los 30, 60 y 90 segundos.

Los resultados se expresan en U/L

- **Determinación de niveles de hemoglobina**

La cantidad de hemoglobina contenida en sangre total se determina mediante la reacción de Drabkin.

El Fe (II) de la hemoglobina es oxidado a Fe (III) por el ferricianuro, dando lugar a la metahemoglobina que, en presencia de ión cianuro, origina la cianmetahemoglobina, compuesto de color rojo y estable, que se puede determinar fotométricamente (van Kampen y Zijlstra, 1961).

Se mezcla la sangre total con 250 volúmenes del reactivo (ferrocianuro potásico 20 mM y cianuro potásico 43 mM). Después de una espera de 20 minutos a temperatura ambiente, la muestra se lee en un espectrofotómetro a 540 nm.

La concentración de Hb se determina únicamente para dar el resultado de los parámetros de estrés oxidativo en función de los niveles de Hb.

b. Parámetros hormonales

La determinación de los niveles hormonales se realiza en un analizador ADVIA Centaur de inmunoensayos mediante la técnica de la quimioluminiscencia. Cuando se usa en combinación con tecnología de inmunoensayo, la luz producida por la reacción indica la cantidad de analito que contiene la muestra (Weeks y Woodhead, 1984).

A la muestra que contiene la hormona a determinar o antígeno (Ag), se le añade el reactivo que consiste en una hormona marcada (Ag marcado) con éster de acridinio (AE) y la fase sólida (partículas paramagnéticas (PMP) recubiertas de anticuerpos específicos de la hormona a determinar (Ac) tal como se indica en la **Figura 20**.

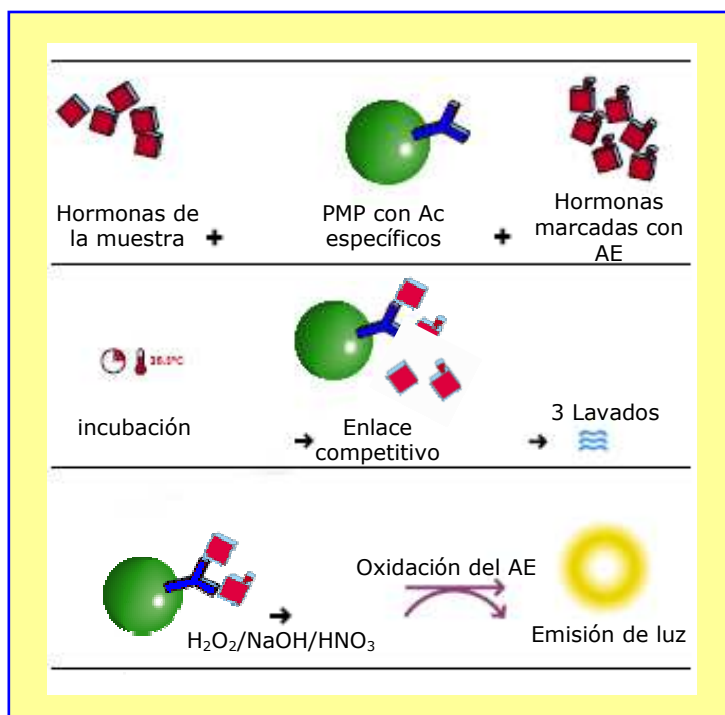


Figura 20. Pasos de la técnica de quimioluminiscencia por enlace competitivo.

La cubeta se incuba 15 minutos a 37 °C. El Ag marcado con AE compete con el Ag de la muestra por los sitios de unión específica limitados en el Ac unidos a las PMP. Si en la muestra hay más Ag específico del analito, se une menos Ag marcado con AE. La cubeta se expone a un campo magnético, que atrae las PMP hacia los imanes. Mientras los imanes sostienen en su sitio a las PMP, la muestra y el reactivo no unidos se eliminan mediante tres lavados. La cubeta contiene ahora la hormona de la muestra y la hormona marcada con AE unida a las PMP por el anticuerpo. A continuación, se añade una mezcla de $H_2O_2/NaOH/HNO_3$ para iniciar la reacción de quimioluminiscencia. La emisión de luz se mide en unidades relativas de luz (RLU). Una vez cuantificada la luz producida por la oxidación de AE, el sistema calcula la concentración de la hormona. La señal es inversamente proporcional a la cantidad de hormona presente en la muestra (Taieb y cols., 2003).

3.7 ESTUDIO DE PARÁMETROS INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

a. Determinación de niveles de isoprostanos en orina

Los niveles de 8-epi-PGF 2α libre se determinaron mediante un kit comercial de inmunoensayo (Katsuki y cols., 2006). Las muestras de orina se centrifugaron suavemente para eliminar el sedimento. Seguidamente, 50 μ l del estándar o muestra de orina se depositaron en una placa de 96 pocillos pre-tratada con anticuerpos monoclonales de ratón purificados. Acto seguido, 50 μ l del antisuero acetilcolinesterasa unida a 8-isoprostano (*tracer*) se añaden a cada pocillo y se incuban a temperatura ambiente durante 18 horas. Después se lava con tampón de lavado, 200 μ l de reactivo de Ellman's que contiene el substrato de la acetilcolinesterasa (**Figura 21**). Las placas se leen a 412 nm y los valores de los niveles de 8-epi-PGF 2α en orina se calculan mediante una curva realizada con diferentes concentraciones del estándar de 8-epi-PGF 2α . El límite de detección del ensayo es de 1.5 pg/ml.

Los resultados se expresan en ng 8-isoprostano/mg creatinina.

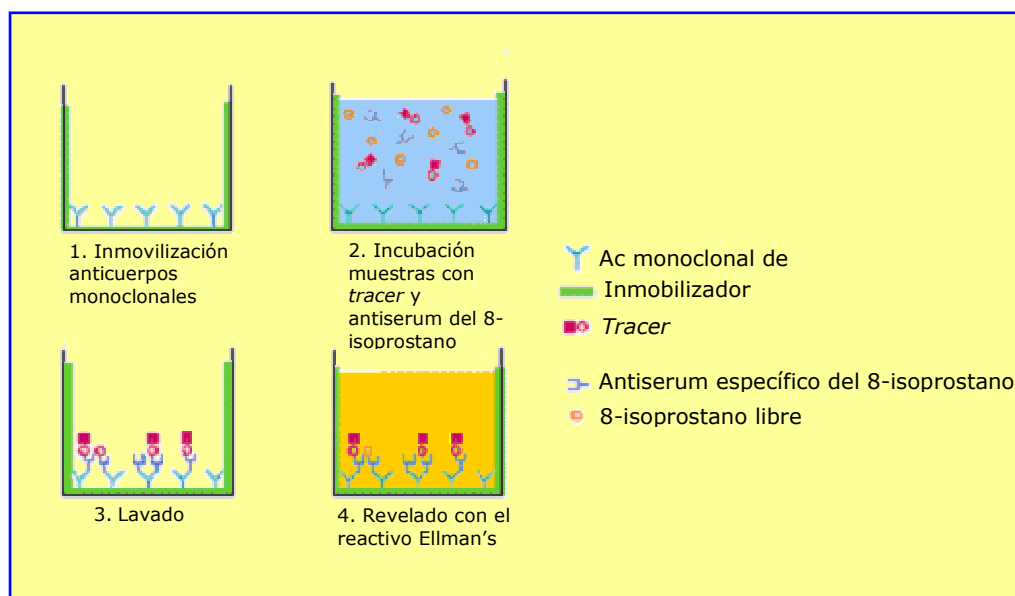


Figura 21. Esquema del método para la determinación de isoprostanos.

b. Marcadores de EO en tejidos y sangre

- **Determinación de la peroxidación lipídica**

La peroxidación de los lípidos se determina por la formación de TBARS según el método de Zupan y colaboradores (2008). Para ello, se toman 150 μ l de homogenado, plasma o eritrocitos, y se le añaden 75 μ l de dodecilsulfato sódico (SDS) y se incuba la mezcla 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se le añade ácido acético al 20 % (pH=3.5) y se centrifuga durante 15 minutos a 3500 rpm y 4°C. Esta primera parte se realiza para precipitar las proteínas de la muestra.

Seguidamente, se toma 1ml de fracción soluble y se mezcla con 1 ml de una solución de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0.8 %. Esta mezcla se deja 1 hora en un baño de aceite a 95 °C. Pasado este tiempo, se enfrían las muestras con hielo. A continuación, se añaden 2 ml de una mezcla n-butanol/piridina (15/1) y se centrifuga a 2000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Por último, se leen las absorbancias del sobrenadante a 532 nm.

Para la determinación de la concentración de la muestra se construye una recta patrón. Como estándar se utiliza el bis-dietilacetal malonaldehído (MDA; d=0.92 kg/l) en diferentes concentraciones.

La peroxidación lipídica se expresa en nmol TBARS/mg proteína.

- **Determinación de la concentración de GSH**

El GSH se determina por el método de Hissin y Hilf (1976). El GSH reacciona con el O-phtalaldehído (OPT) a un pH de 8. Para ello, la fracción soluble previamente precipitada con ácido tricloroacético (TCA) se diluye 1:10 con tampón fosfato sódico

100 mM pH 8, EDTA 5 mM. A continuación, se realiza una segunda dilución 1:20 en la cubeta de reacción: 100 μ l de la fracción soluble o plasma diluida con 1.8 ml de tampón fosfato sódico y 100 μ l de OPT. Se mezcla todo y, después de una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente, se lee en el fluorímetro a una longitud de onda de extinción de 350 nm y una longitud de onda de emisión de 420 nm.

Los resultados se expresan en nmol GSH/mg de proteína.

- **Determinación de la concentración de GSSG**

La concentración de GSSG se mide por el mismo método anterior (Hissin y Hilf, 1976). El GSSG también reacciona con el OPT y da fluorescencia aunque a pH 12. Para evitar que el GSH se transforme en GSSG, la fracción soluble o plasma se incuba 25 minutos con N-etil-maleimida (NEM), que impedirá la oxidación. Pasado el tiempo de incubación, la fracción soluble se diluye 1:10 con tampón NaOH 0.1 N que aporta el pH de interés. A continuación, se vuelve a diluir la muestra, 1:20 en la cubeta, donde se añaden 100 μ l de OPT. Se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente y se lee la fluorescencia bajo las mismas condiciones descritas en el apartado anterior.

Los resultados se expresan en nmol GSSG/mg de proteína.

- **Determinación de la actividad enzimática de la GST**

La actividad enzimática de la GST se determina según describieron Habig y colaboradores (1975). El fundamento de esta técnica es medir la formación de un complejo coloreado que se forma por la reacción entre el GSH y el 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (cDNB) gracias a la acción de la glutatión transferasa.

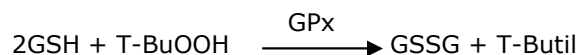
30 μ l de la fracción soluble o plasma, previamente diluida, se mezclan con 225 μ l de reactivo de trabajo (1 ml cDNB 23.2 mM y 49 ml tampón fosfato Na 200 mM pH 6.25). Después se añaden 30 μ l de GSH 10 mM.

Finalmente, se realizan lecturas espectrofotométricas a una longitud de onda de 340 nm, a tiempo 0 y a los 5 minutos.

Los resultados se expresan como mU GST/mg de proteína.

- **Determinación de la actividad enzimática de la GPx**

La actividad enzimática GPx se mide según lo descrito por Wheeler y cols. (1990).



El fundamento de esta técnica es medir la disminución de NADPH a 340 nm durante 2 minutos, producida por la acción de la GR, que según la reacción mostrada arriba, transforma el GSSG producido por la GPx.

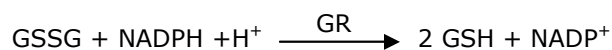
54 μ l de la fracción soluble o plasma, previamente diluida, se mezclan con 135 μ l de reactivo de trabajo (3.7 ml tampón fosfato potásico 100 mM, EDTA 1 mM pH 7, 0.5 ml NADPH 2.25 mM, 0.1 ml de GR diluida 1:2.5 en tampón fosfato potásico). Esta mezcla se incuba 5 minutos a 37 °C. Pasado este tiempo se añaden 36 μ l de T-butilhidroperóxido 15 mM previamente diluido 1:2. Finalmente, se realizan lecturas espectrofotométricas una longitud de onda de 340 nm a tiempo 0 y a los 5 minutos.

El coeficiente de extinción molar del NADPH es de 6.22 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Se calcula el descenso de NADPH/minuto.

Los resultados se expresan en mU GPx/mg de proteína.

- **Determinación de la actividad enzimática de la GR**

Al igual que en el apartado anterior, la actividad GR se mide según lo descrito por Wheeler y cols. (1990). Esta técnica se basa en la medida de la disminución de NADPH a 340 nm durante 10 minutos, debido a la acción de la GR, que transforma el GSSG en GSH. En este caso se forma de NADP⁺ a partir de NADPH inicial debido a la reducción del GSSG.



40 µl de la fracción soluble o de plasma, se mezclan con 356 µl de tampón fosfato potásico (0.25 mM, EDTA 2 mM, pH 7.4) y con 20 µl de NADPH.

Los resultados se expresan mU GR/mg de proteína.

- **Determinación de la actividad enzimática de la CAT**

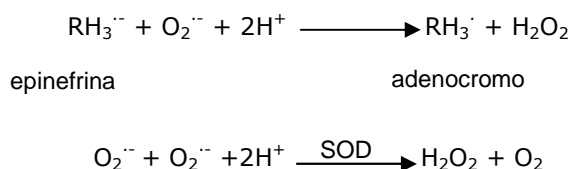
Con los 100 µl de fracción soluble o de plasma, se realiza una dilución adicional con tampón fosfato potásico. El método a seguir en esta ocasión es el de Cohen y cols. (1970).

En una cubeta de cuarzo hasta un volumen final de 3 ml, se mezclan H₂O₂ 19 mM con tampón fosfato potásico 100 mM (KH₂PO₄-K₂HPO₄) de pH 7.5 y con 20 µl de muestra diluida. El fundamento es ver el grado de desaparición H₂O₂ durante los primeros 30 segundos. Para realizarlo se utiliza un espectrofotómetro que lee a una longitud de onda de 240 nm.

Se calcula el descenso/minuto y los resultados se expresan en µmol/min/mg proteína, moles de H₂O₂ transformados.

- **Determinación de la actividad enzimática de la SOD**

La actividad enzimática de la SOD se mide mediante el método de Misra y Fridovich (1972), basado en la auto oxidación de la epinefrina. Los superóxidos formados oxidan la epinefrina a adenocromo. Este paso se puede seguir espectrofotométricamente a 480 nm. La SOD transforma los superóxidos en peróxido de hidrógeno y oxígeno evitando la formación de adenocromo. Este proceso se resume en las dos reacciones siguientes:



El primer paso es evaluar la curva de autooxidación de la epinefrina. Para ello se mezclan 2.5 ml de tampón carbonato potásico Na_2CO_3 - NaHCO_3 (50 mM a pH 10.2, EDTA 0.1 mM) con 300 μl de agua bidestilada y 200 μl de epinefrina 6 mM en HCl 1 mM. La lectura se realiza cada 40 segundos durante 23 minutos a 30 °C, en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 480 nm, como se ha comentado antes. A continuación, se realizan las diluciones pertinentes de la muestra con el fin de encontrar la concentración que inhiba el 50 % de la formación del adenocromo (I_{50}).

Las lecturas se llevan a cabo con una mezcla de 2.5 ml de tampón, 300 μl de las diluciones correspondientes y 200 μl de epinefrina, en las mismas condiciones espectrofotométricas descritas anteriormente.

Los resultados se expresan en unidades U SOD/mg proteína, donde una unidad es la cantidad de muestra que inhibe en un 50

% la transformación de epinefrina en adenocromo a un pH alcalino.

- **Determinación de la concentración de proteínas**

La concentración de proteínas en los diversos tejidos se mide mediante el reactivo de Bradford (Bradford, 1976). El método se basa en la formación de un complejo entre las proteínas y el colorante Brilliant Blue G. Este complejo provoca que la absorbancia máxima del reactivo pase de una longitud de onda de 465 a 595 nm. La absorbancia es proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra.

A 50 μ l de la fracción soluble, previamente diluida, se le añade 1.5 μ l de reactivo Bradford. Esta mezcla se incuba 5 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se lee la absorbancia de la muestra en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 595 nm.

Como estándar se utiliza albúmina sérica bovina (BSA) a una concentración de 1 mg/ml. La concentración de albúmina se determinó únicamente para el cálculo de los parámetros de estrés oxidativo respecto a los niveles de proteína.

3.8 ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

Una fracción de testículo, epidídimo, hígado, riñón, córtex, cerebelo e hipocampo se fija con formaldehído durante dos días y seguidamente fue incluida en parafina. Se realizan secciones de 3 μ m, que posteriormente son teñidas con hematoxilina-eosina para su observación en el microscopio y evaluación de alteraciones morfológicas.

3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Se utiliza el programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) para PC, versión 15.0.

Se trabaja con un nivel de significación del 5 % ($p < 0.05$). Se calcula en primer lugar, los descriptivos de todas las variables (medias y desviación estándar). Para ver si los datos a estudiar siguen una distribución normal, se aplica el test de Levene para evaluar si existe homogeneidad de varianzas.

Cuando no existen diferencias entre datos, es decir, los datos eran homogéneos, se aplica un ANOVA (análisis de varianza). En los casos en que el ANOVA da diferencias significativas entre grupos, se realizan pruebas de comparación múltiple entre grupos o pruebas *post-hoc*: Tuckey.

Cuando el test de Levene es significativo, se realizan pruebas no paramétricas: Kruskal-Wallis. En los casos que dan diferencias significativas entre grupos, se hacen comparaciones mediante un test no paramétrico de la U de Mann-Whitney.

Todos los resultados se analizan con el programa SPSS excepto los procedentes de la FOB. En este caso se utiliza el programa CIA (*Confidence Interval Analysis*), versión 2.0, para el análisis por comparación de proporciones mediante el método de Wilson.

RESULTADOS

1. BATERÍA DE OBSERVACIÓN FUNCIONAL

La respuesta del sistema nervioso central, los efectos neuromusculares y autónomos así como la reactividad sensorial y motora fueron evaluadas mediante la FOB. Dentro de las observaciones motoras, la prueba de la pantalla invertida mostró diferencias significativas entre grupos a los tres días de la exposición a BDE-99. Para la evaluación de esta prueba se le otorgó al animal una puntuación (del 1 al 3) según su habilidad en subir la pantalla: puntuación 1 si el animal se caía, 2 si permanecía en la posición de inicio (situado en el centro de la pantalla mirando hacia abajo) y 3 si giraba y lograba subir en 20 segundos o menos.

Los resultados del análisis estadístico por comparación de frecuencias se resumen en la **Figura 22**. Todos los animales del grupo control subieron la pantalla en menos de 20s. El 80% de los animales expuestos a 0.6 mg BDE-99/kg se cayó, mientras que el 20% logró subir la pantalla. El 80% de los animales expuestos a la dosis de 1.2 mg BDE-99/kg permaneció en la posición inicial, mientras que el 20% se cayeron.

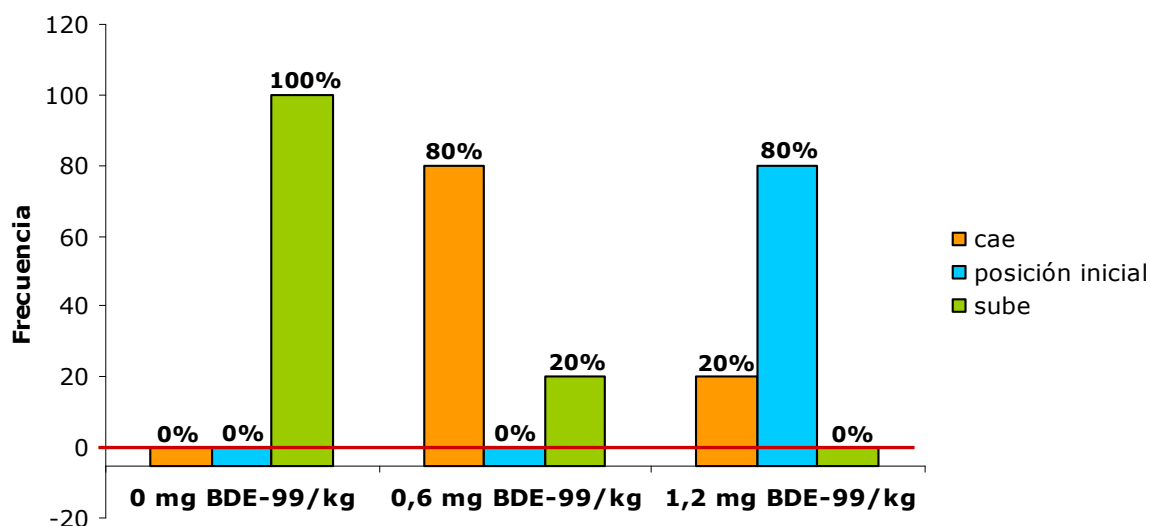


Figura 22. Comparación de proporciones en la prueba de la pantalla invertida. Estadística: test de Wilson.

En la **Tabla 10** se resume el análisis de las proporciones y sus diferencias en la prueba de la pantalla invertida según el método de Wilson. Los resultados se expresan como proporción respecto al intervalo de confianza (IC).

Tabla 10. Habilidad de los animales en la tarea de la pantalla invertida.

Grupos de comparación	0-0.6	0-1.2	0.6-1.2
Puntuación	Frecuencia (IC)		
1	-80% (-96.4 a -19.3)*	-20% (-0.624 a 0.264)	60% (0 a 83.2)
2	-	-80% (-96.4 a -19.3)*	-80% (-96.4 a 19.3)*
3	80% (19.3 a 96.4)*	100% (38.6 a 100)*	20% (-26.4 a 62.4)

1: El animal se cae, 2: permanece en la posición de inicio, 3: sube en 20 segundos o menos. Los resultados se expresan como proporción (IC). El superíndice* indica diferencias significativas entre grupos con una confianza del 95%. Estadística: test de Wilson.

Para el resto de pruebas llevadas a cabo no se han visto efectos como consecuencia de la exposición a BDE-99.

2. EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS DE LA EXPOSICIÓN A BDE-99

El aprendizaje contextual de los animales se evaluó mediante el test de evitación pasiva basado en el modelo de condicionamiento clásico. Se evaluaron las diferencias en el periodo de latencia entre el día de la adquisición (T1) y 24 horas después, en el día de retención (T2).

Se observó una disminución aunque no significativa del tiempo de latencia durante la adquisición (T1) en ambos grupos de exposición a BDE-99 (**Figura 23**). Sin embargo, en el día de retención (24 horas después de la adquisición) todos los animales tardaron más de 5 minutos (T2) en entrar al compartimento oscuro.

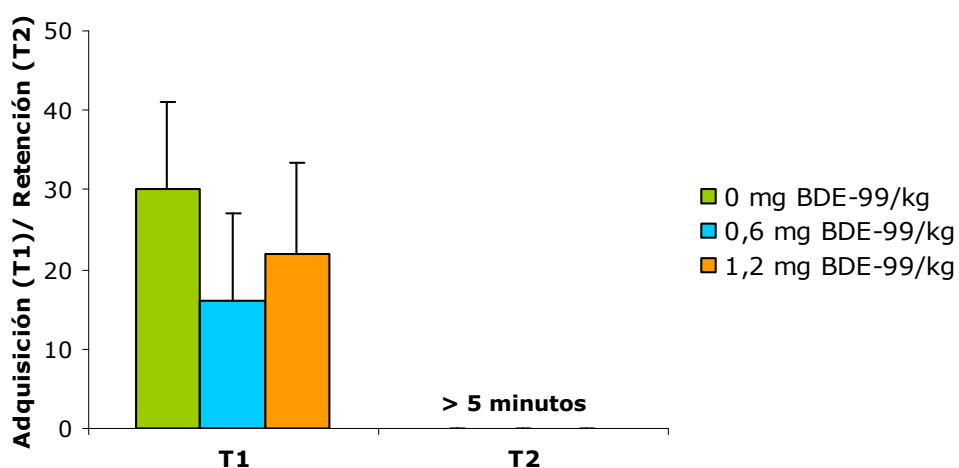


Figura 23. Test de evitación pasiva. Latencia del día de adquisición (T1) y retención 24 h más tarde (T2) en ratas macho adultas. Los resultados se expresan como medias \pm DE. Estadística: T1 ANOVA, T2 Kruskal-Wallis.

La actividad motora de los animales se midió mediante el test del campo abierto. Para evaluar la habituación, se dividió el periodo de observación de 15 minutos en intervalos de 5 minutos. Los parámetros registrados se muestran en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Variables evaluadas en el campo abierto en ratas expuestas a BDE-99.

Dosis BDE-99 (mg/kg)	0	0.6	1.2
No. Animales	10	10	10
Tiempo (s) de permanencia en el centro			
0-5 minutos	26.33±17.18	18.45±11.92	18.16±20.70
5-10 minutos	18.18±10.95	13.00±7.21	16.60±9.98
10-15 minutos	17.17±13.36	19.08±17.64	16.48±18.85
Tiempo (s) de permanencia en la periferia			
0-5 minutos	275.89±17.39	281.55±11.92	281.84±20.70
5-10 minutos	285.14±11.95	291.88±8.66	290.78±11.24
10-15 minutos	289.70±13.33	289.24±15.91	290.84±15.91
Distancia (cm) recorrida en el centro			
0-5 minutos	203.17±131.52	187.07±108.96	155.58±118.87
5-10 minutos	171.62±121.11	188.26±112.32	180.84±115.63
10-15 minutos	179.75±96.08	173.69±161.72	194.43±140.53
Distancia (cm) recorrida en la periferia			
0-5 minutos	1222.02±466.18	1264.86±625.81	1202.65±698.58
5-10 minutos	1383.44±574.39	985.12±448.50	1105.51±685.20
10-15 minutos	1096.59±650.85	1076.13±414.52	818.65±506.57
Número de rearings en el centro			
0-5 minutos	5.40±3.53	5.11±3.06	4.71±2.69
5-10 minutos	6.13±4.02	3.13±2.36	5.17±3.97
10-15 minutos	3.10±3.98	4.00±4.92	2.56±3.94
Número de rearings en la periferia			
0-5 minutos	14.60±6.04	14.44±8.43	13.43±6.21
5-10 minutos	17.60±10.66	12.43±4.93	10.11±8.95
10-15 minutos	10.90±7.68	12.33±7.30	5.38±5.83

Resultados expresados como medias±DE. Estadística: ANOVA.

Todos los animales permanecieron más tiempo en la periferia que en el centro (**Figura 24**). La distancia recorrida por los animales fue mayor en la periferia que en el centro. No se observaron diferencias significativas entre grupos en la distancia total recorrida (**Figura 25**) ni en el número de *rearings*.

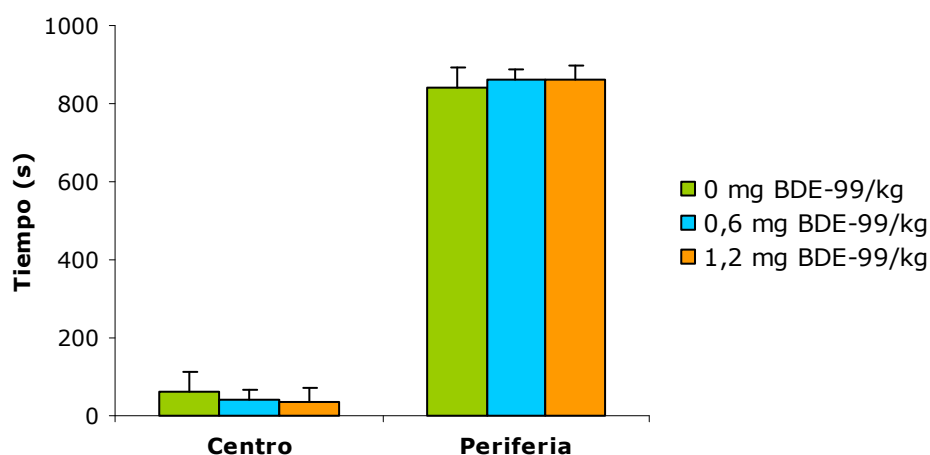


Figura 24. Tiempo total transcurrido en el campo abierto entre el centro y la periferia. Los resultados se expresan como medias \pm DE. Estadística: ANOVA.

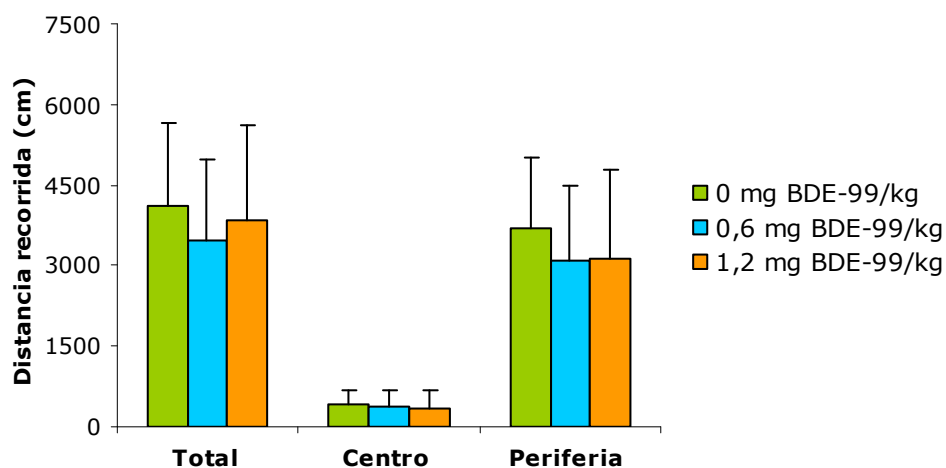


Figura 25. Distancia total, en el centro y en la periferia recorrida en el campo abierto. Los resultados se expresan como medias \pm DE. Estadística: ANOVA.

El aprendizaje espacial se evaluó mediante la prueba del laberinto de agua o *water maze*. Durante el periodo de adquisición (*trials* con plataforma) se registraron cada día los siguientes parámetros: distancia recorrida, el

tiempo en encontrar la plataforma y la velocidad de nado. Durante el *trial* de retención o *trial probe* se registró el tiempo en el cuadrante de la plataforma, así como la distancia recorrida en dicho cuadrante.

En la **Figura 26** se representa la distancia recorrida para encontrar la plataforma en los días de adquisición. Durante este periodo, los animales disminuyeron la distancia recorrida a lo largo de los tres días sin observarse diferencias significativas entre grupos.

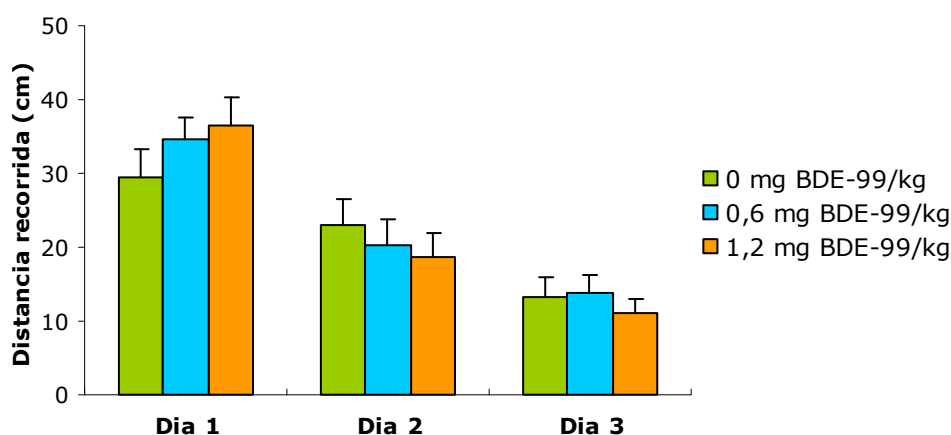


Figura 26. Distancia recorrida para encontrar la plataforma en la prueba del laberinto de agua. Los resultados se expresan como medias \pm DE. Estadística: ANOVA.

La **Figura 27** resume los valores por grupo de la media del tiempo que tardan los animales en encontrar la plataforma en los días de adquisición. No se observaron diferencias significativas entre grupos ya que todos los animales disminuyeron el tiempo que tardaron en encontrar la plataforma a lo largo del periodo de adquisición.

La velocidad media de nado tampoco mostró diferencias significativas entre los animales expuestos y los del grupo control (**Figura 28**).

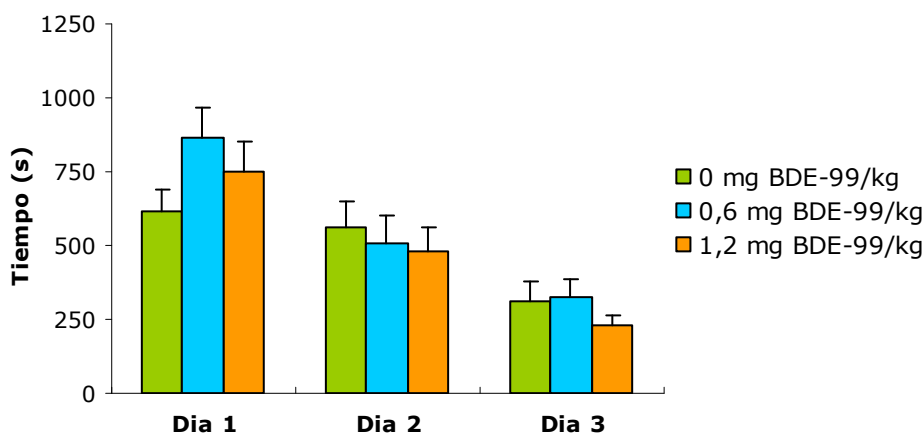


Figura 27. Tiempo transcurrido en encontrar la plataforma en la prueba del laberinto de agua. Los resultados se expresan como medias \pm DE. Estadística: ANOVA.

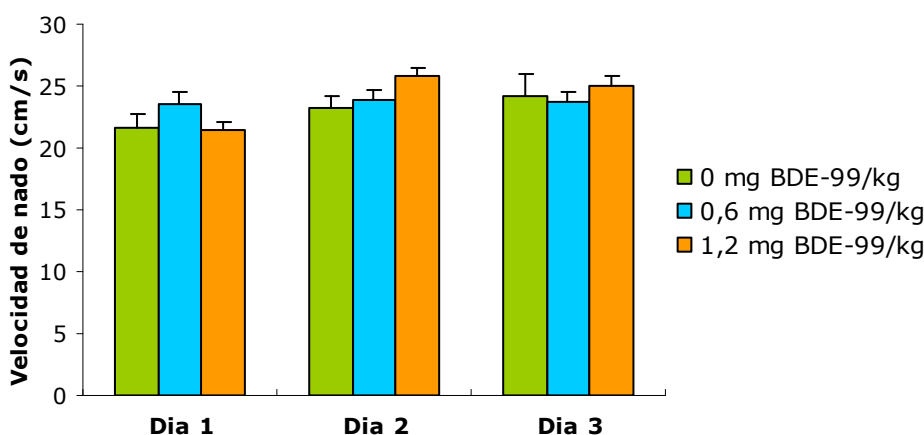


Figura 28. Velocidad de nado en la prueba del laberinto de agua. Los resultados se expresan como medias \pm DE. Estadística: ANOVA.

En el *trial probe*, la exposición a BDE-99 no afectó a ninguno de los grupos de forma significativa ni en la distancia recorrida en el cuadrante de la plataforma (**Figura 29**), ni respecto al tiempo que pasan nadando en este cuadrante (**Figura 30**). La velocidad de nado también se mantuvo sin diferencias entre grupos (**Figura 31**).

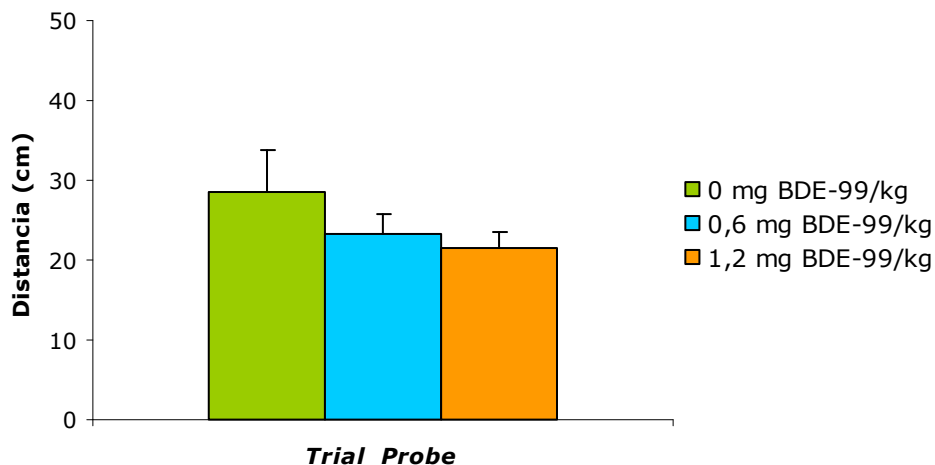


Figura 29. Distancia recorrida en el día del *trial probe* para encontrar la plataforma en la prueba del laberinto de agua. Los resultados se expresan como medias \pm DE. Estadística: ANOVA.

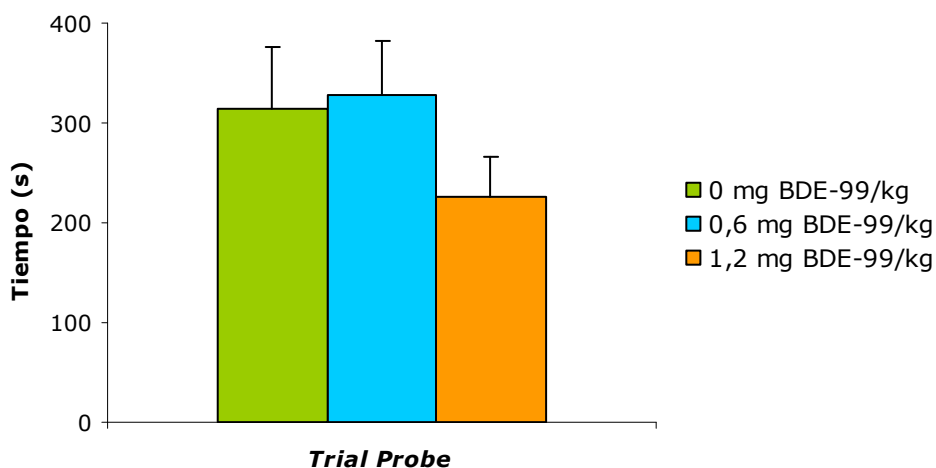


Figura 30. Tiempo de latencia en el cuadrante de la plataforma en el día del *trial probe*. Los resultados se expresan como medias \pm DE. Estadística: ANOVA.

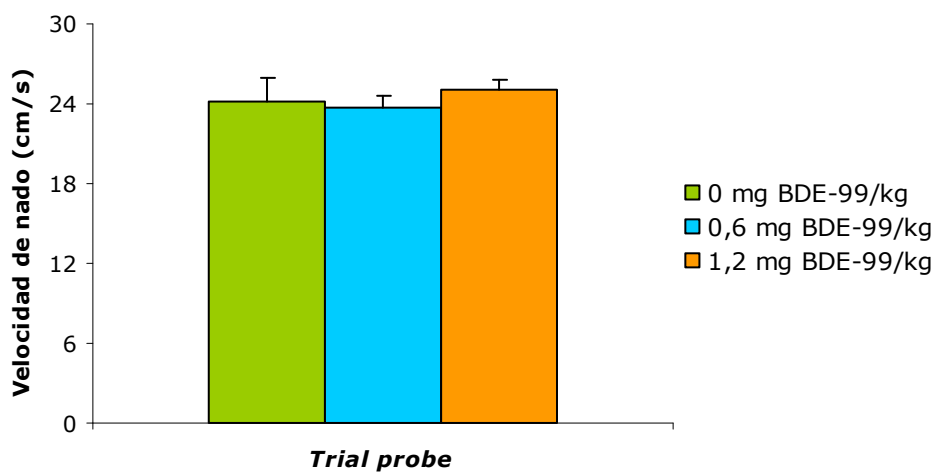


Figura 31. Velocidad de nado en el día del *trial Probe*. Los resultados se expresan como medias \pm DE. Estadística: ANOVA.

3. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A BDE-99 SOBRE PARÁMETROS SEMINALES

En este estudio, se valoró la movilidad, la morfología y la producción de esperma en ratas macho tras 45 días de la exposición a BDE-99.

El peso total de los testículos y epidídimos, la ratio del peso del testículo/peso corporal, así como el peso de los testículos y epidídimos izquierdo y derecho se muestran en la **Tabla 12**. No se observaron, para ninguno de los parámetros estudiados, diferencias significativas entre los animales del grupo control y los expuestos a BDE-99.

Tabla 12. Efectos de la administración de BDE-99 en el peso total del animal, peso de los testículos y peso de los epidídimos.

Dosis BDE-99 (mg/kg)	0	0.6	1.2
No. Animales	10	10	10
Peso del animal (g)¹	464.78±34.25	482.67±44.85	467.78±23.30
Peso del testículo izquierdo (g)²	1.78±0.10	1.86±0.09	1.76±0.24
Peso del testículo derecho (g)²	1.76±0.09	1.82±0.13	1.77±0.23
Peso total de los testículos (g)²	3.54±0.18	3.68±0.23	3.53±0.47
Peso de los testículos/Peso del animal (%)²	0.76±0.05	0.77±0.05	0.76±0.10
Peso del epidídimo izquierdo (g)¹	0.91±0.11	0.90±0.04	0.95±0.13
Peso del epidídimo derecho (g)²	1.03±0.15	0.92±0.098	0.96±0.12
Peso total de los epidídimos (g)²	1.94±0.22	1.81±0.11	1.91±0.23

Resultados expresados como medias±DE. Estadística: ¹ Kruskal-Wallis y test U de Mann-Whitney. ² ANOVA y test de Tukey.

En la **Tabla 13** se muestran los diferentes parámetros seminales analizados. La exposición a la dosis alta de BDE-99 redujo de forma significativa el número de espermatozoides por gramo de epidídimo. Este efecto se corrige al tener en cuenta el peso del epidídimo y del animal. Por otro lado, en testículo, el número de espermátidas disminuyó significativamente en función de la dosis. Esta significación se mantuvo, a diferencia del epidídimo, al tener en cuenta el peso del testículo y del animal.

En cuanto a la movilidad, la exposición a BDE-99 aumentó de forma significativa el porcentaje de espermatozoides inmóviles en ambos grupos de exposición. Este efecto se produjo como consecuencia de un descenso en el porcentaje de espermatozoides con movilidad débil. De la misma forma, el porcentaje de espermatozoides con movilidad alta disminuyó significativamente debido a un aumento en el porcentaje de espermatozoides con movilidad moderada.

Del mismo modo, se observó un incremento significativo en el porcentaje de espermatozoides con cabeza anormal en ambas dosis. Además, la dosis de 1.2 mg BDE-99/kg provocó un incremento de espermatozoides con doble cola y sin cola.

Tabla 13. Efectos de la administración de BDE-99 en parámetros seminales.

Dosis de BDE-99 (mg/kg)	0	0.6	1.2
No. Animales	10	10	10
Contaje de espermatozoides¹			
No. X 10 ⁶ /g epidídimo	41.52±3.14 ^a	40.12±3.44 ^a	34.68±5.23 ^b
No. X 10 ⁶ /epidídimo	39.45±10.03	36.51±3.37	33.12±5.02
No. X 10 ⁶ /epidídimo/g animal	0.085±0.022	0.075±0.006	0.070±0.001
Contaje de espermátidas¹			
No. X 10 ⁶ /g testículo	162.04±16.05 ^a	101.38±12.33 ^b	84.27±8.07 ^c
No. X 10 ⁶ /testículo	286.81±28.4 ^a	186.54±22.68 ^b	148.74±14.24 ^c
No. X 10 ⁶ /testículo/g animal	0.617±0.061 ^a	0.386±0.046 ^b	0.318±0.030 ^b
% Espermatozoides inmóviles²	26.28±6.93 ^a	36.29±6.83 ^b	39.40±4.52 ^b
% Espermatozoides móviles²	73.72±6.13 ^a	63.71±3.51 ^b	60.6±4.55 ^b
% Movilidad muy alta (++++)	ND	ND	ND
% Movilidad alta (++++)	33.05±5.29 ^a	28.29±5.01 ^{ab}	23.22±6.13 ^b
% Movilidad moderada (++)	28.50±4.57 ^a	34.87±4.22 ^a	44.56±6.24 ^b
% Movilidad débil (+)	38.45±3.26 ^a	36.84±2.38 ^a	32.22±2.27 ^b
% Espermatozoides morfología normal²	68.85±1.43	69.39±3.26	63.69±4.39
% Espermatozoides morfología anómala²	31.15±1.54	30.61±3.26	36.31±5.12
% Con cabeza anormal ²	54.61±2.72 ^a	62.37±1.85 ^b	63.90±5.42 ^b
% Con cabeza amorfa ²	28.85±3.81 ^a	19.39±2.19 ^b	13.96±2.63 ^c
% Con doble cola ²	16.2±2.60 ^a	17.94±3.88 ^{ab}	21.67±2.91 ^b
% Sin cola ¹	0.34±0.02 ^a	0.30±0.03 ^a	0.47±0.05 ^b

Resultados expresados como medias ± DE. Estadística: ¹ Kruskal-Wallis y test U de Mann-Whitney. ² ANOVA y test de Tukey. Distintos superíndices (a,b,c) en los valores de una misma fila, indican diferencias significativas ($p < 0.05$) entre grupos. ND: no detectado.

4. EVALUACIÓN DEL ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE ORINA

El análisis bioquímico de orina reveló un aumento significativo de los niveles de proteínas en ratas expuestas a la dosis alta de BDE-99 (1.2mg/kg) respecto al resto de grupos (**Figura 32**).

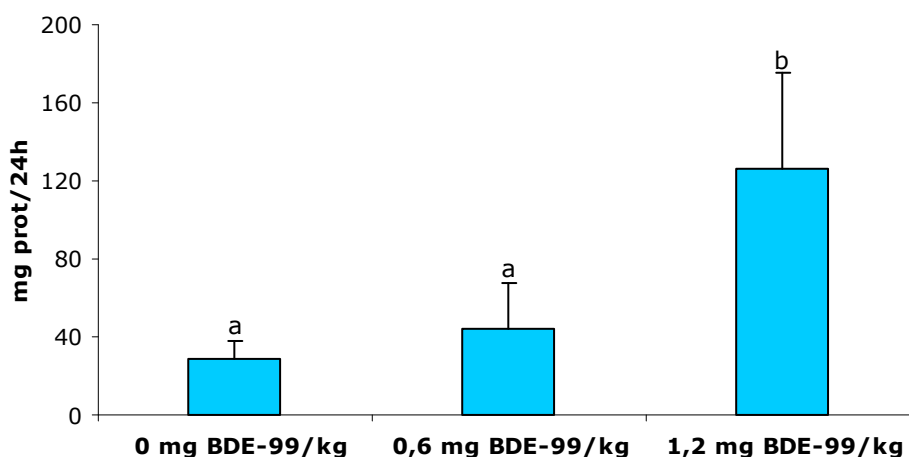


Figura 32. Niveles de proteínas en orina. Los resultados se expresan como medias \pm DE. Letras diferentes (a,b) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p<0.05$). Estadística: Kruskal-Wallis y test U de Mann-Whitney.

La actividad de la LDH (**Figura 33**) disminuyó significativamente en la orina de los animales en ambos grupos de exposición.

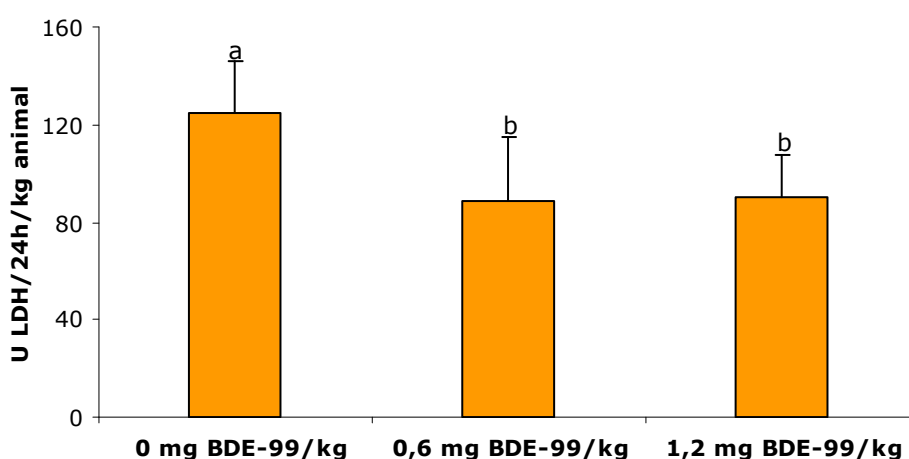


Figura 33. Actividad LDH en orina. Los resultados se expresan como medias \pm DE. Letras diferentes (a,b) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p<0.05$). Estadística: ANOVA y test de Tukey.

Por otra parte, las actividades de las enzimas GGT (**Figuras 34**) y NAG (**Figura 35**) disminuyeron tras la exposición a BDE-99 aunque sólo de forma significativa en la orina de ratas expuestas a la dosis alta.

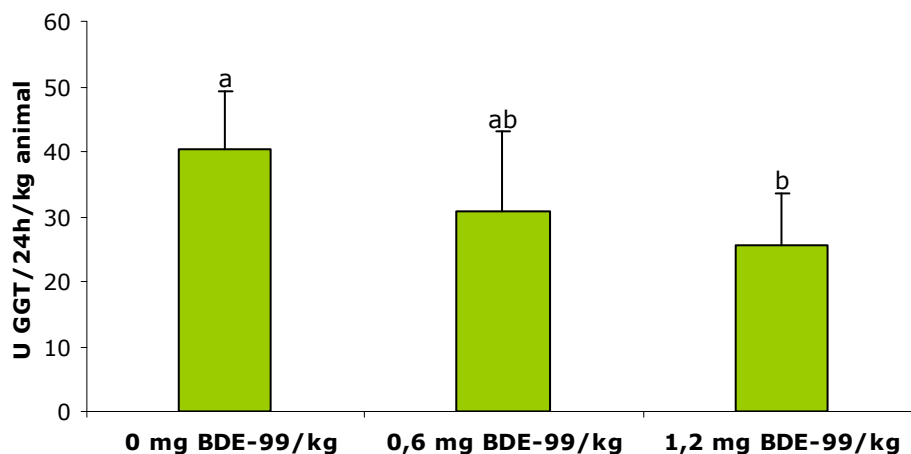


Figura 34. Actividad GGT en orina. Los resultados se expresan como medias±DE. Letras diferentes (a,b) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p<0.05$). Estadística: ANOVA y test de Tukey.

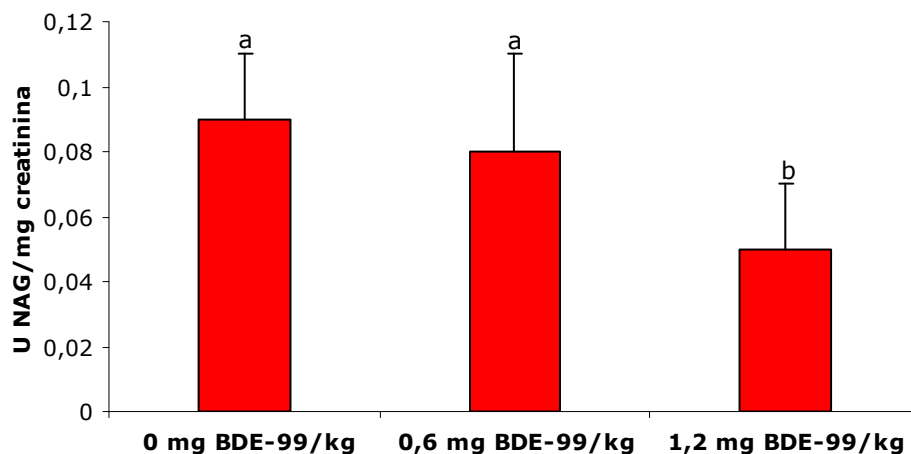


Figura 35. Actividad NAG en orina. Los resultados se expresan como medias±DE. Letras diferentes (a,b) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p<0.05$). Estadística: ANOVA y test de Tukey.

La exposición a BDE-99 produjo un incremento aunque no significativo del aclaramiento de creatinina (C_{cr}) a la dosis de 1.2 mg BDE-99/kg. En el resto de parámetros bioquímicos analizados (volumen de orina, creatinina,

urea, ácido úrico) no se encontraron diferencias significativas entre grupos (**Tabla 14**).

Tabla 14. Parámetros bioquímicos analizados en orina de ratas expuestas a BDE-99.

Dosis BDE-99 (mg/kg)	0	0.6	1.2
No. Animales	10	10	10
Volumen orina (ml/24h) ²	11.75±2.55	16.13±7.71	13.86±4.10
Creatinina (mg/24h) ²	16.44±1.43	15.45±1.81	15.22±2.48
Urea (mg/24h) ²	481.25±143.37	398.75±161.79	541.67±189.41
Ácido úrico (mg/24h) ²	4.28±1.32	5.66±0.89	5.08±1.51
C _{Cr} (ml/min) ¹	0.83±0.44	0.85±0.48	2.09±1.35

Resultados expresados como medias±DE. Estadística: ¹Kruskal-Wallis y ²ANOVA.

5. EVALUACIÓN DEL ANÁLISIS BIOQUÍMICO Y HORMONAL DE SANGRE

En el análisis bioquímico de sangre que evalúa los siguientes parámetros: creatinina, urea, ácido úrico, GOT, GPT, FA y LDH en plasma y eritrocitos.

El análisis de ácido úrico en sangre mostró un descenso significativo de los niveles del mismo en ratas expuestas a la dosis de 1.2mg/kg (**Figura 36**).

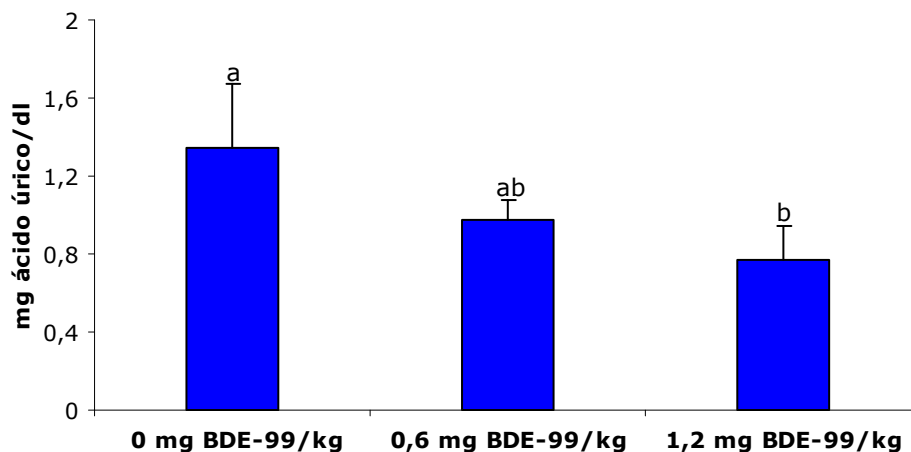


Figura 36. Niveles de ácido úrico en sangre. Los resultados se expresan como medias \pm DE. Letras diferentes (a,b) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p < 0.05$). Estadística: Kruskal-Wallis y test U de Mann-Whitney.

La exposición a BDE-99 aumentó la actividad de las enzimas GOT (**Tabla 15**) y GPT (**Figura 37**) aunque únicamente de forma significativa la actividad de esta última en ratas expuestas a la dosis alta.

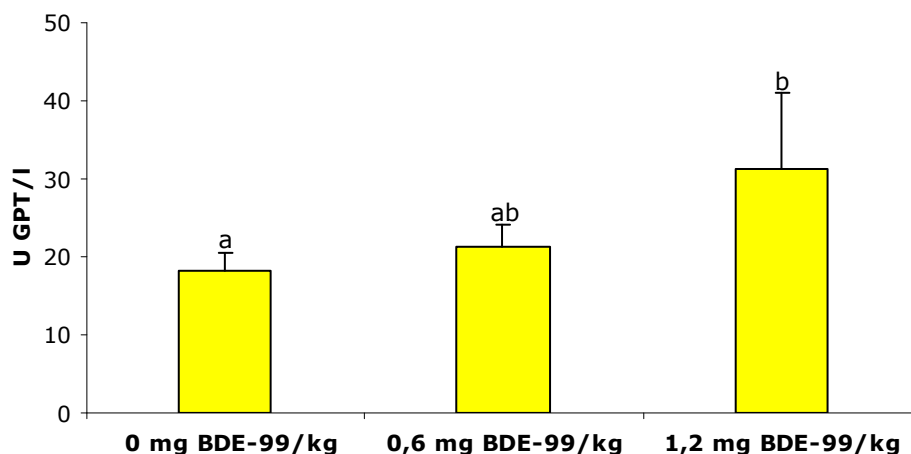


Figura 37. Actividad GPT en sangre. Los resultados se expresan como medias \pm DE. Letras diferentes (a,b) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p < 0.05$). Estadística: Kruskal-Wallis y test U de Mann-Whitney.

El resto de parámetros bioquímicos analizados en sangre se resumen en la **Tabla 15**. La exposición a BDE-99 aumentó aunque no de forma significativa los niveles de creatinina y urea, así como la actividad de las

enzimas LDH y FA en la sangre de ratas expuestas a la dosis alta. Sin embargo, no se observaron diferencias entre grupos en la actividad CE.

Tabla 15. Resultados del análisis bioquímico de sangre en ratas expuestas a BDE-99.

Dosis BDE-99 (mg/kg)	0	0.6	1.2
No. Animales	10	10	10
Creatinina (mg/dl)	0.48±0.07	0.48±0.07	0.50±0.11
Urea (mg/dl)	32.25±5.90	29.30±4.29	36.75±5.75
LDH_{plasma} (U/I)	161.94±61.13	140.07±43.09	156.21±67.97
LDH_{eritrocitos} (U/I)	1171.22±121.95	1170.78±174.17	1199.10±179.76
CE (U/I)	287.37±70.07	274.50±71.71	289.69±36.22
GOT (U/I)	89.83±14.67	90.25±22.37	97.30±14.08
FA (U/I)	125.90±41.82	123.00±50.54	143.10±51.53

Resultados expresados como medias±DE. Estadística: ANOVA.

En el análisis hormonal se evaluaron las siguientes hormonas: TSH, T3, T4, T4 libre, testosterona, progesterona y androstenediona.

Los niveles de testosterona disminuyeron significativamente en ambos grupos de exposición a BDE-99 (**Figura 38**). Del mismo modo, la exposición a BDE-99 indujo un descenso en los niveles de progesterona aunque sólo de forma significativa a la dosis de 1.2 mg/kg (**Figura 39**).

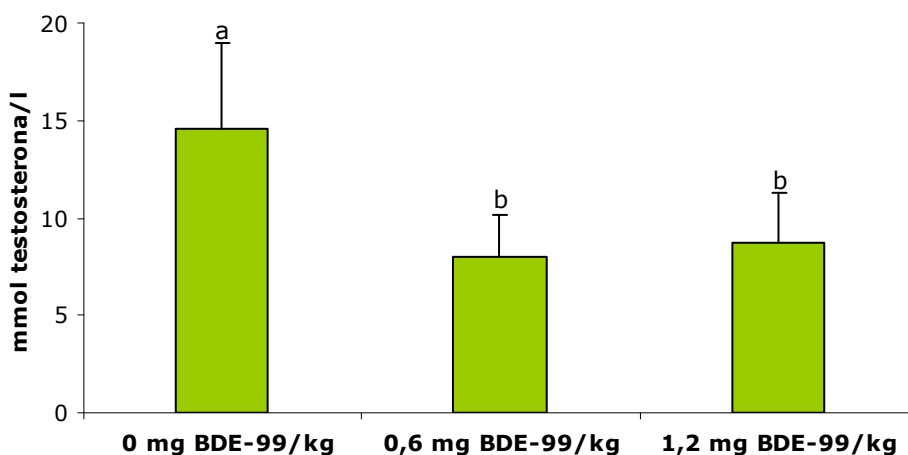


Figura 38. Niveles de testosterona en suero. Los resultados se expresan como medias \pm DE. Letras diferentes (a,b) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p < 0.05$). Estadística: ANOVA y test de Tukey.

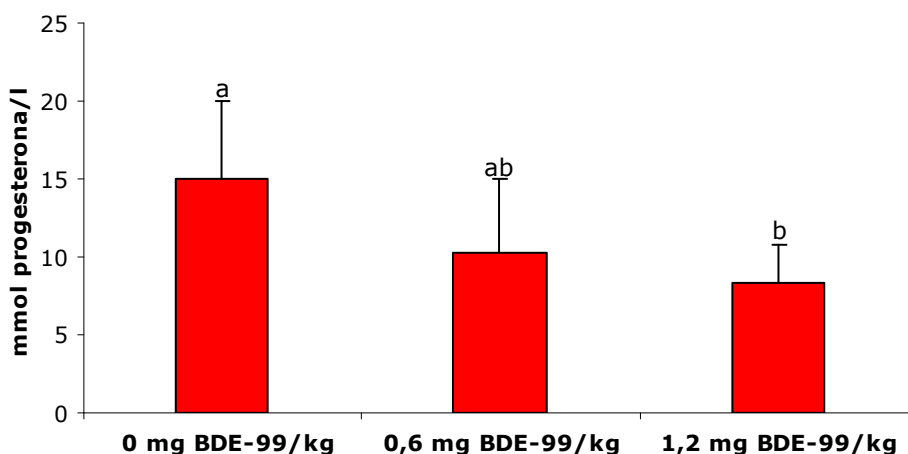


Figura 39. Niveles de progesterona en suero. Los resultados se expresan como medias \pm DE. Letras diferentes (a,b) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p < 0.05$). Estadística: ANOVA y test de Tukey.

El resto de niveles hormonales determinados se muestran en la **Tabla 16**. Los niveles de TSH tendieron a aumentar mientras que los niveles de T4 mostraron una tendencia a disminuir. No se observaron diferencias significativas entre el grupo control y los grupos expuestos a BDE-99.

Tabla 16. Niveles hormonales de ratas expuestas a BDE-99.

Dosis BDE-99 (mg/kg)	0	0.6	1.2
No. Animales	10	10	10
TSH (U/I)	1.44±0.58	1.98±0.61	2.07±0.65
T4 (nmol/l)	51.42±4.17	50.02±5.78	50.69±6.89
T3 (nmol/l)	1.32±0.12	1.21±0.08	1.32±0.09
T4 libre (pmol/l)	35.80±1.67	35.02±2.26	34.90±3.48
Androstenediona (ng/ml)	0.46±0.10	0.60±0.21	0.41±0.13

Resultados expresados como medias±DE. Estadística: ANOVA.

6. EVALUACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA Y DEL ESTADO OXIDATIVO

6.1 Orina

Los resultados de la peroxidación lipídica en muestras de orina medida como niveles de isoprostanos se muestran en la **Figura 40**. La exposición a BDE-99 aumentó aunque no de forma significativa los niveles de isoprostanos en los animales expuestos a ambas dosis respecto al grupo control.

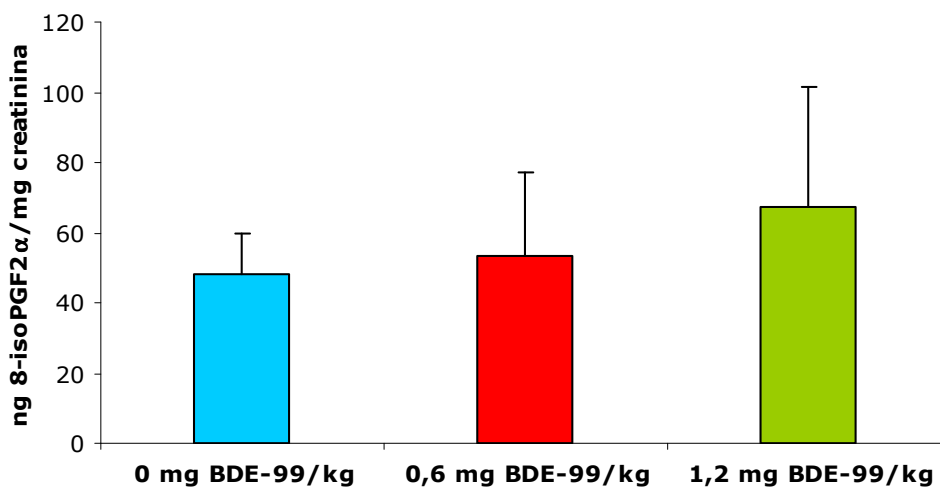


Figura 40. Niveles de isoprostanos en orina. Los resultados se expresan como medias±DE. Estadística: ANOVA.

6.2 Sangre

La exposición a BDE-99 produjo un aumento significativo de la actividad de la SOD a ambas dosis (**Figura 41**). Por el contrario, la actividad GR disminuyó de forma significativa tanto en la dosis de 0.6 mg BDE-99/kg como en la de 1.2 mg BDE-99/kg (**Figura 42**).

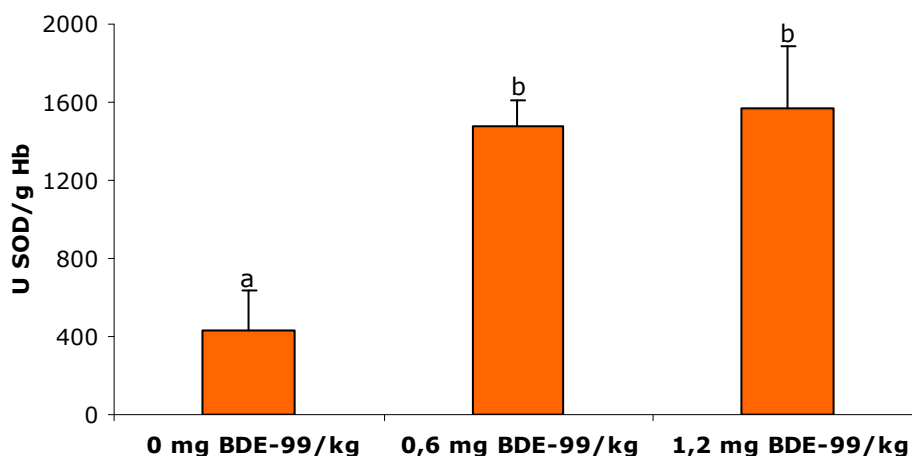


Figura 41. Actividad SOD en eritrocitos. Los resultados se expresan como medias±DE. Letras diferentes (a,b) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p<0.05$). Estadística: ANOVA y test de Tukey.

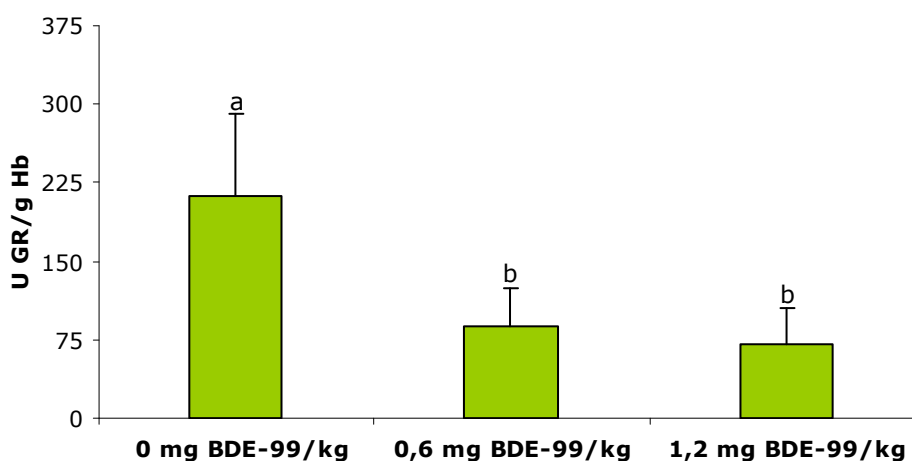


Figura 42. Actividad GR en eritrocitos. Los resultados se expresan como medias±DE. Letras diferentes (a,b) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p<0.05$). Estadística: Kruskal-Wallis y test U de Mann Whitney.

No se encontraron diferencias significativas en el resto de marcadores de estrés oxidativo analizados en sangre (**Tabla 17**). Sin embargo, el BDE-99 causó un descenso de los niveles de TBARS y GSSG tanto en los eritrocitos como en el plasma. Esta disminución se vio acompañada por una tendencia a disminuir en la actividad de la CAT en eritrocitos y un aumento de GSH en plasma.

Tabla 17. Marcadores de estrés oxidativo en sangre de ratas macho expuestas a BDE-99.

Dosis BDE-99 (mg/kg)	0	0.6	1.2
No. Animales	10	10	10
Eritrocitos			
CAT (mmol/min/g Hb) ²	34.52±14.91	32.30±4.78	29.60±4.94
GPx (U/g Hb) ²	106.77±28.12	132.87±26.35	130.40±29.88
TBARS (nmol/g Hb) ²	6.11±2.34	5.68±1.96	4.58±2.25
GSH (μmol/ g Hb) ²	0.32±0.23	0.27±0.16	0.36±0.24
GSSG (μmol/ g Hb) ²	2.36±0.62	2.30±0.66	2.00±0.40
GSSG/GSH ²	13.39±9.62	10.88±5.91	7.81±3.59
Plasma			
TBARS (μmol/ml) ²	26.37±6.15	24.94±9.96	19.39±7.78
GSH (nmol/ml) ²	17.96±5.60	17.75±7.86	20.76±4.41
GSSG (nmol/ml) ²	57.09±15.53	49.55±14.74	46.07±6.40
GSSG/GSH ¹	3.49±1.58	3.24±0.47	4.65±2.76

Resultados expresados como medias±DE. Estadística: ¹ Kruskal-Wallis y ² ANOVA.

6.3 Tejidos

A continuación se muestran los resultados de la peroxidación lipídica y estado oxidativo de testículo, epidídimo, hígado, riñón y partes de encéfalo.

Testículo

Los resultados de la peroxidación lipídica medida como TBARS se muestran en la **Figura 43**. La exposición a BDE-99 aumentó de forma significativa los niveles de TBARS en los animales expuestos a la dosis de 1.2 mg BDE-

99/kg respecto al resto de grupos. Por el contrario, la exposición a BDE-99 redujo de forma significativa la actividad de la CAT en los animales expuestos a la dosis de 1.2 mg BDE-99/kg (**Figura 44**).

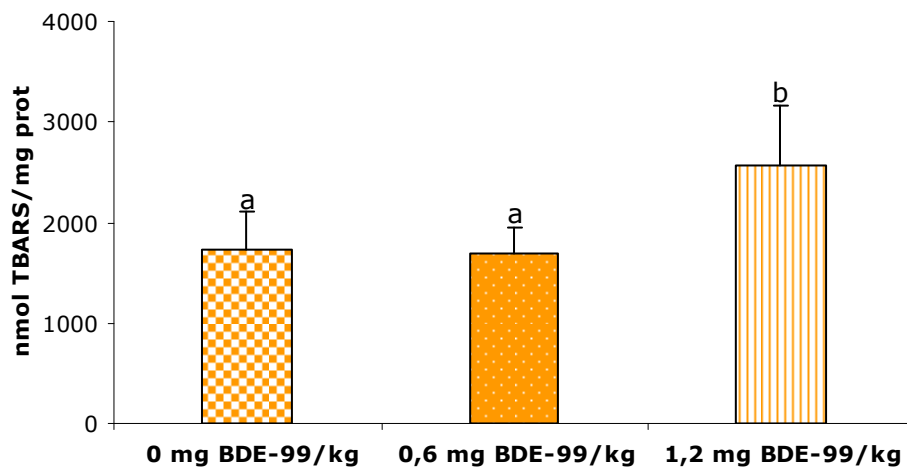


Figura 43. Niveles de TBARS en testículo. Los resultados se expresan como medias \pm DE. Letras diferentes (a,b) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p < 0.05$). Estadística: ANOVA y test de Tukey.

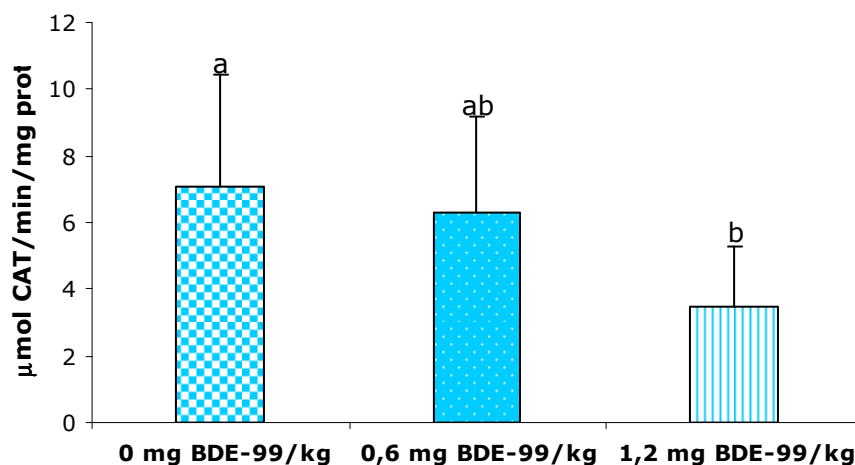


Figura 44. Actividad CAT en testículo. Los resultados se expresan como medias \pm DE. Letras diferentes (a,b) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p < 0.05$). Estadística: ANOVA y test de Tukey.

Los niveles de GSSG se incrementaron de forma significativa en ambos grupos de tratamiento (0.6 y 1.2 mg BDE-99/kg) respecto al grupo control (**Figura 45**). La ratio GSSG/GSH también se vio aumentada

significativamente en los animales tratados con la dosis alta de BDE-99 respecto al grupo control (**Figura 46**).

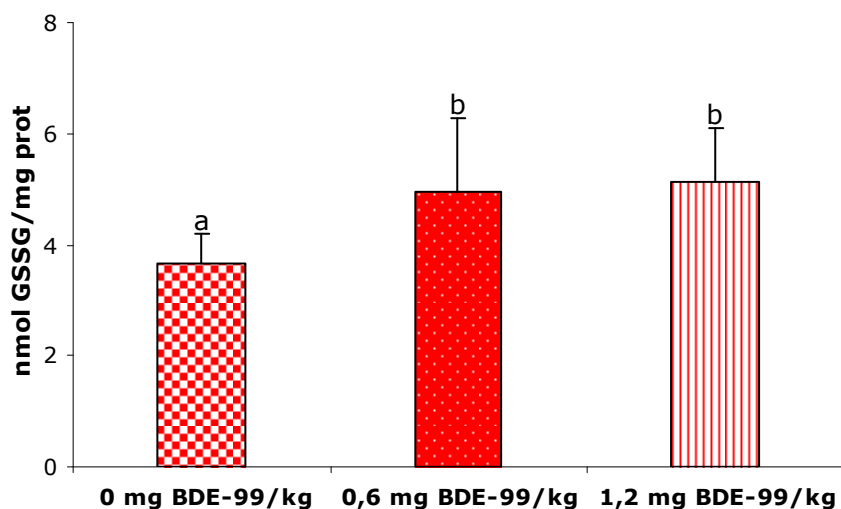


Figura 45. Niveles de GSSG en testículos. Los resultados se expresan como medias±DE. Letras diferentes (a,b) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p<0.05$). Estadística: ANOVA y test de Tukey.

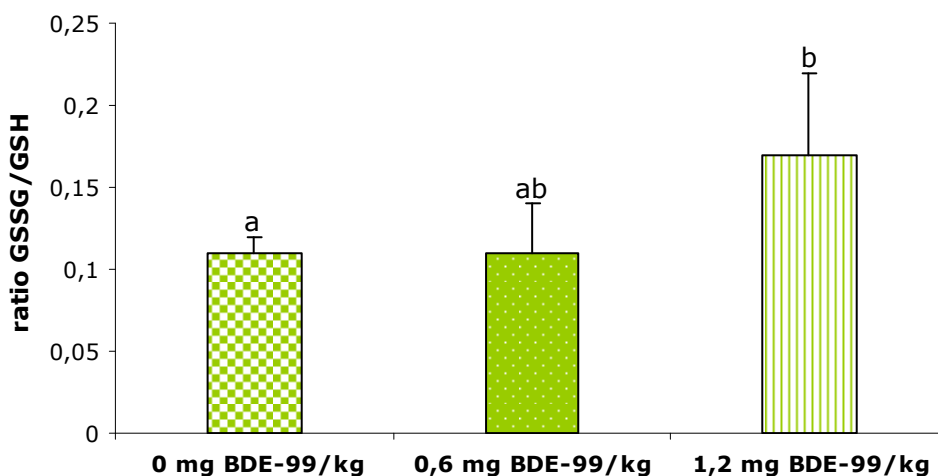


Figura 46. ratio GSSG/GSH en testículos. Los resultados se expresan como medias±DE. Letras diferentes (a,b) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p<0.05$). Estadística: Kruskal-Wallis y test U de Mann Whitney.

Las actividades de las enzimas SOD y GPx tendieron a aumentar y disminuir respectivamente a la dosis de 1.2 mg BDE-99/kg. Por otra parte, los niveles de GSH y las actividades enzimáticas GR y GST no se alteraron tras la exposición (**Tabla 18**).

Tabla 18. Efectos de la exposición a BDE-99 sobre marcadores de estrés oxidativo en testículo.

Dosis BDE-99 (mg/kg)	0	0.6	1.2
No. Animales	10	10	10
SOD (U/mg prot)¹	44.04±12.73	45.30±10.96	46.69±14.40
GR (mU/mg prot)²	36.55±8.14	40.19±12.71	32.03±5.13
GPx (mU/mg prot)²	161.72±41.04	162.04±44.02	134.69±20.86
GST (mU/mg prot)¹	0.81±0.23	1.00±0.22	0.89±0.18
GSH (nmol/mg prot)²	34.59±4.10	38.13±3.54	32.06±6.25

Resultados expresados como medias±DE. Estadística: ¹ Kruskal-Wallis y ² ANOVA.

Epidídimo

La exposición a BDE-99 aumentó significativamente los niveles de TBARS en los epidídimos de las ratas expuestas a la dosis alta (**Figura 47**). Las actividades de la SOD (**Figura 48**) y de la GR (**Figura 49**) disminuyeron de forma significativa en ambas dosis de tratamiento (0.6 y 1.2 mg/kg).

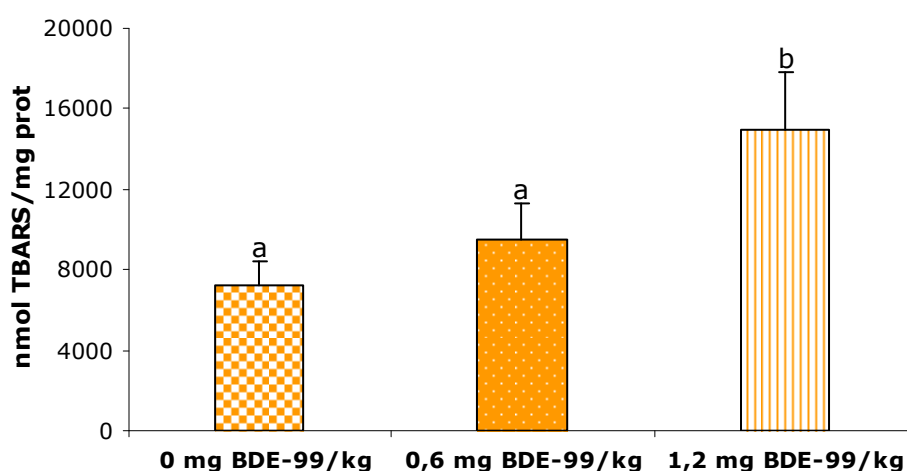


Figura 47. Niveles de TBARS en epidídimo. Los resultados se expresan como medias±DE. Letras diferentes (a,b) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p < 0.05$). Estadística: Kruskal-Wallis y test U de Mann Whitney.

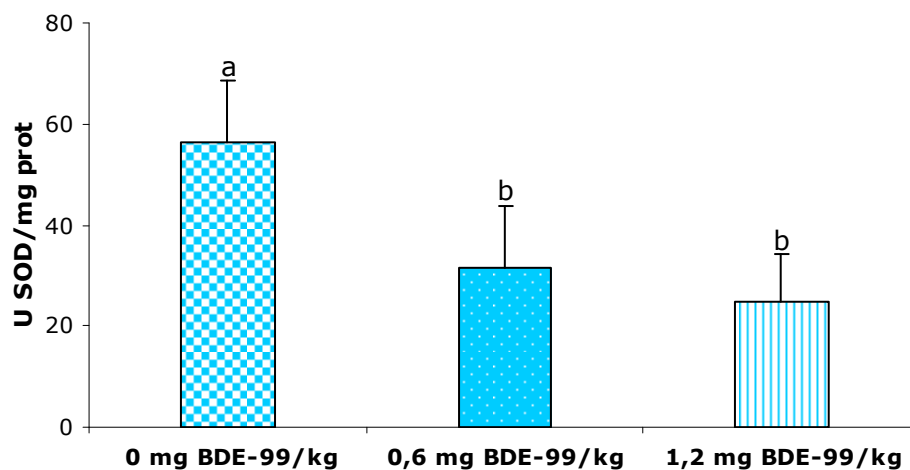


Figura 48. Actividad SOD en epidídimo. Los resultados se expresan como medias \pm DE. Letras diferentes (a,b) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p < 0.05$). Estadística: ANOVA y test de Tukey.

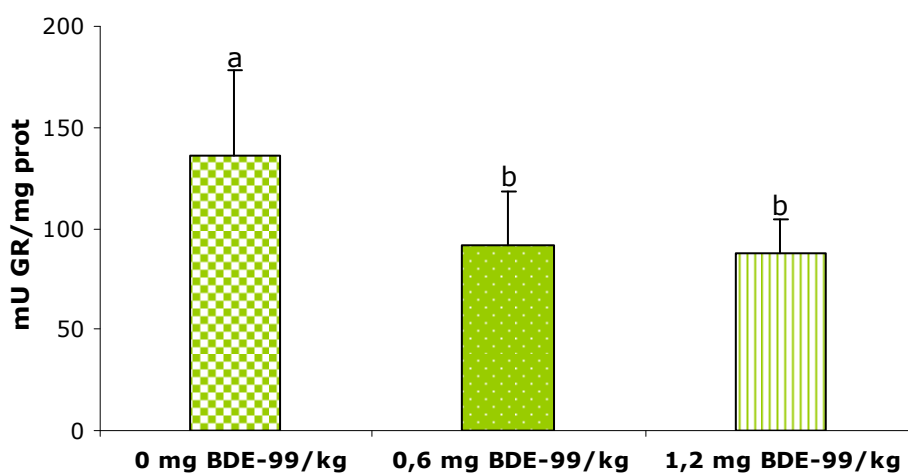


Figura 49. Actividad GR en epidídimo. Los resultados se expresan como medias \pm DE. Letras diferentes (a,b) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p < 0.05$). Estadística: ANOVA y test de Tukey.

Por otro lado, la actividad GST, los niveles de GSSG y GSH, así como la ratio GSSG/GSH muestran una tendencia a disminuir aunque no de forma significativa (**Tabla 19**). Las actividades de la CAT y la GPx no se vieron alteradas como consecuencia de la exposición a BDE-99.

Tabla 19. Efectos de la exposición a BDE-99 sobre marcadores de estrés oxidativo en epidídimo.

Dosis BDE-99 (mg/kg)	0	0.6	1.2
No. Animales	10	10	10
CAT ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}$)	4.94 \pm 2.48	4.04 \pm 1.78	4.15 \pm 1.14
GPx (mU/mg prot)	232.42 \pm 30.12	239.55 \pm 18.59	217.09 \pm 15.34
GST (mU/mg prot)	0.60 \pm 0.04	0.57 \pm 0.09	0.55 \pm 0.12
GSH (nmol/mg prot)	32.44 \pm 7.04	30.41 \pm 5.01	28.83 \pm 3.43
GSSG (nmol/mg prot)	4.81 \pm 1.62	4.26 \pm 1.81	4.04 \pm 1.45
GSSG/GSH	0.21 \pm 0.08	0.17 \pm 0.07	0.16 \pm 0.07

Resultados expresados como medias \pm DE. Estadística: ANOVA.

Hígado

La exposición a BDE-99 produjo un aumento significativo de la actividad de la SOD en ambos grupos de exposición (**Figura 50**). Sin embargo, la actividad de la CAT disminuyó aunque sólo de forma significativa en los animales expuestos a la dosis más alta (**Figura 51**).

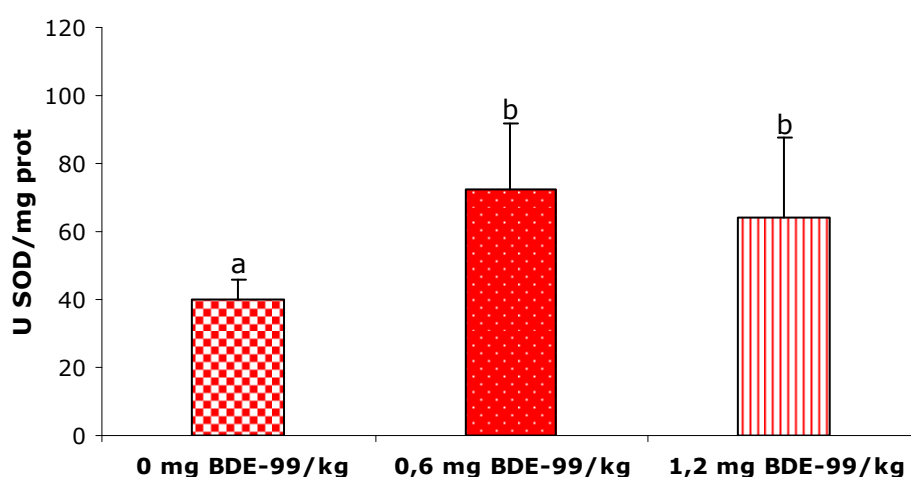


Figura 50. Actividad SOD en hígado. Los resultados se expresan como medias \pm DE. Letras diferentes (a,b) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p < 0.05$). Estadística: Kruskal-Wallis y test U de Mann Whitney.

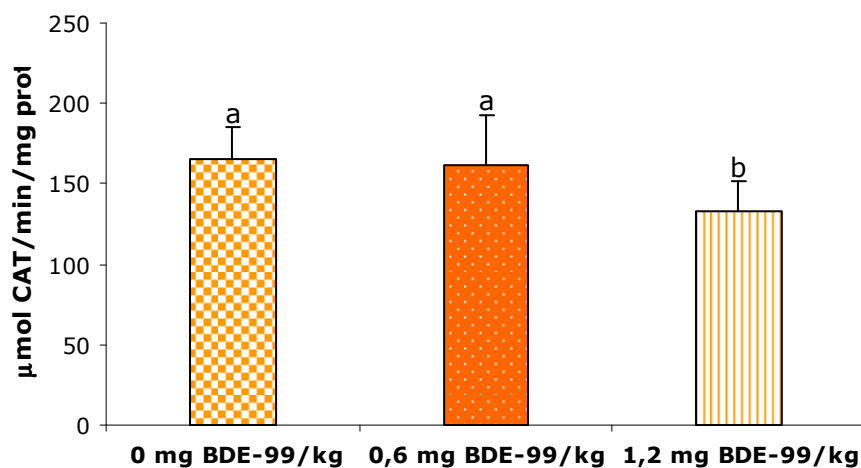


Figura 51. Actividad CAT en hígado. Los resultados se expresan como medias \pm DE. Letras diferentes (a,b) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p < 0.05$). Estadística: ANOVA y test de Tukey.

Los niveles de GSH disminuyeron significativamente en ambos grupos de tratamiento (**Figura 52**). Por el contrario, los niveles de GSSG (**Figuras 53**) así como la ratio GSSG/GSH (**Figuras 54**) aumentaron de forma significativa en los animales de ambos grupos.

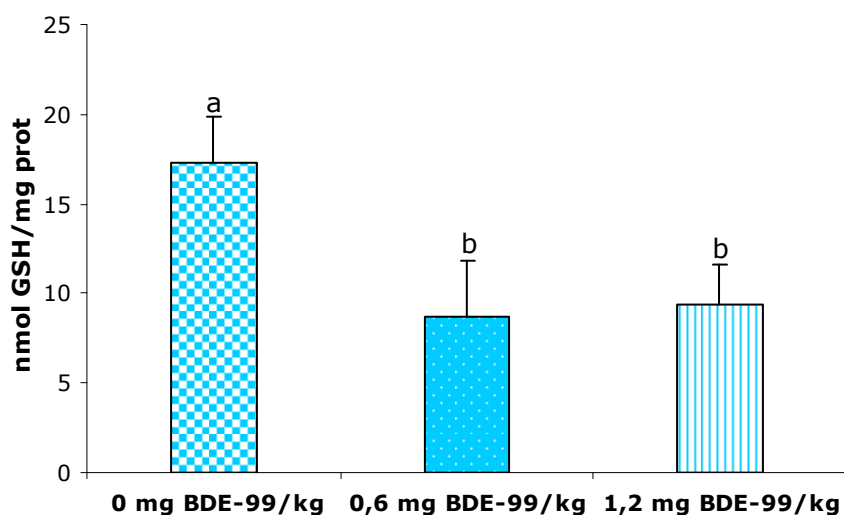


Figura 52. Niveles de GSH en hígado. Los resultados se expresan como medias \pm DE. Letras diferentes (a,b) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p < 0.05$). Estadística: ANOVA y test de Tukey.

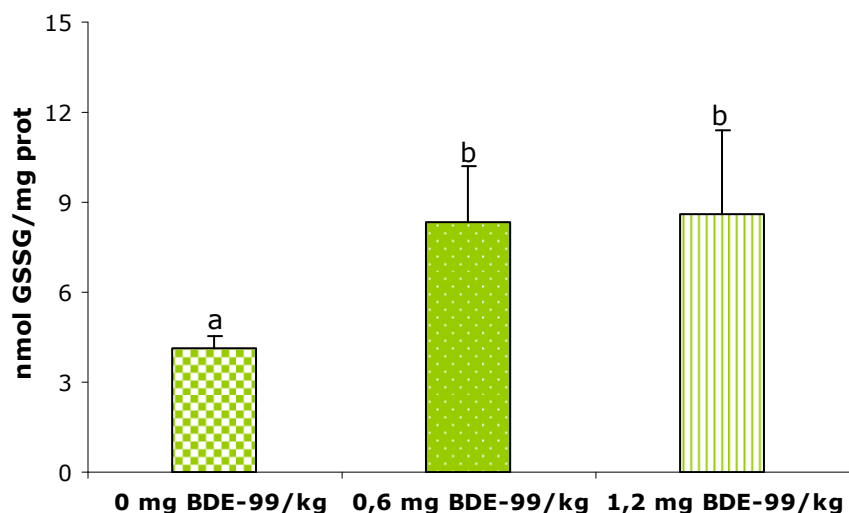


Figura 53. Niveles de GSSG en hígado. Los resultados se expresan como medias \pm DE. Letras diferentes (a,b) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p < 0.05$). Estadística: ANOVA y test de Tukey.

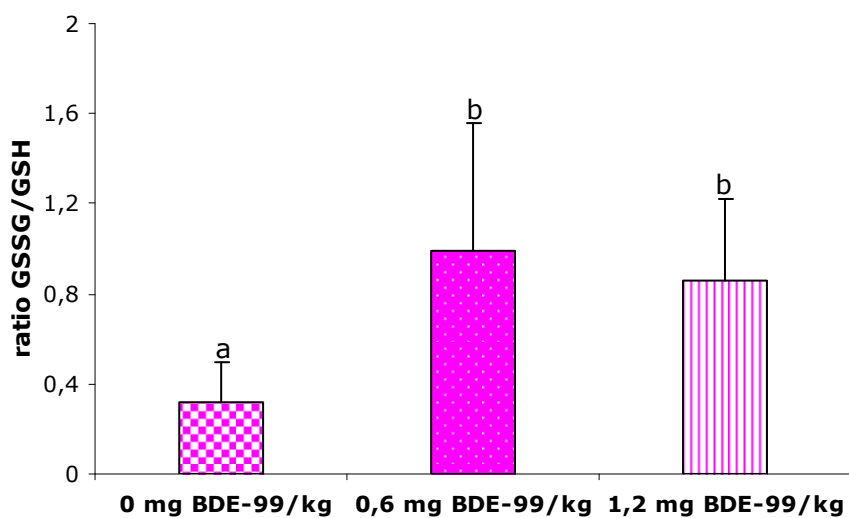


Figura 54. Ratio GSSG/GSH en. Los resultados se expresan como medias \pm DE. Letras diferentes (a,b) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p < 0.05$). Estadística: Kruskal-Wallis y test U de Mann-Whitney.

La actividad enzimática GST mostró una tendencia a disminuir, mientras que las actividades GR y GPx así como los niveles de TBARS no mostraron diferencias significativas por la exposición a BDE-99 (**Tabla 20**).

Tabla 20. Efectos de la exposición a BDE-99 sobre marcadores de estrés oxidativo en hígado.

Dosis BDE-99 (mg/kg)	0	0.6	1.2
No. Animales	10	10	10
GR (mU/mg prot)²	547.29±103.58	498.11±115.99	533.29±120.59
GPx (mU/mg prot)²	836.01±133.69	974.10±156.84	930.88±129.29
GST (mU/mg prot)¹	0.69±0.13	0.68±0.06	0.65±0.08
TBARS (nmol/mg prot)²	5153.84±1345.76	5383.76±1207.25	4901.83±1386.39

Resultados expresados como medias±DE. Estadística: ¹ Kruskal-Wallis y ² ANOVA.

Riñón

La actividad de la CAT disminuyó significativamente en los animales tratados con la dosis alta de BDE-99 respecto al grupo control (**Figura 55**). Por el contrario los niveles de GSSG así como la ratio GSSG/GSH aumentaron de forma significativa en el mismo grupo de animales, como consecuencia de la exposición a BDE-99 (**Figura 56 y 57**).

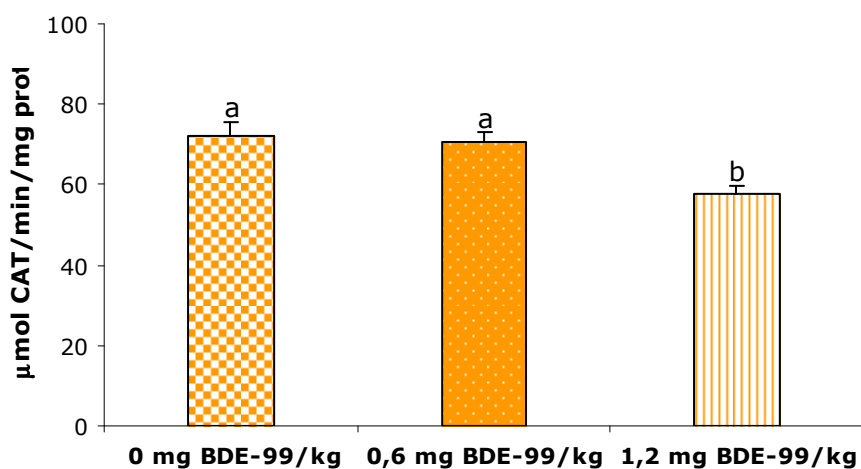


Figura 55. Actividad CAT en el riñón. Los resultados se expresan como medias±DE. Letras diferentes (a,b) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p < 0.05$). Estadística: ANOVA y test de Tukey.

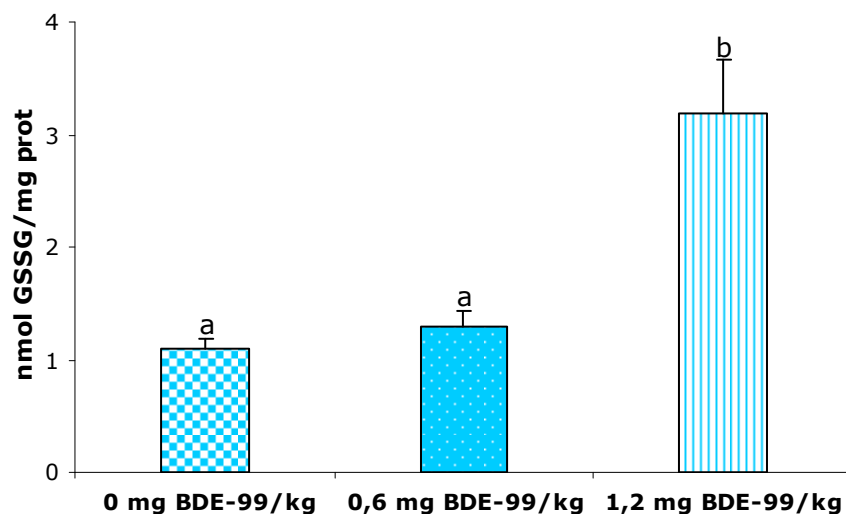


Figura 56. Niveles de GSSG en el riñón. Los resultados se expresan como medias \pm DE. Letras diferentes (a,b) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p < 0.05$). Estadística: Kruskal-Wallis y test U de Mann-Whitney.

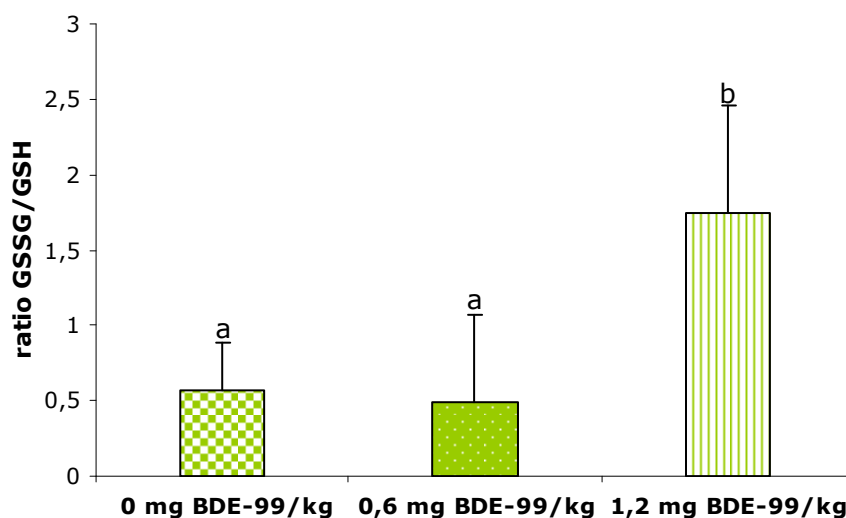


Figura 57. Ratio GSSG/GSH en el riñón. Los resultados se expresan como medias \pm DE. Letras diferentes (a,b) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p < 0.05$). Estadística: Kruskal-Wallis y test U de Mann-Whitney.

Las actividades de la SOD y la GR mostraron una tendencia a disminuir a causa de la exposición a BDE-99. Las actividades GPx y GST así como los niveles de TBARS y GSH no mostraron diferencias entre grupos (**Tabla 21**).

Tabla 21. Efectos de la exposición a BDE-99 sobre marcadores de estrés oxidativo en riñón.

Dosis BDE-99 (mg/kg)	0	0.6	1.2
No. Animales	10	10	10
SOD (U/mg prot)	26.37±5.06	23.02±5.14	23.96±7.38
GR (mU/mg prot)	162.53±15.23	151.05±12.71	152.38±30.24
GPx (mU/mg prot)	480.04±86.08	502.90±82.77	460.00±116.09
GST (mU/mg prot)	0.13±0.01	0.13±0.02	0.13±0.01
TBARS (nmol/mg prot)	4189.79±666.76	4570.93±986.24	3923.80±704.15
GSH (nmol/mg prot)	1.17±0.24	1.40±0.27	1.19±0.37

Resultados expresados como medias±DE. Estadística: ANOVA.

Encéfalo

La evaluación de la peroxidación lipídica y estado oxidativo de encéfalo, se realizó en tres fracciones correspondientes al córtex, cerebelo e hipocampo.

La exposición a BDE-99 produjo una disminución significativa de la actividad de la CAT en el **córtex** de los animales de ambos grupos de exposición a BDE-99 (**Figura 58**).

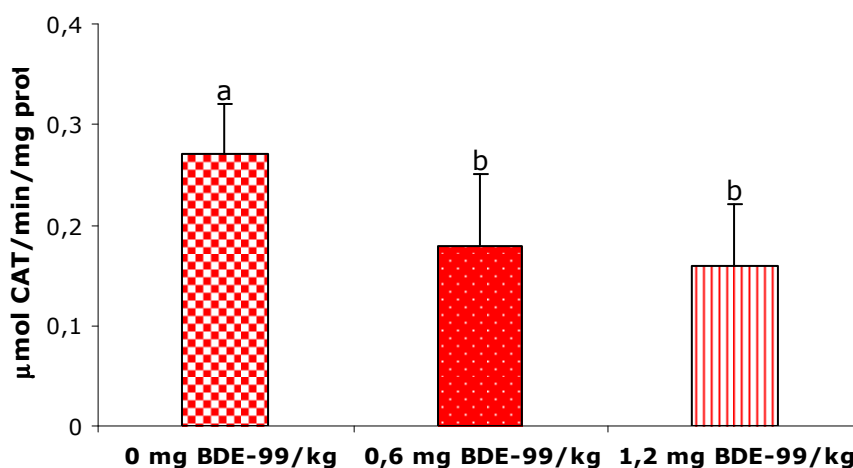


Figura 58. Actividad CAT en córtex. Los resultados se expresan como medias±DE. Letras diferentes (a,b) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p<0.05$). Estadística: ANOVA y test de Tukey.

Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en el resto de marcadores de estrés oxidativo determinados en córtex (**Tabla 22**).

Tabla 22. Efectos de la exposición a BDE-99 sobre marcadores de estrés oxidativo en córtex.

Dosis BDE-99 (mg/kg)	0	0.6	1.2
No. Animales	10	10	10
SOD (U/mg prot)²	28.42±8.04	27.55±5.97	34.12±5.70
GR (mU/mg prot)²	107.40±31.72	89.15±10.60	108.11±23.63
GPx (mU/mg prot)²	80.45±22.58	69.06±18.61	74.23±10.29
GST (mU/mg prot)¹	0.22±0.09	0.18±0.03	0.21±0.05
TBARS (nmol/mg prot)²	3812.54±1435.93	2966.11±1330.71	4622.66±1395.34
GSH (nmol/mg prot)²	26.17±12.25	19.28±7.10	30.26±10.94
GSSG (nmol/mg prot)¹	12.42±7.07	8.34±2.96	13.71±7.20
GSSG/GSH¹	0.39±0.09	0.46±0.11	0.33±0.08

Resultados expresados como medias±DE. Estadística: ¹ Kruskal-Wallis y ² ANOVA.

En **cerebelo**, se observó una disminución significativa de las actividades de la SOD y la GR en ratas tratadas con la dosis de 1.2 mg BDE-99/kg respecto al grupo control (**Figuras 59 y 60**). Sin embargo, la actividad de la CAT disminuyó significativamente en ambos grupos de exposición (**Figura 61**).

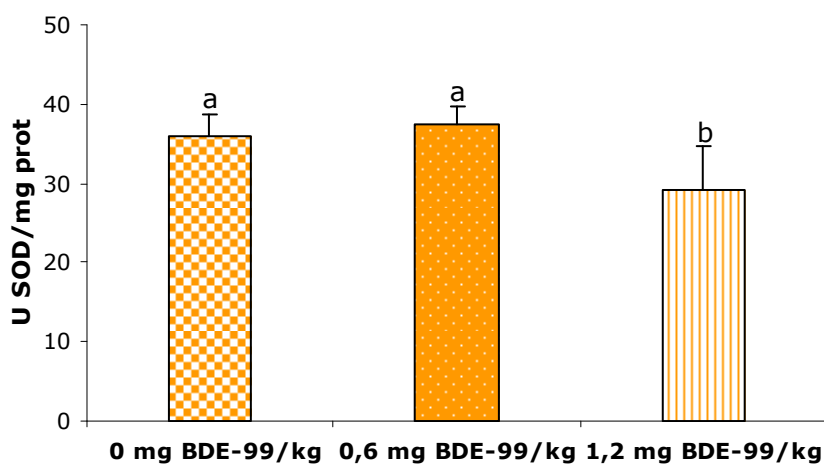


Figura 59. Actividad SOD en cerebelo. Los resultados se expresan como medias \pm DE. Letras diferentes (a,b) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p < 0.05$). Estadística: ANOVA y test de Tukey.

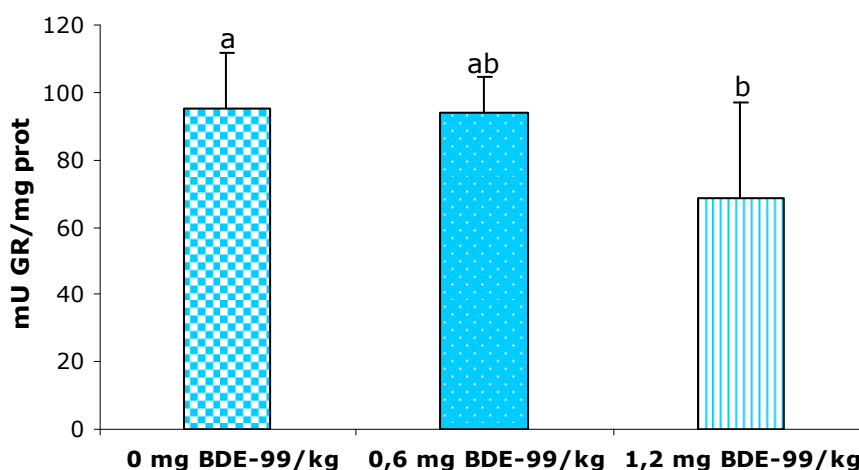


Figura 60. Actividad GR en cerebelo. Los resultados se expresan como medias \pm DE. Letras diferentes (a,b) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p < 0.05$). Estadística: Kruskal-Wallis y test U de Mann-Whitney.

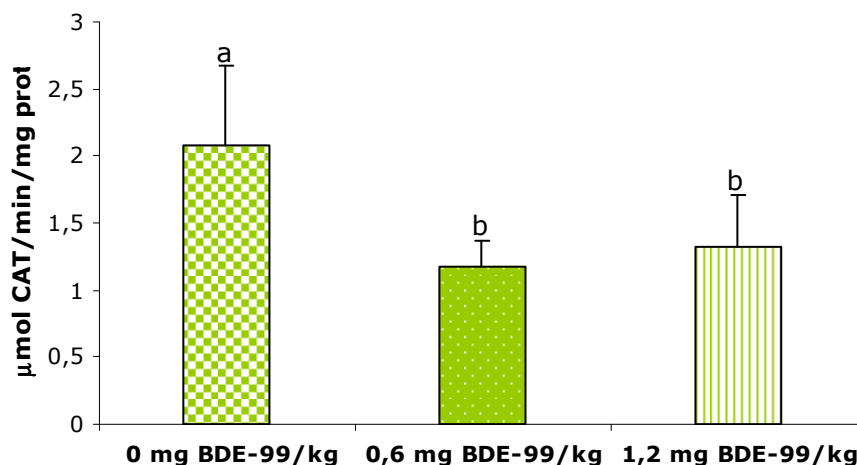


Figura 61. Actividad CAT en cerebelo. Los resultados se expresan como medias±DE. Letras diferentes (a,b) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ($p<0.05$). Estadística: Kruskal-Wallis y test U de Mann-Whitney.

Otros marcadores, como los niveles de TBARS y GSSG disminuyeron aunque no de forma significativa por la exposición a BDE-99. Las actividades de la GPx y la GST así como los niveles de GSH y la ratio GSSG/GSH no mostraron diferencias entre grupos (**Tabla 23**).

Tabla 23. Efectos de la exposición a BDE-99 sobre marcadores de estrés oxidativo en cerebelo.

Dosis BDE-99 (mg/kg)	0	0.6	1.2
No. Animales	10	10	10
GPx (mU/mg prot)²	81.33±19.42	67.21±11.26	70.43±11.62
GST (mU/mg prot)¹	0.14±0.03	0.18±0.08	0.13±0.02
TBARS (nmol/mg prot)²	3006.82±457.22	2621.87±698.92	2542.94±479.67
GSH (nmol/mg prot)²	14.14±5.14	17.93±5.09	15.87±4.98
GSSG (nmol/mg prot)²	8.69±2.88	8.12±2.53	8.01±3.90
GSSG/GSH¹	0.39±0.09	0.46±0.11	0.33±0.08

Resultados expresados como medias±DE. Estadística: ¹ Kruskal-Wallis y ² ANOVA.

En **hipocampo**, la exposición a BDE-99 no produjo diferencias significativas entre el grupo control y los grupos de exposición (**Tabla 24**). Sin embargo, algunos parámetros evaluados como la actividad de la CAT, la GR, GST y niveles de GSSG tienen una cierta tendencia a disminuir en la dosis más elevada de exposición.

Tabla 24. Efectos de la exposición a BDE-99 sobre marcadores de estrés oxidativo en hipocampo.

Dosis BDE-99 (mg/kg)	0	0.6	1.2
No. Animales	10	10	10
SOD (U/mg prot)²	21.70±2.87	24.80±3.23	22.35±3.31
CAT (µmol/min/mg prot)²	0.75±0.22	0.62±0.12	0.70±0.23
GR (mU/mg prot)²	107.36±17.13	106.59±36.99	100.30±12.33
GPx (mU/mg prot)¹	68.23±25.92	66.67±20.82	69.77±13.99
GST (mU/mg prot)²	0.25±0.07	0.28±0.09	0.16±0.07
TBARS (nmol/mg prot)²	1408.33±170.06	1372.39±221.31	1584.36±252.95
GSH (nmol/mg prot)²	30.36±11.30	32.26±7.66	29.28±3.09
GSSG (nmol/mg prot)²	10.44±2.81	11.12±2.14	9.19±2.19
GSSG/GSH²	0.30±0.09	0.36±0.10	0.33±0.04

Resultados expresados como medias±DE. Estadística:¹ Kruskal-Wallis y ² ANOVA.

7. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

En este trabajo se realizó un estudio histopatológico de testículo, epidídimo, hígado, riñón y de fracciones de encéfalo como córtex, cerebelo e hipocampo.

En la **Tabla 25** se presentan los resultados del estudio histopatológico de testículo y epidídimo. El examen del testículo mostró la presencia de una descamación intratubular prematura (DIP) leve en ratas expuestas a la dosis de 0.6 mg BDE-99/kg. Esta misma alteración se observó con mayor severidad en las muestras de los animales de la dosis alta. La DIP (que consiste en una migración de células implicadas en la espermatogénesis, aún no maduras, hacia la luz del tubo seminífero) se valoró según el grado de severidad en leve (+) y moderada (++).

En el epidídimo, no se observaron anomalías histopatológicas como consecuencia de la exposición a BDE-99.

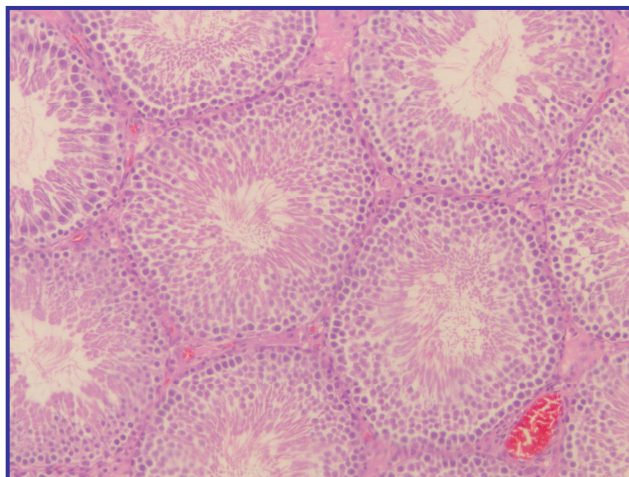
Tabla 25. Anormalidades histopatológicas en testículo y epidídimo de ratas expuestas a BDE-99.

Dosis de BDE-99 (mg/kg)	0	0.6	1.2
No. Animales	10	10	10
Testículo			
Descamación intratubular premature (DIP)	N	+	++
Epidídimo			
	N	N	N

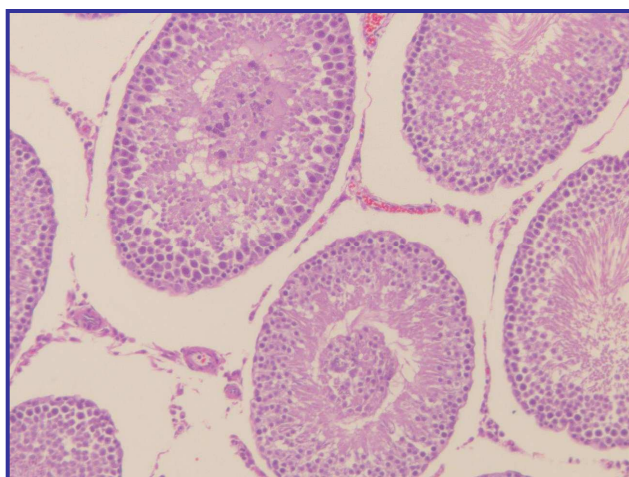
N, normal. Grado de DIP: leve (+), moderada (++)

En las imágenes de la **Figura 62** se muestran cortes histológicos representativos de testículos y epidídimos de cada uno de los grupos de estudio. En la imagen **A** se observa una correcta maduración celular en el testículo, mientras que en las imágenes **B** y **C** se observa claramente la DIP. No se observaron alteraciones en los cortes histológicos de epidídimo (imágenes **D**, **E** y **F**).

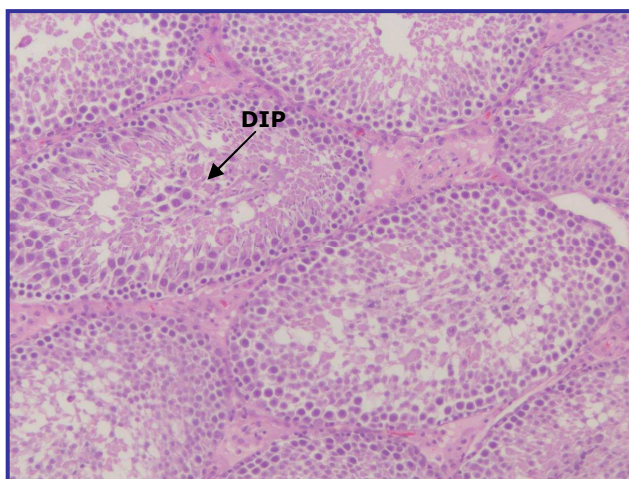
Figura 62. Imágenes representativas de los cortes histológicos de testículo (**A-C**) y epidídimo (**D-F**) de cada grupo de exposición.



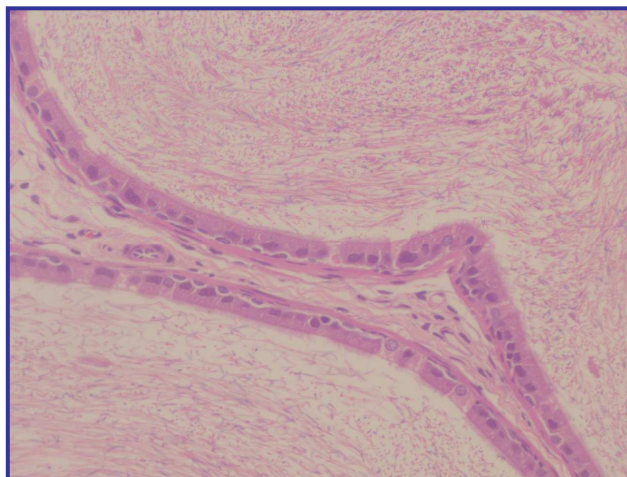
A: 0 mg BDE-99/kg (200x)



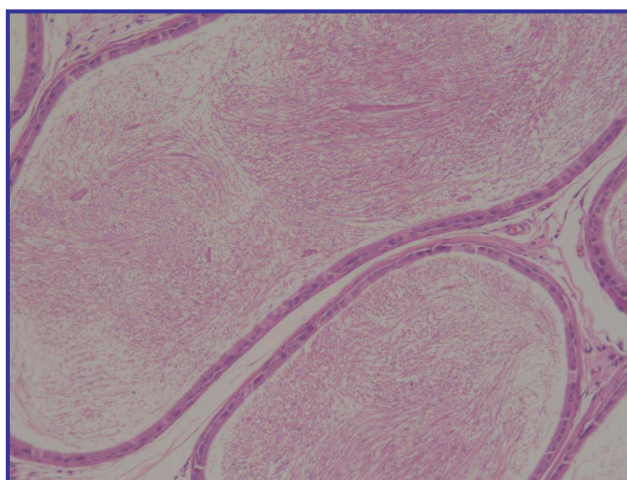
B: 0.6 mg BDE-99/kg (200x)



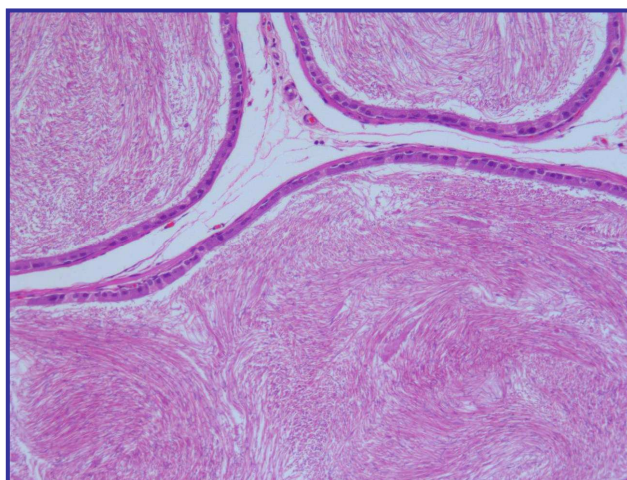
C: 1.2 mg BDE-99/kg (200x)



D: 0 mg BDE-99/kg (200x)



E: 0.6 mg BDE-99/kg (100x)



F: 1.2 mg BDE-99/kg (100x)

En el riñón, se ha estudiado la morfología de los glomérulos, túbulos y vasos. En el caso de los túbulos, el análisis mostró presencia de fagolisosomas en los cortes histológicos de las ratas expuestas a ambas dosis. La presencia de fagolisosomas se clasificó en: fagolisosomas en un tubo por campo de visión (+), de 1 a 3 tubos por campo de visión (++) y más de 3 tubos por campo de visión (+++). Las anomalías observadas se muestran en la **Tabla 26**. En el estudio hitopatológico del hígado, no se encontraron alteraciones morfológicas.

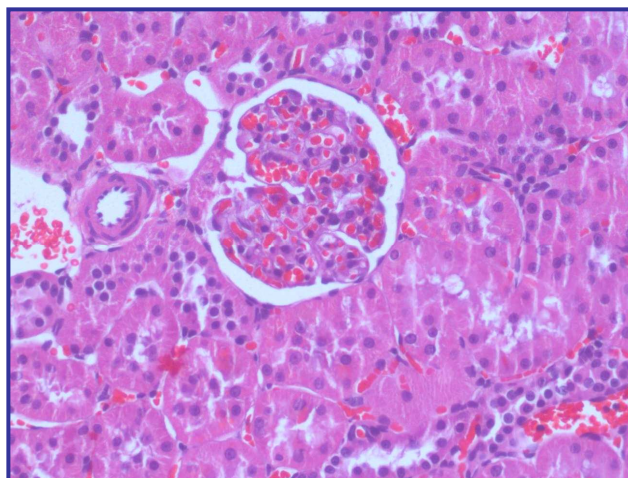
Tabla 26. Anormalidades histopatológicas en riñón e hígado de ratas expuestas a BDE-99.

Dosis BDE-99 (mg/kg)	0	0.6	1.2
No. Animales	10	10	10
Riñón			
Existencia de fagolisosomas	N	+	++
Hígado			
	N	N	N

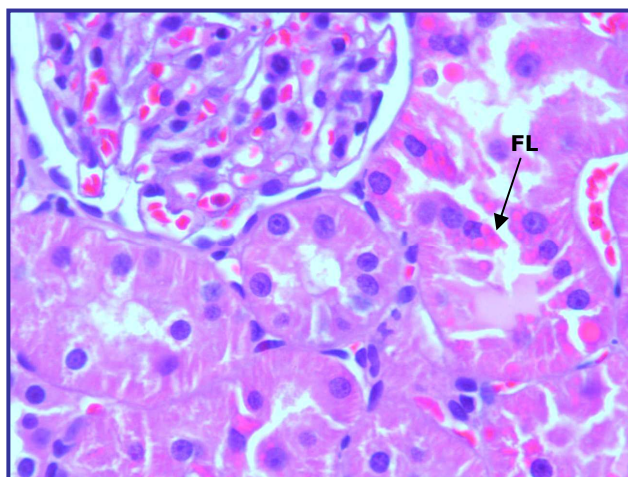
N, normal. Presencia de fagolisosomas: fagolisosomas en un tubo por campo de visión (+), de 1 a 3 tubos por campo de visión (++) y más de 3 tubos por campo de visión (+++).

En las imágenes de la **Figura 63** se muestran cortes histológicos representativos de hígado y riñón de cada uno de los grupos de estudio. En las imágenes de la muestra de riñón (**H** e **I**), se puede distinguir la presencia de fagolisosomas (**FL**) que presentan una coloración rosácea. En el caso del hígado, la morfología fue estrictamente normal (imágenes **J-L**).

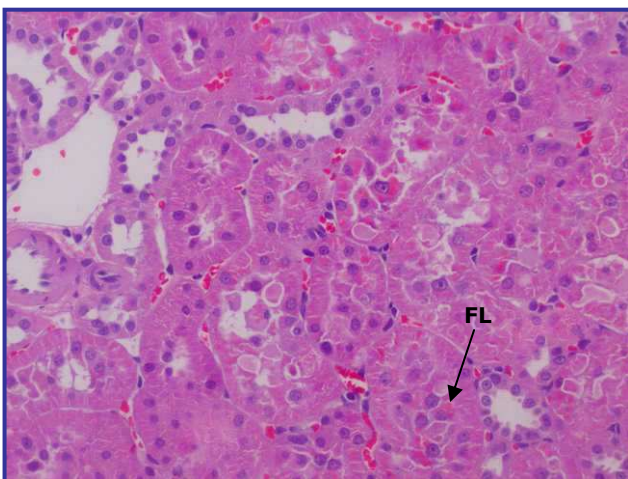
Figura 63. Imágenes representativas de los cortes histológicos de riñón (**G-I**) e hígado (**J-L**) de cada grupo de exposición.



G: 0 mg BDE-99/kg (200x)

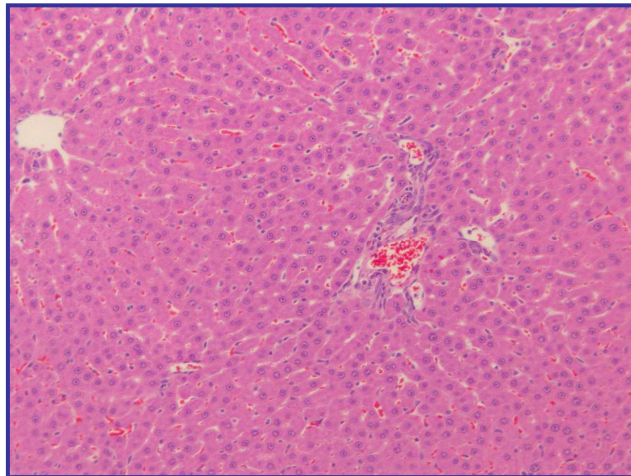


H: 0.6 mg BDE-99/kg (400x)

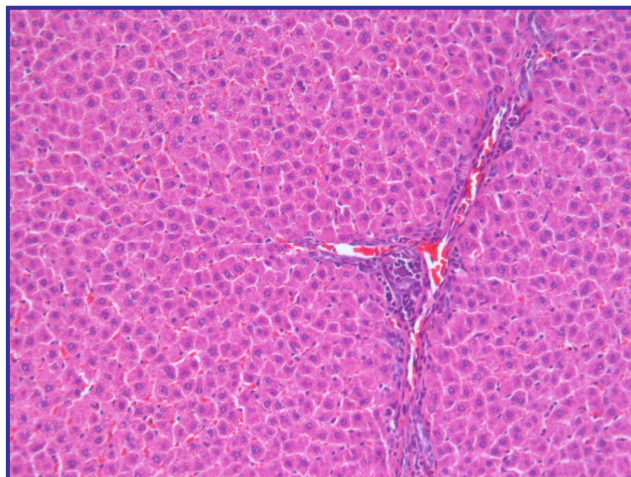


I: 1.2 mg BDE-99/kg (200x)

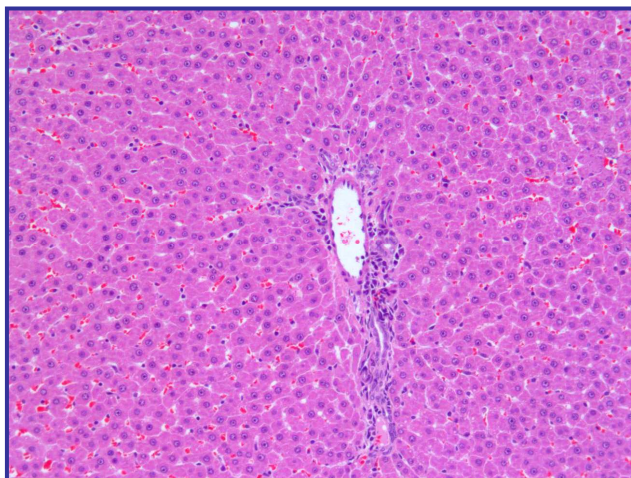
Resultados



J: 0 mg BDE-99/kg (100x)



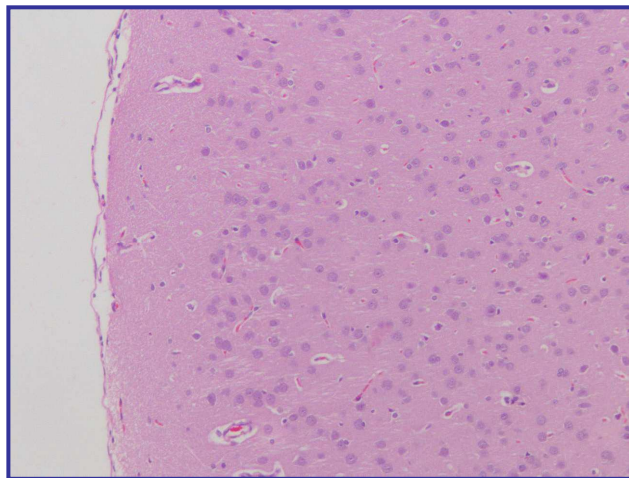
K: 0.6 mg BDE-99/kg (100x)



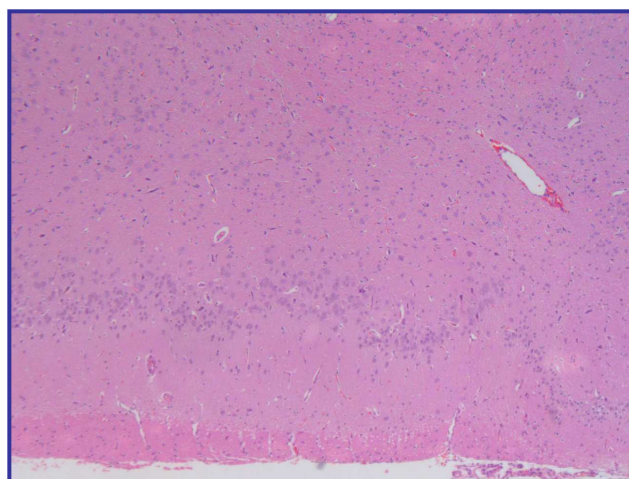
L: 1.2 mg BDE-99/kg (100x)

Por último, en la **Figura 64** se muestran los cortes histológicos de córtex (**M-O**), cerebelo (**P-R**) e hipocampo (**S-U**). No se encontraron diferencias significativas en la morfología de estos tejidos como consecuencia de la exposición a BDE-99.

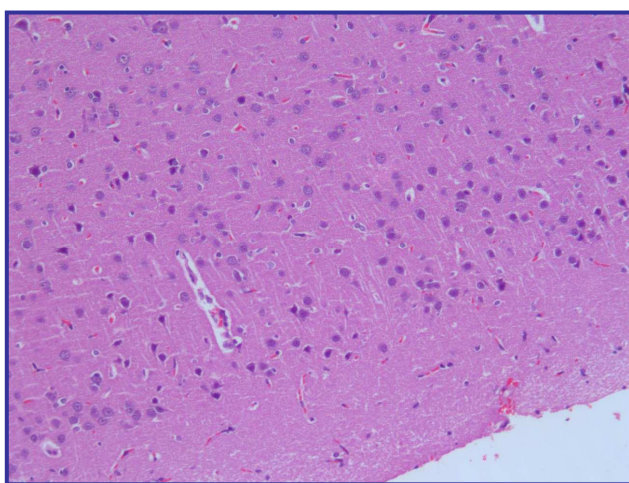
Figura 64. Imágenes representativas de los cortes histológicos de córtex (**M-O**), cerebelo (**P-R**) e hipocampo (**S-U**) de cada grupo de exposición.



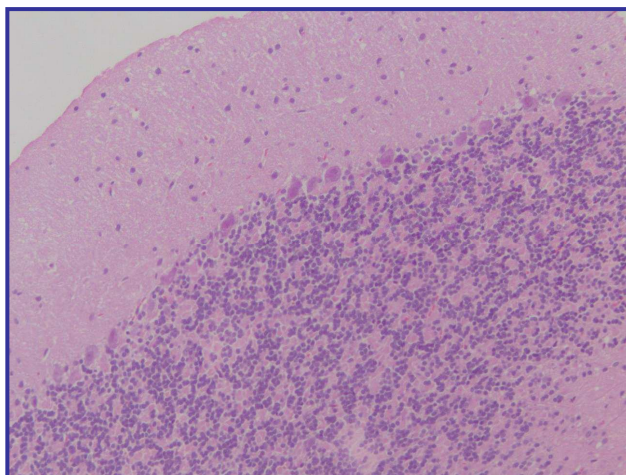
M: 0 mg BDE-99/kg (100x)



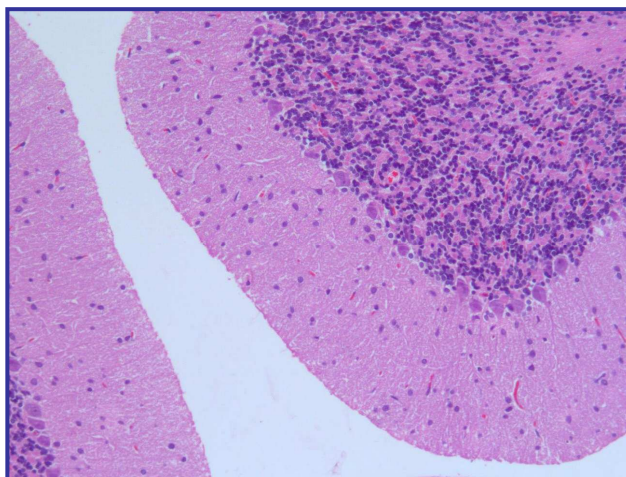
N: 0.6 mg BDE-99/kg (40x)



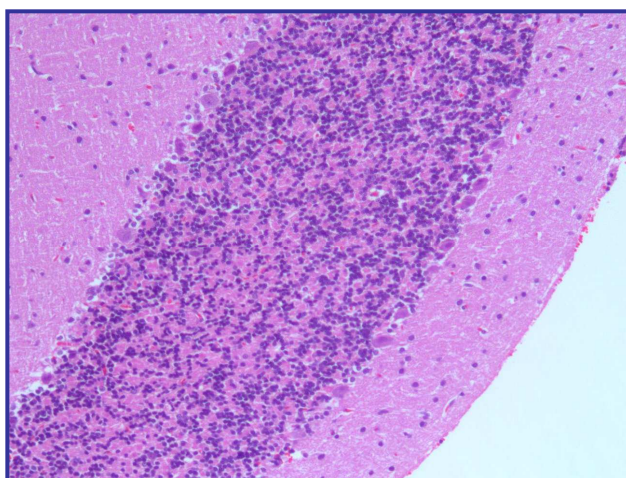
O: 1.2 mg BDE-99/kg (100x)



P: 0 mg BDE-99/kg (100x)

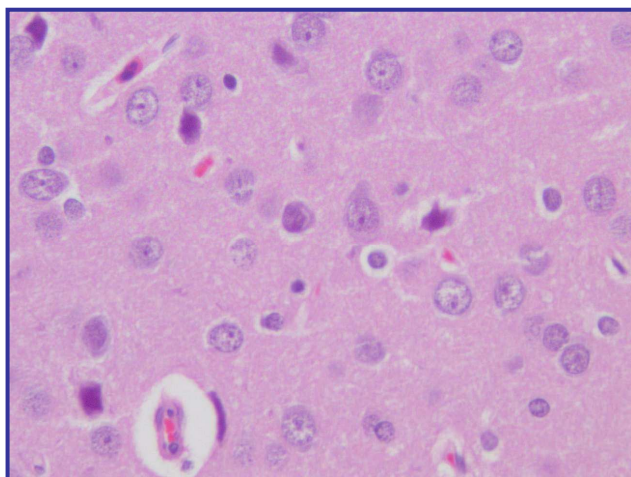


Q: 0.6 mg BDE-99/kg (100x)

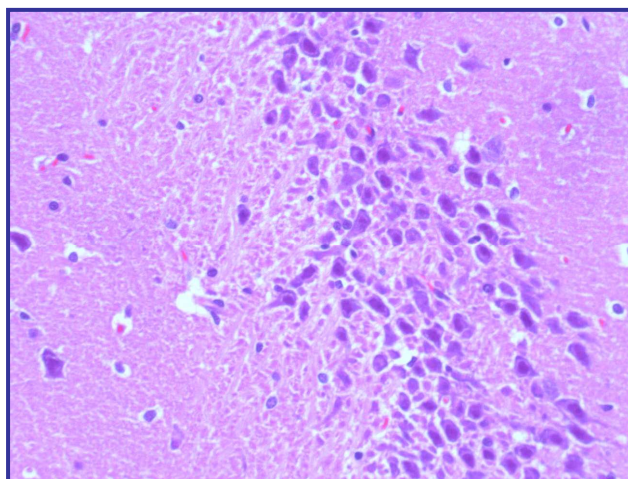


R: 1.2 mg BDE-99/kg (100x)

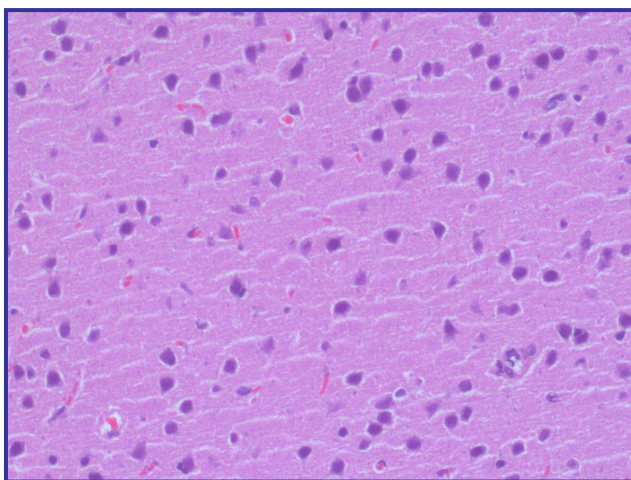
Resultados



S: 0 mg BDE-99/kg (400x)



T: 0.6 mg BDE-99/kg (200x)



U: 1.2 mg BDE-99/kg (200x)

DISCUSIÓN

1. BATERÍA DE OBSERVACIÓN FUNCIONAL

La FOB utilizada en este trabajo consiste en un conjunto de observaciones que permiten evaluar la respuesta del sistema nervioso central, los efectos neuromusculares y autónomos así como la reactividad sensorial y motora. En nuestro estudio, a diferencia de Fuentes y colaboradores (2007), las ratas mostraron dificultad en la tarea de la pantalla invertida al tercer día de la exposición a BDE-99. Esta diferencia podría ser debida, entre otras, a que en este último estudio trabajaron con PFOS, un compuesto persistente diferente. Tal y como sugieren diversos autores (Metz y Schwab, 2004; Baillieux y cols., 2008), esta alteración encontrada podría ser consecuencia de daño a nivel de la corteza así como del cerebelo ya que ambos órganos están relacionados con las funciones motoras y sensoriales.

2. EFECTOS NEUROCONDUCTUALES DERIVADOS DE LA EXPOSICIÓN A BDE-99

Numerosos estudios indican que las habilidades cognitivas pueden verse afectadas por la exposición a ciertos contaminantes ambientales persistentes, principalmente PCBs y PBDEs (Ahlbom y cols., 1995; Eriksson y cols., 1998).

Eriksson y colaboradores (2001, 2002) evaluaron la neurotoxicidad del BDE-99, en ratones expuestos el día postnatal 10, mediante una dosis única (0.8 o 12 mg/kg). Estos autores, al realizar el test del campo abierto hallaron alteraciones en el comportamiento espontáneo. Esta misma pauta de comportamiento fue observada por otros autores tras una exposición perinatal prolongada (Viberg y cols., 2002; Branchi y cols., 2002, 2005) (día gestacional 6-postnatal 21) así como por exposición mediante dosis única a BDE-99 en el día postnatal 10 (Viberg y cols., 2005). A diferencia de estos estudios realizados en crías, en nuestro trabajo, la exposición a BDE-99 mediante dosis única durante la edad adulta, no produjo alteraciones en la realización de este test.

El aprendizaje y la memoria espacial a través del test del laberinto de agua de Morris, fue evaluado en ratas por Eriksson y colaboradores (2001). En dicho estudio, la exposición neonatal a una dosis única de BDE-99 (12 mg/kg) alteró la habilidad cognitiva de los animales. Otro estudio más reciente realizado en ratas expuestas perinatalmente (día gestacional 6-postnatal 21) a una dosis de 2 mg BDE-99/kd/día, mostró un aumento del tiempo en encontrar la plataforma durante el segundo y tercer día del periodo de adquisición (Cheng y cols., 2009). Nuestros resultados han puesto de manifiesto que todos los animales mostraron la misma habilidad en la ejecución de este test.

A diferencia de los estudios mencionados anteriormente realizados en crías, en el presente estudio, la exposición durante la edad adulta a BDE-99 no produjo alteraciones cognitivas. Parece ser que la exposición a ciertos contaminantes durante las fases críticas del desarrollo produce efectos tóxicos más importantes que los ocasionados sobre el sistema nervioso ya maduro (Rice y Barone, 2000; Selevan y cols., 2000). El BDE-99 se comporta de modo similar a algunos congéneres de PCBs que producen problemas de aprendizaje en ratas jóvenes pero no en adultas (Piedrafita y cols., 2008). Estos animales presentaron alteraciones en la vía glutamato-NO-cGMP que modula algunos tipos de aprendizaje y memoria (Llansola y cols., 2007). Sin embargo, esta vía podría permanecer inalterada en adultos expuestos a BDE-99 al igual que se ha observado tras la exposición a PCBs (Piedrafita y cols., 2008). Estos resultados sugieren que la exposición a BDE-99 causa problemas en la función cognitiva cuando las ratas son jóvenes pero su efecto se reduce en adultos. El mecanismo que relaciona la madurez del individuo con los cambios vistos aún es desconocido.

3. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A BDE-99 SOBRE PARAMETROS SEMINALES

Numerosos estudios epidemiológicos indican que la calidad espermática está disminuyendo en el hombre (Cohn y cols., 2002; Slama y cols., 2004; Giudice, 2006). Alteraciones cromosómicas, consumo de tabaco, drogas y fármacos, así como la exposición a tóxicos medioambientales, pueden contribuir a una disminución de la calidad del espermatozoide en el hombre (Pasqualotto y cols., 2004; Stefankiewicz y cols., 2006). En este trabajo se ha evaluado por primera vez, en ratas macho adultas, los efectos de la exposición a BDE-99 sobre la reproducción masculina. Esta evaluación se realizó a los 45 días ya que corresponde a un ciclo completo de espermatogénesis en la rata (Clermont, 1972).

Una de las principales afectaciones encontradas en el análisis de parámetros seminales fue una disminución dependiente de la dosis del número de espermátidas en testículo. Esta misma afectación fue observada en ratas adultas expuestas prenatalmente a una dosis única de 0.06 o 0.3 mg BDE-99/kg (Kuriyama y cols., 2005).

En nuestro estudio, la disminución de espermátidas fue acompañada por una disminución del porcentaje de espermatozoides móviles. Estos espermatozoides presentaron a su vez alteraciones morfológicas, destacando un aumento en el porcentaje de espermatozoides con cabeza anormal, con doble cola y sin cola. Van der Ven y colaboradores (2008) encontraron alteraciones morfológicas en espermatozoides de ratas expuestas durante 28 días a la mezcla penta-BDE a una dosis de 200 mg/kg. Estudios sobre capacidad fecundadora de los espermatozoides, han descrito que la disminución de la movilidad y las alteraciones morfológicas de los espermatozoides alteran la fertilidad masculina (Chemes y Rawe, 2003; Aitken, 2006).

Se han descrito alteraciones en parámetros seminales tras la exposición a otros compuestos persistentes, distintos al BDE-99, como los PCBs, demostrando que el aparato reproductor masculino es especialmente

sensible a los tóxicos medioambientales (Fielden MR y cols., 2001; Hsu y cols., 2004; Kuriyama y Chahoud, 2004).

4. EVALUACIÓN DEL ANÁLISIS BIOQUÍMICO DE ORINA

Hasta el momento, no hay información disponible de los efectos tóxicos del BDE-99 sobre marcadores bioquímicos de la función renal.

En nuestro trabajo, el análisis de orina mostró un incremento de proteínas en las ratas expuestas a BDE-99. Este efecto, según Jarad y Miner (2009) es una manifestación temprana de lesión en el riñón. El filtrado glomerular contiene grandes cantidades de proteínas que son casi totalmente reabsorbida por los túbulos, de manera que no aparecen en la orina bajo condiciones normales. Un aumento en proteinuria indica patología renal (Zucchelli y cols., 1988). La causa puede ser debida a un aumento en la permeabilidad glomerular o a una insuficiencia de reabsorción tubular (Jeansson y cols., 2009).

La determinación de actividades enzimáticas en orina también facilita la detección de daño renal (Thomsen y cols., 1993; Bellés y cols., 2007; Naghibi y cols., 2007). A diferencia de estos estudios, la exposición a BDE-99 causó una disminución de las actividades enzimáticas de la LDH, la NAG y la GGT.

5. EVALUACIÓN DEL ANÁLISIS BIOQUÍMICO Y HORMONAL DE SANGRE

Los estudios de toxicidad hepática de los penta-BDEs se basan principalmente en un incremento del peso y el tamaño del hígado (ATSDR, 2004). En nuestro trabajo se analizó la actividad enzimática de las transaminasas GPT y GOT. Los niveles de ambas actividades enzimáticas incrementaron tras la exposición a BDE-99. Estas enzimas se encuentran predominantemente en el citoplasma de las células hepáticas y su

excreción hacia la sangre indica daño celular. Por otra parte, la actividad enzimática FA se vio aumentada aunque no de forma significativa. Estos resultados indican que la alteración de permeabilidad de las células hepáticas no fue grave o bien, que el periodo de 45 días post-exposición fue suficiente para restablecer los niveles iniciales (Amacher, 1998). Resultados similares fueron encontrados en estudios sobre toxicidad hepática tras la exposición de PCBs en ratas (Mayes y cols., 1998; Kutlu y cols., 2007).

Por otro lado, la exposición a BDE-99 disminuyó los niveles de ácido úrico en sangre. Éste, es un potente antioxidante no enzimático de gran importancia biológica que es capaz de quelar radicales libres, iones metálicos y actuar como una sustancia oxidable capaz de aceptar electrones (Becker, 1993; Glantzounis y cols., 2005; Kuzkaya y cols., 2005). Gracias a estas propiedades, protege a los eritrocitos del daño oxidativo (Ames y cols., 1981; Ford y cols., 2002). Los niveles disminuidos de ácido úrico encontrados en nuestro trabajo sugieren que la exposición a BDE-99 causa estrés oxidativo.

Debido a la falta de información sobre los efectos de los congéneres individuales, en este trabajo se realizó un análisis hormonal para evaluar la influencia del BDE-99 sobre la respuesta hormonal. Según datos bibliográficos, los PBDEs causan efectos sobre el desarrollo y la reproducción sugiriendo un comportamiento como disruptores endocrinos (Darnerud, 2008).

La exposición a BDE-99 en ratas gestantes causó alteraciones en los niveles de TSH, T3 y T4 (Hakk y cols., 2002; Kuriyama y cols., 2007). Por el contrario, nuestros resultados ponen de manifiesto que la exposición a BDE-99 en la edad adulta no produce diferencias en estos niveles. Estos resultados sugieren que los efectos del BDE-99 sobre las hormonas tiroideas se manifiestan cuando la exposición se realiza en la etapa crítica del desarrollo. Además, el período de 45 días después de la exposición podría haber sido tiempo suficiente para restablecer los niveles hormonales (Du y Zhan, 2008).

Aunque se ha confirmado la interacción del BDE-99 con la función tiroidea, falta información de los posibles efectos sobre otros sistemas hormonales. Estudios experimentales han puesto de manifiesto que la exposición durante la gestación a BDE-99 disminuye los niveles de hormonas sexuales circulantes (estradiol y testosterona) (Lilienthal y cols., 2006), sin embargo no hay información sobre los efectos sobre estas hormonas en la edad adulta. En nuestro trabajo, la exposición a BDE-99 produjo una disminución en los niveles de testosterona y de su precursora, la progesterona. Este mismo efecto fue observado por otros autores, tanto *in vivo* como *in vitro* tras la exposición a PCBs (Andric y cols., 2000; Murugesan y cols., 2008). Este hecho, sugiere que el BDE-99 podría inhibir la síntesis de andrógenos en el testículo o actuar como antagonista del receptor de andrógeno (Stoker y cols., 2005). Entre las funciones de la testosterona encontramos la estimulación de la espermatogénesis y la maduración de las espermátidas a espermatozoides (McLachlan y cols., 2002; Walker, 2009). Por ello, la disminución de los niveles de testosterona, hallada en nuestro estudio, podría ser la responsable de la disminución de espermátidas en testículo y las alteraciones morfológicas del esperma.

6. EVALUACIÓN DE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA Y DEL ESTADO OXIDATIVO

Hasta el momento se desconoce el mecanismo a través del cual el BDE-99 produce efectos tóxicos. En este estudio, evaluamos si el BDE-99 podría producir estrés oxidativo (EO) como posible mecanismo de afectación en diversos sistemas. Esta hipótesis se basa en estudios previos que han demostrado que la exposición a ciertos tóxicos ambientales, como los PCBs, causan trastornos a través del daño oxidativo (Lehmann y cols., 2007; Glauert y cols., 2008).

La capacidad antioxidante no enzimática de la sangre se encuentra fundamentalmente en los eritrocitos. Estas células son consideradas como neutralizadoras de los RLOs ya que no sólo aportan protección

antioxidante a ellas mismas sino también al resto de tejidos y órganos del cuerpo (Mendiratta y cols., 1998; Siems y cols., 2000). Existe una interacción sinérgica y cooperativa entre las enzimas del sistema antioxidante que protege al organismo contra el daño oxidativo (Chaudiere y Ferrari-Iliou, 1999). En nuestro trabajo, la exposición a BDE-99 aumentó significativamente la actividad de la SOD y disminuyó la actividad de la GR en eritrocitos. Ambas enzimas forman parte de la primera barrera ante la producción de EROs. El incremento de la actividad de la SOD es reflejo de una elevada formación de anión superóxido en la célula y de eliminación por esta enzima. Sin embargo, una intensa producción de RLOs por un tiempo prolongado agota la estimulación de la actividad de las enzimas, como en el caso de la GR.

Recientemente se han relacionado anomalías en el esperma con un exceso de EO atribuido a la exposición a ciertos contaminantes persistentes (Aly y cols., 2009). Éstos, generan RLOs y EROs y como consecuencia dañan la defensa antioxidante del tracto reproductivo masculino (Agarwal y cols., 2003; Aitken, 2006).

La exposición a BDE-99 incrementó los niveles de TBARS tanto en testículo como en epidídimo. Los espermatozoides son particularmente susceptibles a la peroxidación lipídica debido al alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) presentes en su membrana y necesarios para mantener una fluidez adecuada necesaria para la fertilización (Jones y cols., 1979; Linares y cols., 2006). Además, niveles altos de RLOs o EROs pueden aumentar la permeabilidad de la membrana plasmática del espermatozoide, causando diversas anomalías morfológicas, como las encontradas en nuestro estudio, alterando así la fertilidad masculina.

En lo referente al estado antioxidante de testículo, la exposición a BDE-99 produjo una disminución de la actividad de la CAT. Esta disminución refleja la inhabilidad del testículo para eliminar el H_2O_2 producido por el BDE-99 (Aly y cols., 2009). La disminución de la CAT fue acompañada de un incremento en los niveles de GSSG y como consecuencia del ratio

GSSG/GSH, conduciendo a la producción de radicales libres y facilitando la peroxidación lipídica (Nehru y Bansal, 1996).

En epidídimo, el BDE-99, produjo una disminución de las actividades SOD y GR. La SOD está implicada en la movilidad del espermatozoide, inhibiendo la peroxidación lipídica que causa pérdida de movilidad (Kobayashi y cols., 1991; Garrido y cols., 2004). El aumento de los niveles de TBARS producido por el BDE-99 es una consecuencia del descenso de la SOD. El epitelio del tracto genital, especialmente en el epidídimo, es rico en GR que funciona como antioxidante protegiendo de la oxidación a grupos sulfhidrilo y ácidos grasos insaturados de los espermatozoides durante el proceso de maduración y almacenaje (Kaneko y cols., 2002; Linares y cols., 2006).

La reducción de las actividades enzimáticas antioxidantes y el incremento de la peroxidación lipídica reflejan el daño oxidativo producido por el BDE-99 sobre el tracto genital masculino. Este hecho, también ha sido observado por otros autores tras la exposición a PCBs. Parece ser que el BDE-99 al igual que los PCBs produce toxicidad tanto en testículo como en epidídimo y que esta toxicidad está inducida por el EO producido (Senthil kumar y cols., 2004; Aly y cols., 2009).

El BDE-99 al igual que otros xenobióticos liposolubles, es transformado por el citocromo P450 en metabolitos que son oxidados posteriormente convirtiéndose en intermediarios reactivos inestables (Hakk y cols., 2002; Chen y cols., 2006). Estos intermediarios pueden atacar a los componentes hepáticos (ADN, lípidos y proteínas) produciendo finalmente lesiones en las células hepáticas. De los sistemas antioxidantes con los que cuenta el hígado, el más importante, por ser éste su principal sitio de síntesis, almacenamiento y exportación, es el glutatión. Su importancia radica en el papel central que desempeña en la protección contra el EO, como neutralizador de radicales libres y como cofactor de diferentes enzimas antioxidantes (Pompella y cols., 2003; Lin y Yang, 2007). El GSH ejerce, dentro del hepatocito, de neutralizador de los metabolitos oxidantes. La exposición a BDE-99 indujo una disminución de los niveles

hepáticos de GSH acompañada de un aumento de los niveles de GSSG y la ratio GSSG/GSH. Esta disminución de GSH, a causa del BDE-99, indica una activación de la detoxificación hepática.

Otras actividades enzimáticas hepáticas que se vieron alteradas son la SOD y la CAT que aumentaron y disminuyeron respectivamente. Estas actividades actúan de manera asociada disminuyendo la toxicidad que podría ser consecuencia de la formación de aniones superóxidos y radicales originados durante el metabolismo del BDE-99. Estos mismos resultados fueron obtenidos por Banudevi y colaboradores (2006) tras evaluar los efectos de los PCBs en el hígado. La alteración de estas enzimas acompañada del incremento del ratio GSSG/GSH, apoyan que el BDE-99 produce EO.

Al igual que en hígado, la exposición a BDE-99 redujo la actividad CAT y aumento el ratio GSSG/GSH en riñón. Hasta el momento no se han encontrado efectos renales adversos debido a la exposición a BDE-99. Sin embargo, autores que estudiaron este órgano tras la exposición a PCBs, encontraron también alteraciones en el estado oxidativo (Banudevi y cols., 2006; Lu y cols., 2009). En patologías como la insuficiencia renal aguda, el daño tubular está relacionado con un aumento del EO. Los RLOs producen la activación de la enzima xantinaoxidasa y de los neutrófilos, mecanismos importantes implicados en el daño renal (Edelstein y cols., 1997). Además, los RLOs participan en la formación de la proteinuria encontrada en el presente estudio (Sanaka y cols., 1997). Por otra parte, en el análisis de orina, los niveles de isoprostanos mostraron, como producto de peroxidación del ácido araquidónico de las membranas, una tendencia a aumentar. Un incremento de estos niveles sugiere también daño oxidativo renal (Morrow 1994).

El EO es un factor relacionado con procesos neurodegenerativos (Venkataraman y cols., 2007). El cerebro es especialmente sensible a la oxidación debido al alto contenido en PUFAs. Se han relacionado problemas en el aprendizaje con el EO producido por algunos compuestos. Éstos inducen la formación de EROs que alteran la neurotransmisión

dopaminérgica. El EO también altera la transmisión glutamatérgica y la función cognitiva (Fonnum y cols., 2006).

Los estudios realizados hasta el momento hablan de los efectos críticos del BDE-99 sobre el neurocomportamiento pero el mecanismo a través del cual induce alteraciones motoras y cognitivas se desconoce (Eriksson y cols., 2001; Kuriyama y cols., 2005). Además estos estudios se centran en ratas expuestas durante la gestación. Algunos trabajos realizados *in vitro* sugieren neurotoxicidad a través de daño oxidativo pero no de congéneres aislados sino de mezclas (Giordano y cols., 2008).

En nuestro estudio, la exposición a BDE-99 produjo alteraciones en marcadores de EO en diferentes partes del encéfalo. En el córtex la actividad de la CAT disminuyó a causa del BDE-99. En cerebelo, las actividades de la CAT, la SOD y la GR disminuyeron. Este descenso en las actividades enzimáticas de las diferentes regiones del encéfalo también se ha observado tras la exposición a PCBs en rata (Lee y Opanashuk, 2004; Venkataraman y cols., 2007).

Tanto la corteza como el cerebelo se encargan de la integración funciones motoras y sensoriales (Baillieux y cols., 2008). Según nuestros resultados, el cerebelo es la parte más susceptible al EO tras la exposición a BDE-99. Dado que en nuestro trabajo las ratas expuestas a BDE-99 mostraron dificultad en la tarea de la pantalla invertida, podría haber relación entre el EO encontrado en cerebelo y la incapacidad para ejecutar esta tarea. A diferencia de otros estudios en los que se observaron alteraciones en los tests de conducta en crías (Eriksson y cols., 1998; Branchi y cols., 2002), cabe destacar que las ratas del presente estudio eran adultas y no mostraron alteraciones en el resto de tests de conducta.

En cuanto al hipocampo, no se encontraron alteraciones de marcadores de EO. Sin embargo Cheng y colaboradores (2009), que evaluaron el estado oxidativo en crías tras la exposición a BDE-99, observaron variaciones en marcadores de EO en esta zona del cerebro.

7. ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

Hasta el momento no hay alteraciones histopatológicas descritas por la acción del BDE-99 sobre el tracto reproductor masculino. Sin embargo, en nuestro trabajo el examen histopatológico de testículo reveló una descamación intratubular prematura (DIP) en ratas expuestas a BDE-99. Estos resultados corroboran los obtenidos por Alonso y colaboradores (2009). En ambos casos, una DIP, si es lo bastante pronunciada, podría comportar una disminución de los espermatozoides así como una alteración en su morfología. Del mismo modo, se han relacionado alteraciones en el epitelio de los túbulos seminíferos con la exposición a ciertos PCBs (Alston y cols., 2003).

Los estudios que evalúan los efectos tóxicos sobre la función renal de los PBDEs y de sus homólogos clorados, los PCBs, son escasos (Lu y cols., 2009). Alteraciones como degeneración de los túbulos y los glomérulos han sido observadas por algunos autores tras la exposición a PCBs (Rao y Banerji, 1990; Kutlu y cols., 2007).

En nuestro estudio, el análisis histopatológico de riñón reveló la presencia de fagolisosomas. Esta alteración también fue observada por otros autores, sugiriendo degeneración celular (Muruganandan y cols., 2002; Pedraza-Chaverrí y cols., 2004).

DISCUSIÓN GLOBAL

El BDE-99 es uno de los congéneres de PBDEs más persistentes detectado en el medio ambiente (Darnerud y cols., 2001; de Wit, 2002; McDonald, 2002). Hasta el momento, el efecto más observado en roedores es a nivel de neurocomportamiento. El BDE-99 también parece influir en la homeostasis de la función tiroidea (Hallgren y cols., 2001; Hallgren y Darnerud, 2002; Zhou y cols., 2001, 2002). Ambos efectos son la consecuencia de una exposición pre y postnatal.

En nuestro estudio en ratas adultas, no se encontraron alteraciones ni en el comportamiento ni en los niveles de hormonas tiroideas tras la exposición a BDE-99. Estos resultados podrían ser debido a que la exposición en la edad adulta no tiene efectos críticos a diferencia de cuando la exposición se realiza durante el desarrollo.

En relación a los métodos utilizados para evaluar el comportamiento de los animales (evitación pasiva, campo abierto y laberinto de agua), aunque sean los más habituales, no podemos descartar que al aplicar otros tests (T-maze, Y-maze, radial-maze, test de habituación, análisis de huella, test del cilindro, escalera horizontal, etc.) a parte de confirmar los resultados obtenidos también obtendríamos más información de los procesos de afectación de los animales.

En nuestro estudio, la exposición a BDE-99 produjo desequilibrio del estatus oxidativo en córtex y cerebelo. Algunos estudios sugieren neurotoxicidad a través de daño oxidativo, por lo que, el EO podría ser el mecanismo de la alteración motora observada en este trabajo así como de los efectos observados por otros autores en crías (Kuriyama y cols., 2007).

Otro punto de discusión importante es el papel del BDE-99 como disruptor endocrino sobre la función reproductora masculina. Tanto en nuestro estudio como en el llevado a cabo por Kuriyama y colaboradores (2005), la exposición a BDE-99 produjo disminución de la espermatogénesis y alteraciones morfológicas del esperma. Sin embargo, en nuestro caso particular, los niveles de testosterona disminuyeron significativamente en sangre. La testosterona es fundamental en el proceso de la espermatogénesis. Por ello, parece confirmarse el papel del BDE-99 como disruptor endocrino. Falta profundizar si actúa a nivel de receptores (AR) o a nivel de síntesis de andrógenos. Stoker y colaboradores (2005) propusieron la actuación del DE-71 como antagonista del receptor de andrógenos. Al estudiar in vitro los congéneres que forman esta mezcla, el papel como antagonista fue atribuido a otros congéneres y no al BDE-99. Por ello, hay que incentivar los estudios de los congéneres de PBDEs por

separado, para poder atribuir los efectos observados a cada congénere en particular.

Otro aspecto implicado en las alteraciones de los parámetros seminales encontrados en este trabajo es el daño oxidativo. Algunas de las enzimas antioxidantes evaluadas en este estudio son de vital importancia durante la producción y maduración del esperma. La reducción de estas actividades, acompañada de un aumento en la peroxidación lipídica, refleja el papel del EO como mecanismo de toxicidad en los órganos reproductivos masculinos.

Respecto al estado oxidativo de los diferentes tejidos evaluados, las variaciones observadas en los niveles de las enzimas antioxidantes pueden ser debidas a una acción directa del BDE-99 sobre su actividad o a una acción de este compuesto sobre los genes que las codifican, provocando una activación o inhibición de las mismas. Mediante técnicas de expresión génica se podrían conocer con más profundidad los mecanismos básicos de la acción del BDE-99.

Las dosis de BDE-99 utilizadas en el presente trabajo (0.6 y 1.2 mg/kg) corresponden a 58 y 116 veces el nivel más alto encontrado en tejido adiposo humano (She y cols., 2002). Éstas son las dosis más bajas utilizadas en ratas adultas y en las que se han observado efectos tóxicos. Por ello, se hace necesaria la investigación sobre dosis bajas de BDE-99 con el fin de establecer niveles mínimos de toxicidad de dicho compuesto.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. En general, no se observan variaciones en el estado de los animales ni tampoco se aprecian alteraciones significativas en los tests de neurocomportamiento realizados.
2. No se observan diferencias significativas en el peso de los testículos y epidídimos a ninguna de las dosis de exposición. El conteo de espermátidas en testículo muestra una disminución significativa dependiente de la dosis.
3. La exposición a la dosis alta de BDE-99 provoca un descenso significativo del grado de movilidad en los espermatozoides y, en consecuencia, un incremento significativo del porcentaje de espermatozoides inmóviles.
4. El porcentaje de espermatozoides con morfología anómala aumenta en los animales expuestos a la dosis de 1.2 mg BDE-99/kg.
5. El análisis bioquímico de orina revela una disminución significativa a la dosis alta de exposición de las actividades enzimáticas de la GGT, la NAG y la LDH. Sin embargo, la concentración de proteínas aumenta de forma significativa a esta misma dosis.
6. La actividad de la GPT y la concentración de ácido úrico en sangre aumenta y disminuye respectivamente de forma significativa en los animales expuestos a la dosis de 1.2 mg BDE-99/kg.
7. La exposición a BDE-99 produce un descenso significativo de los niveles de testosterona y su precursora la progesterona a la dosis más elevada.
8. La actividad de la SOD y de la GR aumenta y disminuye respectivamente de forma significativa en sangre en ambos grupos de exposición.

9. En epidídimo, el BDE-99 causa una disminución de las actividades enzimáticas de la SOD y la GR mientras que en testículo se observa un descenso de la actividad de la CAT y un aumento de los niveles de GSSG. En ambos tejidos aumenta la peroxidación lipídica a la dosis más alta de exposición.
10. El BDE-99 provoca una alteración de los marcadores de estrés oxidativo en hígado y riñón. En riñón, se observa una disminución significativa de la actividad de la CAT y un incremento de los niveles de GSSG y la ratio GSSG/GSH. Estos mismos efectos se observan en el hígado junto con un aumento significativo de la actividad enzimática de la SOD y una disminución significativa de los niveles de GSH.
11. En el encéfalo, el efecto del BDE-99 se manifiesta con un descenso significativo de la actividad de la enzima de la CAT en córtex y cerebelo, y una disminución de las actividades enzimáticas de la GR y la SOD en el cerebelo.
12. El examen histopatológico revela una descamación intratubular prematura en testículo y presencia de fagolisosomas en el riñón principalmente a la dosis alta de exposición.

CONCLUSIÓN GLOBAL

La exposición oral a BDE-99 provoca efectos tóxicos en ratas macho adultas que se manifiestan a través de un desequilibrio en el estado oxidativo y hormonal. Estas variaciones causan una alteración únicamente en la respuesta fisiológica reproductiva.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Abuja PM, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clinica chimica acta* 2001; 306: 1-17.
- Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and Sterility* 2003; 79: 829-843.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for polybrominated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers: Public Health Service 2004, Atlanta, GA.
- Ahlbom J, Fredriksson A, Eriksson P. Exposure to an organophosphate (DFP) during a defined period in neonatal life induces permanent changes in brain muscarinic receptors and behaviour in adult mice. *Brain Research* 1995; 677:13-19.
- Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *Journal Of Reproduction And Fertility* 1987; 8: 459-469.
- Aitken RJ, Krausz C, Buckingham D. Relationships between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions. *Molecular Reproduction and Development* 1994; 39: 268-279.
- Aitken RJ. Sperm function tests and fertility. *International Journal of Andrology* 2006; 29: 69-75.
- Akaike MH, Kat H, Ohno H, Kobayashi T. Hyperactivity and spatial maze learning impairment of adult rats with temporary neonatal hypothyroidism. *Neurotoxicol Teratol* 1991; 13: 317-322.

- Alae M, Luross J, Sergeant DB, Muir DCG, Whittle DM, Solomon K. Distribution of polybrominated diphenyl ethers in the Canadian environment. *Organohalogen Compounds* 1999; 40:347-350.
- Albina ML, Bellés M, Linares V, Sánchez DJ, Domingo JL. Restraint stress does not enhance the uranium-induced developmental and behavioral effects in the offspring of uranium-exposed male rats. *Toxicology* 2005; 215: 69-79.
- Allchin CR, Law RJ, Morris S. Polybrominated diphenylethers in sediments and biota downstream of potential sources in the UK. *Environmental Pollution* 1999; 105: 197-207.
- Alm H, Kultima K, Scholz B, Nilsson A, Andrén PE, Fex-Svenningsen A, Dencker L, Stigson M. Exposure to brominated flame retardant PBDE-99 affects cytoskeletal protein expression in the neonatal mouse cerebral cortex. *Neurotoxicology* 2008; 29: 628-637.
- Almaguer-Melián W, Martínez-Martí L, Frey JU, and Bergado JA. The amygdala is part of the behavioral reinforcement system modulating long-term potentiation in rat hippocampus. *Neuroscience* 2003; 119: 319-322.
- Alonso V, Linares V, Bellés M, Albina ML, Sirvent JJ, Domingo JL, Sánchez DJ. Sulfasalazine induced oxidative stress: A possible mechanism of male infertility. *Reproductive Toxicology* 2009; 27: 35-40.
- Alston DA, Tandler B, Gentles B, Smith EE. Testicular histopathology in deer mice (*Peromyscus maniculatus*) following exposure to polychlorinated biphenyl. *Chemosphere* 2003; 52: 283-285.
- Álvarez JG, Storey BT. Assessment of cell damage caused by spontaneous lipid peroxidation in rabbit spermatozoa. *Biology of Reproduction* 1984b; 30: 323-332.
- Álvarez JG, Storey BT. Differential Incorporation of Fatty Acids into and Peroxidative Loss of Fatty Acids from Phospholipids of Human

- Spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development* 1995; 42: 334-346.
- Álvarez JG, Storey BT. Lipid peroxidation and the reactions of superoxide and hydrogen peroxide in mouse spermatozoa. *Biology of Reproduction* 1984a; 30: 833-841.
 - Álvarez JG, Storey BT. Role of Glutathione Peroxidase in Protecting Mammalian Spermatozoa from Loss of Motility Caused by Spontaneous Lipid Peroxidation. *Gamete Reserch*, 1989; 23: 77-90.
 - Álvarez JG, Storey BT. Role of superoxide dismutase in protecting rabbit spermatozoa from O₂ toxicity due to lipid peroxidation. *Biology of Reproduction* 1983; 28: 1129-1136.
 - Álvarez JG, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit and mouse epididymal spermatozoa. Dependence of rate on temperature and oxygen concentration. *Biology of Reproduction* 1985; 32: 342-351.
 - Álvarez JG, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation in rabbit epididymal spermatozoa. *Biology of Reproduction* 1982; 27: 1102-1108.
 - Álvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *Journal of Andrology* 1987; 8: 338-348.
 - Aly HA, Domènech O, Abdel-Naim AB. Aroclor 1254 impairs spermatogenesis and induces oxidative stress in rat testicular mitochondria. *Food and Chemical Toxicology* 2009. In press.
 - Amacher DE. Serum Transaminase Elevations as Indicators of Hepatic Injury Following the Administration of Drugs. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 1998; 27: 119-130.

- Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1981; 78: 6858-6862.
- Andric SA, Kostic TS, Stojilkovic SS, Kovacevic RZ. Inhibition of rat testicular androgenesis by a polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1248. *Biology of Reproduction* 2002; 62: 1882-1888.
- Baeuerle PA, Baltimore D. NF-Kappa B: ten years after. *Cell* 1996; 87: 13-20.
- Baillieux H, De Smet HJ, Paquier PF, De Deyn PP, Mariën P. Cerebellar neurocognition: insights into the bottom of the brain. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 2008; 110: 763-773.
- Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, Oxidants, and aging. *Cell* 2005; 120: 483-495.
- Ballschmiter K, Mennel A, Buyten J. Long chain alkyl-polysiloxanes as non-polar stationary phases in capillary gas chromatography. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 1993; 346: 396-402.
- Banudevi S, Krishnamoorthy G, Venkataraman P, Vignesh C, Aruldas MM, Arunakaran J. Role of alpha-tocopherol on antioxidant status in liver, lung and kidney of PCB exposed male albino rats. *Food and Chemical Toxicology* 2006; 44: 2040-2046.
- Becker BF. "Towards the physiological function of uric acid". *Free Radical Biology and Medicine* 1993; 14: 615-631.
- Beckman KB, Ames BN. The free radicals theories of aging matures. *Physiological Reviews* 1998; 547-581.
- Bellés M, Albina ML, Linares V, Gómez M, Sánchez DJ, Domingo JL. Combined action of uranium and stress in the rat. I. Behavioral effects. *Toxicology Letters* 2005; 158: 176-185.

- Bellés M, Linares V, Luisa Albina M, Sirvent J, Sánchez DJ, Domingo JL. Melatonin reduces uranium-induced nephrotoxicity in rats. *Journal of Pineal Research* 2007;43:87-95.
- Bellés M, Linares V, Luisa Albina M, Sirvent J, Sánchez DJ, Domingo JL. Melatonin reduces uranium-induced nephrotoxicity in rats. *Journal of Pineal Research* 2007; 43: 87-95.
- Bergmeyer HU, Hørder M, Rej R. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Scientific Committee, Analytical Section: approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 2. IFCC method for aspartate aminotransferase (L-aspartate: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.1). *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 1986; 24: 497-510.
- Bocio A, Llobet JM, Domingo JL, Corbella J, Teixidó A, Casas C. Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in Foodstuffs: Human Exposure through the Diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003; 51: 3191-3195.
- Bowie AG, Moynagh PN, O'Neill LA. Lipid peroxidation is involved in the activation of NF-kB by tumour necrosis factor but not interleukin-1 in the human endothelial cell line ECV304. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272: 25941-25950.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976; 72: 248-254.
- Branchi I, Alleva E, Costa LG. Effects of perinatal exposure to polybrominated diphenyl ether (PBDE 99) on mouse neurobehavioural development. *Neurotoxicology* 2002; 23:375-384
- Branchi I, Capone F, Vitalone A, Madia F, Santucci D, Alleva E, Costa LG. Early developmental exposure to BDE 99 or Aroclor 1254 affects neurobehavioural profile: interference from the administration route. *Neurotoxicology* 2005; 26: 183-192.

- Brominated Science and Environmental Forum (BSEF). Major brominated flame retardants volume estimates. Total market demand by region in 2001, 2003 Brussels, Belgium. www.bsef.com.
- Brucker-Davis F, Pointis G, Chevallier D, Fenichel P. Update on cryptorchidism: endocrine, environmental and therapeutic aspects. *Journal of Endocrinological Investigation* 2003; 26: 575-587.
- Burniston DA, Symons RK, Croft M, Trout M, Korth W. Determination of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in Australian pig fat. *Organohalogen Compounds* 2003; 61: 167-170.
- Capen CC. Pathophysiology of chemical injury of the thyroid gland. *Toxicology Letters* 1992; 64/65: 381-388.
- Carlsen E, Giwerman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *British Medical Journal* 1992; 305: 609-613..
- Cathcart R, Schwieters E, Saul RL, Ames BN. Thymine glycol and thymidine glycol in human and rat urine: a possible assay for oxidative DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 1984; 81: 5633-5637.
- Ceccatelli R, Faass O, Schlumpf M, Lichtensteiger W. Gene expression and estrogen sensitivity in rat uterus after developmental exposure to the polybrominated diphenyl ether PBDE 99 and PCB. *Toxicology* 2006; 220:104-116.
- Cerutti P, Trump BF. *Cancer Cells* 1991; 3: 1-7.
- Cetin B. Atmospheric concentrations and phase partitioning of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in Izmir, Turkey. *Chemosphere* 2008; 71: 1067-1078.
- Chaudiere J, Ferrari-Iliou R. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. *Food and Chemical Toxicology* 1999; 37: 949-962.

- Chemes EH, Rawe YV. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Human Reproduction Update* 2003; 9: 405-428.
- Chen LJ, Lebetkin EH, Sanders JM, Burka LT. Metabolism and disposition of 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (BDE99) following a single or repeated administration to rats or mice. *Xenobiotica* 2006; 36: 515-534.
- Cheng J, Gu J, Ma J, Chen X, Zhang M, Wang W. Neurobehavioural effects, redox responses and tissue distribution in rat offspring developmental exposure to BDE-99. *Chemosphere* 2009; 75: 963-968.
- Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiological Reviews* 1972; 52: 198-236. Review.
- Cohen G, Dembiec D, Marcus J. Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry* 1970; 34: 30-38.
- Cohn BA, Overstreet JW, Fogel RJ, Brazil CK, Baird DD, Cirillo PM. Epidemiologic studies of human semen quality: considerations for study design. *American journal of epidemiology* 2002; 155: 664-671.
- Colborn T, vom Saal FS, Soto AM. Developmental effects of endocrine disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives* 1993; 101: 378-384.
- Colomina MT, Roig JL, Sánchez DJ, Domingo JL. Influence of age of exposure on aluminum-induced neurobehavioral effects and morphological changes in the brain of rats. *Neurotoxicology* 2002; 23: 775-781.

- Colomina MT, Sánchez DJ, Sánchez-Turet M, Domingo JL. Behavioural effects of aluminium in mice: influence of restraint stress, *Neuropsychobiology* 1999; 40: 142-149.
- Comisión de las Comunidades Europeas (COM). Comunicación de la Comisión al Consejo, el Parlamento Europeo y el Comité Económico y Social (COM). Propuesta sobre residuos de aparatos eléctricos y electrónicos. COM 2001, 68.
- Comisión de las Comunidades Europeas (COM). Estrategia comunitaria en materia de alteradores endocrinos (Sustancias de las que se sospecha interfieren en lo sistemas hormonales de seres humanos y animales). COM 1999, 706.
- Costa LG, Giordano G. Developmental neurotoxicity of polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants. *Neurotoxicology* 2007; 28: 1047-67. Review.
- Crisp TM, Clegg ED, Cooper RL, Wood WP, Anderson DG, Baetcke KP, Hoffman JL, Morrow MS, Rodier DJ, Schaeffer JE, Tovart LW, Zeeman MG, Patel YM. Environmental endocrine disruption : an effect assessment and analysis. *Environmental Health Perspectives* 1998; 106: 11-56.
- Darnerud PO, Eriksen GS, Jóhannesson T, Larsen PB, Viluksela M. Polybrominated diphenyl ethers: occurrence, dietary exposure, and toxicology. *Environmental Health Perspectives* 2001; 109: 49-68. Review.
- Darnerud PO, Risberg S. Tissue localisation of tetra- and pentabromodiphenyl ether congeners (BDE-47, -85 and -99) in perinatal and adult C57BL mice. *Chemosphere* 2006; 62: 485-493.
- Darnerud PO. Brominated flame retardants as possible endocrine disruptors. *International Journal of Andrology* 2008; 31: 152-160.
- Davis JK. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposium* 1995; 61:1-31.

- Davis KJA. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. General aspects. *Journal of Biological Chemistry* 1987; 262: 9895-9901.
- de Wit C. An overview of brominated flame retardants in the environment. *Chemosphere* 2002; 46: 583-624.
- Den Blawen DH, Poppe WA, Trischler W. Cholinesterase (EC 3.1.1.8) with butyrylthiocholine-iodide as substrate: references depending on age and sex with special reference to hormonal effects and pregnancy. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 1983; 21: 381-386.
- Djukic M, Jovanovic MC, Ninkovic M, Vasiljevic I, Jovanovic M. The role of nitric oxide in paraquat-induced oxidative stress in rat striatum. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 2007; 14: 247-252.
- Domingo JL, Cid RM, Castell V, Llobet JM. Human exposure to PBDEs through the diet in Catalonia, Spain: Temporal trend. A review of recent literature on dietary PBDE intake. *Toxicology* 2008; 248: 25-32.
- Domingo JL. Human Exposure to polybrominated diphenyl ethers through the diet. *Journal of Chromatography* 2004; A1054: 321-326.
- Du FY, Zhan P. Time-dependent effects of pentabrominated diphenyl ethers on thyroid hormones and histological structure of thyroids in rats. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2008; 39: 98-100.
- Edelstein CL, Ling H, Wangsiripaisan A, Schier RW. Emerging therapies for acute renal failure. *American Journal of Kidney Diseases* 1997; 30: 89-95.
- Eriksson P, Jakobsson E, Frederiksson A. Brominated flame retardants: a novel class of developmental neurotoxicants in our

- environment?. *Environmental Health Perspectives* 2001; 109: 903-908.
- Eriksson P, Jakobsson E, Fredriksson A. Developmental neurotoxicity of brominated flameretardants, polybrominated diphenyl ethers and tetrabromo-bis-phenol. *Organohalogen Compounds* 1997; 35: 375-377.
 - Eriksson P, Viberg H, Jakobsson E, Orn U, Fredriksson A. A brominated flame retardant, 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether: uptake, retention, and induction of neurobehavioural alterations in mice during a critical phase of neonatal brain development. *Toxicological Sciences* 2002; 67: 98-103.
 - Eriksson P. Perinatal Developmental Neurotoxicity of PCBs. Report 4897. Stockholm, Sweden: Swedish Environmental Protection Agency; 1998:1-56.
 - European Union Risk Assesment (EU). Diphenyl ether, pentabromoderivative (pentabromodiphenyl ether). Office for Official Publications of the European Committees 2001, Luxembourg.
 - Fabrellas B, Larrazabal D, Martinez MA, Eljarrat E and Barceló D. Presence of polybrominated diphenyl ethers in Spanish sewage sludges: important contribution of deca-BDE. *Organohalogen Compounds* 2004; 66: 3755-3760.
 - Fernández MF, Pedraza V, Olea N. Estrogens in the environment: is there a breast cancer connection?. *Cancer Journal* 1998; 11: 11-17.
 - Fernie KJ, Shutt JL, Mayne G, Hoffman D, Letcher RJ, Drouillard KG, Ritchie IJ. Exposure to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): changes in thyroid, vitamin A, glutathione homeostasis, and oxidative stress in American kestrels (*Falco sparverius*). *Toxicological Sciences* 2005; 88: 375-383.

- Fielden MR, Halgren RG, Tashiro CH, Yeo BR, Chittim B, Chou K, Zacharewski TR. Effects of gestational and lactational exposure to Aroclor 1242 on sperm quality and in vitro fertility in early adult and middle-aged mice. *Reproductive Toxicology* 2001; 15: 281-292.
- Fonnum F, Mariussen E, Reistad T. Moléculas mechanisms involved in the toxic effects of polychlorinated biphenyls (PCBs) and brominated flame retardants (BFRs). *Journal of Toxicology and Environmental Health* 2006; 69: 21-35.
- Ford E, Hughes MN, Wardman P. Kinetics of the reactions of nitrogen dioxide with glutathione, cysteine, and uric acid at physiological pH. *Free Radical Biology and Medicine* 2002; 32: 1314-1323..
- Fowles JR, Fairbrother A, Baecher-Steppan L, Kerkvliet NI. Immunologic and endocrine effects of the flame-retardant pentabromodiphenyl ether (DE-71) in C57BL/6J mice. *Toxicology* 1994; 86:49-61.
- Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science* 1978; 201:875-880.
- Fuentes S, Vicens P, Colomina MT, Domingo JL. Behavioral effects in adult mice exposed to perfluorooctane sulfonate (PFOS). *Toxicology* 2007; 242: 123-129.
- Fujii J, Iuchi Y, Matsuki S, Ishii T. Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. *Asian Journal of Andrology* 2003; 5: 231-242.
- Garner M, Turner MC, Ghadirian P, Krewski D, Wade M. Testicular cancer and hormonally active agents. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, critical Reviews* 2008; 11: 260-275.
- Garrido N, Meseguer M, Simon C, Pellicer A, Remohí J. Pro-oxidative and anti-oxidative imbalance in human semen and its relation with male fertility. *Asian Journal of Andrology* 2004; 6: 59-65.

- Gurr E. Synthetic dyes in Biology, medicine and chemistry. Academic Press 1971, London, New York.
- Guvenius DM, Aronsson A, Ekman-Ordeberg G, Bergman A, Norén K. Human prenatal and postnatal exposure to polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated biphenyls, polychlorobiphenyls, and pentachlorophenol. Environmental Health Perspectives 2003; 111:1235-1241.
- Habig WH, Pabst MJ, Jacoby WB. Glutathione-S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. Journal of Biological Chemistry 1975; 249: 7130-7139.
- Hakk H, Huwe J, Low M, Rutherford D, Larsen G. Tissue disposition, excretion and metabolism of 2,2',4,4',6-pentabromodiphenyl ether (BDE-100) in male Sprague-Dawley rats. Xenobiotica 2006; 36: 79-94.
- Hakk H, Larsen G and Wehler K. Tissue disposition, excretion and metabolism of 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (BDE-99) in the male Sprague-Dawley rat. Xenobiotica 2002; 32: 369-382.
- Hale RC, La Guardia MJ, Harvey EP, Gaylor MO, Mainor TM, Duff WH. Flame retardants. Persistent pollutants in land-applied sludges. Nature 2001; 412: 140-1.
- Hale RC, La Guardia MJ, Harvey EP, Mainor TM. Potential role of FIRE retardant-treated polyurethane foam as a source of brominated diphenyl ethers to the US environment. Chemosphere 2002; 46: 729-735.
- Hallgren S, Darnerud PO. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and chlorinated paraffins (CPs) in rats—testing interactions and mechanisms for thyroid hormone effects. Toxicology 2002; 177: 227-243.
- Hallgren S, Sinjari T, Håkansson H, Darnerud PO Effects of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated

- biphenyls (PCBs) on thyroid hormone and vitamin A levels in rats and mice. *Archives of Toxicology* 2001; 75: 200-208.
- Halliwell B, Gutteridge JM. *Free Radicals in biology and Medicine*. Second ed. New York: Oxford University Press. 1989.
 - Hardy ML. The toxicology of the three commercial polybrominated diphenyl oxide (ether) flame retardants. *Chemosphere* 2002; 46: 757-777.
 - Hassanin A, Breivik K, Meijer SN, Steinnes E, Thomas GO, Jones KC. PBDEs in European Background Soils: Levels and Factors Controlling Their Distribution. *Environmental Science Technology* 2004; 38: 738-745.
 - Hausamen TU, Helger R, Gross W. Optimal conditions for the determination of serum alkaline phosphatase by a new kinetic method. *Clinical Chimica Acta* 1967; 15: 241-245.
 - He P, He W, Wang A, Xia T, Xu B, Zhang M, Chen X. PBDE-47-induced oxidative stress, DNA damage and apoptosis in primary cultured rat hippocampal neurons. *Neurotoxicology* 2008; 29: 124-129.
 - Hill JM, Switzer RC. The regional distribution and cellular localization of iron in the rat brain. *Neuroscience* 1984; 11: 595-603.
 - Hissin PJ, Hilf R. A fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry* 1976; 74: 214-226.
 - Holland MK, Álvarez JG, and Storey BT. Production of superoxide and activity of superoxide dismutase in rabbit epididymal spermatozoa. *Biology of Reproduction* 1982; 27: 1109-1118.
 - Hooper H, McDonald TA. The PBDEs: an emerging environmental challenge and another reason for breast-milk monitoring programs. *Environmental Health Perspectives* 2000; 108: 387-392.

- Hoppin JA, Brock JW, Davis BJ, Baird DD. Reproducibility of urinary phthalate metabolites in first morning urine samples. *Environmental Health Perspectives* 2002; 110: 515-518.
- Hsu PC, Guo YL, Li MH. Effects of acute postnatal exposure to 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl on sperm function and hormone levels in adult rats. *Chemosphere* 2004; 54: 611-618.
- International Program on Chemical Safety (IPCS). Brominated Diphenyl Ethers. *Environmental Health Criteria* 162. Geneva:World Health Organization, 1994, Geneva.
- International Programme on Chemical Safety (IPCS). *Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disruptors*. T. Damstra, S. Barlow, A. Bergman, R. Kavlock, and G. van der Kraak, Eds. World Health Organization 2002, Geneva.
- International Research and Development Corporation (IRDC). Pentabromodiphenyl ether. Acute toxicity studies in rats and rabbits. Submitted to the U.S. Environmental Protection Agency under TSCA 1975; 8D. OTS0522286.
- Ivanov II. A relay model of lipid peroxidation in biological membranes. *Journal of Free Radicals in Biology and Medicine* 1985; 1: 247-253.
- Jacobson JL, Jacobson SW. Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero. *New England Journal of Medicine* 1996; 335: 783-789.
- Jarad G, Miner JH. Update on the glomerular filtration barrier. *Current opinion in Nephrology and Hypertension* 2009; 18: 226-232.
- Jeansson M, Björck K, Tenstad O, Haraldsson B. Adriamycin alters glomerular endothelium to induce proteinuria. *Journal of the American Society of Nephrology* 2009; 20:114-22.

- Jensen TK, Toppari J, Keiding N, Skakkebaek NE. Do environmental oestrogens contribute to the decline in male reproductive health? *Clinical Chemistry* 1995; 41/42: 1896-1901.
- Jones MM, Singh PK, Zimmerman LJ, Gomez M, Albina ML, Domingo JL. Effects of some chelating agents on urinary copper excretion by the rat. *Chemical Research in Toxicology* 1995; 8: 942-948.
- Jones R, Mann T, Sherins RJ. Peroxidative break-down of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal effects of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertility and Sterility* 1979; 31: 531-537.
- Jones-Otazo HA, Clarke JP, Diamond ML, Archbold JA, Ferguson G, Harner T, Richardson GM, Ryan JJ, Wilford B. Is house dust the missing exposure pathway for PBDEs? An analysis of the urban fate and human exposure to PBDEs. *Environmental Science Technology* 2005, 39: 5121-5130.
- Jow WW, Schlegel PN, Cichon Z, Phillips D, Goldstein M, Bardin CW. Identification and localization of copper-zinc superoxide dismutase gene expression in rat testicular development. *Journal of andrology* 1993; 14: 439-447.
- Joyce D, Albanese C, Steer J, Fu M, Bouzahzah B, Pestell RG. NF- κ B and cell-cycle regulation: the cyclin connection. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 2001; 12: 73-90.
- Kaneko T, Iuchi Y, Kobayashi T, Fujii T, Saito H, Kurachi H, Fujii J. The expression of glutathione reductase in the male reproductive system of rats supports the enzymatic basis of glutathione function in spermatogenesis. *European Journal of Biochemistry* 2002; 269: 1570-8.
- Kaplowitz N, Tsukamoto H. Oxidative stress and liver disease. *Progress Liver Diseases* 1996; 14: 131-59.

- Kaplowitz N. Cell death at the millennium. Implications for liver diseases. *Clinics in Liver Disease* 2000; 4: 1-23. Review.
- Karbownik M, Reiter RJ. Antioxidative effects of melatonin in protection against cellular damage caused by ionizing radiation. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 2000; 225: 9-22.
- Katsuki A , Suematsu M, Gabazza EC, Murashima S, Nakatani K, Togashi K, Yano Y, Adachi Y, Sumida Y. Increased oxidative stress is associated with decreased circulating levels of adiponectin in Japanese metabolically obese, normal-weight men with normal glucose tolerance. *Diabetes Research and Clinical Practice* 2006; 73: 310–314.
- Kiviranta H, Ovaskainen, ML, Vartiainen T. Market basket study on dietary intake of PCDD/Fs, PCBs, and BDEs in Finland. *Environmental Pollution* 2004; 30: 923-932.
- Kobayashi T, Miyazaki T, Natori M, Nozawa S. Protective role of superoxide dismutase in human sperm motility: superoxide dismutase activity and lipid peroxide in human seminal plasma and spermatozoa. *Human Reproduction* 1991; 6: 987-991.
- Koopman-Esseboom C, Morse DC, Weisglas-Kuperus N, Lutkeschipholt IJ, Van der Paauw C, Tuinstra LGMT, Brouwer A, Sauer PJJ. Effects of dioxins and polychlorinated biphenyls on thyroid hormone status of pregnant women and their infants. *Pediatric Research* 1994; 36: 468-473.
- Kuriyama SN, Chahoud I. In utero exposure to low-dose 2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 118) impairs male fertility and alters neurobehavior in rat offspring. *Toxicology* 2004; 202: 185-197.
- Kuriyama SN, Talsness CE, Grote K, chahoud I. Developmental exposure to low dose PBDE 99: effects on male fertility and neurobehavior in rat offspring. *Environmental Health Perspectives* 2005; 113: 149–154.

- Kuriyama SN, Wanner A, Fidalgo-Neto AA, Talsness CE, Koerner W, Chahoud I. Developmental exposure to low-dose PBDE-99: Tissue distribution and thyroid hormone levels. *Toxicology* 2007; 242: 80-90.
- Kutchai HC. Membranas celulares y transporte transmembrana de solutos y agua. En: Berne RM, Levy MN, editors. *Fisiología*. Madrid: Harcourt Brace, 1998; 3-18.
- Kutlu S, Colakoglu N, Halifeoglu I, Sandal S, Seyran AD, Aydin M, Ylmaz B. Comparative evaluation of hepatotoxic and nephrotoxic effects of aroclors 1221 and 1254 in female rats. *Cell Biochemistry and function* 2007; 25: 167-172.
- Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG, Dikalov S. Interactions of peroxynitrite with uric acid in the presence of ascorbate and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric oxide synthase. *Biochemical Pharmacology* 2005; 70: 343-354.
- Latchoumycandane C, Chitra KC, Mathur PP. The effect of methoxychlor on the epididymal antioxidant system of adult rats. *Reproductive Toxicology* 2002; 16: 161-172.
- Law RJ, Allchin CR, de Boer J, Covaci A, Herzke D, Lepom P, Morris S, Tronczynski J, de Wit CA. Levels and trends of brominated flame retardants in the European environment. *Chemosphere* 2006; 64: 187-208.
- Lee DW, Opanashuk LA. Polychlorinated biphenyl mixture aroclor 1254-induced oxidative stress plays a role in dopaminergic cell injury. *Neurotoxicology* 2004; 25: 925-939.
- Lehmann DW, Levine JF, McHugh Law J. Polychlorinated biphenyl exposure causes gonadal atrophy and oxidative stress in *Corbicula fluminea* clams. *Toxicologic Pathology* 2007; 35: 356-365.
- Lilienthal H, Hack A, Roth-Härer A, Wichert Grande S, Talsness CE. Effects of developmental exposure to 2,2',4,4',5-

- pentabromodiphenyl ether (PBDE-99) on sex steroids, sexual development, and sexually dimorphic behavior in rats. *Environmental Health Perspectives* 2006; 114: 194-201.
- Lin T, Yang MS. Benzo[a]pyrene-induced elevation of GSH level protects against oxidative stress and enhances xenobiotic detoxification in human HepG2 cells. *Toxicology* 2007; 235: 1-10.
 - Linares MV, Albina ML, Bellés M, Mayayo E, Sánchez DJ, Domingo JL. Combined action of uranium and stress in the rat II. Effects on male reproduction. *Toxicology Letters* 2005; 158: 186-195.
 - Linares MV, Bellés M, Albina ML, Sirvent JJ, Sánchez DJ, Domingo JL. Assessment of the pro-oxidant activity of uranium in kidney and testis of rats. *Toxicology Letters* 2006; 167: 152-161.
 - Linares V, Alonso V, Albina ML, Bellés M, Sirvent JJ, Domingo JL, Sánchez DJ. Lipid peroxidation and antioxidant status in kidney and liver of rats treated with sulfasalazine. *Toxicology* 2009; 256: 152-156.
 - Lindsay DG, Astley SB. European research on the functional effects of dietary antioxidants- EUROFEDA. *Molecular Aspects of Medicine* 2002; 23:1-38.
 - Llansola M, Erceg S, Monfort P, Montoliu C, Felipo V. Prenatal exposure to polybrominated diphenylether 99 enhances the function of the glutamate-nitric oxide-cGMP pathway in brain *in vivo* and in cultured neurons. *European Journal of Neuroscience* 2007; 25: 373-379.
 - Lonn EM y Yusuf S. Is there a role for antioxidant vitamins in the prevention of cardiovascular diseases? An update on epidemiological and clinical trials data. *The Canadian journal of cardiology* 1997; 13: 957-965.
 - López-Teijón M, García F, Serra O, Moragas M, Rabanal A, Olivares r, Álvarez JG. Semen quality in a population of volunteers from the

- province of Barcelona. Reproductive Biomedicine Online 2007; 15: 434-444.
- Lu CF, Wang YM, Peng SQ, Zou LB, Tan DH, Liu G, Fu Z, Wang QX, Zhao J. Combined Effects of Repeated Administration of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and Polychlorinated Biphenyls on Kidneys of Male Rats. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 2009. In press.
 - MacLusky NJ, Clark AS, Naftolin F, Goldman-Rakic PS. Estrogen formation in the mammalian brain: possible role of aromatase in sexual differentiation of the hippocampus and neocortex. Steroids 1987; 50: 459-474.
 - MacLusky NJ, Naftolin F. Sexual differentiation of the central nervous system. Science 1981; 211: 1294-1303.
 - Maffei Facino R, Carini M, Aldini G, Berti F, Rossoni G. Panax ginseng administration in the rat prevents myocardial ischemia-reperfusion damage induced by hyperbaric oxygen: evidence for an antioxidant intervention. Planta medica 1999; 65: 614-619.
 - Mandalakis M, Atsarou V, Stephanou EG. Airborne PBDEs in specialized occupational settings, houses and outdoor urban areas in Greece. Environmental Pollution 2008; 155: 375-382.
 - Maroni M y Fait A. Health effects in men from longterm exposure to pesticides. Toxicology 1993; 78: 1-180.
 - Marsh G, Bergman A, Bladh LG, Gillner M, Jakobsson E. Synthesis of p-hydroxybromodiphenyl ethers and binding to the thyroid receptor. Organohalogen Compounds 1998; 37: 305-308.
 - Matcheko N, Tysklind M, de Wit C, Bergek S, Andersson R and Sellström U. Application of sewage sludge to arable land – soil concentrations of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls,

- and their accumulation in earth worms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2002; 21: 2515-2525.
- Mayes BA, McConnell EE, Neal BH, et al. Comparative carcinogenicity in Sprague-Dawley rats of the polychlorinated biphenyl mixtures Aroclors 1016, 1242, 1254 and 1260. *Toxicological Sciences* 1998; 41: 62-76.
 - Mazdai A, Dodder NG, Abernathy MP, Hites RA, Bigsby RM. Polybrominated diphenyl ethers in maternal and fetal blood samples. *Environmental Health Perspectives* 2003; 111: 1249-1252.
 - McEwen BS, Coirini H, Westlind-Danielsson A, Frankfurt M, Gould E, Schumacher M, Woolley C. Steroid hormones as mediators of neural plasticity. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 1991; 39:223-232.
 - McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, De Kretser DM, Pratis K, Robertson DM. Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Progress in Hormone Research* 2002; 57: 149-179.
 - McMillan TJ, Leatherman E, Ridley A, Shorrocks J, Tobi SE, Whiteside JR. Cellular effects of long wavelength UV light (UVA) in mammalian cells. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 2008; 60: 969-976.
 - Meerts IA, Letcher RJ, Hoving S, Marsh G, Bergman A, Lemmen JG, van der Burg B, Brouwer A. In vitro estrogenicity of polybrominated diphenyl ethers, hydroxylated PDBEs and polybrominated bisphenol A compounds *Environmental Health Perspectives* 2001;109: 399-407.
 - Mendiratta S, Qu ZC, May JM. Erythrocyte ascorbate recycling: antioxidant effects in blood. *Free Radical in Biology and Medicine* 1998; 24: 789-797.

- Meneses M, Wingfors H, Schuhmacher M, Domingo JL, Lindström G, Van Bavel B. Polybrominated diphenyl ethers detected in human adipose tissue from Spain. *Chemosphere* 1999; 39: 2271-2278.
- Mercurio F, Manning AM. NF- κ B as a primary regulator of the stress response. *Oncogene* 1999; 18: 6163-6171.
- Meseguer M, Garrido N, Simón C, Pellicer A, Remohí J. Concentration of glutathione and expression of Glutathione peroxidases 1 and 4 in fresh sperm provides a forecast of the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Journal of Andrology* 2004; 25: 773-780.
- Metz GA, Schwab ME. Behavioral characterization in a comprehensive mouse test battery reveals motor and sensory impairments in growth-associated protein-43 null mutant mice. *Neuroscience* 2004; 129: 563-574.
- Minotti G, Aust SD. Redox cycling of iron and lipid peroxidation. *Lipids* 1992; 27: 219- 26.
- Minotti G, Aust SD. The role of iron in oxygen radical mediated lipid peroxidation. *Chemico- Biological Interactions* 1989; 71: 1-19.
- Misra HP, Fridovich I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry* 1972; 247: 3170-3175.
- Mitra AK, Faruque FS, Avis AL. Breast cancer and environmental risks: where is the link? *Journal of Environmental Health* 2004; 66: 24-32.
- Moche W, Thanner G. Levels of PBDE in effluents and sludge from sewage treatment plants in Austria. *Proceedings of the Third International Workshop on Brominated Flame Retardants BFR 2004, Toronto, Canada, June 6-9 2004; 167-170.*

- Moreira PI, Nunomura A, Nakamura M, Takeda A, Shenk JC, Aliev G, Smith MA, Perry G. Nucleic acid oxidation in Alzheimer disease. *Free Radical Biology and Medicine* 2008; 44: 1493-1505.
- Morel, Y.; Barouki, R. Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochemical Journal* 1999; 342: 481-496.
- Morris R. Developmental of a water maze-procedure for studing spatial learning in the rat. *Journal of Neurosciences Methods* 1984; 11: 47-56.
- Morrow JD, Minton TA, Badr KF and Roberts LJ II: Evidence that F2 isoprostane, 8-epi-prostaglandin F2 alfa is formed in vivo. *Biochemica et Biophysica Acta* 1994; 1210: 244-248.
- Moser VC. The functional observational battery in adult and developing rats. *Neurotoxicology* 2000; 21: 989-996.
- Muruganandan S, Gupta S, Kataria M, Lal J, Gupta PK. Mangiferin protectsthe streptozotocin-induced oxidative damage to cardiac and renal tissues in rats. *Toxicology* 2002; 176: 165-176.
- Murugesan P, Muthusamy T, Balasubramanian K, Arunakaran J. Polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) inhibits testosterone biosynthesis ans antioxidant enzymes in cultures Leydig cells. *Reproductive Toxicology* 2008; 25: 447-454.
- Nagahara AH, Otto T, Gallagher M. Entorhinal-perirhinal lesions impair performance of rats on two versions of place learning in the Morris water maze. *Behavioral Neuroscience* 1995; 109: 3-9.
- Naghibi B, Ghafghazi T, Hajhashemi V, Talebi A. Vancomycin-induced nephrotoxicity in rats: is enzyme elevation a consistent finding in tubular injury?. *Journal of Nephrology* 2007; 20:482-488.
- Nehru LB, Bansal MP. Effect of selenium supplementation on the glutathione redox system in the kidney of mice after chronic

- cadmium exposures. *Journal of Applied Toxicology* 1996; 17: 81-84.
- Nohl H, Hegner D. Evidence for the existence of catalase in the matrix space of rat heart mitochondria. *FEBS Letters* 1978; 253: 5061-5063.
 - Nylund K, Asplund L, Janssen B, Jonsson P, Litzen K, Sellström U. Analysis of some polyhalogenated organic pollutants in sediment and sewage sludge. *Chemosphere* 1992; 24: 1721-1730.
 - O'Keefe JA, Handa RJ. Transient elevation of estrogen receptors in the neonatal rat hippocampus. *Dev Brain Res* 1990; 57: 119-127.
 - Oehninger S, Blackmore P, Mahony M, Hodgen G. Effects of hydrogen peroxide on human spermatozoa. *Journal Of Assisted Reproduction And Genetics* 1995; 12: 41-47.
 - Olea N, Fernandez MF. Chemicals in the environment and human male fertility. *Occupational and Environmental Medicine* 2007; 64: 430-431.
 - Olea, N, Pulgar R, Pérez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillo-Fertrell A, Pedraza V, Soto AM, Sonnenschein C. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environmental Health Perspectives* 1996; 104: 298-305.
 - Ollero M, Powers DP, Álvarez JG. Variation of docosahexaenoic acid content in subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications for sperm lipoperoxidative damage. *Molecular Reproduction and Development* 2000; 55: 326-334.
 - Pajovic SB, Saicic ZS, Spasic MB, Petrovic MB. The effect of ovarian hormones on antioxidant enzyme activities in the brain of male rats. *Physiological Research* 2003; 52: 189-194.
 - Palm A, Cousins IT, Mackay D, Tysklind M, Metcalf C, Alaee M. Assessing the Environmental Fate of Chemicals of Emerging

- Concern: A Case Study of the PBDEs. *Environmental Pollution* 2002; 117: 195-213.
- Pasqualotto FF, Lucon AM, Sobreiro BP, Pasqualotto EB, Arap S. Effects of medical therapy, alcohol, smoking, and endocrine disruptors on male infertility. *Revista do Hospital das Clínicas* 2004; 59: 375-382.
 - Pedraza-Chaverrí J, Barrera D, Maldonado PD, Chirino YI, Macías-Ruvalcaba NA, Medina-Campos ON, Castro L, Salcedo MI, Hernández-Pando R. S-allylmercaptocysteine scavenges hydroxyl radical and singlet oxygen in vitro and attenuates gentamicin-induced oxidative and nitrosative stress and renal damage in vivo. *BMC Clinical Pharmacology* 2004; 4: 5.
 - Peters T. Proposals for standardization of total protein assays. *Clinical Chemistry* 1968; 14: 1147-1159.
 - Pettersson JA. Personal air sampling and analysis of polybrominated diphenyl ethers and other bromine containing compounds at an electronic recycling facility in Sweden. *Journal of Environmental Monitoring* 2004; 6: 874-880.
 - Piedrafita B, Erceg S, cauli O, Monfort P, Felipo V. Developmental exposure to polychlorinated biphenyls PCB153 or PCB126 impairs learning ability in young but not in adult rats. *European Journal of Neuroscience* 2008; 27: 177-182.
 - Pilkington A, Buchanan D, Jamal GA, Gillham R, Hansen S, Kidd M, Hurley JF, Soutar CA. An epidemiological study of the relations between exposure to organophosphate pesticides and indices of chronic peripheral neuropathy and neuropsychological abnormalities in sheep farmers and dippers. *Occupational and Environmental Medicine* 2001; 58: 702-710.
 - Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V, Casini AF. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical Pharmacology* 2003; 66: 1499-1503.

- Pulgar R, Olea-Serrano MF, Novillo-Fertrell A, Rivas A, Pazos P, Pedraza V, Navajas JM, Olea N. Determination of bisphenol A and related aromatic compounds released from bis-GMA-based composites and sealants by high performance liquid chromatography. *Environmental Health Perspectives* 2000; 108: 21-27.
- Quinn MT, Gauss KA. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. *Journal of Leukocyte Biology* 2004; 76: 760-781.
- Rahman, I. Regulation of Nuclear Factor-kB, Activator Protein-1, and Glutathione Levels by Tumor Necrosis Factor-a and Dexamethasone in Alveolar Epithelial Cells *Biochem. Pharmacology* 2000; 60: 1041-1049.
- Rao CV, Banerji SA. Effect of polychlorinated biphenyl (Aroclor 1260) on histology of kidney and thyroid of rats. *Indian Journal of Experimental Biology* 1990; 28: 152-154.
- Ray DE, Richards PG. The potential for toxic effects of chronic, low-dose exposure to organophosphates. *Toxicology Letters* 2001; 120: 343-351. Review.
- Réus GZ, Valvassori SS, Nuernberg H, Comim CM, Stringari RB, Padilha PT, Leffa DD, Tavares P, Dagostim G, Paula MM, Andrade VM, Quevedo J. DNA damage after acute and chronic treatment with malathion in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008; 56: 7560-7565.
- Rice D, Barone JrS. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environmental Health Perspectives* 2000; 108: 511-533.
- Rudel RA, Camann DE, Spengler JD, Korn LR, Brody JG. Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust. *Environmental Science Technology* 2003; 37: 4543-4553.

- Sampson EJ, Baird MA, Burtis CA, Smith EM, Witte DL, Bayse DD. A coupled-enzyme equilibrium method for measuring urea in serum: optimization and evaluation of the AACC study group on urea candidate reference method. *Clinical Chemistry* 1980; 26: 816-826.
- Sanaka T, Nakano Y, Nishimura H, Shinobe M, Higuchi C, Omata M, Nihei H, Sugino N. Therapeutic effect of a newly developed antioxidative agent (OPC-15161) on experimental immune complex nephritis. *Nephron* 1997; 76: 315-322.
- Sanders GTB, Pasman AJ. Determination of uric acid with uricase and peroxidase. *Clinical Chimica Acta* 1980; 101: 299-303.
- Schantz SL, Widholm JJ. Cognitive effects of endocrine-disrupting chemicals in animals. *Environmental Health Perspectives* 2001; 109: 1197-1206. Review.
- Schechter A, Paepke O, Tung K, Staskal D, Birnbaum L. Polibrominated diphenyl ethers contamination of United States food. *Environmental Science Technology* 2004; 38: 5306-5311.
- Schlumpf M, Cotton B, Conscience M, Haller V, Steinmann B, Lichtensteiger W. In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. *Environmental Health Perspectives* 2001; 109: 239-244.
- Schlumpf M, Schmid P, Durrer S, Conscience M, Maerkel K, Henseler M, Gruetter M, Herzog I, Reolon S, Ceccatelli R, Faass O, Stutz E, Jarry H, Wuttke W, Lichtensteiger W. Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters--an update. *Toxicology* 2004; 205: 113-122.
- Schmutzler C, Hamann I, Hofmann PJ, Kovacs G, Stemmler L, Mentrup B, Schomburg L, Ambrugger P, Grüters A, Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Wuttke W, Köhrle J. Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. *Toxicology* 2004; 205: 95-102.

- Schuhmacher M, Kiviranta H, Vartiainen T, Domingo JL. Concentrations of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in milk of women from Catalonia, Spain. *Chemosphere* 2007; 67: 295-300.
- Selevan SG, Kimmel CA, Mendola P. Identifying critical windows of exposure for children's health. *Environmental Health Perspectives* 2000; 108: 451-455.
- Sellström U. Determination of some polybrominated flame retardants in biota, sediment and sewage sludge. Doctoral Dissertation, Department of Environmental Chemistry and ITM Laboratory for Analytical Environmental Chemistry, Stockholm University 1999.
- Sener G, Sehirli AO, Altunbas HZ, Ersoy Y, Paskaloglu K, Arbak S, Ayanoglu-Dulger G. Melatonin protects against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Journal of Pineal Research* 2002; 32: 231-236.
- Senthil kumar J, Banudevi S, Sharmila M, Murugesan P, Srinivasan N, Balasubramanian K, Aruldas MM, Arunakaran J. Effects of Vitamin C and E on PCB (Aroclor 1254) induced oxidative stress, androgen binding protein and lactate in rat Sertoli cells. *Reproductive Toxicology* 2004; 19: 201-208.
- Shao J, White CC, Dabrowski MJ, Kavanagh TJ, Eckert ML, Gallagher EP. The role of mitochondrial and oxidative injury in BDE 47 toxicity to human fetal liver hematopoietic stem cells. *Toxicological Sciences* 2008; 101: 81-90.
- She J, Petreas M, Winkler J, Visita P, McKinney M, Kopec D. PBDEs in the San Francisco Bay area: measurement in harbor seal blubber and human breast adipose tissue. *Chemosphere* 2002; 46: 697-707.
- Shigenaga MK, Gimeno CJ, Ames BN. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA

- damage. Proceedings of the National Accademy of Science of the United States of America 1989; 86: 9697-9701.
- Shoeib M, Harner T, Ikonomou M, Kannan K. Indoor and Outdoor Concentrations and Phase Partitioning of Perfluoroalkyl Sulfonamides and Polybrominated Diphenyl Ethers. Environmental Science Technology 2004; 38: 1313-1320.
 - Siddiqi MA. Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs): New Pollutants-Old Diseases. Clinical Medicine and research 2003; 1: 281-290.
 - Siems WG, Sommerburg O, Grune T. Erythrocyte free radical and energy metabolism. Clinical Nephrology 2000; 53: 9-17.
 - Sies H, Stahl W. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. American Journal of Clinical Nutrition 1995; 62: 1315 - 1321.
 - Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. The American journal of medicine 1991; 91: 31-38.
 - Sjödin A, Patterson DG and Bergman Å. A review on human exposure to brominated flame retardants - particularly polybrominated diphenyl ethers. Environmental International 2003; 29: 829-839.
 - Skakkebaek NE. Testicular dysgenesis syndrome. Hormone Reserch 2003; 60: 49.
 - Skenderi KP, Tsironi M, Lazaropoulou C, Anastasiou CA, Matalas AL, Kanavaki I, Thalmann M, Goussetis E, Papassotiriou I, Chrousos GP. Changes in free radical generation and antioxidant capacity during ultramarathon foot race. European journal of clinical investigation 2008; 38: 159-165.

- Slama R, Ducot B, Keiding N, Bouyer, J. Studying human fertility and environmental exposures. *Environmental Health Perspectives* 2004; 112: 604-606.
- Smythies J. The neurotoxicity of glutamate, dopamine, iron and reactive oxygen species: functional interrelationship in health and diseases. *Neurotoxicity Research* 1999; 1: 27-39.
- Sonnenschein C y Soto AM. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 1998; 65: 143-50.
- Spierto FW, MacNeil ML, Burtis CA. The effect of temperature and wavelength on the measurement of creatinine with the Jaffe procedure. *Clinical Biochemistry* 1979; 12: 18-21.
- Stadtman ER, Oliver CN. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *The Journal of Biological Chemistry* 1991; 266: 2005-2008.
- Stanley JS, Cramer PH, Thornburg KR, Remmers JC, Breen JJ, Schwemberger J. Mass spectral confirmation of chlorinated and brominated diphenylethers in human adipose tissues. *Chemosphere* 1991; 23: 1185-1195.
- Stapleton HM, Dodder NG, Offenberg JH, Schantz MM and Wise SA. Polybrominated Diphenyl Ethers in House Dust and Clothes Dryer Lint. *Environmental Science Technology* 2005; 39: 925-931.
- Staskal DF, Hakk H, Bauer D, Diliberto JJ, Birnbaum LS. Toxicokinetics of polybrominated diphenyl ether congeners 47, 99, 100, and 153 in mice. *Toxicological Sciences* 2006; 94: 28-37.
- Stefankiewicz J, Kurzawa R, Drozdziak M. Environmental factors disturbing fertility of men. *Ginekologia Polska* 2006; 77: 163-169.
- Stein SA, Adams PM, Shanklin DR, Mihailoff GA, Palnitkar MB. Thyroid hormone control of brain and motor development:

- molecular, neuroanatomical, and behavioral studies. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1991; 299: 47-105.
- Stohs SJ y Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine* 1995; 18: 321-36.
 - Stoker TE, Cooper RL, Lambright CS, Wilson VS, Furr J, Gray LE. In vivo and in vitro anti-androgenic effects of DE-71, a commercial polybrominated diphenyl ether (PBDE) mixture. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2005; 207: 78-88.
 - Stoker TE, Laws SC, Crofton KM, Hedge JM, Ferrell JM, Cooper RL. Assessment of DE-71, a commercial polybrominated diphenyl ether (PBDE) mixture, in the EDSP male and female pubertal protocols. *Toxicological Sciences* 2004; 78: 144-155.
 - Storey BT, Álvarez JG, Thompson K. Human Sperm Glutathione Reductase Activity in Situ Reveals Limitation in the Glutathione Antioxidant Defense System Due to Supply of NADPH. *Molecular Reproduction and Development* 1998; 49: 400-407.
 - Strandman T, Koistinen J, Vartiainen T. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in placenta and human milk. *Organohalogen Compounds* 2000; 47: 61-64.
 - Szasz G. A kinetic photometric method for serum gamma-glutamyl transpeptidase. *Clinical Chemistry* 1969; 15: 124-136.
 - Taieb J, Benattar C, Birr AS, Poüs C. From ACS-180 to Advia-Centaur (Bayer diagnostics): assessment of estradiol, progesterone, LH and FSH assays. *Annales de Biologie Clinique* 2003; 61: 223-228.
 - Talsness CE, Shalibaei M, Kuriyama S, Grande S, Sterner-Kock A, Schnikter P, Souza C, Grote C, Chahoud I. Ultrastructural changes observed in rat ovaries following in utero and lactational exposure to low doses of a polybrominated flame retardant. *Toxicology Letters* 2005; 157: 189-202.

- purified technical pentabromodiphenyl ether (pentaBDE) mixture in Wistar rats. *Toxicology* 2008; 245: 109-22.
- Van Houten B, Woshner V, Santos JH. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair* 2006; 5: 145-152.
 - Van Kampen EJ, Zijlstra WG. *Clinica Chimica Acta* 1961; 6: 538-544.
 - Venkataraman P, Muthuvel R, Krishnamoorthy G, Arunkumar A, Sridhar M, Srinivasan N, Balasubramanian K, Aruldas MM, Arunakaran J. PCB (Aroclor 1254) enhances oxidative damage in rat brain regions: protective role of ascorbic acid. *Neurotoxicology* 2007; 28: 490-498.
 - Venkataraman P, Muthuvel R, Krishnamoorthy G, Arunkumar A, Sridhar M, Srinivasan N, Balasubramanian K, Aruldas MM, Arunakaran J. PCB (Aroclor 1254) enhances oxidative damage in rat brain regions: protective role of ascorbic acid. *Neurotoxicology* 2007; 28: 490-498.
 - Viberg H, Fredriksson A, Eriksson P. Deranged spontaneous behavior and decrease in cholinergic muscarinic receptors in hippocampus in the adult rat, after neonatal exposure to the brominated flame-retardant, 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (PBDE 99). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2005; 20: 283-288.
 - Viberg H, Fredriksson A, Eriksson P. Neonatal exposure to the brominated flame retardant 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether causes altered susceptibility in the cholinergic transmitter system in the adult mouse. *Toxicological Sciences* 2002; 67: 104-107.
 - Viña J, Gómez-Cabrera MC, Lloret A, Márquez R, Miñana JB, Pallardó FV, Sastre J. Free radicals in exhaustive physical exercise: mechanism of production, and protection by antioxidants. *IUBMB Life* 2000; 50: 271-277.

- Vitenskapskomiteen for mattrygghet (VKM) (Norwegian Scientific Committee for food safety.) Utalelse fra faggruppen for forurensninger, naturlige toksiner og medisinrester i matkjeden. Risikovurdering av PBDE 2005; 04/504.
- Wakui S, Takagi F, Muto T, Yokoo K, Hirono S, Kobayashi Y, Shiota K, Akahori F, Suzuki Y, Hano H, Endou H, Kanai Y. Spermatogenesis in aged rats after prenatal 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl exposure. *Toxicology* 2007; 238:186-191.
- Walker WH. Molecular mechanisms of testosterone action in spermatogenesis. *Steroids* 2009; 74: 602-607.
- Weeks I, Woodhead JS. Chemiluminescence immunoassays. *Journal of Clinical Immunoassay* 1984; 7: 82-89.
- Wen S, Yang FX, Gong Y, Zhang XL, Hui Y, Li JG, Liu AL, Wu YN, Lu WQ, Xu Y. Elevated levels of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in male electrical and electronic equipment dismantling workers exposed to high concentrations of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans, polybrominated diphenyl ethers, and polychlorinated biphenyls. *Environmental Science Technology* 2008; 42: 4202-4207.
- Wenning RJ. Uncertainties and data needs in risk assessment of three commercial polybrominated diphenyl ethers: probabilistic exposure analysis and comparison with European Commission results. *Chemosphere* 2002; 46: 779-796.
- Wheeler CR, Salzman JA, Elsayed NM, Omaye ST, Korte DW Jr. Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Analytical Biochemistry* 1990; 184: 193-199.
- WIL Research Laboratories. A range-finding teratology study in rats with DE-79. Submitted to U.S. Environmental Protection Agency under TSCA 1986;OTS0522298.

- Wilford BH, Shoeib M, Harner T, Zhu J, Jones KC. Polybrominated Diphenyl Ethers in Indoor Dust in Ottawa, Canada: Implications for Sources and Exposure. *Environmental Science Technology* 2005; 39: 7027-7035.
- World Health Organization (WHO). Brominated Diphenyl Ethers Environmental Health Criteria 1994; 162, WHO, Geneva.
- Wyrobeck AJ, Bruce WR. Chemical induction of sperm abnormalities in mice. *Proceedings of the National Academy of sciences USA* 1975; 72: 4425-4429.
- Yakata M, Uchiyama T, Wada K, Sugita K, Sakai O. Urinary enzyme determination and its clinical significance. C. Enzyme derived from the kidney tubular epithelium--N-acetyl-beta-D-glucosaminidase. 4. Preclinical evaluation of the urinary NAG activity and changes in renal diseases. *Japanese journal of clinical pathology* 1983; 56: 90-101.
- Yu K, He Y, Yeung LW, Lam PK, Wu RS, Zhou B. DE-71-induced apoptosis involving intracellular calcium and the Bax-mitochondria-caspase protease pathway in human neuroblastoma cells in vitro. *Toxicological Sciences* 2008; 104: 341-351.
- Zegers BN, Lewis WA, Booij K, Smittenberg RH, Boer W, de Boer J and Boon JP. Levels of polybrominated diphenyl ether flame retardants in sediment cores from Western Europe. *Environmental Science Technology* 2003; 37: 3803-3807.
- Zegers BN, Lewis WE and Boon J.P. Levels of Some Polybrominated Diphenyl Ether (PBDE) Flame Retardants in Dated Sediment Cores. *Organohalogen Compounds* 2000; 47: 229-232.
- Zhang YM. Protective effect of quercetin on aroclor 1254-induced oxidative damage in cultured chicken spermatogonial cells. *Toxicological Sciences* 2005; 88: 545-550.

- Zhou T, Ross DG, De Vito MJ, et al. Effects of short-term in vivo exposure to polybrominated diphenyl ethers on thyroid hormones and hepatic enzyme activities in weaning rats. *Toxicological Sciences* 2001; 61: 76- 82.
- Zhou T, Taylor MM, DeVito MJ, et al. Developmental exposure to brominated diphenyl ethers results in thyroid hormone disruption. *Toxicological Sciences* 2002; 66: 105-116.
- Zucchelli P, Zuccalà A, Sturani A. Glomerular dysfunction in diabetic nephropathy. *Postgraduate medical journal* 1988; 64: 48-49.
- Zupan G, Pilipovi´c, Hrelja, peternel S. Oxidative stress parameters in different rat brain structures after electroconvulsive shock-induced seizures. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological psychiatry* 2008; 32: 771-777.

ABREVIATURAS

%	Porcentaje
$^1\text{O}_2$	Oxígeno singlete
8-OHdG	8-hidroxi-2' deoxiguanosina
Ac	Anticuerpo
AE	Éster de acridinio
Ag	Antígeno
As	Arsénico
ATP	Adenosín trifosfato
BDE	Éter de bromodifenilo
BHA	Butilhidroxianisol
BHT	Butil hidroxil tolueno
Br	Bromo
CAT	Catalasa
Cd	Cadmio
cDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenceno
CE	Colinesterasa
cm	Centímetros
COX	Ciclooxigenasa
Cu	Cobre
Cyt P450	Citocromo P450
DDD	Diclorodifenildicloroetano
DDE	Diclorofenildicloroetano
DDT	Clofenotano

DE	Disruptor endocrino
DES	Dietilestilbestrol
DHA	Ácido docosaheptaenoico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	Ditiobis-nitrobenzoato
EDTA	Ácido etildiaminotetracético
EPN	O-etil-O-p-nitrofenil fenilfosfonotionato
EROD	Etoxiresorufin-O-dietilasa
EROs	Especies reactivas de oxígeno
ER α	Receptor estrogénico tipo α
ER β	Receptor estrogénico tipo β
FA	Fosfatasa alcalina
Fe ⁺²	Catión ferroso
Fe ⁺³	Catión férrico
FOB	Batería de observación funcional
g	Gramo
G6PD	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
GGT	Gamma-GT
GLDH	Glutamato deshidrogenasa
GOT	Transaminasa glutamicooxalacética
GPT	Transaminasa glutamicopirúvica
GPx	Glutación peroxidasa
GR	Glutación reductasa
GSH	Glutación reducido

GSSG	Glutati3n oxidado
GST	Glutati3n-S-transferasa
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Per3xido de hidr3geno
HCl	3cido clorh3drico
Hg	Mercurio
HNO ₃	3cido n3trico
HO ⁻	Ani3n hidr3xido
HO [•]	Radical hidroxilo
HO ₂ [•]	Radical hidroper3xido
K ₂ HPO ₄	Fosfato pot3sico b3sico
kg	Kilogramo
KH ₂ PO ₄	Fosfato pot3sico 3cido
L [•]	Radical carbonado
LD ₅₀	Dosis letal 50
LDH	Lactato deshidrogenasa
Log K _{ow}	Coefficiente de partici3n octanol-agua
LOH	3cido graso hidroxilo
LPO	Lipoxigenasa
m	Metros
M	Molar
m ³	Metro c3bico
mA	Miliamperio
MAO	Monoamino oxidasa

MDA	Malondialdehído
MDH	Malato deshidrogenasa
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mM	Milimolar
Mn	Manganeso
MROD	Metoxiresorufin-O-dietilasa
Na ₂ CO ₃	Carbonato sódico básico
Na ₂ HPO ₄	Fosfato sódico básico
NADPH	Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato
NADPH	Fosfato de dinucleótido de Nicotiamida y Adenina
NAG	N-Acetil-β-D-glucosaminidasa
NaH ₂ PO ₄	Fosfato sódico ácido
NaOH	Hidróxido sódico
NEM	N-etil-maleimida
NF-κβ	Factor de transcripción kappa beta
ng	Nanogramo
nm	Nanómetros
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
O ₂	Oxígeno molecular
O ₂ ^{•-}	Anión superóxido
°C	Grado centígrado
ONOO ⁻	Anión peroxinitrito

OPT	O-phtalaldehido
Pa	Presión de vapor
Pb	Plomo
PBB	Bifenoles polibromados
PBDEs	Éteres difenílicos polibromados
PCB	Bifenilos policlorados
PCDD	Policlorodibenzodioxinas
PCDF	Policlorodibenzofuranos
PKC	Proteína kinasa C
PMP	Partículas paramagnéticas
POD	Peroxidasa
POPs	Contaminantes orgánicos persistentes
PROD	Pentoxiresorufin-O-dietilasa
ps	Peso seco
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
PVC	Cloruro de polivinilo
RLO	Radical libre de oxígeno
RLU	Unidades relativas de luz
RO•	Radical alcoxilo
ROO•	Radical peroxilo
ROOH	Hidroperóxido
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SDS	Dodecilsulfato sódico

Se	Selenio
SOD	Superóxido dismutasa
$t_{1/2}$	Tiempo de vida medio
T2	Hormona 3,5-diiodotironina
T3	Hormona 3,3,5-triiodotironina
T4	Hormona 3,3,5,5-tetraiodotironina
TBA	Ácido tiobarbitúrico
T-BuOOH	T-butilhidroperóxido
TCA	Ácido tricloroacético
TR α	Receptor tiroideo tipo α
TR β	Receptor tiroides tipo β
TSH	Hormona tirotropina
TTR	Transtiretina
U	Unidades
UDPGT	Uridina difosfato-glucuronosil tranferasa
UOD	Uricasa
W	Vatios
Zn	Zinc
Π^*	Orbital molecular pi
σ^*	Orbital molecular sigma
μ l	Microlitro