



TRABAJO FIN DE MÁSTER

MÁSTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

CURSO 2020-21

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ DE ELCHE

**EFECTO DE LA MEZCLA DE VARIOS
DISRUPTORES ENDOCRINOS EN LA
VIABILIDAD DE LA CÉLULA β PANCREÁTICA**

Autor: Alejandro Andy Maciá Vázquez

Tutores: Ángel Nadal Navajas

Laura Marroquí Esclapez

D. ÁNGEL NADAL NAVAJAS, Doctor y Catedrático del Área de Fisiología de la Universidad Miguel Hernández de Elche, y **Dña. LAURA MARROQUÍ ESCLAPEZ**, Doctora y Profesora Ayudante Doctor del Área de Fisiología de la Universidad Miguel Hernández de Elche.

CERTIFICAN

Que el presente trabajo titulado:

“Efecto de la mezcla de varios disruptores endocrinos en la viabilidad de la célula β pancreática”

y que constituye la Memoria del Trabajo Fin de Máster en Biotecnología y Bioingeniería, que presenta:

D. ALEJANDRO ANDY MACIÁ VÁZQUEZ

ha sido realizado bajo su supervisión en el Instituto de Investigación, Desarrollo e Innovación en Biotecnología Sanitaria de Elche (IDiBE), cumpliendo todos los requisitos necesarios.

Y para que así conste, se expide y firma el presente certificado en Elche a 21 de junio de 2021

Fdo.: Prof. Ángel Nadal Navajas

Fdo.: Prof. Laura Marroquí Esclapez

Agradecimientos

En primer lugar, quería agradecer a mis tutores, el Dr. Ángel Nadal y la Dra. Laura Marroquí, por todo lo que me han enseñado durante este año. Gracias a su apoyo y dedicación he logrado hacer de este un mejor trabajo y de mi un mejor científico.

Agradecer también, a la Dra. Cristina Ripoll, por toda la ayuda incondicional que me ha dado, sin ella nunca hubiera llegado hasta aquí.

Agradezco a todas aquellas personas que me han acompañado en el laboratorio y que me han permitido realizar este trabajo. A Athenea Pérez y a Ignacio Babiloni, por explicarme con todo el cariño y dedicación cualquier duda que me surgiera y sobre todo por estar siempre ahí para darme ánimos y guiarme en mi camino como científico. Doy las gracias al Dr. Reinaldo Sousa, por todas las aportaciones que me han permitido hacer un mejor trabajo y por ayudarme desde el día 1 a ser un mejor científico. Agradezco enormemente el formidable trabajo de las técnicas de laboratorio Luisi Navarro, Salomé Ramón, sin ellas este trabajo no habría sido posible. A Beatriz Bonmatí, por toda su paciencia para enseñarme a realizar cultivos celulares y por toda esa alegría que me contagiaba. Además, quiero dar especialmente las gracias a la Dra. Eva Tudurí, por estar siempre ahí apoyándome en los peores momentos y por guiarme por el duro camino de la ciencia.

Doy las gracias toda mi familia. A mis padres que con su esfuerzo me han permitido tener la mejor de las vidas. A mi hermana Eva, por la incondicional ayuda y esfuerzo que me ha dedicado desde pequeño, y por ayudarme con todo su conocimiento a mejorar este trabajo. A mi hermano Iván, por enseñarme la pasión de aprender y la satisfacción de enseñar. A mi hermano Daniel, por darme la oportunidad y apoyarme en mi carrera científica. Y a mi hermana Paula, por enseñarme a que todo lo que hagas en la vida lo hagas con pasión. Doy las gracias a cada uno de ellos por darme la felicidad todos los días de mi vida.

Quiero además, dar las gracias a mi amigo Rubén, por creer en mi y darme todo su apoyo para realizar este trabajo. También se las doy a mi amigo Aarón, por toda la ayuda que me ha brindado para que este fuera el mejor de los trabajos. Pero, sobre todo, agradezco a ambos por haber escucharme y acompañarme todos estos años en los peores y en los mejores momentos de mi vida.

Finalmente, dedico este trabajo a mi cuñado Jose, este ha sido uno de los años más difíciles de mi vida, pero él siempre ha estado ahí, día tras día, contagiándome su infinita energía y alegrándome hasta los más oscuros días. Doy las gracias por apoyarme desde pequeño, hacerme crecer y enseñarme “que no hay nada imposible si tú crees que puedes hacerlo”.

Resumen y palabras clave

El sistema endocrino controla numerosos procesos fisiológicos y de homeostasis. En nuestro día a día nos exponemos a multitud de sustancias químicas exógenas y algunas de ellas, conocidas como disruptores endocrinos, son capaces de interactuar con el sistema endocrino y producir efectos adversos sobre el organismo de un individuo o su prole. En los últimos años, estudios en modelos celulares y animales, así como, estudios epidemiológicos en humanos, sugieren que los disruptores endocrinos podrían ser un factor importante en el desarrollo de la diabetes mellitus, una de las enfermedades más prevalentes en la actualidad. A pesar de este avance en el conocimiento entre la exposición a disruptores endocrinos y la diabetes, son pocos los trabajos que se centran en el estudio de los efectos de la exposición de varias de estas sustancias al mismo tiempo; tal como ocurre en nuestra vida cotidiana.

En este trabajo estudiamos los efectos en la viabilidad celular de las células β pancreáticas al exponerlas a una mezcla entre tres importantes disruptores endocrinos, como son el Bisfenol A, presente en numerosos envases de comida y bebida que consumimos habitualmente, el Tributilestaño, un potente biocida bioacumulado en numerosas especies acuáticas que forman parte de nuestra dieta, y el Triclosán, presente en muchos de nuestros productos de higiene que usamos a diario. Con ello queremos determinar posibles efectos sinérgicos o aditivos entre ellos que puedan estar consecuentemente afectando al desarrollo de la diabetes.

Para lograr estos objetivos empleamos la línea celular INS-1E, formada a partir de células β de insulinoma de rata, a las cuales tratamos con los diferentes disruptores endocrinos durante 72 horas antes de comprobar la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT.

Los resultados evidenciaron tanto en la mezcla con Bisfenol A y Tributilestaño, como de Bisfenol A con Triclosán, que no existe ningún tipo de sinergia, aditividad o antagonismo entre ellas.

Palabras clave: Mezclas de disruptores endocrinos, Célula β , Viabilidad celular, Bisfenol A, Tributilestaño, Triclosán.

Abstract and keywords

The endocrine system controls numerous physiological and homeostasis processes. In our daily life we are exposed to a multitude of exogenous chemical substances and some of them, which are known as endocrine disruptors, are able to interact with the endocrine system and producing adverse effects on the organism of an individual or his progeny. In recent years, studies in cellular and animal models, as well as epidemiological studies in humans, suggest that endocrine disruptors could be an important factor in the development of diabetes mellitus, one of the most prevalent diseases nowadays. Despite this advance in THE knowledge between exposure to endocrine disruptors and diabetes, there's only a small number of studies that focus on the effects to the exposure to several of these substances at the same time; just as it happens in our daily lives.

In this work we studied the effects on cell viability of pancreatic β cells by exposing them to a mixture of three important endocrine disruptors, such as the Bisphenol A, WHICH IS present in many food and drink packages that we usually consume, the Tributyltin, a powerful biocide which is still being bioaccumulated in numerous aquatic species WHICH ARE part of our diet, and THE Triclosan, which is present in many of our hygiene products that we utilize daily. With this we want to determine possible synergistic or additive effects between them that may be consequently affecting the development of diabetes.

To achieve these objectives, we used the INS-1E cell line, made up of rat insulinoma β cells, which were treated with the different endocrine disruptors for a duration of 72 hours before checking cell viability using the MTT assay.

The results showed in both, the mixture with bisphenol A and Tributyltin, and the one of bisphenol A with Triclosan, that there is no type of synergy, additivity or antagonism between them.

Keywords: Endocrine disruptor mixtures, β cell, Cell viability, Bisphenol A, Tributyltin, Triclosan.

Abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADP: Adenosín difosfato

BPA: Bisfenol A

bw: Peso corporal

Cf: Concentración Final

CYT: Citoquinas

DMSO: Dimetilsulfóxido

E2: 17 β -estradiol

ER: Receptor de Estrógenos

FBS: Fetal Bovine Serum

GPGR: Receptor 1 de Estrógeno
acoplado a Proteína G

IFN- γ : Interferón Gamma

IL-1: Interleuquina 1 β

JNK: Quinasa c-Jun N-terminal

LEC: Concentración Letal
Efectiva

MAPK: Proteínas Quinasas
Activadas por Mitógenos

NOEC: Concentración Sin Efecto
Observado

NT: No Tratado

PBS: Tampón Fosfato Salino

PFO's: Compuestos Orgánicos
Fluorados

POP's: Compuestos Órgano
Persistentes

RPMI: Roswell Park Memorial
Institute

ROS: Especies Reactivas de
Oxígeno

TCS: Triclosán

TBT: Tributilestaño

Vf: Volumen Final

Vmedio: Volumen de Medio de
cultivo

Índice

1. Introducción y Antecedentes	7
1.1. Introducción a los disruptores endocrinos	7
1.2. Importancia del estudio de mezclas de disruptores endocrinos	9
1.3. Efecto de los disruptores endocrinos en la diabetes mellitus	10
1.4. Características e importancia de los disruptores endocrinos a estudiar	14
2. Objetivos	25
3. Procedimiento experimental	26
3.1. Pase y siembra celular	26
3.2. Tratamientos	32
3.3. Ensayo MTT	38
3.4. Análisis Estadístico	39
4. Resultados	40
4.1. Puesta a punto de la medida de viabilidad en células INS-1E	40
4.2. Efecto de varios disruptores endocrinos sobre la viabilidad de las células INS-1E	41
4.3. Efecto de una mezcla de disruptores endocrinos sobre la viabilidad de las células INS-1E	44
5. Discusión	48
5.1. Bisfenol A	48
5.2. Tributilestaño	49
5.3. Triclosán	50
5.4. Mezclas	51
6. Conclusiones	53
7. Bibliografía	54

1.Introducción

1.1. Introducción a los disruptores endocrinos

El correcto funcionamiento del sistema endocrino condiciona nuestro estado de salud. Este sistema se basa en una serie de mensajeros químicos llamados hormonas, producidas por una serie de glándulas endocrinas que se distribuyen por todo el cuerpo (**Figura 1**) y viajan a través del torrente sanguíneo hacia los órganos y tejidos diana. Las hormonas regulan muchos de los procesos fisiológicos y funciones homeostáticas de nuestro organismo, tales como: la concentración de glucosa en sangre, la diferenciación celular, el crecimiento y la función de los órganos reproductores, el crecimiento corporal y la producción de energía, e incluso afecta al sueño y al estado de ánimo (EPA, s.f.; Gore *et al.*, 2015; WHO, 2013). Sin embargo, ciertas sustancias químicas son capaces de alterar el funcionamiento normal del sistema hormonal, llegando a provocar graves efectos adversos para la salud. A estas sustancias se las conoce como disruptores o alteradores endocrinos (ECHA, 2014).

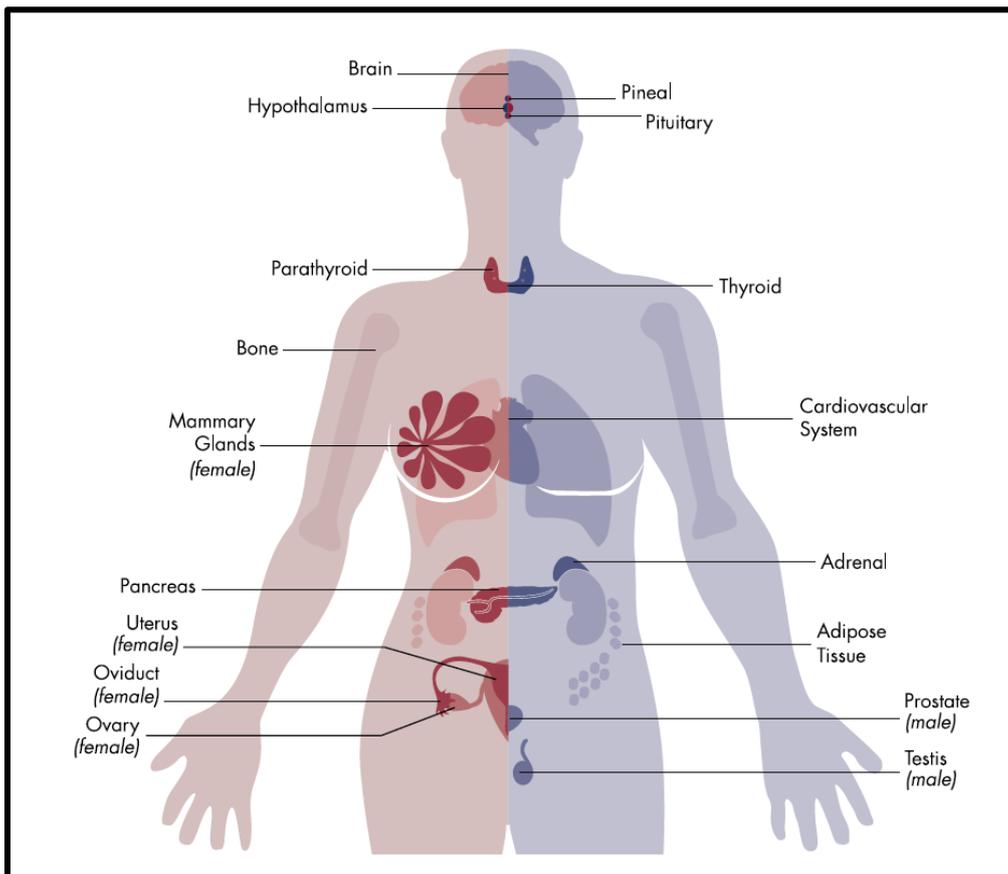


Figura 1. Diagrama de las principales glándulas endocrinas del cuerpo humano en mujeres (izquierda) y hombres (derecha). Fuente: Gore *et al.*, 2015.

La OMS en 2002 publicó la “Evaluación mundial del estado de la ciencia de los disruptores endocrinos” donde se definió un disruptor endocrino como una “sustancia exógena o conjunto de ellas que interacciona con el sistema endocrino, produciendo efectos adversos sobre el organismo de un individuo o su progenie” (WHO, UNEP & ILO, 2002). Una década después, la OMS, junto con el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP) publicaría el “State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals – 2012”, que hasta el día de hoy es el informe más detallado elaborado sobre los efectos de los disruptores endocrinos en la salud publicado por una organización pública mundial. En este informe se destaca como los conocimientos y la comprensión científica sobre los disruptores endocrinos durante la década anterior a su publicación ha avanzado considerablemente. No obstante, cabe destacar que ya ha pasado otra década desde su publicación durante la cual han avanzado los conocimientos todavía más, sobre todo en el papel que tienen en el desarrollo de patología complejas, como la obesidad y la diabetes mellitus.

Los disruptores endocrinos se relacionan con al menos siete patologías importantes (Gore *et al.*, 2015). Una de ellas es la infertilidad, tanto en hombres como en mujeres, pero también, patologías de la glándula tiroides, alteraciones del desarrollo neurológico, cánceres hormono-dependientes, trastornos suprarrenales, desórdenes del sistema inmune, diabetes mellitus, obesidad y enfermedades cardiovasculares. También, existe cada vez más preocupación por la exposición materna, fetal e infantil a los disruptores endocrinos, porque son los periodos de mayor vulnerabilidad, donde se producen efectos a dosis más bajas y que además son duraderos, es decir, no son reversibles (Gore *et al.*, 2015).

El hecho de que actúen en etapas del desarrollo, como el embarazo o la infancia hace que los posibles efectos se manifiesten mucho tiempo después de haberse producido la exposición. Esto genera unos de los principales problemas en los estudios con humanos, la dificultad para demostrar causalidad entre los efectos dañinos y la exposición a los disruptores endocrinos. Los efectos en la salud de la exposición de un feto a estas sustancias químicas pueden no llegar a mostrarse hasta que son adultos o incluso no manifestarse hasta futuras generaciones (ECHA, 2014).

Los disruptores endocrinos no solo afectan a la salud humana, sus efectos en la naturaleza también son considerables, habiéndose demostrado alteraciones en el sistema endocrino de moluscos, crustáceos, peces, reptiles, pájaros y mamíferos de todas partes del mundo (WHO/UNEP, 2013). Los disruptores endocrinos suponen un grave riesgo para la supervivencia de algunas especies donde sus poblaciones se han visto menguadas por la exposición a estos compuestos (ECHA, 2014).

Como resultado del avance en el conocimiento de los efectos deletéreos de los disruptores endocrinos, su reducción y sustitución por alternativas más seguras se ha convertido en una absoluta prioridad para las agencias gubernamentales de todo el mundo. Según el Reglamento REACH (Registro, Evaluación, Autorización y Restricción de sustancias y mezclas químicas) de la Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas (ECHA, de sus siglas en inglés), los disruptores endocrinos pueden identificarse como sustancias extremadamente preocupantes, una categoría que comparte junto con las sustancias carcinogénicas, mutagénicas y tóxicas para la reproducción. Además, este mismo Reglamento estipula que toda sustancia activa que se demuestre que puede afectar al sistema endocrino no se podrá aprobar para su uso, salvo que el riesgo de exposición sea “desdeñable” o esta sustancia sea imprescindible para “prevenir o controlar un grave peligro para la salud humana o animal, o el medio ambiente” (ECHA, 2014).

1.2. Importancia del estudio de mezclas de disruptores endocrinos

Por regla general, tanto los seres humanos, como la vida silvestre se exponen a mezclas complejas de compuestos químicos. Por lo tanto, uno de los factores más importantes y de mayor interés en el estudio de los disruptores endocrinos es como afecta a los seres vivos la exposición a varios de estos compuestos al mismo tiempo. Los conocimientos sobre las mezclas a las que nos exponemos en nuestra vida cotidiana son muy limitados y menos aún conocemos que efectos provocan en nuestro sistema endocrino. El motivo de esta falta de conocimiento se debe a la dificultad de realizar estudios científicos sobre la mezcla de estos compuestos, dado que hay que tener en cuenta las posibles sinergias entre disruptores endocrinos y sustancias distintas a estas, o con otros factores externos como el estrés ambiental, biológico o físico (WHO/UNEP, 2013). Tal como apuntan Silva, Rajapakse & Kortenkamp (2002) en su trabajo sobre la mezcla de 8 xenoestrógenos, existe cierta problemática en este tipo de estudios por la reproducibilidad de los bioensayos, la naturaleza de los componentes de la mezcla ha de ser muy similar para poder realizar predicciones correctas y el análisis de los efectos se ha de realizar a todos los niveles de organización, desde el nivel molecular hasta a nivel de organismo.

El informe de 2012 de la OMS sobre el estado de la ciencia de los disruptores endocrinos 2012 (WHO/UNEP, 2013) recalca la importancia de realizar estos estudios y que hacen falta nuevos enfoques para examinar los efectos de mezclar varios disruptores endocrinos, con el fin de evaluar los efectos en la salud humana bajo la exposición a estas mezclas. Además, se señala que al estudiar individualmente estos compuestos existe el riesgo de subestimar

la exposición simultánea a varios disruptores. También, se destaca que deben incrementarse los estudios animales de causa efecto para la exposición a mezclas de disruptores endocrinos, para poder extrapolarlos a los seres humanos, ya que estos estudios no se pueden realizar en personas.

En el presente trabajo nos hemos centrado en el estudio de cuáles son los efectos en la viabilidad de las célula β pancreática, responsables de la secreción de insulina, al exponerlas a una mezcla entre el Bisfenol A, un disruptor endocrino presente en nuestra vida cotidiana y que está relacionado con la diabetes (Alonso-Magdalena *et al.*, 2010), y otros dos disruptores endocrinos a los que estamos ampliamente expuestos como son el Tributilestaño (Sousa *et al.*, 2014) y el Triclosán (Dann & Hontela, 2011).

1.3. Efecto de los disruptores endocrinos en la diabetes mellitus

1.3.1. Introducción a la diabetes mellitus

Según datos de 2014 de la OMS, 422 millones de adultos en todo el mundo sufrían diabetes, lo que supone un 8.5% de toda la población adulta del planeta. La prevalencia de esta enfermedad ha ido en continuo aumento, hace 40 años, en 1980 había 108 millones de personas afectadas (4.7% de la población adulta) (WHO, 2016; WHO, 2021). Este continuo incremento se puede apreciar en la **Figura 2**, los casos siguen aumentando año tras año hasta el día de hoy y según estimaciones de la Federación Internacional de la Diabetes para 2045, 700 millones de personas en el mundo sufrirán diabetes (IDF, 2019b). En cuanto a la prevalencia de esta enfermedad a lo largo del mundo, como podemos ver en la **Figura 3** los porcentajes más altos en población adulta los encontramos en Oriente medio y el norte de África, en Norte América y en el sureste asiático (IDF, 2019a).

En cuanto a la letalidad, esta ha ido aumentando constantemente a lo largo del tiempo, pasando de ser la causa directa de la muerte de 1.5 millones de personas en 2012 a 1.6 millones en 2016 (WHO, 2016; WHO, 2021). Además, a los datos de 2012 hay que sumarle otras 2.2 millones de muertes provocadas por enfermedades derivadas de la hiperglucemia, como ataques cardíacos, accidentes cerebrovasculares o insuficiencia renal (WHO, 2016). Con estos datos, la diabetes se convierte en una de las enfermedades no transmisibles más letales del mundo (WHO, 2021).

El incremento de los casos de diabetes a nivel mundial comúnmente se relaciona con factores como el sobrepeso o la obesidad derivados de un estilo de vida y alimentación no saludable. En este trabajo ponemos el foco en un factor ambiental muy importante, la exposición a disruptores endocrinos. Estas sustancias son capaces tanto de provocar daños

directamente sobre los órganos implicados en la regulación de la glucosa, como de inducir obesidad que indirectamente acabará ocasionando la diabetes.

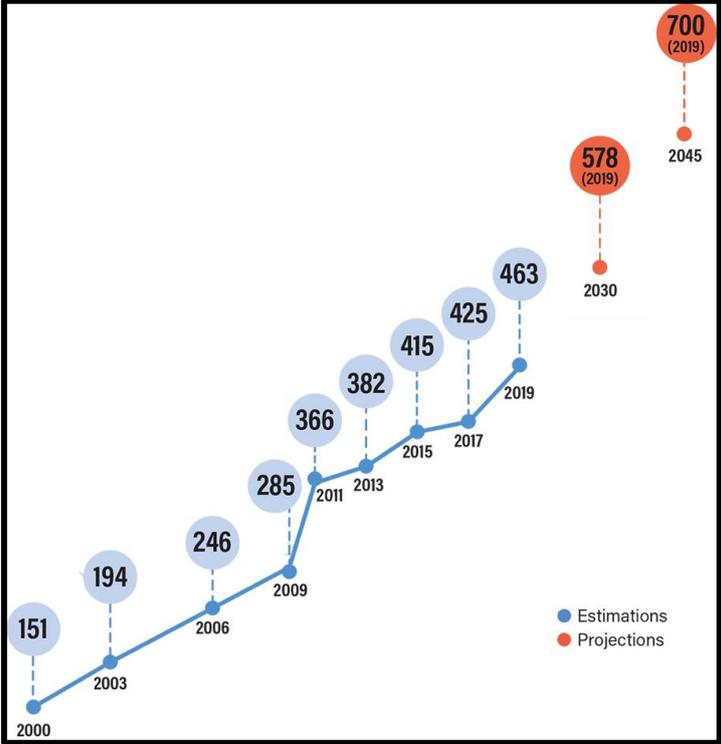


Figura 2. Gráfica sobre la evolución en los últimos 20 años del número estimado de adultos con diabetes en el mundo (en azul) y la proyección a futuro de la evolución de la enfermedad (en naranja). Fuente: IDF, 2019b.

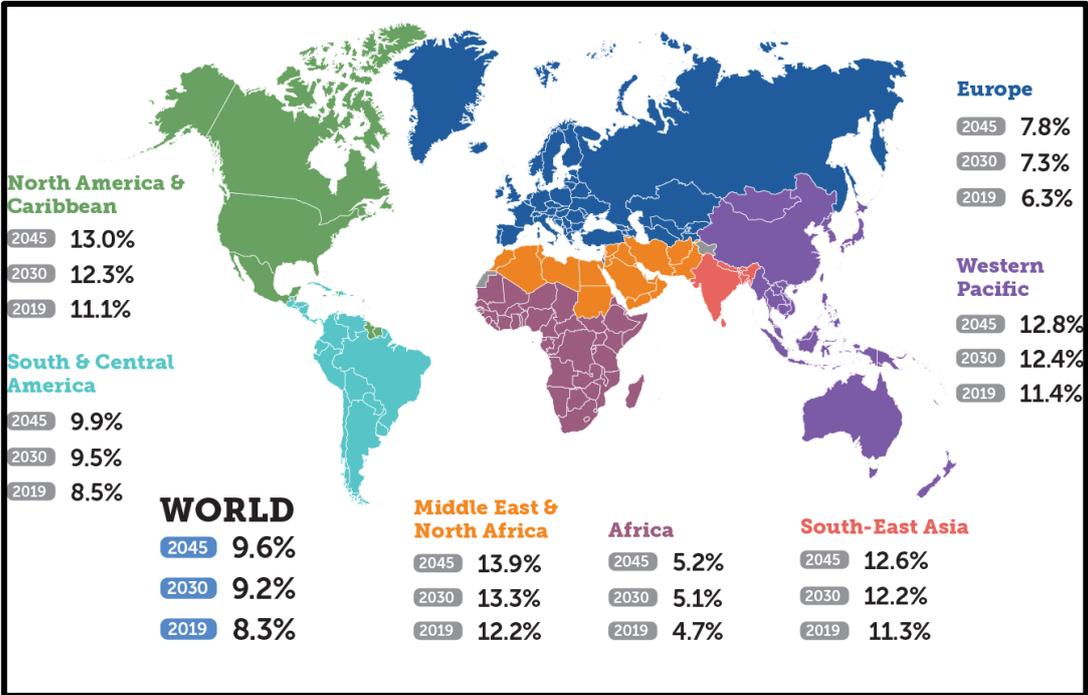


Figura 3. Porcentajes actuales y previsiones de futuro de la prevalencia de la diabetes en adultos por regiones del mundo. Fuente: IDF, 2019a.

1.3.2. La diabetes tipo 2 y los disruptores endocrinos

La diabetes tipo 2 supone el 90% de los casos mundiales de diabetes antes mencionados. Esta se caracteriza por un uso ineficaz de la insulina. Esta hormona se encarga de regular la cantidad de glucosa en sangre y es producida por las células β de los islotes de Langerhans del páncreas endocrino. Este tipo de diabetes es el resultado de una resistencia a la insulina, que se caracteriza por una mala respuesta o asimilación de las células de los músculos, tejido adiposo e hígado a esta hormona. Esto dificulta la absorción de la glucosa, lo que puede acabar ocasionando un aumento excesivo de la glucosa en sangre (hiperglucemia). En respuesta a esto el páncreas produce más insulina para intentar que las células dianas puedan absorber la glucosa de la sangre y así restablecer los niveles necesarios para el correcto funcionamiento del organismo. De no ser posible revertir la correcta regulación de la glucosa, se producirán graves daños para nuestro cuerpo, especialmente en el sistema nervioso y vascular (NIH, s.f.; WHO/UNEP, 2013).

El papel de los disruptores endocrinos en la etiología de la diabetes y la obesidad puede ser explicada mediante la hipótesis del diabetógeno y obesógeno (Gore *et al.*, 2015). La hipótesis del diabetógeno sugiere que todo “disruptor endocrino en sangre capaz de producir resistencia a la insulina, independientemente de su potencial obesogénico y su acumulación en adipocitos, puede ser considerado un factor de riesgo de diabetes tipo 2” (Gore *et al.*, 2015). Como diabetógenos, los disruptores endocrinos se dirigen directamente a las células implicadas en la regulación de la glucosa en sangre (**Figura 4**). Por un lado, pueden afectar a los islotes de Langerhans, alterando la síntesis natural de insulina y generando hiperinsulinemia o hipoinsulinemia. Por otro lado, estos compuestos pueden generar resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa en el tejido adiposo, las células hepáticas y en el músculo esquelético. Todas estas alteraciones acaban conduciendo al desarrollo de la diabetes tipo 2 (Gore *et al.*, 2015).

La hipótesis de los obesógenos sugiere que la exposición a ciertos disruptores endocrinos durante la etapa prenatal o temprana del individuo puede inducir obesidad (Grün *et al.*, 2006a; Janesick & Blumberg, 2011; Janesick & Blumberg, 2012). La obesidad es ocasionada por un desequilibrio entre la energía adquirida por los alimentos y la gastada, lo que lleva a una excesiva acumulación de lípidos en el tejido adiposo y a una expansión de este (Gray & Vidal-Puig, 2007). Cualquier alteración en el tejido adiposo que evite que este pueda seguir expandiéndose u ocasione una pérdida de función puede contribuir al desarrollo de la obesidad y a las complicaciones metabólicas como la diabetes (Virtue & Vidal-Puig, 2010). Tal como apuntan Gore *et al.* (2015) en su revisión, la obesidad es un factor de riesgo importante para la diabetes tipo 2, ya que esta es puede causar resistencia

a la insulina e intolerancia a la glucosa, lo que supone que la exposición a obesógenos es un riesgo indirecto el desarrollo de la diabetes tipo 2 (**Figura 4**).

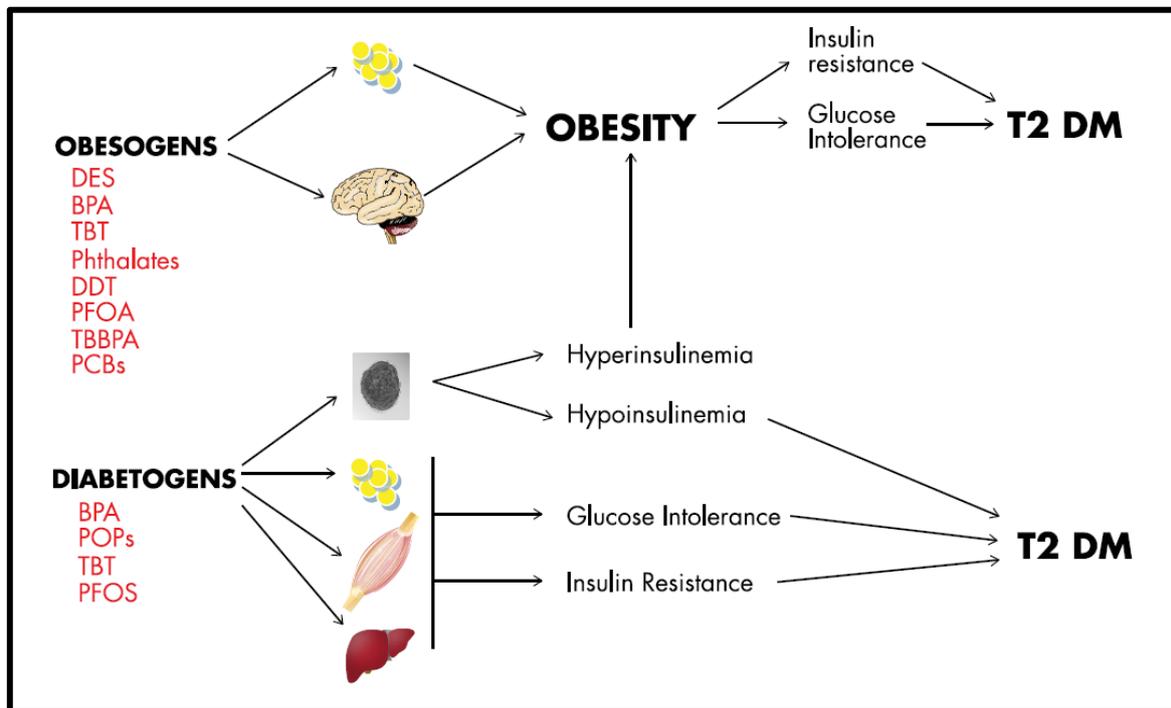


Figura 4. Esquema de los efectos de los disruptores endocrinos obesógenos y diabetógenos en el desarrollo de la obesidad y la diabetes tipo 2. Los obesógenos actúan sobre los tejidos adiposos y el cerebro. Los diabetógenos actúan en los islotes de Langerhans, los tejidos adiposo, el músculo esquelético y las células hepáticas. Fuente: Modificado de Gore et al., 2015.

Los estudios epidemiológicos, en cultivos celulares y en animales con varios disruptores endocrinos corroborarían estas dos hipótesis. De estos destacamos el BPA (Alonso-Magdalena *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2011), los Contaminantes Orgánicos Persistentes (POP's) (Lee *et al.*, 2014), el TBT (Kirchner *et al.*, 2010), los compuestos orgánicos fluorados (PFOs) (Wan *et al.*, 2014), las dioxinas (Novelli, Piaggi & De Tata, 2005) o el arsénico (Díaz-Villaseñor *et al.*, 2006).

1.3.3. La diabetes tipo 1 y los disruptores endocrinos

La diabetes tipo 1 es una enfermedad producida por la muerte de las células β pancreáticas (normalmente los enfermos han perdido entre el 80 y el 90% de estas en el momento del diagnóstico), debido a una respuesta autoinmune selectiva sobre estas células. Esto conlleva a una no producción de la hormona insulina, no pudiéndose reducir la cantidad de glucosa en sangre y con ello acabar ocasionando una hiperglucemia en los pacientes.

Además, hay que recalcar que esta es la enfermedad autoinmune con más prevalencia entre los menores de edad, y que los datos epidemiológicos destacan que la edad a la que comienza a manifestarse esta diabetes es cada vez menor (WHO/UNEP, 2013 citando a Ziegler et al., 2011).

Sin embargo, se ha investigado poco sobre el papel potencial del desarrollo de la diabetes tipo 1 y la exposición a disruptores endocrinos. Los pocos estudios se limitan a una pequeña cantidad de compuestos químicos y ninguno a estudios prospectivos a largo plazo (Howard, 2018 citando a Bodin, Stene, & Nygaard, 2015; Howard & Lee, 2012). Las sustancias a destacar y con las que se cuenta con estudios son los PCB's (Timme-Laragy *et al.*, 2015), los ftalatos (Jacobs *et al.*, 2018), los PFOS (Sant *et al.*, 2017), el arsenico (Grau-Pérez *et al.*, 2017) y el BPA (Bodin *et al.*, 2013).

Además, se conoce que los disruptores endocrinos pueden presentar propiedades inmunotóxicas, con lo que podría suponer alteraciones en mecanismos inmunitarios y endocrinos claves en el desarrollo de la diabetes tipo 1 (WHO/UNEP, 2013 citando a Cooper *et al.*, 2009).

1.4. Características e importancia de los disruptores endocrinos a estudiar

A continuación, una vez visto la importancia de los disruptores endocrinos en la diabetes, pasaremos a describir las características e importancia de cada uno de los compuestos químicos que estudiaremos este trabajo. Con el fin de evidenciar sus riesgos para la salud y servir de marco para comprender mejor los posibles efectos en la viabilidad celular que tendrán estos compuestos cuando se combinen entre ellos.

1.4.1. Bisfenol A

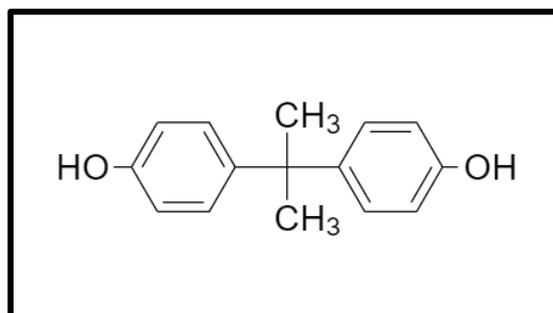


Figura 5. Molécula de Bisfenol A. Fuente: Dann & Hontela, 2011.

El Bisfenol A (**Figura 5**), es un compuesto que forma parte de los plásticos que conforman muchos de los envases de comida y bebidas (Barnes et al., 2009). El hecho de estar tan presente en nuestras vidas ha propiciado que se hayan elaborado una gran cantidad de estudios en los cuales se han examinado su relación con la diabetes. Por ejemplo, un estudio muestra como a las concentraciones más altas de BPA, detectadas en muestras de orina de estadounidenses, existe una asociación con la diabetes y la alteración de la función hepática (WHO/UNEP, 2013 citando a Lang et al., 2008).

Los estudios *in vivo* nos muestran que el BPA es capaz de imitar los efectos del estrógeno natural 17β -estradiol (E2) en las células β sobre la homeostasis de la glucosa en sangre, gracias a la activación de los receptores de estrógenos (Alonso-Magdalena et al., 2006; Alonso-Magdalena et al., 2008). La alta exposición a este compuesto está relacionada con el aumento en el contenido de insulina de las células β , que deriva en una alteración en la tolerancia hacia la insulina, convirtiéndose así en un factor de riesgo del desarrollo de diabetes (Alonso-Magdalena et al., 2006; Alonso-Magdalena et al., 2010). Si nos fijamos en las evidencias halladas en la exposición a este compuesto durante la gestación, observamos que el BPA es capaz provocar el mal desarrollo del páncreas en los primeros años de vida del individuo, aumentando la división celular de las áreas con células β (García-Arévalo et al., 2016) y el número de agrupaciones de células en los islotes de Langerhans (Whitehead et al., 2016). Esta alteración en las células β de los islotes conduce a los individuos a una hiperinsulinemia, lo que a su vez provoca una señalización excesiva de insulina que conlleva a alteraciones graves de la regulación de glucosa en sangre en individuos adultos (García-Arévalo et al., 2016).

Los estudios en animales evidencian que la exposición al BPA es capaz de producir una serie de efectos negativos transgeneracionales, efectos negativos que se transmiten a la siguiente generación cuando esta se encuentra en el útero de la madre, relacionados con la regulación de la glucosa en sangre. Por ejemplo, estudios con animales evidencian que exponer a ratonas preñadas a BPA no solo provocó una disminución de la tolerancia a la glucosa y un aumento de la resistencia a la insulina durante la gestación, si no que esta continuó aumentando meses después del parto. Además, este mismo estudio mostró también que estos efectos se hacían patentes en los ratones macho adultos que se habían expuesto al BPA mientras se encontraban en el útero de sus madres (Alonso-Magdalena et al., 2010). Por otra parte, se ha demostrado que la exposición materna en ratas a BPA produjo en la segunda generación masculina (la descendencia masculina de los individuos que se expusieron a este compuesto cuando estaban en el útero de sus madres) una disminución de la secreción de insulina, cambios epigenéticos y una disminución de la masa de célula β en los islotes Langerhans (Mao et al., 2015). En otro estudio de Alonso-

Magdalena confirma estas evidencias, las hembras preñadas desarrollaron intolerancia a la glucosa y pérdida de función, y masa de las células β hasta 7 meses después de producirse el parto (Alonso-Magdalena *et al.*, 2015).

En cuanto a estudios en ratones adultos, la cantidad de Bisfenol A a la que fueron expuestos y el tiempo de exposición determinaron los efectos sobre los islotes. En tratamientos de cuatro días, el BPA aumento la liberación de insulina en respuesta a la glucosa (Alonso-Magdalena *et al.*, 2006). Mientras que en tratamientos más largos (20 días) se produjo una alteración en la expresión génica, un aumento de la apoptosis y una disminución de la secreción de insulina en las células β (Ahangarpour *et al.*, 2016).

Por otra parte, los pocos estudios que relacionan el BPA con la diabetes tipo 1, muestran tanto en machos como en hembras de ratones no obesos diabéticos (NOD), que la exposición en el agua a este compuesto en las primeras 12 semanas de vida ocasionó inflamación de los islotes de Langerhans (insulinitis) e hiperglucemia (Bodin *et al.*, 2013). Un año después, el mismo autor demostró en ratones hembra NOD que se expusieron al BPA mientras estaban en el útero de sus madres (exposición transmaternal), un aumento en la gravedad de la insulinitis y la incidencia de diabetes a las 20 semanas de vida. Además de observar un aumento de la apoptosis en las células α y β pancreáticas, vitales ambas para la regulación de la glucosa en sangre, y en los macrófagos clave en la respuesta autoinmune (Bodin *et al.*, 2014).

El Bisfenol A actúa principalmente como un estrógeno, aunque puede utilizar otros modos de acción (Wetherill *et al.*, 2007). La estrogenicidad se define como la capacidad que tiene una sustancia química exógena de unirse a los receptores de estrógenos (ER α y ER β) de las células y actuar como factores de transcripción de elementos de respuesta estrogénica en el ADN (Matthews, *et al.*, 2001) En el caso del BPA tradicionalmente se le ha considerado como xenoestrógeno débil, los estudios revelan que la afinidad de este compuesto por los receptores de estrógenos era 10.000 veces inferior y su potencia estrogénica era entre 1000 y 5000 veces menor, comparándolo con el 17 β -estradiol (E2) (Nadal *et al.*, 2018 citando a Kuiper *et al.*, 1998). Esto conlleva que los efectos del BPA solo estarían presentes a dosis altas, del orden micromolar (Nadal *et al.*, 2018). Sin embargo, en la actualidad hay cada vez más estudios que ponen en entredicho que esta sustancia sea un estrógeno débil, demostrando que el BPA puede tener la misma estrogenicidad que el E2 a dosis bajas, del orden nanomolar (Nadal *et al.*, 2018 citando a Steinmetz *et al.*, 1997; Vom Saal *et al.*, 1997). Este hecho podría explicarse por respuestas estrogénicas extranucleares rápidas (Nadal *et al.*, 2018). Estudios recientes han demostrado que estas respuestas rápidas y esta aparición de efectos adversos a dosis bajas de BPA podrían deberse al papel

que juega el Receptor 1 de estrógeno acoplado a proteína G (GPER). Este receptor permitiría generar respuestas biológicas de forma rápida al no necesitar una respuesta genómica (Nadal *et al.*, 2018).

Todo esto, abre la puerta a una comprensión mejor sobre los efectos a dosis bajas y obliga a las autoridades de control de productos químicos a estar en alerta ante este tipo de compuestos y a que se produzcan cambios importantes en la legislación vigente (Nadal *et al.*, 2018 citando a Vandenberg, 2014; Birnbaum *et al.*, 2012).

Peligro toxicológico

El 4,4'-(propano-2,2-diil)difenol, también conocido como Bisfenol A (BPA) está clasificado según la Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas (ECHA, de sus siglas en inglés) en su clasificación y etiquetado armonizados, como una sustancia que puede dañar la fertilidad, causar daño ocular grave, puede causar una reacción alérgica en la piel y puede causar irritación respiratoria. Además, según la clasificación proporcionada por las empresas a la ECHA, estas señalan que el BPA puede dañar la fertilidad o el feto y es tóxica para la vida acuática con efectos duraderos ECHA (2021b).

El BPA está incluido en la lista de sustancias candidatas a ser altamente preocupantes (SVHC, de sus siglas en inglés) debido a sus propiedades tóxicas para la reproducción y de disrupción endocrina que pueden causar efectos adversos en la salud de las personas y en el medio ambiente. Según la normativa REACH de la ECHA, su uso está restringido en la UE como sustancia sola y en mezclas destinadas al consumo desde marzo de 2018, tal como detallaré en el siguiente apartado.

La clasificación que da la ECHA sobre la peligrosidad del BPA es la siguiente:

«*Eye Dam. 1, Skin Sens. 1, STOT SE 3, Repr. 1B*».

Regulación Europea

Según la ECHA (2020a), el BPA está incluido en el Plan de Acción Móvil Comunitario (CoRAP por sus siglas en inglés), lo que supone que un “Estado miembro la ha evaluado o evaluará en los próximos años”. Por otra parte, esta sustancia también es candidata, según la ECHA (2020b), a ser clasificada como una Sustancia Altamente Preocupante (SVHC). Estas sustancias se caracterizan por estar clasificadas como carcinógenas, mutágenas o tóxicas para la reproducción y/o ser sustancias persistentes, bioacumulables y tóxicas (PBT), o muy persistentes y bioacumulables (mPmB) (ECHA, 2020d).

La última regulación a nivel europeo del uso del BPA como componente de materiales u objetos en contacto con alimentos se recoge en el REGLAMENTO (UE) No 10/2011 DE LA COMISIÓN. En este se estipula un límite de 0,05 mg de BPA por kg de alimento, proveniente de la migración desde barnices o revestimientos aplicados a objetos en contacto con dichos alimentos. Además, este reglamento también recoge la prohibición de que se produzca la migración de cualquier concentración de BPA desde barnices o revestimientos aplicados a materiales y objetos destinados específicamente a entrar en contacto con alimentos para lactantes o niños de corta edad, tales como preparados para lactantes, alimentos elaborados a base de cereales o bebidas a base de leche.

Exposición

El BPA es el componente mayoritario del plástico de policarbonato, sus moléculas forman enlaces éster entre sí para crear este polímero. Este plástico está muy presente en nuestra vida cotidiana, con él se crean productos que entran en contacto con nuestros alimentos como vajillas, botellas o contenedores de almacenamiento de alimentos. Ahora bien, el problema surge cuando estos recipientes y envases son expuestos a sustancias ácidas o a aumentos de temperatura. En estas condiciones los enlaces éster son hidrolizados, liberando al ambiente los monómeros de BPA y permitiendo que migre este hasta los alimentos. A todo esto, hay que añadir que el Bisfenol A también lo podemos encontrar en forma de aditivo para conformar otros tipos de plásticos, como el PVC, el PET, el HDPE o el PS. Estos plásticos se emplean en la fabricación de electrodomésticos, botellas de agua, film y diversos envases de alimentos, de donde se pueden producir migraciones hasta los alimentos. También hay que destacar que aunque la principal fuente de exposición al BPA es la ingesta oral, hay cada vez más estudios que recalcan la importancia de la vía transdérmica por entrar en contacto nuestra piel con el papel térmico de tickets de la compra (recubiertos con BPA) (Nadal *et al.*, 2018).

Ahora bien, la migración que ocurre en botellas de agua ha sido en los últimos años una de las principales preocupaciones a nivel de salud pública. Por ello, son muchos los estudios que han medido la cantidad de BPA que migra desde los envases y que nos puede dar una idea de la cantidad a la que nos vemos expuestos diariamente a este compuesto. A continuación, se citarán varios de estos estudios que encontramos recogidos en la revisión bibliográfica de Pedersen *et al.* (2015). Por un lado, los análisis muestran que las tasas de migración de BPA varían en promedio entre los 1.84 y los 4.83 ng cm²/h (Cao & Corriveau, 2008a). Por otro lado, otro estudio del mismo autor (Cao & Corriveau, 2008b) constata que la concentración de BPA en el agua es de 1,7 a 4,1 µg/L, tras llenar dichas botellas con

agua hirviendo y medir un día después con el agua a temperatura ambiente. Además, estudios como el de Le *et al.* (2008) constatan que exponer a las botellas a agua hirviendo aumentaba en un factor de 55 la tasa de liberación de BPA, comparado con un factor de 15 que estaba presente con analizando el agua a temperatura ambiente. También hay que destacar que un mayor tiempo de uso de recipientes de plástico provoca una mayor migración de BPA al agua (Nam *et al.* 2010). Con todo esto se llega a la conclusión que una mayor exposición a altas temperaturas y un uso prolongado de las botellas o recipientes de plástico policarbonatado, aumentan la liberación de BPA al agua (Hoekstra & Simoneau, 2013).

Con todo estos resultados y muchos otros estudios, en enero de 2015 la EFSA (EFSA, 2019) determinó que la Ingesta Diaria Tolerable (TDI por sus siglas en inglés) no debe de superar los 4 µg/kg bw/día. Anteriormente se encontraba en los 50 µg/kg bw/día.

1.4.2. Tributilestaño

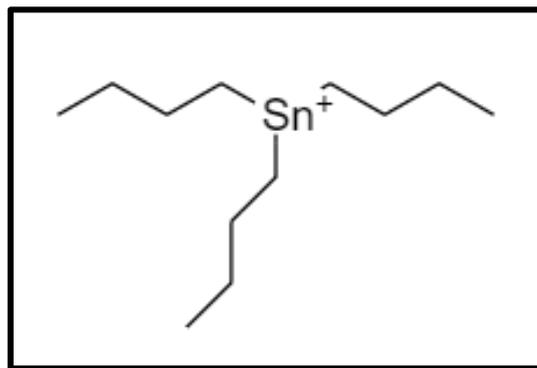


Figura 6. Molécula del catión de Tributilestaño. Fuente: ChemSpider, s.f.

El Tributilestaño (TBT) (**Figura 6**) en origen era un potente biocida empleado en pinturas antiincrustante en los cascos de los barcos. Sin embargo, este compuesto supuso ser altamente tóxico para la vida acuática, donde provoca una de las alteraciones endocrinas más importantes y estudiadas; el imposex (Sousa *et al.*, 2014). Este fenómeno se basa en una serie de anomalías sexuales permanentes en hembras de gasterópodos marinos. Por ello, tras numerosos estudios que demostraron estos efectos, finalmente en 2008 los organismos reguladores se vieron obligados a prohibir su uso en pinturas de barcos. Aun así, aún estamos lejos de librarnos por completo del TBT en nuestras vidas, ya que este sigue estando presente y acumulado en las aguas de todos los mares y océanos (Sousa *et al.*, 2014).

A parte de todos los peligros conocidos para las especies acuáticas, los estudios científicos destacan la peligrosidad del TBT en la salud. Tal como recoge en su revisión Alonso-Magdalena *et al.* (2018) hay suficientes estudios que demuestran que este compuesto organoestánnico produce graves daños en el páncreas. Por ejemplo, la exposición aguda al TBT ocasionó un aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células β , tanto en cultivos celulares como en islotes de ratón o humanos (Chen *et al.*, 2017). Los daños dependerán de las dosis, el sexo y la duración del tratamiento. Por un lado, un estudio de Zuo *et al.* (2014) mostró que ratones macho perdían proliferación de células en los islotes, mientras que aumentaba la apoptosis de las células que existían. Tras 60 días de tratamiento se comenzó a ver alteraciones a nivel metabólico, los niveles de insulina y glucagón en sangre comenzaron a disminuir, lo que a su vez aumento la cantidad de glucosa en sangre y además los individuos comenzaron a presentar resistencia a la insulina. Por su parte, los efectos en ratones hembra a exposiciones cortas mostraron una leve intolerancia a la glucosa, un desarrollo de hiperinsulinemia y un aumento en el número de islotes de Langerhans (Bertuloso *et al.*, 2015). Además de todo esto, hay estudios in vivo que destacan el papel del TBT como un posible obesógeno (Grün & Blumberg 2006b), lo que a su vez, y como ya se ha mencionado en este trabajo, podría derivar en el desarrollo de la diabetes.

Finalmente, hay que remarcar que, aunque estemos altamente expuesto en nuestra vida cotidiana al Tributilestaño aún nos queda mucho por conocer y comprender sobre los efectos en la salud humana, y como nos exponemos a él (Sousa *et al.*, 2014). Además de no existir apenas estudios que comprueban las posibles sinergias con otros compuestos disruptores endocrinos.

Peligro toxicológico

El tributilestaño (TBT, de sus siglas en inglés) es según la clasificación y etiquetado armonizados de la ECHA una sustancia tóxica si se ingiere, puede dañar la fertilidad o al feto, causa daños en los órganos por exposición prolongada o repetida, es muy tóxica para la vida acuática con efectos duraderos, es nocivo en contacto con la piel, provoca irritación ocular grave y provoca irritación cutánea (ECHA, 2021c).

El 100% de los registros de la REACH evidencian que se trata de una sustancia que es tóxica para la reproducción. Además, es reconocida por la UE como un compuesto persistente, bioacumulativo y tóxico (ECHA, 2021b).

La clasificación que da la ECHA sobre la peligrosidad del TBT es la siguiente:

«Acute Tox. 3, Acute Tox. 4, Skin Irrit. 2, Eye Irrit. 2, Repr. 1B, STOT RE 1, Aquatic Acute 1, Aquatic Chronic».

Regulación Europea

La sustancia es candidata según la ECHA (2021b) a ser clasificada como una Sustancia Altamente Preocupante (SVHC). Estas sustancias han de reunir los criterios de estar clasificadas como carcinógenas, mutágenas o tóxicas para la reproducción y/o ser sustancias persistentes, bioacumulables y tóxicas (PBT), o muy persistentes y muy bioacumulables (mPmB) y/o sustancia que producen un nivel equivalente de preocupación que las sustancias CMR o PBT/mPmB (ECHA, 2021d).

Además, pone como límite de concentración en ambientes acuáticos de 10 en factor de M, tanto en exposiciones crónicas como agudas. Esto equivale a una Concentración Letal Efectiva para el 50% de la población (LEC₅₀) mayor que 0.01 mg/L y menor o igual que 0.1 mg/L para la toxicidad aguada y a una Concentración Sin Efecto Observado (NOEC) mayor que 0.001 mg/L y menor o igual que 0.01 mg/L para la toxicidad crónica (ChemSafetyPRO, 2019).

A nivel europeo esta sustancia fue regulada en el REGLAMENTO (CE) No 782/2003 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO del 14 de abril de 2003 relativo a la prohibición de los compuestos organoestánicos en los buques:

El 1 de enero de 2003, para la prohibición de la aplicación de compuestos organoestánicos en los buques, y el 1 de enero de 2008, para la eliminación de la presencia de compuestos organoestánicos en los buques.

La legislación española acata el reglamento europeo 782/2003 sobre el TBT, además de incluir una legislación específica en el DOUE-L-2009-81005:

Los compuestos organoestánicos trisustituidos tales como los compuestos de tributilestaño (TBT) y trifenilestaño (TPT) no se utilizarán después del 1 de julio de 2010 cuando su concentración en el artículo, o en parte del mismo, supere el equivalente al 0,1 % en peso de estaño.

Exposición

La principal fuente de exposición de los humanos al TBT es la dieta, siendo la más importante la ingesta de marisco. En este sentido, según Müller *et al.* (2013), la exposición a este compuesto depende en gran medida del lugar del mundo donde se mida. En Japón según la WHO (1999b) en los años 1991 y 1992 se estimaba entre 6,9 y 6,7 $\mu\text{g}/\text{día}/\text{persona}$. Mientras tanto la EFSA (2004) calcula valores de 0,8 en Inglaterra y 2,6 $\mu\text{g}/\text{día}/\text{persona}$ en Corea. El mismo estudio habla de exposiciones de 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg pc}/\text{día}$ en noruegos que ingieren una gran cantidad de marisco (el percentil 95 de la población). Las concentraciones, por ejemplo, de este compuesto en ostras varían entre los 320 y los 1510 $\text{ng}/\text{g}-1$ de peso seco de la zona costera de Hsiangshan (China) (Antizar-Ladislao, 2008 citando a Chien, 2002).

Según Penninks (1993) el TDI basado en estudios de función inmunológica en ratas sería de 0.25 $\mu\text{g}/\text{kg pc}-1/\text{día}-1$, un valor que ha aceptado la WHO (WHO-IPCS, 1999).

1.4.3. Triclosán

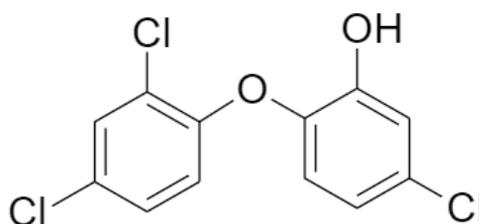


Figura 7. Molécula de Triclosán. Fuente: Dann & Hontela, 2011.

El triclosán (TCS) (**Figura 7**) es un compuesto antimicrobiano y antifúngica de amplio espectro que se emplea en la fabricación de muchos productos de higiene o de desinfección como pastas de dientes, desodorantes o jabones (Dann & Hontela, 2011). El uso de este compuesto en la vida cotidiana se considera seguro, existen potenciales peligros para la salud humana y del medio ambiente, como su capacidad de bioacumulación, la toxicidad para organismos acuáticos, el aumento bacterias resistentes a los antibióticos y sus efectos como disruptor endocrino (Dann & Hontela, 2011). Concretamente la capacidad del TCS de actuar como un disruptor endocrino se debe a que la estructura de su molécula tiene similitudes con las hormonas tiroideas y con otros disruptores endocrinos estrogénicos y

androgénicos. Pudiendo provocar así daños tanto en la homeostasis tiroidea como en las partes de nuestro cuerpo sensibles a hormonas sexuales (Dann & Hontela, 2011). Además, otros estudios apuntan a que esta sustancia podría provocar daños en las mitocondrias, especialmente en la células no renovables como las presentes en el páncreas (Ajao *et al.*, 2015).

Por ello, el principal motivo por el que se va a estudiar en este trabajo el efecto del TCS en la viabilidad celular de la célula β pancreática es por su posible sinergia con el BPA. Esta hipótesis nace a raíz de un estudio de 2020 donde se muestra que la exposición a TCS aumenta la expresión del receptor GPER (Huang *et al.*, 2020) y como ya se ha indicado en este trabajo, GPER es vital para que el BPA pueda tener efectos dañinos sobre la salud a dosis bajas (Nadal *et al.*, 2018).

Peligro toxicológico

El triclosán, según la clasificación y etiquetado armonizados de la ECHA, es clasificado como una sustancia muy tóxica para la vida acuática, como muy tóxica para la vida acuática con efectos duraderos, causa irritación ocular grave y provoca irritación cutánea (ECHA, 2021e).

Además, esta sustancia está siendo evaluada para comprobar si es persistente, bioacumulativa y tóxica. Y paralelamente se está intentando comprobar si se trata de un disruptor endocrino (ECHA, 2021e).

La clasificación que da la ECHA sobre la peligrosidad del TCS es la siguiente:

«*Skin Irrit. 2, Eye Irrit. 2, Aquatic Acute 1, Aquatic Chronic 1*».

Regulación europea

El Triclosán, al igual que el Bisfenol A, está incluido en el Plan de Acción Móvil Comunitario (CoRAP) lo que supone que un Estado miembro la ha evaluado o evaluará en los próximos años.

Además, pone como límite de concentración en ambientes acuáticos de 100 en factor de M, tanto en crónico como en agudo. Recordando que esto equivale a una Concentración Letal Efectiva para el 50% de la población (LEC₅₀) mayor que 0.001 mg/L y menor o igual que 0.01 mg/L para la toxicidad aguda y a una Concentración Sin Efecto Observado (NOEC) mayor que 0.0001 mg/L y menor o igual que 0.001 mg/L para la toxicidad crónica (ChemSafetyPRO, 2019).

En cuanto a legislación, tanto a nivel europeo como nacional, la sustancia está regulada por el REGLAMENTO (CE) No 1223/2009 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO del 30 de noviembre de 2009 sobre los productos cosméticos. En él se estipula que el triclosán como conservante en los productos cosméticos no debe de tener una concentración superior al 0,3 %.

Exposición

Según García-Yerena *et al.* (2016) la principal fuente de exposición de los humanos al TCS es mediante productos de limpieza, higiene o belleza, tales como pastas de dientes, enjuagues bucales, jabones, desodorantes, etc. Esto supone que estamos expuestos a este compuesto por la piel, las mucosas, por vía oral y posiblemente por vías aéreas. Se estima que estaríamos expuestos a 1.9 g/día de triclosán por vía oral (Rodricks *et al.*, 20010)., suponiendo que se produce una ingesta de entre un 5 y 40% de pasta dental del total usada diariamente (Sandborgh-Englund *et al.*, 2006). Por otro lado, se ha encontrado TCS en la leche materna a una concentración de entre 0.018 y 0.95 ng/g, lo que supone que un bebe de 4 kg de peso estaría ingiriendo 570 ng/día de esta sustancia, suponiendo bebe 150 mL/kg/día de leche materna (Allmyr *et al.*, 2006).

2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es comprobar los efectos en la viabilidad celular al exponer a las células β pancreáticas a una mezcla de disruptores endocrinos. Específicamente estudiaremos la mezcla de 3 importantes disruptores endocrinos como son el Bisfenol A, presente en numerosos envases de comida y bebida de nuestra vida cotidiana, el Tributilestaño, un potente biocida aún bioacumulado en numerosas especies acuáticas que forman parte de nuestra dieta, y el Triclosán, presente en muchos de nuestros productos de higiene en que usamos a diario. Concretamente estudiaremos los efectos en la viabilidad celular el Bisfenol A con diferentes concentraciones del rango nano molar de los otros dos compuestos. Con el fin de determinar posibles dinámicas de sinergia o antagonismo entre las parejas de compuestos que puedan estar consecuentemente afectando al desarrollo de la diabetes.

3. Procedimiento experimental

Este trabajo y toda la metodología de uso de cultivos celulares que a continuación se describe ha sido avalada por la Oficina de Investigación Responsable de la UMH, registrado con el Código de Investigación Responsable (COIR): TFM.MBB.ANNYLM.AAMV.210511.

Todos los experimentos fueron realizados con la línea celular INS-1E, proveniente de células aisladas de un insulinooma de rata inducido por rayos X (Asfari *et al.*, 1992). Cada semana se siembran placas completas de 96 pocillos con esta línea celular para realizar los experimentos de la semana siguiente.

3.1. Pase y siembra celular

El pase celular y la siembra de placas de 96 pocillos se realizará una vez a la semana, siempre el mismo día y a las mismas horas, para conservar la homogeneidad de las siembras y con ello de mis experimentos. Todo el procedimiento exceptuando, la centrifugación y el conteo de células al microscopio, se realizará en el interior de una cabina de seguridad biológica de flujo laminar vertical. Además, antes de empezar a trabajar en la cabina se deberá irradiar con luz ultravioleta 15 minutos y después limpiar la base y las paredes con jabón muy diluido y etanol al 70%. Todo el material que se use dentro de cabina habrá de ser desinfectado con etanol al 70% antes de introducirlo dentro de la misma.

- Materiales:
 - Medio completo para INS-1E con rojo fenol
 - RPMI 1640+ Glutamax (Gibco 61870-010)
 - FBS Inactivado 5% (Hyclone SV30160.03)
 - Hepes 10 mM (Gibco 15630-056)
 - Na Pyruvate 1 mM (Gibco 11360-039)
 - B-Mercaptoethanol 0.05 mM (Gibco 31350-010)
 - Penicilina Streptomycin 100 u/mL / 100 µg/ml (Gibco 15140-122)
 - Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (Biowest L0615-500)
 - Tripsina-EDTA 1X 0.05% (Gibco 25300-054)
 - Un flask de cultivo de 25 cm²
 - Una cámara de Neubauer (Preciss Europe ZMB027)
 - Una centrífuga *Eppendorf s702*
 - Un microscopio *Olympus ix71*

– Las placas P96 necesarias para los experimentos

- Metodología:

En primer lugar, atemperamos el medio, el PBS y la Tripsina en el baño a 37°C. Introducimos todo el material dentro de la campana previamente desinfectada y dejando para el final flask con las células. Retiramos el medio del frasco de cultivo con una pipeta serológica. Luego limpiamos las células con 3 mL de PBS con una pipeta serológica, vertiéndolo por la pared opuesta a las células y retirándolo inmediatamente. Seguidamente añadimos 1 mL de tripsina con una micropipeta P 1000 e introducimos el flask al incubador durante 3 minutos. Una vez pasado el tiempo, sacamos del incubador y damos dos golpes secos a la base del flask para desprender todas las células de la pared, valiéndonos de un microscopio podemos asegurarnos que todas han pasado a la tripsina. Rápidamente neutralizamos la Tripsina añadiendo 4 mL de medio completo con una pipeta serológica, rociando la pared donde estaban las células para asegurar que se despeguen todas. Pasamos el contenido del flask a un tubo de 15 mL con una pipeta serológica y centrifugamos 7 minutos a 1000 rpm en una centrífuga *Eppendorf Centrifuge 5702*. Mientras tanto, rotulamos el nuevo flask poniendo «nombre, fecha, un número más de pase que del que se parte, nombre de las células y número de células que siembras». Llevamos de nuevo al tubo de la centrífuga a la campana y se retira el medio vertiendo todo el contenido en un solo movimiento, sobre el recipiente de residuos sin tocarlo. Después, añadimos 1 mL de medio con una micropipeta P 1000 y resuspendemos las células pipeteando lentamente 5 veces. A continuación, debemos llevar el volumen hasta los 10 mL, con lo que nos valdremos de nuevo con una pipeta serológica, y con el tubo cerrado, giramos 5 veces despacio para mezclar.

Ahora bien, dependiendo de la cantidad de células sembradas deberemos diluir o no el medio con células para contarlas cómodamente en el microscopio. En el caso de haber 1.5 millones de células o menos no diluiremos y procederemos a extraer dos veces directamente del tubo 10 μ L para introducirlos en las dos ranuras cámara de Neubauer. En el caso opuesto haremos una dilución 1:2, que para ello se pasan 20 μ L del medio con células del tubo de 15 mL a un tubo de 0,2 mL y le añadimos otros 20 μ L de medio completo, de ahí sacaremos los 10 μ L para la cámara de Neubauer.

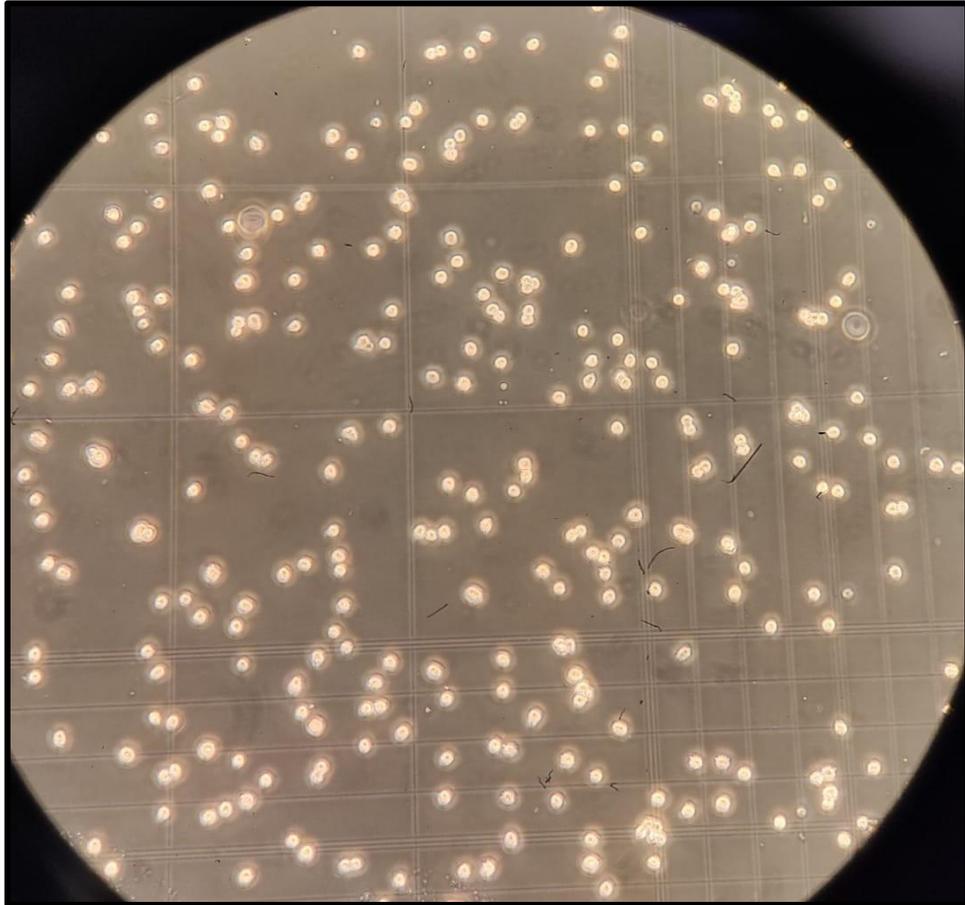


Figura 8. Fotografía al microscopio (10x) con el filtro PhL de las células INS-E en una cámara de Neubauer. En la imagen se puede apreciar parte de un cuadrante, formado por una cuadrícula de 5 x 5 y se paradas entre sí por varias líneas paralelas. Fuente: Elaboración propia.

A continuación, llevamos la cámara al microscopio, en donde contaremos la media de células [\bar{x} de células en los cuadrantes] vivas en los cuatro cuadrantes. Cada lado de la cámara está formado por cuatro cuadrantes separados por líneas paralelas, hay que contar al menos 4 cuadrantes de los 8 que dispone la cámara (**Figura 8**). A la hora de diferenciar las células vivas de las muertas, nos fijaremos en que las vivas deben tener una membrana refringente (al enfocar y desenfocar el campo las membranas producen refracción). Con todo esto, y sabiendo que el factor de dilución es 2 y que el factor de corrección del volumen de la cámara es 10,000, podremos calcular el número de células por mL:

$$\text{Número de células} \left(\frac{\text{cel}}{\text{mL}} \right) = 2 \times 10,000 \times \bar{x} \text{ de células en los cuadrantes}$$

PASE

A partir del resultado anterior podremos hallar el volumen de medio con células que debemos añadir al nuevo bote, así como la cantidad de medio que añadiremos para completar un volumen de 5 mL dentro del bote. Normalmente el número final de células que habrá en cada bote de 25 cm² está entre los 1,5 y 1,6 millones de células:

$$\begin{aligned} \text{Volumen del tubo con células para el pase (mL)} = \\ \frac{\text{Número de células/mL}}{\text{Número de células final en el bote}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Volumen de medio para el pase (mL)} = \\ 5 \text{ (mL)} - \text{Volumen del tubo con células para el pase (mL)} \end{aligned}$$

Una vez acabado los cálculos, añadimos el medio completo para INS-1E [*Volumen de medio para el pase (mL)*] a un tubo nuevo de 15 mL con una pipeta serológica de 5 mL. Luego resuspendemos las células con la misma pipeta o bien volteando el tubo lentamente. Pasamos el *Volumen del tubo para el pase (mL)* con la pipeta al tubo nuevo y mezclamos. Con la misma pipeta serológica transferimos el volumen del tubo sobre la base de la nueva botella, lo cerramos, tumbamos la botella suavemente para que el líquido se distribuya correctamente y lo llevamos a incubar a 37°C y 5% de CO₂. La botella no se deberá tocar en la siguientes horas para asegurar que se adhieran correctamente y empiecen a crecer.

SIEMBRA

En cuanto a la siembra de placas P 96, para realizar los cálculos se tendrán en cuenta la cantidad de placas a sembrar, el número de pocillos por placa y las células que se sembrarán en cada uno de los pocillos. El número de células será menor cuanto más tiempo vaya a pasar entre la siembra y el tratamiento de estas. Lo más común será añadir entre 15.000 y 20.000 células por pocillo. También a la hora de realizar los cálculos al número de total de pocillos a sembrar le añadiremos entre 4 y 6 pocillos teniendo en cuenta el error de pipeteo. Con ello, para realizar los cálculos partiremos del *Número de células/mL*:

$$\text{Número de total de células} = \text{Número de pocillos} \times \text{Número de células por pocillo}$$

$$\text{Volumen final (mL)} = \text{Número de pocillos} \times 200 \mu\text{L} \times 0.001$$

$$\text{Volumen del tubo con células para sembrar (mL)} = \frac{\text{Número de células/mL}}{\text{Número de total de células}}$$

$$\text{Volumen de medio para sembrar (mL)} = \text{Volumen final (mL)} - \text{Volumen del tubo con células para sembrar (mL)}$$

Ahora, igual que con el pase añadimos a un tubo de 50 mL los volúmenes correspondientes de medio completo para INS-1E [*Volumen de medio para sembrar (mL)*] y de medio con células [*Volumen del tubo con células para sembrar (mL)*] usando pipetas serológicas de 5 y 10 mL. Mezclamos los volúmenes con una pipeta de 10 mL. A continuación, si no se ha hecho antes, rotulamos las placas P 96 que vayamos a sembrar escribiendo «nombre, fecha, número de pase del que parte, nombre de la línea celular y número de células que siembras». Una vez todo listo procederemos a añadir pocillo por pocillo, valiéndonos de una micropipeta P200, 200 µL del tubo, homogenizando la dispersión de células cada dos columnas. Una vez acabada una placa le pondremos la tapa y llevamos las placas al incubador de 35°C y 5% de CO₂.

3.2. Tratamientos

Se realizaron 6 experimentos distintos, cuatro controles en los que analizaremos la viabilidad celular al exponer las células únicamente a uno de los compuestos en diferentes concentraciones y dos mezclas, donde combinaremos diferentes concentraciones de TBT y TCS con 1 nM de BPA. A continuación, se describirán los tratamientos que conformaban cada experimento y los materiales que emplearemos.

❖ Experimento 1 (Puesta a punto de la técnica con DMSO):

➤ Tratamientos:

- No tratado (Cambiamos el medio)
- DMSO (0.002%)
- DMSO (1%)
- DMSO (5%)
- DMSO (10%)
- DMSO (20%)

❖ **Experimento 2 (Control BPA):**

➤ Tratamientos:

- Vehículo (DMSO 0.01%)
- BPA (1 nM)
- BPA (1 μ M)
- Control positivo [Citoquinas: IL-1 β (10 u/mL) y IFN- γ (100 u/mL)]

❖ **Experimento 3 (Control TBT):**

➤ Tratamientos:

- Vehículo (DMSO 0.002%)
- TBT (1 nM)
- TBT (10 nM)
- TBT (100 nM)
- TBT (200 nM)
- Control positivo [Citoquinas: IL-1 β (10 u/mL) y IFN- γ (100 u/mL)]

❖ **Experimento 4 (Control TCS):**

➤ Tratamientos:

- Vehículo (DMSO 0.01%)
- TCS (1 nM)
- TCS (10 nM)
- TCS (100 nM)
- TCS (1 μ M)
- Control positivo [Citoquinas: IL-1 β (10 u/mL) y IFN- γ (100 u/mL)]

❖ **Experimento 5 (Mezcla TBT + BPA):**

➤ Tratamientos:

- Vehículo (DMSO 0.002%)
- BPA (1 nM)
- TBT (1 nM)
- TBT + BPA (1 nM + 1 nM)
- TBT (10 nM)
- TBT + BPA (10 nM + 1 nM)
- TBT (100 nM)
- TBT + BPA (100 nM + 1 nM)
- TBT (200 nM)

- TBT + BPA (200 nM + 1 nM)
- Control positivo [Citoquinas: IL-1 β (10 u/mL) y IFN- γ (100 u/mL)]

❖ **Experimento 6 (Mezcla TCS + BPA):**

➤ **Tratamientos:**

- Vehículo (DMSO 0.01%)
- BPA (1 nM)
- TCS (1 nM)
- TCS + BPA (1 nM + 1 nM)
- TCS (10 nM)
- TCS + BPA (10 nM + 1 nM)
- TCS (100 nM)
- TCS + BPA (100 nM + 1 nM)
- TCS (1 μ M)
- TCS + BPA (1 μ M + 1 nM)
- Control positivo [Citoquinas: IL-1 β (10 u/mL) y IFN- γ (100 u/mL)]

● **Materiales:**

- Medio completo para INS-1E con rojo fenol
- Bisfenol A (BPA) [4,4'-Isopropylidene diphenol] (MP Biomedicals)
- Tributyl estaño (TBT) [Tributyltin chloride] 96% (Aldrich)
- Triclosán (TCS) (Sigma)
- Alicuota con Dimethyl sulfoxide (DMSO) 99.9% (Sigma D8418)
- Botellitas de cristal
- Un microscopio Olympus ix71
- Una báscula de precisión (Mettler Toledo AG64)
- Placas sembradas de P96

3.3. Preparación de Stock's

Los stocks se prepararán nuevos cada semana y se almacenarán a -20°C para usarse varios días de la misma semana. Para preparar los stock's de BPA, TBT y TCS nos valdremos de botellitas de cristal y una báscula de precisión para pesar adecuadamente las sustancias. Empleamos botellitas de cristal y no de plástico para evitar que, tanto en la preparación de los stock's como a la hora de realizar los tratamientos, no se desprenda a la dilución compuestos de las paredes del recipiente. En los tres casos intentaremos introducir en cada botellita alrededor de 3 mg, el caso del BPA y el TCS al estar en forma de lentejas

nos valdremos de una cucharita metálica, para el TBT que es líquido usaremos un micropipeta P20, y pipetearemos 3 μL . Todos los stock's se prepararon disolviendo/diluyendo en DMSO los compuestos pesados. Por ello calcularemos a partir de la fórmula de la molaridad la cantidad de este compuesto que añadiremos a cada botellita para tener una molaridad de final de 10 nM:

$$\text{Volumen } (\mu\text{L}) = \frac{\text{masa de la sustancia (mg)}}{PM \left(\frac{\text{mg}}{\text{mmol}} \right) \times 10 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}}} \times 10^3$$

3.3.1. Preparación de los tratamientos

Ahora bien, para alcanzar la molaridad que deseamos para tratar las células, realizaremos diluciones en serie partiendo del correspondiente stock's. Usaremos botellitas de cristal y medio completo de INS-1E para realizar las diluciones; entre dilución y dilución agitaremos en el Vortex durante 5 segundos. Para preparar el vehículo procederemos de igual manera partiendo de una alícuota de DMSO, el mismo que usamos para diluir y preparar los stocks de los compuestos.

Por otro lado, para realizar los controles positivos de citoquinas usaremos una mezcla de Interleuquina 1 β (IL-1 β) humana a 10 unidades/mL e Interferón γ (IFN- γ) de rata a 100 unidades/mL. Las citoquinas están congeladas a -20°C en tubos a concentraciones de 30.000 unidades/mL (IL-1 β) y 140.000 unidades/mL (IFN- γ), antes de usarlas las descongelaremos lentamente en hielo y las mantendremos en él en todo momento.

En lo que respecta a los cálculos, todos los experimentos a excepción del primero usaremos una misma fórmula para realizar la diluciones en serie:

$$\text{Concentración inicial} \times \text{Volumen inicial} = \text{Concentración final} \times \text{Volumen final}$$

En el caso del primer experimento simplemente sustuiremos en la siguiente fórmula el porcentaje de DMSO [% de dilución] que queramos preparar para cada tratamiento y obtendremos la cantidad de DMSO que deberemos añadir a una botellita para preparar el tratamiento. Luego completaremos hasta el *Volumen final* con medio completo.

$$\text{Volumen de DMSO [Experimento 1]} = \frac{\text{Volumen final} \times \% \text{ de dilución}}{100}$$

A la hora de preparar los tratamientos, lo primero que habremos de hacer es revisar al microscopio las células de las placas P96 sembradas que vayamos a usar ese día para comprobar que estén en perfecto estado y que no haya contaminación o cualquier elemento que pueda alterar los resultados.

Una vez introduzcamos todos los materiales necesarios dentro de la cabina procederemos a realizar las diluciones en serie con botellitas de cristal para preparar los tratamientos de nuestras células. Una vez terminados procederemos a tratar las placas, para ello con una micropipeta P 200 retiraremos el medio de cada uno de los pocillos y lo sustituiremos por 200 μ L del tratamiento correspondiente. Una vez terminado introduciremos la placa en el incubador.

Todos los procedimientos para realizar los tratamientos de cada uno de los experimentos se muestran de manera esquemática en las **Figuras 9-16**.

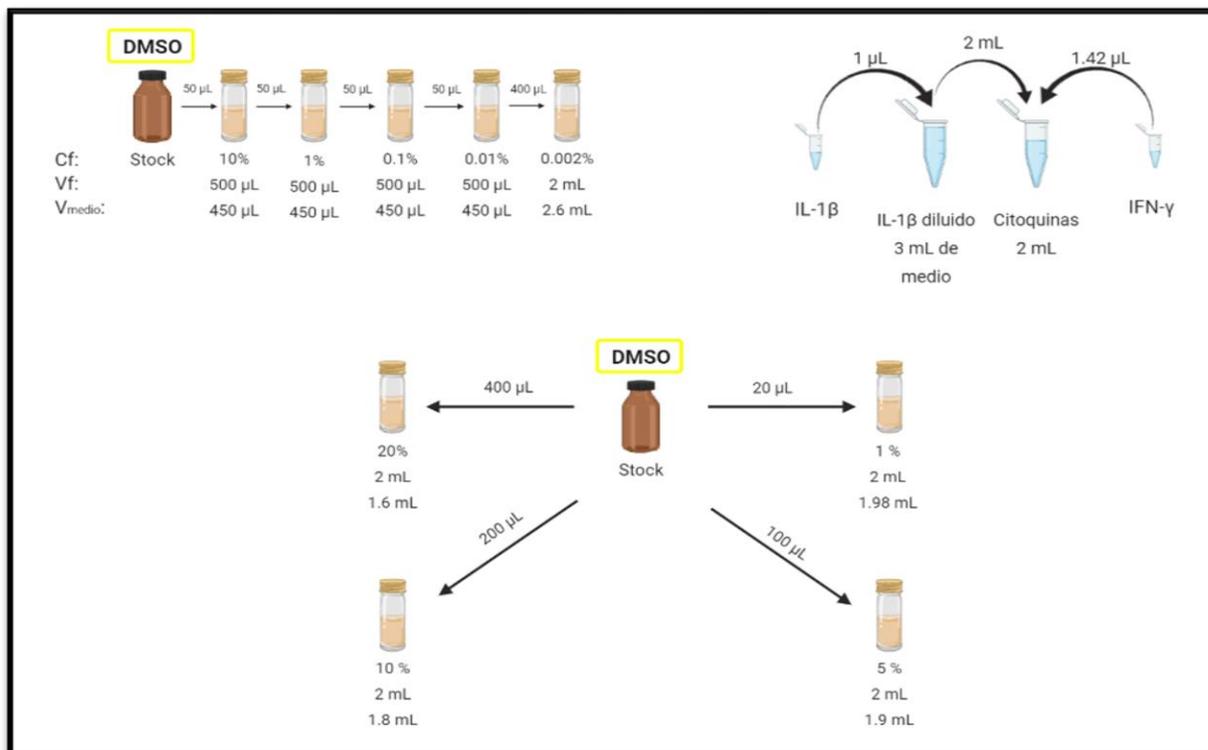


Figura 9. Esquema del protocolo para la preparación de los tratamientos del experimento 1 (Puesta a punto de la técnica con DMSO).

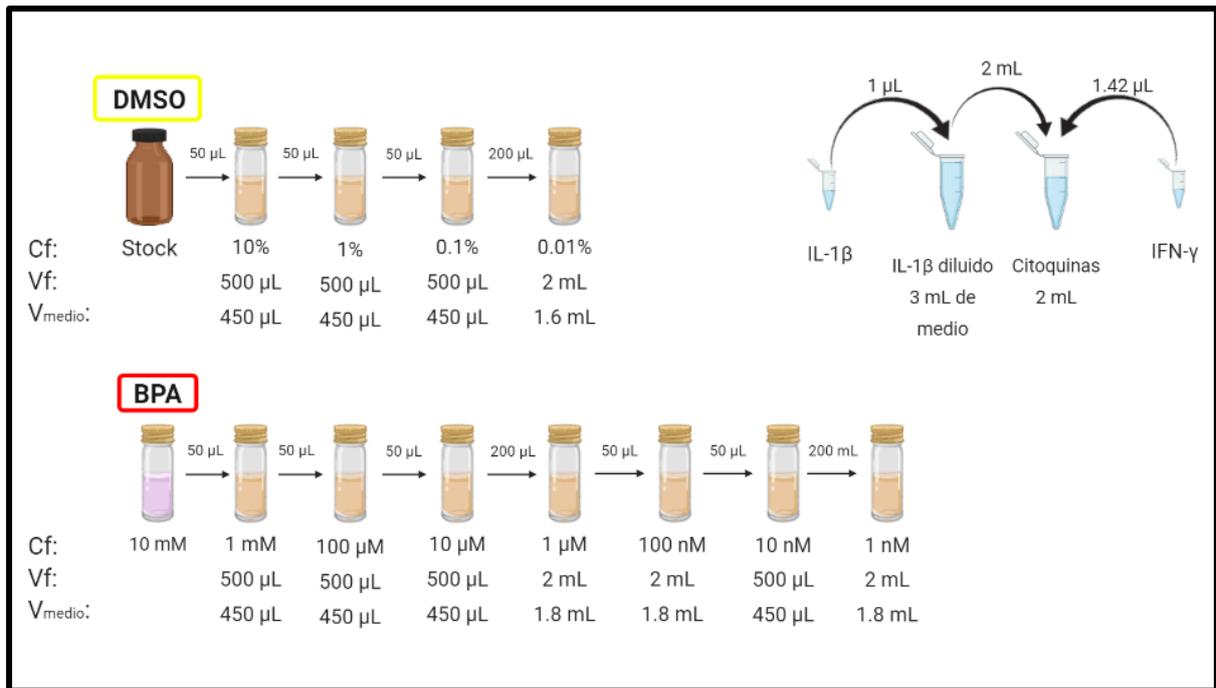


Figura 10. Esquema del protocolo para la preparación de los tratamientos del experimento 2 (Control BPA).

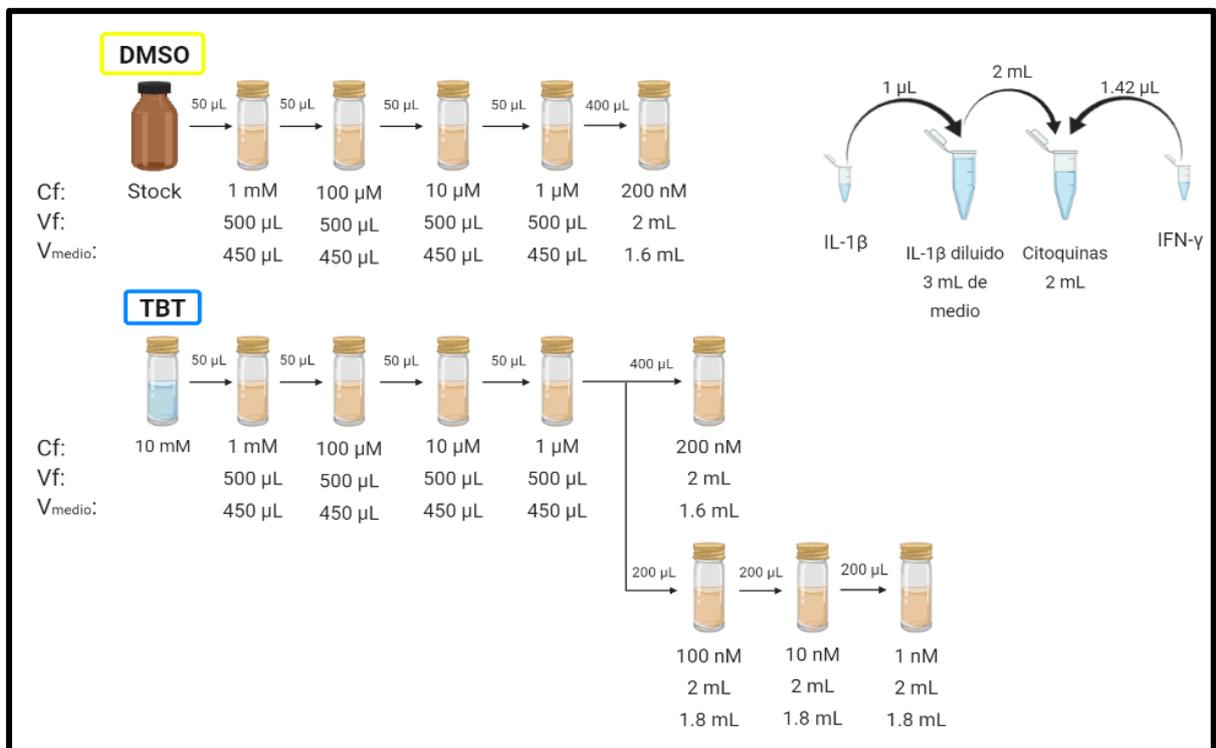


Figura 11. Esquema del protocolo para la preparación de los tratamientos del experimento 3 (Control TBT).

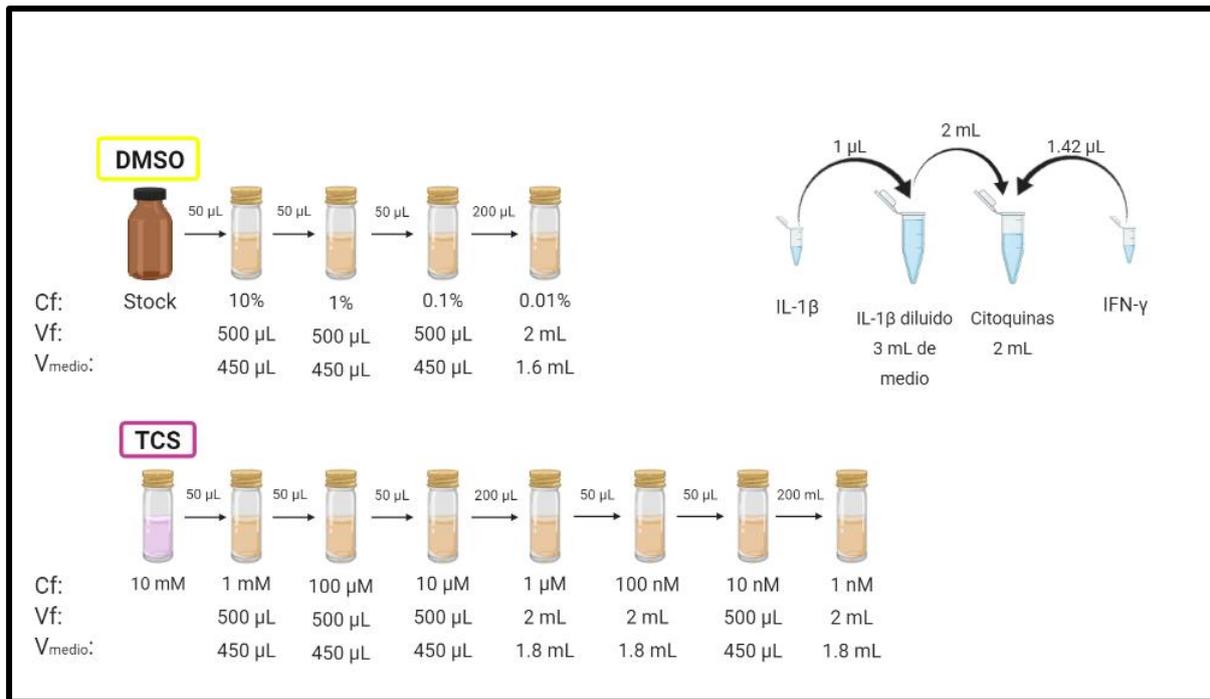


Figura 12. Esquema del protocolo para la preparación de los tratamientos del experimento 4 (Control TCS).

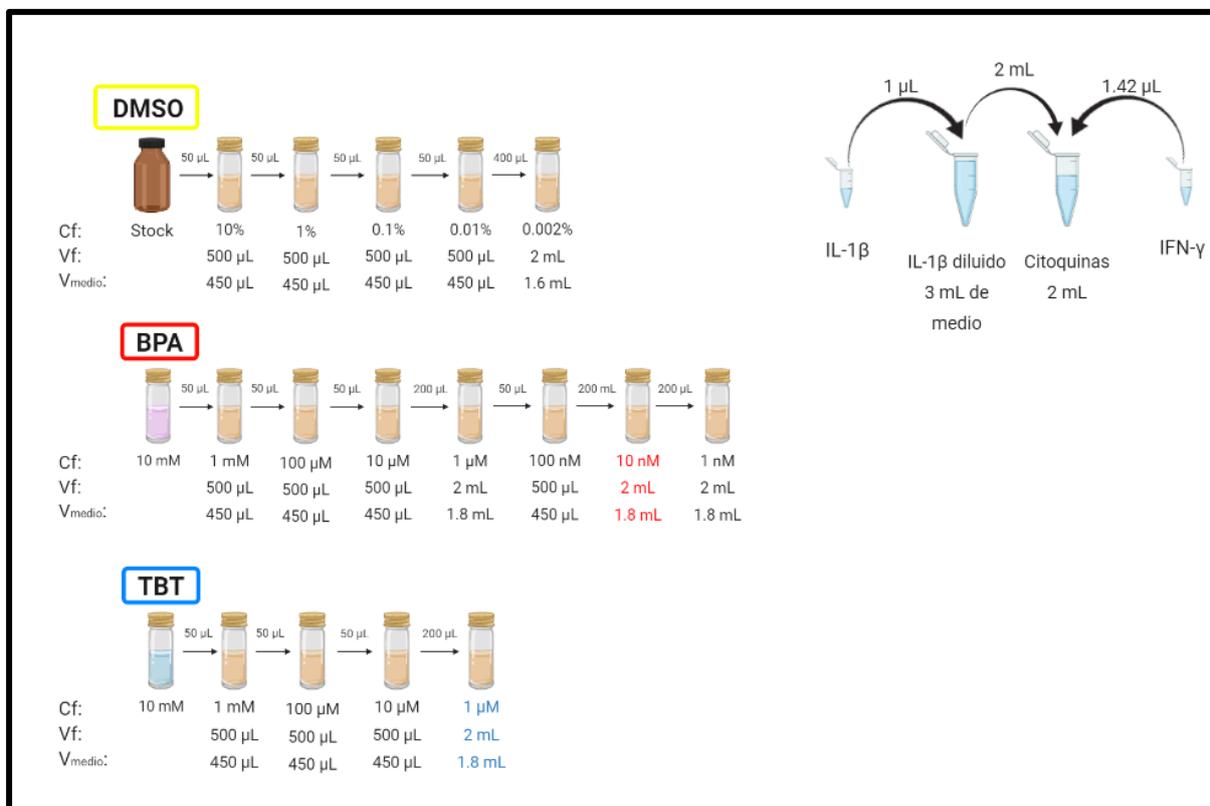


Figura 13. Esquema del protocolo para la preparación de los tratamientos del experimento 5 (Mezcla BPA+TBT). Parte 1.

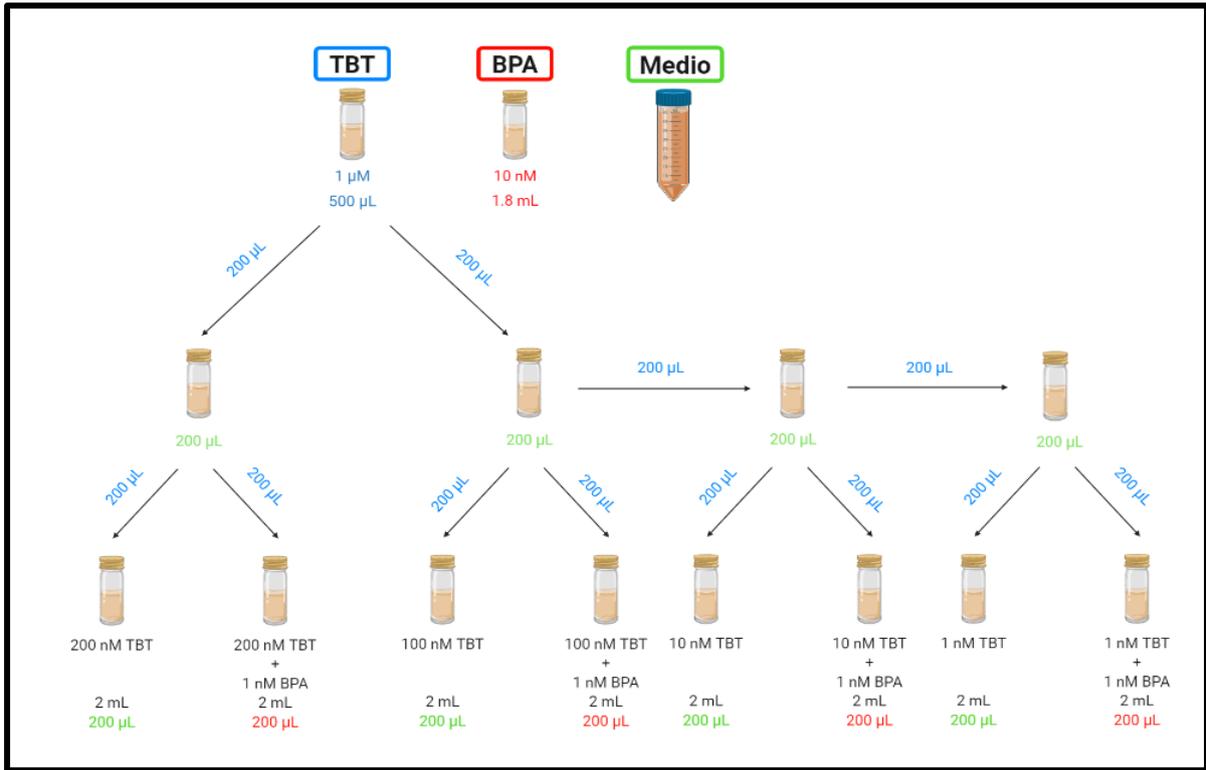


Figura 14. Esquema del protocolo para la preparación de los tratamientos del experimento 5 (Mezcla BPA+TBT). Parte 2.

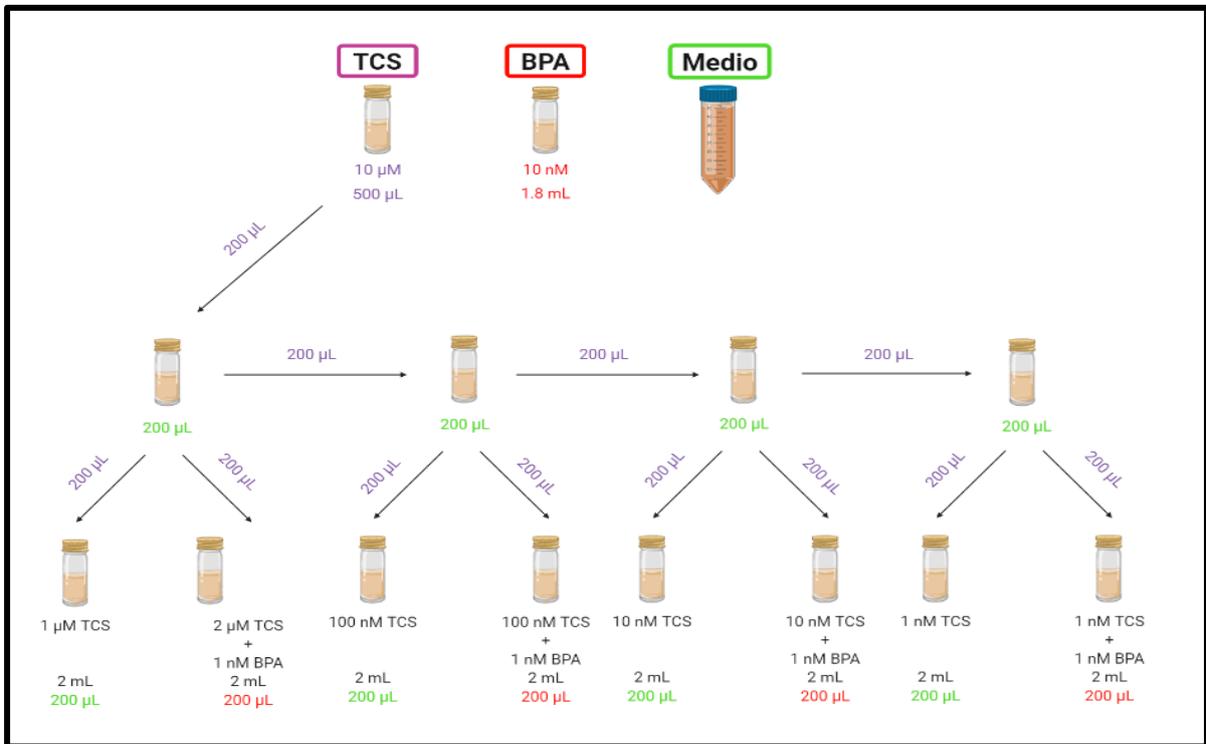


Figura 15. Esquema del protocolo para la preparación de los tratamientos del experimento 6 (Mezcla BPA+TCS). Parte 1.

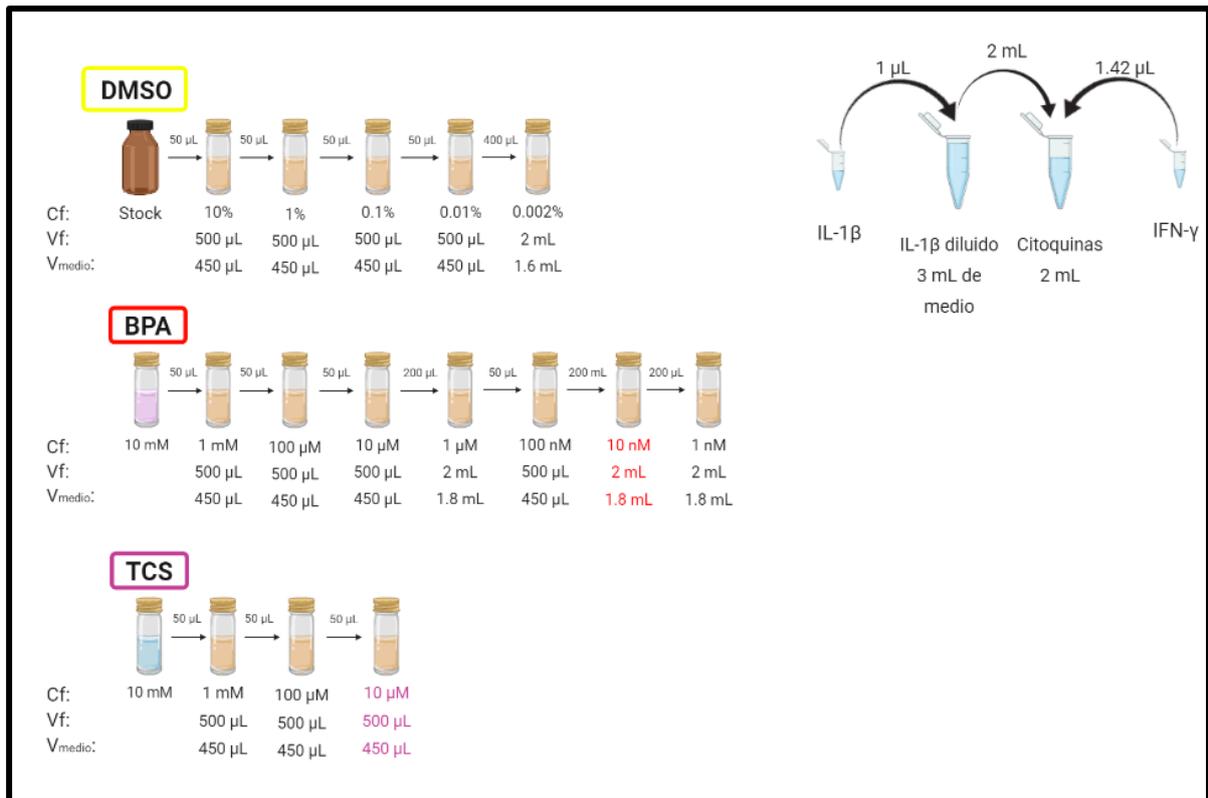


Figura 16. Esquema del protocolo para la preparación de los tratamientos del experimento 6 (Mezcla BPA+TCS). Parte 2.

3.4. Ensayo MTT

El ensayo de MTT es un método colorimétrico para análisis homogéneo de la viabilidad celular en líneas celulares. El ensayo se basa en la metabolización y reducción del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio) por parte de las mitocondrias de células viables, que da como producto cristales color púrpura de formazán. Los cristales son insolubles en agua y precipitan quedándose en la superficie de las células y en el medio de cultivo. Posteriormente se emplea un disolvente orgánico como el DMSO para solubilizar el formazán y poder leer en un lector de placas la absorbancia de las muestras (Riss *et al.*, 2004).

El ensayo del MTT fue originalmente ideado por Mosmann (1983), y para este estudio se siguió el protocolo de Sigma (s.f.) con algunas modificaciones.

- Materiales:
 - Un tubo de 5 mL de MTT 5 mg/mL (Sigma)
 - Un tubo de medio completo RPMI 1640 sin rojo fenol (Gibco)

- Un lector de placas (Bio Rad iMark)

En primer lugar, se descongela el tubo con MTT 5 mg/mL y atemperamos el medio RPMI sin rojo fenol. Antes de introducir los tubos en la campana, agitamos 1 segundo en el Vortex. Preparamos una dilución 1:1 con el medio y el MTT dentro de un tubo de 15 mL. Seguidamente introducimos en la campana la placa tratada y pipeteamos en cada columna de pocillos 50 μ L con una pipeta multicanal de 8 puntas la dilución de MTT.

Pasadas 3 horas se retira todo el volumen con una pipeta de vidrio conectada a un aspersor y añadimos 100 μ L de DMSO a todos los pocillos para disolver los cristales de formazán. Por último, llevamos la placa al lector y medimos a 595 nm, agitando en rápido durante 10 segundos. Guardamos la hoja de Excel que nos generará el programa para analizar posteriormente los resultados.

3.5. Análisis Estadístico

Los resultados de este trabajo se analizaron y se representaron gráficamente usando el programa *GraphPad Prism 7.0*. Los datos resultantes de la lectura de cada una de las placas se normalizaron, haciendo que la media del vehículo represente el 100% de la viabilidad celular. Los resultados se muestran como media \pm SEM (Error Estándar de la Media) y se ilustraron en forma de gráficos de barras con unos iconos que representan el valor de cada uno de los experimentos. Se usaron los test paramétricos t-test, cuando se compararon resultados de únicamente entre dos grupos, y One-way ANOVA para cuando se comparó entre tres o más grupos. Se considera estadísticamente significativo un valor de $p < 0.05$.

4. Resultados

4.1. Puesta a punto de la medida de viabilidad en células INS-1E

4.1.1. Efectos del DMSO en la viabilidad celular de la línea celular INS-1E

Con el fin de optimizar las mejores condiciones para el desarrollo posterior de este trabajo utilizando la técnica del MTT, realizamos el experimento mostrado en la **Figura 17**. En este experimento, tratamos las células INS-1E en cultivo con DMSO, conocido por su efecto tóxico a altas concentraciones (Sandler & Andersson, 1982). En respuesta a concentraciones crecientes de 0.002, 1, 5, 10 y 20% (vol/vol), el DMSO produjo muerte celular de manera dosis dependiente cuando lo comparamos con el del control (NT); en células no tratadas con DMSO. Como se puede observar en la **Figura 17**, el DMSO produjo una bajada significativa a una concentración del 5%. La concentración de 0.002%, que puede parecer extraña, se explica por ser la concentración equivalente al porcentaje utilizado en los experimentos posteriores utilizando los diferentes disruptores endocrinos. De esta forma demostramos, que esta concentración de DMSO no resulta tóxica para las células INS-1E y que, por lo tanto, si el TBT, el BPA o la mezcla de ambos produce un efecto en la viabilidad celular, este será un efecto genuino de estos compuestos y no, debido al contenido en el DMSO.

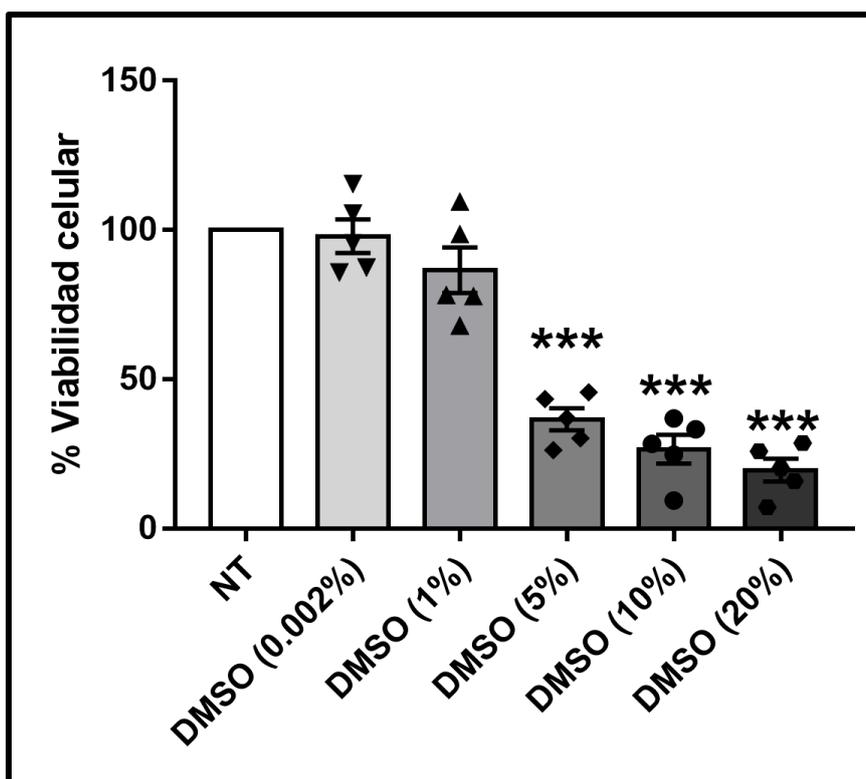


Figura 17 Efecto del dimetilsulfóxido (DMSO) en la viabilidad celular de INS-1E. Las células se trataron con 5 concentraciones diferentes de DMSO: 0.002, 1, 5, 10 y 20 %. Como control negativo (NT) no se les aplicó ningún tratamiento, solo se les cambió medio completo para INS-1E. Las células se trataron durante 24 horas y luego se determinó los resultados mediante un ensayo de MTT. Los datos se muestran como media \pm SEM. One-way ANOVA vs Vehículo: *** $p \leq 0.001$.

4.2. Efecto de varios disruptores endocrinos sobre la viabilidad de las células INS-1E

4.2.1. Efecto del Bisfenol-A (BPA)

Para analizar el efecto en la viabilidad de las células β INS-1E frente al BPA tratamos las células con dos concentraciones de BPA, 1nM y 1 μ M, ambas produjeron una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad celular comparadas con las condiciones control, en ausencia de BPA. Como control positivo, utilizamos la mezcla de citoquinas, IL-1 β e IFN- γ , que produce una disminución masiva de la viabilidad celular.

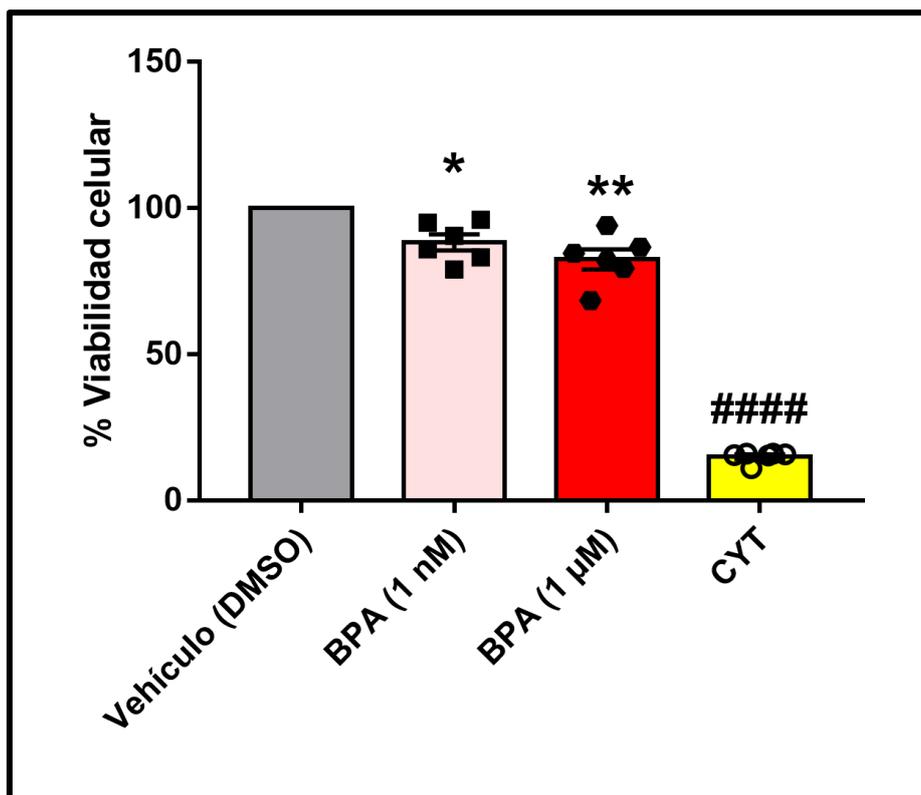


Figura 18. Efecto del Bisfenol A (BPA) en la viabilidad celular de INS-1E. Las células se trataron con 2 concentraciones diferentes de BPA: 1 nM y 1 µM. Como vehículo se usó DMSO a 1 µM y como control positivo una mezcla de citoquinas (CYT). Las células se trataron durante 72 horas y luego se determinó los resultados mediante un ensayo de MTT. Los datos se muestran como media ± SEM. One-way ANOVA vs Vehículo: * $p \leq 0.5$, ** $p \leq 0.01$. Paired t-test vs CYT: #### $p \leq 0.0001$.

Como se aprecia en la **Figura 18**, a ambas concentraciones la exposición a BPA supuso una disminución significativa de la viabilidad de las células INS-1E. La viabilidad celular fue menor en las que estaban expuestas a 1 µM de BPA ($82.52 \pm 3.48\%$), que las que estuvieron expuestas a 1 nM ($88.28 \pm 2.74\%$). La diferencia en el porcentaje medio de viabilidad celular fue de hasta un 17.48% (en 1 µM).

4.2.2. Efecto del Tributilestaño

En la **Figura 19**, analizamos los efectos en la viabilidad celular de INS-1E frente a 1 nM, 10 nM, 100 nM, 200 nM de Tributilestaño, excepto 1 nM todas las concentraciones mostraron una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad al compararlas con el control; sin TBT. Para el control positivo se empleó la mezcla de citoquinas.

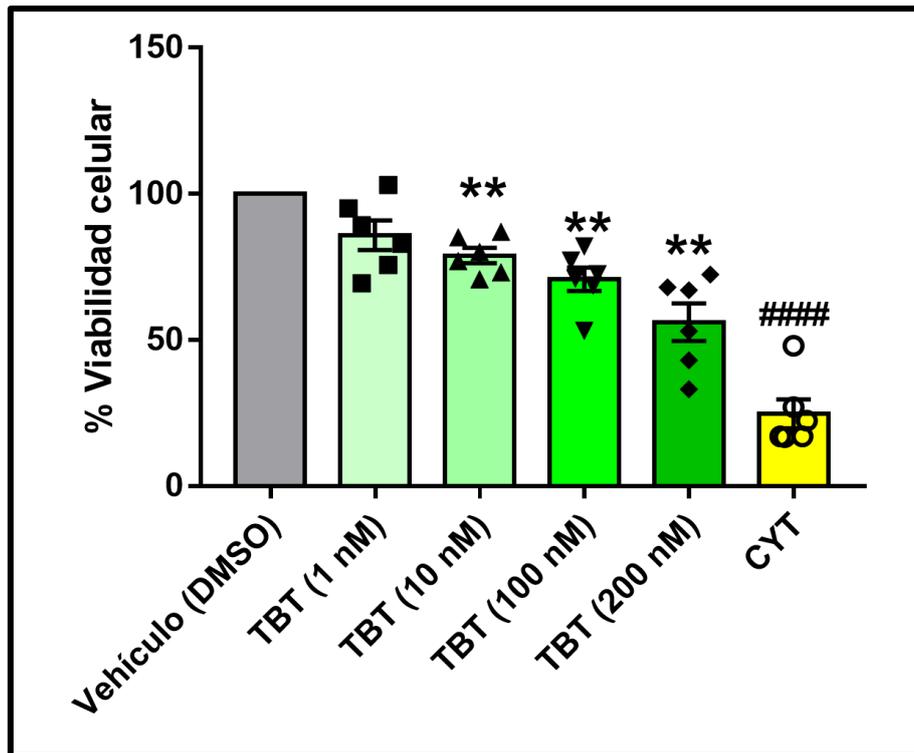


Figura 19. Efecto del Tributilestaño (TBT) en la viabilidad celular de INS-1E. Las células se trataron con 4 concentraciones diferentes de TBT: 1, 10, 100 y 200 nM. Como vehículo se usó DMSO a 200 nM y como control positivo una mezcla de citoquinas (CYT). Las células se trataron durante 72 horas y luego se determinó los resultados mediante un ensayo de MTT. Los datos se muestran como media \pm SEM. One-way ANOVA vs Vehículo: ** $p \leq 0.01$. Paired-test vs CYT: #### $p \leq 0.0001$.

Como podemos apreciar en la **Figura 19**, cuanto mayor es la concentración de TBT a la que se expone a las células β más disminuye su viabilidad. En el caso de 200 nM se alcanza una disminución en el porcentaje medio de la viabilidad celular de hasta el 43.88% comparando con el vehículo.

4.2.3. Efecto del Triclosán

Ahora bien, para analizar el efecto en la viabilidad celular al exponer a las células β a Triclosán se trataron con concentraciones crecientes desde 1 nM a 1 μ M. Como vemos en la **Figura 20**, no se observó una variación estadísticamente significativa en el porcentaje medio de la viabilidad celular a ninguna de las concentraciones estudiadas en este trabajo, comparándolas con las condiciones control sin TCS. Como control positivo utilizamos la mezcla de citoquinas.

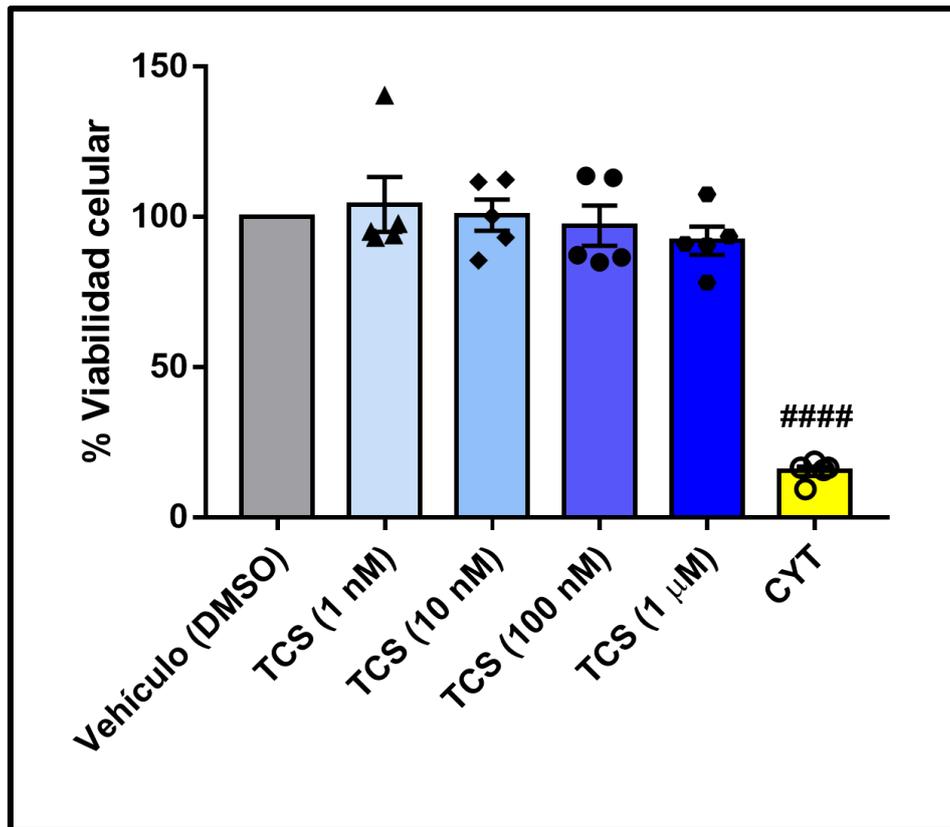


Figura 20. Efecto del Triclosán (TCS) en la viabilidad celular de INS-1E. Las células se trataron con 4 concentraciones diferentes de TCS: 1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 μM. Como vehículo se usó DMSO a 1 μM y como control positivo una mezcla de citoquinas (CYT) IL-1β e IFN-γ. Las células se trataron durante 72 horas y luego se determinó los resultados mediante un ensayo de MTT. Los datos se muestran como media ± SEM. Paired t-test vs CYT: ####p≤0.0001.

4.3. Efecto de una mezcla de disruptores endocrinos sobre la viabilidad de las células INS-1E

Una vez realizados los experimentos con los tres compuestos por separado, procedimos a comprobar cuál era el efecto en el porcentaje de viabilidad celular de una mezcla de dos de estos compuestos. Las mezclas elegidas fueron, el TBT más el BPA, y el TCS más el BPA.

4.3.1. Efecto de la mezcla de Tributilestaño y Bisfenol A

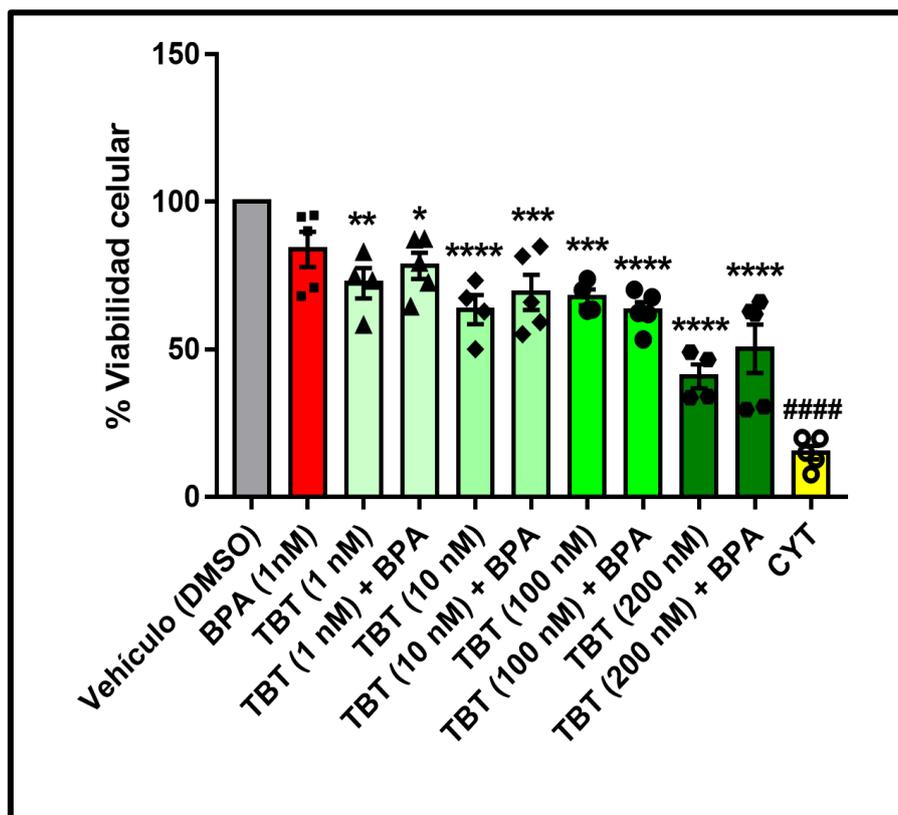


Figura 21. Efecto al mezclar Tributilestaño (TBT) con Bisfenol A (BPA) en la viabilidad celular de INS-1E. Las células se trataron por un lado con 1 nM de BPA y con 4 concentraciones diferentes de TBT: 1 nM, 10 nM, 100 nM y 200 nM. Por otro lado, se trataron células añadiéndoles una mezcla de cada una de las concentraciones de TBT más 1 nM de BPA. Como vehículo se usó DMSO a 200 nM y como control positivo una mezcla de citoquinas (CYT). Las células se trataron durante 72 horas y luego se determinó los resultados mediante un ensayo de MTT. Los datos se muestran como media \pm SEM. One-way ANOVA vs Vehículo: * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$. Paired t-test vs CYT: #### $p \leq 0.0001$.

El caso del TBT+BPA las células fueron tratadas con 1 nM de BPA y se les añadió una concentración de TBT, 1 nM, 10 nM, 100 nM y 200 nM. El efecto de la mezcla TBT+BPA se comparó con el de ambos compuestos por separado, el BPA 1nM y el TBT a concentraciones 1, 10, 100 y 200 nM. Como control positivo, utilizamos la mezcla de citoquinas, que conocemos que provoca una disminución masiva de la viabilidad celular.

Los resultados (**Figura 21**) mostraron una disminución estadísticamente significativa en la viabilidad celular tanto del TBT como de la mezcla BPA+TBT, comparándolo con el vehículo. Cuanto mayor fue la concentración de TBT a la que estaban expuestas las células β mayor fue la disminución en la viabilidad, llegando a una disminución del 59.23% si comparamos en las condiciones control frente a 200 nM de TBT. Esta disminución también se apreció en

las mezclas de ambos compuestos, habiendo la mayor muerte en la mezcla de 200 nM de TBT + 1 nM de BPA ($50.22 \pm 8.25\%$). Por otro lado, cuando analizamos por separado el porcentaje medio de viabilidad celular de 1 nM de BPA frente a las condiciones de control, no se evidencia una diferencia estadísticamente significativa.

Al analizar por parejas cada una de las concentraciones de TBT y con su correspondiente mezcla de TBT + BPA, no encontramos ninguna diferencia estadística significativa. La presencia de BPA no aumentaba ni disminuía el efecto del TBT en estas condiciones. Igualmente, la mezcla de ambos compuestos no presentaba ninguna diferencia significativa cuando se comparó en el efecto de 1nM BPA.

4.3.2. Efecto de la mezcla de Tributilestaño y Bisfenol A

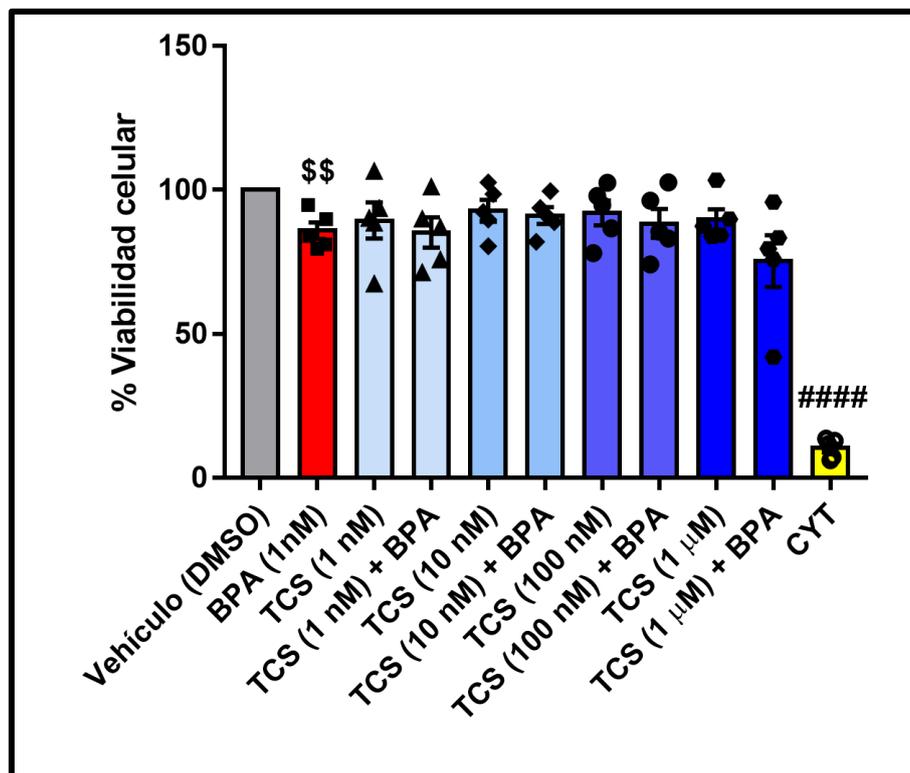


Figura 22. Efecto al mezclar Triclosán (TCS) con Bisfenol A (BPA) en la viabilidad celular de INS-1E. Las células se trataron por un lado con 1 nM de BPA y con 4 concentraciones diferentes de TCS: 1 nM, 10 nM, 100 nM y 1 µM. Por otro lado, se trataron células añadiéndoles una mezcla de cada una de las concentraciones de TBT más 1 nM de BPA. Como vehículo se usó DMSO a 200 nM y como control positivo una mezcla de citoquinas (CYT) IL-1β e IFN-γ. Las células se trataron durante 72 horas y luego se determinó los resultados mediante un ensayo de MTT. Los datos se muestran como media ± SEM. Paired t-test vs BPA (1 nM): \$\$p≤0.01. Paired t-test vs CYT: ####p≤0.0001.

Para analizar el efecto de la mezcla de TCS y BPA se trataron las células INS-1E una mezcla de 4 concentraciones de TCS más 1 nM de BPA y se compararon con el efecto del BPA 1nM y del TCS 1, 10, 100 y 1000 nM. Como control positivo se empleó la mezcla de citoquinas.

Los resultados del porcentaje medio de viabilidad celular que se muestran en la **Figura 22**, revelaron que no había una diferencia estadísticamente significativa entre cada una de las concentraciones de TCS y las condiciones control. Del mismo modo no se observaron diferencias entre las mezclas de TCS y BPA, y las condiciones control. Aunque, por otro lado, si comparamos las condiciones control frente a 1 nM de BPA sí que apreciamos una diferencia estadísticamente significativa ($85.84 \pm 2.85\%$).

Al comparar cada una de las concentraciones de TCS con sus respectivas mezclas, evidenciando que no existía diferencia significativa entre ninguna de ellas. De igual modo, la estadística nos muestra que no haya una diferencia significativa entre 1 nM de BPA y cada una de las mezclas.

5. Discusión

5.1. Bisfenol A

La preocupación por los efectos sobre salud de los disruptores endocrinos ha ido en aumento notablemente en las últimas décadas. Cada vez son más los estudios que muestran como estos compuestos, a los que estamos expuestos en nuestra vida cotidiana, suponen un importante factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades graves y muy prevalentes como es el caso de la diabetes.

La toxicidad de los disruptores endocrinos no funciona igual que con otras sustancias químicas, compuestos como el BPA son capaces producir efectos adversos en la célula β pancreática de forma no monotónica, como por ejemplo la alteración en la entrada de calcio a la célula o el contenido en insulina. A diferencia de lo que afirma la toxicología clásica, el BPA a dosis bajas del orden del nano molar o el pico molar, como a las que nos encontramos expuestos ambientalmente, es capaz de dañar las células β mediante mecanismos específicos que no se manifiestan a dosis más altas. Esto es debido a que este disruptor endocrino es capaz de actuar como si se tratase de una hormona (como por ejemplo el estradiol) uniéndose a los mismos receptores de estrógenos y activando las mismas rutas de señalización (Nadal et al., 2018). Ahora bien, uno de los mecanismos más probables que estaría implicado en este fenómeno son las respuestas estrogénicas extranucleares rápidas, las cuales se basan, en el caso del BPA, en la activación del Receptor 1 de Estrógeno Acoplado a Proteína G (GPER), con el cual se pueden lograr respuestas biológicas rápidas al no necesitar de activar vías genómicas (Nadal et al., 2018). Aunque también hay que destacar que uno de los efectos más notorios del BPA que sigue una dosis respuesta no monotónica es el aumento del contenido de insulina en las células β , que es debido principalmente a mecanismos moleculares relacionados con el Receptor de Estrógenos α (ER α) (Nadal et al., 2018).

El BPA reduce principalmente la supervivencia de la célula β mediante dos mecanismos, el estrés sobre los Receptores de Estrógenos (ER) y el estrés oxidativo. Ambos se producen como consecuencia de una hipersecreción de insulina (Aston-Mourney et al., 2008). Esto es corroborado por Makaji et al. (2011), el cual expone en su estudio con la línea celular β TC-6 de células β de ratón. La exposición crónica a BPA es capaz de aumentar la secreción de insulina, y alterar la expresión de proteínas clave en la respuesta al estrés en el retículo endoplásmico, lo que conduciría a una deficiente función celular, a la muerte de las células y desarrollo de diabetes tipo 2. También hay que destacar, que este compuesto es capaz de

perturbar los procesos de bioenergía, biogénesis y dinámica mitocondrial, lo que deriva en un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno y una activación de la vía mitocondrial de apoptosis (Marroqui *et al.*, 2018).

Los resultados de este estudio mostraron un descenso significativo en la supervivencia de la célula β pancreática aún a concentraciones bajas de 1 nM, como a las que nos encontramos expuestos de forma ambiental. Además, el incremento en la muerte celular aumentó significativamente a una concentración de 1 μ M. Estos resultados son corroborados por Lin *et al.* (2013), que muestra un porcentaje de viabilidad celular muy similar a una concentración de 2 nM, exponiendo a las células de INS durante 48 horas al BPA. Sin embargo, este mismo estudio mostró un porcentaje de viabilidad celular notoriamente menor a concentraciones altas (2 μ M) que las evidenciadas nuestro estudio (82.52% frente a alrededor del 30%).

5.2. Tributilestaño

El tributilestaño (TBT) es uno de los disruptores endocrinos más importantes y conocidos en el mundo. Su uso extenso en pinturas anticrustantes de barcos supuso severos daños en los aparatos reproductores de los gasteropodos marinos, provocando un fenómeno denominado imposex. La repercusión de estos daños en las especies marinas llevó a un cambio drástico de la legislación, prohibiendo el uso del TBT en barcos. Aún con esto, seguimos estando expuestos en nuestra vida cotidiana a este compuesto químico mediante la ingesta de alimentos marinos, ya que este sigue bioacumulándose en los mares de todo el mundo. Por su parte, los estudios sobre el TBT siguen evidenciando que se trata de una sustancia que supone un importante riesgo para el desarrollo de enfermedades humanas, como el desarrollo de la diabetes. Debido fundamentalmente a su capacidad de aumentar el estrés oxidativo de las células β pancreáticas (Huang *et al.*, 2018).

Los estudios en ratones nos muestran que la exposición a concentraciones nano molares de TBT provocan citotoxicidad y apoptosis significativamente en células β pancreáticas. Además, se ha observado a estas concentraciones una escisión de la ADP-ribosa y de las proteínas quinasas activas por mitógenos-JNK y fosforilación de ERK1/2. También, se mostró un aumento significativo de las especies reactivas de oxígeno (ROS), provocando así estrés oxidativo en las células. La apoptosis de las células β debido a la exposición al TBT a concentraciones bajas estaría fuertemente relacionado con el estrés oxidativo. Concretamente el TBT provocaría la apoptosis de las células β mediante la vía JNK, que es activada por los ROS, y que activa las Caspasas-3. ROS que promueven la apoptosis

mediada por la activación de MAPK (JNK, ERK y p38) son un mecanismo importante para la apoptosis de células β (Huang *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2017).

Los resultados de nuestro estudio muestran una significativa disminución del porcentaje de viabilidad celular de célula β a partir de 10 nM de TBT. Resultados muy similares a los que obtuvo Ghaemmaleki *et al.* (2020) a concentraciones de 10 nM y 100 nM, en su estudio en islotes de Langerhans de rata cuando los expuso durante 24 horas.

5.3. Triclosán

El Triclosán es un compuesto químico antimicrobiano y antifúngico presente en numerosos productos de higiene de nuestro día a día. Su uso se considera seguro para la salud humana a las concentraciones a las que está presente en los productos de higiene. Sin embargo, existen sospechas de que el TCS podría ser un problema por su toxicidad hacia organismos acuáticos, la aparición de bacterias resistentes a antibióticos, su capacidad de bioacumularse o efectos de disrupción endocrina. Concretamente la capacidad del TCS de actuar como un disruptor endocrino se debe a que la estructura de su molécula tiene similitudes con las hormonas tiroideas y con otros disruptores endocrinos estrogénicos y androgénicos. Pudiendo provocar así daños tanto en la homeostasis tiroidea como en las partes de nuestro cuerpo sensibles a hormonas sexuales (Dann & Hontela, 2011).

Ahora bien, no existen estudios exhaustivos sobre el efecto del TCS sobre la viabilidad celular de las células β pancreáticas. Nuestro estudio evidencia que a concentraciones bajas de entre 1 nM y 1 μ M no se produce ninguna disminución estadísticamente significativa en la supervivencia de las células. Sin embargo, según Ajao *et al.* (2015) demostró en islotes pancreáticos murinos (MIN-6) que el TCS provoca la disipación del potencial de membrana mitocondrial, lo que lo convierte en una sustancia tóxica para estos orgánulos tan importantes en la respiración celular. Por ello, existe la preocupación de que las exposiciones a largo plazo a este compuesto podrían provocar daños mitocondriales, sobre todo en células no renovables como las que conforman el páncreas endocrino.

En todo caso, el TCS debería de ser estudiado más en profundidad para determinar su potencial como factor de riesgo de desarrollo de la diabetes a largo plazo, ya que se trata de un compuesto muy presente en cientos de productos de higiene de uso diario.

5.4. Mezclas

En nuestro día a día no nos exponemos a simples compuestos químicos aislados, nuestros cuerpos reciben grandes cocteles de sustancias químicas que interactúan entre sí creando sinergias o antagonismos. Por ello, el estudio de las mezclas de disruptores endocrinos es uno de los enfoques más realista para comprender y conocer todos los riesgos y peligros que suponen estas sustancias químicas para la salud humana y del medio ambiente.

El enfoque de estudiar mezclas de estas sustancias resulta difícil llevarlo a cabo, dificultad que va en aumento cuantos más de estos compuestos se estudien a la vez. Por ello no existen muchos trabajos que estudien los efectos de la mezcla de diferentes disruptores endocrinos en la salud humana y consecuentemente no existen muchas evidencias de los efectos específicos sobre las células pancreáticas o el desarrollo de la diabetes. Aún con todo esto, hay que señalar que en el caso del BPA y debido a la alta preocupación que se ha tenido por este compuesto existen estudios que analizan los efectos de su mezcla sobre la salud humana o el medio ambiente (Hamid, Junaid & Pei, 2021). Por ejemplo, Silva, Rajapakse & Kortenkamp (2002) elaboraron hace dos décadas uno de los primeros trabajos sobre mezclas de disruptores endocrinos, en el cual estudiaron los efectos de la mezcla de 8 xenoestrógenos; uno de ellos el BPA. En él evidenciaron que la mezcla de esos compuestos producía efectos significativos a concentraciones que individualmente no producían efectos. No obstante, no existe hasta la fecha ningún estudio que haya analizado los efectos sobre las células β pancreáticas de mezclar este disruptor endocrino con el TBT o el TCS; como hemos realizado en este trabajo.

Los resultados de nuestro trabajo sobre la mezcla de diferentes concentraciones nano molares de Tributilestaño con 1 nM de Bisfenol A evidenciaron que no hubo diferencia significativa entre las células β tratadas solo con TBT y las tratadas con TBT más BPA. Únicamente se observó la muerte celular propia del incremento de las concentraciones de TBT. Por lo cual afirmamos que a nivel de viabilidad celular no existe ningún tipo de sinergia o antagonismo entre el TBT y el BPA a estas concentraciones.

Sin embargo, hay que destacar un estudio realizado por Ghaemmaleki *et al.* (2020) con β -estradiol (E2). Una hormona cuyos efectos en la biosíntesis de insulina en la célula β son muy similares a los que provoca el BPA (Nadal *et al.* 2009). En ese trabajo se analizaron los efectos de exponer durante 24 horas a islotes de Langerhans de rata a una mezcla de 10 μ M de TBT con concentraciones ascendentes de entre 10 nM y 100 μ M de E2. Sus resultados constataron que esta mezcla era capaz contrarrestar la toxicidad del TBT, reduciendo el estrés oxidativo y la hipersecreción de insulina hasta niveles normales, e

incrementado la viabilidad de los islotes hasta el punto de protegerlos y aumentar un 50% la supervivencia con respecto a las condiciones normales. Esto constataría que la activación de vías de receptores de estrógenos (ER) por parte de compuestos estrogénicos E2 son capaces de interferir en la producción de ROS y en la apoptosis provocada por sustancias como el TBT.

Por otro lado, nuestro estudio analizó los efectos sobre la supervivencia de la célula β al mezclar 1 nM de BPA con concentraciones de entre 1 nM y 1 μ M de TCS. Los resultados evidenciando que no hubo diferencia significativa alguna entre las células tratadas únicamente con TCS y las tratadas con la mezcla. Tan solo se observó los efectos nulos sobre la viabilidad celular del TCS.

No podemos demostrar con el tipo celular y las condiciones experimentales empleadas, que el Triclosán aumente la expresión de GPER y provoque un aumento de los efectos del BPA sobre la viabilidad celular de la célula β (Huang *et al.*, 2020).

6. Conclusiones

Finalmente, pasamos a resumir las conclusiones alcanzadas en este trabajo sobre los efectos en la viabilidad de la célula β pancreática de tres importantes disruptores endocrinos (Bisfenol A, Tributilestaño, Triclosán) y los efectos de mezclarlos entre ellos:

- El Bisfenol A es capaz de reducir la viabilidad celular de las células β a concentraciones desde 1 nM a 1 μ M.
- El Tributilestaño redujo la viabilidad de las células β pancreáticas a concentraciones nanomolares.
- El Triclosán no alteró la supervivencia de las células β pancreáticas a concentraciones entre 1 nM y 1 μ M.
- La mezcla entre 1 nM de Bisfenol A y varias concentraciones nanomolares de Tributilestaño no alteraron los efectos en la viabilidad propios del TBT.
- La mezcla entre 1 nM de Bisfenol A y varias concentraciones entre 1 nM y 1 μ M de Triclosán no produjo ningún efecto en la viabilidad celular.

7. Bibliografía

- Ahangarpour, A., Afshari, G., Mard, S. A., Khodadadi, A., & Hashemitabar, M. (2016). Preventive effects of procyanidin A2 on glucose homeostasis, pancreatic and duodenal homeobox 1, and glucose transporter 2 gene expression disturbance induced by bisphenol A in male mice. *Journal of Physiology and Pharmacology*, *67*(2), 243–252.
- Ajao, C., Andersson, M. A., Teplova, V. V., Nagy, S., Gahmberg, C. G., Andersson, L. C., Hautaniemi, M., Kakasi, B., Roivainen, M. & Salkinoja-Salonen, M. (2015). Mitochondrial toxicity of triclosan on mammalian cells. *Toxicology Reports*, *2*, 624-637. doi:10.1016/j.toxrep.2015.03.012
- Allmyr, M., Adolfsson-Erici, M., McLachlan, M. S. & Sandborgh-Englund, G. (2006). Triclosan in plasma and milk from Swedish nursing mothers and their exposure via personal care products; *Sci Total Environ*, *372*, 87-93. doi:10.1016/j.scitotenv.2006.08.007
- Alonso-Magdalena, P., Garcia-Arevalo, M., Quesada, I., & Nadal, A. (2015). Bisphenol-A treatment during pregnancy in mice: A new window of susceptibility for the development of diabetes in mothers later in life. *Endocrinology*, *156*(5), 1659–1670. doi:10.1210/en.2014-1952
- Alonso-Magdalena, P., Morimoto, S., Ripoll, C., Fuentes, E., & Nadal, A. (2006). The Estrogenic Effect of Bisphenol A Disrupts Pancreatic β -Cell Function In Vivo and Induces Insulin Resistance. *Environmental Health Perspectives*, *114*, 106-112. doi:10.1289/ehp.8451
- Alonso-Magdalena, P., Quesada, I., & Nadal, A. (2011). Endocrine disruptors in the etiology of type 2 diabetes mellitus. *Nature Reviews*, *7*(6), 346-353. doi:10.1038/nrendo.2011.56
- Alonso-Magdalena, P., Ropero, A. B., Carrera, M. P., Cederroth, C. R., Baquié, M., Gauthier, B. R., . . . Nadal, A. (2008). Pancreatic Insulin Content Regulation by the Estrogen Receptor ER α . *PLoS ONE*, *3*(4), e2069. doi:10.1371/journal.pone.0002069
- Alonso-Magdalena, P., Tudurí, E., Marroquí, L., Quesada, I., Sargis, R. M., & Nadal, A. (2018). Toxic Effects of Common Environmental Pollutants in Pancreatic β -Cells and the Onset of Diabetes Mellitus. *Encyclopedia of Endocrine Diseases (Second Edition)*, *1*, 764-775. doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.64325-8
- Alonso-Magdalena, P., Vieira, E., Soriano, S., Menes, L., Burks, D., Quesada, I., & Nadal, A. (2010). Bisphenol A Exposure during Pregnancy Disrupts Glucose Homeostasis in Mothers and Adult Male Offspring. *Environ Health Perspect*, *118*, 1243–1250. doi:10.1289/ehp.1001993
- Antizar-Ladislao, B. (2008). Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. A review. *Environment International*, *34*, 292–308.
- Asfari, M., Janjic, D., Meda, P., Guodong, L., Halban, P. A., & Wollheim, C. B. (1992). Establishment of Z-Mercaptoethanol-Dependent Differentiated Insulin-Secreting Cell Lines. *Endocrinology*, *130*(1), 167-178.
- Aston-Mourney, K., Proietto, J., Morahan, G., & Andrikopoulos, S. (2008). Too much of a good thing: why it is bad to stimulate the beta cell to secrete insulin. *Diabetologia*, *51*, 540–545. doi:10.1007/s00125-008-0930-2
- Barnes, D. K., Galgani, F., Thompson, R. C. & Barlaz, M. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *364*(1526), 1985-1998. doi:10.1098/rstb.2008.0205

- Bertuloso, B. D., Podratz, P. L., Merlo, E., De Araújo, J. F., Lima, L. C., De Souza, L. N., Gava, A. L., De Oliveira, M., Miranda-Alves, L., Carneiro, M. T., Nogueira, C. R & Graceli, J. B. (2015). Tributyltin chloride leads to adiposity and impairs metabolic functions in the rat liver and pancreas. *Toxicology Letters*, 235(1), 45-59. doi:10.1016/j.toxlet.2015.03.009
- Birnbaum, L. S., Bucher, J. R., Collman, G. W., Zeldin, D. C., Johnson, A. F., Schug, T. T., & Heindel, J. J. (2012). Consortium-based science: the NIEHS's multipronged, collaborative approach to assessing the health effects of bisphenol A. *Environ Health Perspect*, 120(12), 1640–1644. doi:10.1289/ehp.1205330
- Bodin, J., Bølling, A. K., Becher, R., Kuper, F., Løvik, M. & Nygaard, U. C. (2014). Transmaternal bisphenol A exposure accelerates diabetes type 1 development in NOD mice. *Toxicol Sci*, 137(2), 311-323. doi:10.1093/toxsci/kft242
- Bodin, J., Bølling, A. K., Samuelsen, M., Becher, R., Løvik, M., & Nygaard, U. C. (2013). Long-term bisphenol A exposure accelerates insulinitis development in diabetes-prone NOD mice. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 35(3), 349–358. doi:10.3109/08923973.2013.772195
- Bodin, J., Stene, L. C. & Nygaard, U. C. (2015). Can exposure to environmental chemicals increase the risk of diabetes type 1 development? *Biomed Res Int*, 2015, 208947. doi:10.1155/2015/208947.
- Cao, X-L. & Corriveau, J. (2008a). Migration of bisphenol A from polycarbonate baby and water bottles into water under severe conditions. *J. Agric Food Chem*, 56, 6378-6381. doi:10.1021/jf800870b
- Cao, X-L. & Corriveau, J. (2008b). Determination of bisphenol A in water by isotope dilution headspace solid phase microextraction and gas chromatography/mass spectrometry without derivatization. *J. AOAC Int*, 91, 622-629.
- ChemSafetyPRO. (16 de noviembre de 2019). *ChemSafetyPRO*. Obtenido de What Is M-factor and How It Is Used for GHS Classification: https://www.chemsafetypro.com/Topics/GHS/What_is_M-factor_and_how_it_is_used_for_enviromental_hazard_classification.html
- ChemSpider. (s.f.). *Tributyltin cation*. Recuperado el 14 de junio de 2021, de ChemSpider: Search and share chemistry: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.34402.html>
- Chen, Y.-W., Lan, K.-C., Tsai, J.-R., Weng, T.-I., Yang, C.-Y., & Liu, S.-H. (2017). Tributyltin exposure at noncytotoxic doses dysregulates pancreatic b-cell function in vitro and in vivo. *Archives of Toxicology*, 91(9), 3135-3144. doi:10.1007/s00204-017-1940-y
- Chien, L. C., Hung, T. C., Choang, K. Y., Yeh, C. Y., Meng, P. J., Shieh, M. J., Han, B. C. (2002). Daily intake of TBT, Cu, Zn, Cd and As for fishermen in Taiwan. *Sci Total Environ*, 285, 177–85. doi:10.1016/s0048-9697(01)00916-0
- Cooper, G. S., Makris, S. L., Nietert, P. J., & Jinot, J. (2009). Evidence of autoimmune-related effects of trichloroethylene exposure from studies in mice and humans. *Environmental Health Perspectives*, 117(5), 696-702. doi:10.1289/ehp.11782
- Dann, A. B., & Hontela, A. (2011). Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *J. Appl. Toxicol.*, 31, 285–311. doi:10.1002/jat.1660

- Díaz-Villaseñor, A., Sánchez-Soto, M. C., Cebrián, M. E., Ostrosky-Wegman, P. & Hiriart, M. (2006). Sodium arsenite impairs insulin secretion and transcription in pancreatic β -cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 214(1), 30-34. doi:10.1016/j.taap.2005.11.015
- ECHA. (2014). *Alteradores endocrinos*. Recuperado el 2021 de mayo de 20, de ECHA: <https://echa.europa.eu/es/hot-topics/endocrine-disruptors>
- ECHA. (2021a). *European Chemicals Agency*. Obtenido de Evaluación de sustancias - CoRAP (4,4'-isopropylidenediphenol): <https://echa.europa.eu/es/information-on-chemicals/evaluation/community-rolling-action-plan/corap-table/-/dislist/details/0b0236e1807e375d>
- ECHA. (2021b). *European Chemicals Agency*. Recuperado el 20 de abril de 2021, de Substance Information - 4,4'-isopropylidenediphenol: <https://echa.europa.eu/es/substance-information/-/substanceinfo/100.001.133>
- ECHA. (2021c). *European Chemicals Agency*. Recuperado el 20 de noviembre de 2020, de Substance Information - Bis(tributyltin) oxide: <https://echa.europa.eu/es/substance-information/-/substanceinfo/100.000.244>
- ECHA. (2021d). *European Chemicals Agency*. Recuperado el 22 de noviembre de 2020, de Identificación de sustancias extremadamente preocupantes: <https://echa.europa.eu/es/substances-of-very-high-concern-identification-explained>
- ECHA. (2021e). *European Chemicals Agency*. Recuperado el 22 de noviembre de 2020, de Substance Information - Triclosan: <https://echa.europa.eu/es/substance-information/-/substanceinfo/100.020.167>
- EFSA. (2004). Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the food chain on a request from the Commission to assess the health risks to consumers associated with exposure to organotins in foodstuff. *The EFSA Journal*, 102, 1-119. doi:10.2903/j.efsa.2004.102
- EFSA. (2019). *European Food Safety Authority*. Recuperado el 7 de marzo de 2021, de Topic - Bisphenol A: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/bisphenol>
- EPA. (s.f.). *Endocrine Disruption: What is the Endocrine System?* Recuperado el 13 de junio de 2021, de United States Environmental Protection Agency: <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/what-endocrine-system>
- García-Arevalo, M., Alonso-Magdalena, P., Servitja, J. M., Boronat-Belda, T., Merino, B., Villar-Pazos, S., Medina-Gómez, G., Novials, A. & Nadal, A. (2016). Maternal exposure to bisphenol-A during pregnancy increases pancreatic beta-cell growth during early life in male mice offspring. *Endocrinology*, 157(11), 4158-4171. doi:10.1210/en.2016-1390
- García-Yerena, G., Jesús-Sánchez, A., Reyes, G., & Cerda-Cristerna, B. I. (2016). Triclosán en pastas dentales, ¿Tiene un riesgo verdadero para la salud? *International Journal of Dental Sciences*, 18(2), 41-49.
- Ghaemmaleki, F., Mohammadi, P., Baeri, M., Navaei-Nigjeh, M., Abdollahi, M., & Mostafalou, S. (2020). Estrogens counteract tributyltin-induced toxicity in the rat islets of Langerhans. *Heliyon*, 6(3), e03562. doi:<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03562>

- Gore, A. C., Chappell, V. A., Fenton, S. E., Flaws, J. A., Nadal, A., Prins, G. S., Toppari, J. & Zoeller, R. T. (2015). EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocr Rev.*, *36*(6), E1-E150. doi:10.1210/er.2015-1010
- Grau-Pérez, M., Kuo, C. C., Spratlen, M., Thayer, K. A., Mendez, M. A., Hamman, R. F., Dabelea, D., Adgate, J. L., Knowler, W. C., Bell, R. A., Miller, F. W., Liese, A. D., Zhang, C., Douillet, C., Drobná, Z., Mayer-Davis, E. J., Styblo, M. & Navas-Acien, A. (2017). The Association of Arsenic Exposure and Metabolism With Type 1 and Type 2 Diabetes in Youth: The SEARCH Case-Control Study. *Diabetes Care*, *40*(1), 46-53. doi:10.2337/dc16-0810.
- Gray, S. L. & Vidal-Puig, A. J. (2007). Adipose tissue expandability in the maintenance of metabolic homeostasis. *Nutr Rev*, *65*(6 Pt 2), S7-S12. doi:10.1111/j.1753-4887.2007.tb00331.x
- Grün, F., & Blumberg, B. (2006a). Environmental obesogens: organotins and endocrine disruption via nuclear receptor signaling. *Endocrinology*, *147*(6 Suppl), S50-55. doi:10.1210/en.2005-1129
- Grün, F., Watanabe, H., Zamanian, Z., Maeda, L., Arima, K., Cubacha, R., Gardiner, D. M., Kanno, J., Iguchi, T. & Blumberg, B. (2006b). Endocrine-disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. *Mol Endocrinol*, *20*(9), 2141-2155. doi:10.1210/me.2005-0367
- Hamid, N., Junaid, M., & Pei, D.-S. (2021). Combined toxicity of endocrine-disrupting chemicals: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *215*, 112136. doi:https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112136
- Hoekstra, E. J. & Simoneau, C. (2013). Release of bisphenol A from polycarbonate: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, *53*(4), 386-402. doi:10.1080/10408398.2010.536919
- Howard, S. G. (2018). Developmental Exposure to Endocrine Disrupting Chemicals and Type 1 Diabetes Mellitus. *Frontiers in Endocrinology*, *9*, 513. doi:10.3389/fendo.2018.00513
- Howard, S. G., & Lee, D.-H. (2012). What is the role of human contamination by environmental chemicals in the development of type 1 diabetes? *J Epidemiol Community Health*, *66*(6), 479-481. doi:10.1136/jech.2011.133694
- Huang, C.-F., Yang, C.-Y., Tsai, J.-R., Wu, C.-T., Liu, S.-H., & Lan, K.-C. (2018). Low-dose tributyltin exposure induces an oxidative stress-triggered JNK-related pancreatic β -cell apoptosis and a reversible hypoinsulinemic hyperglycemia in mice. *Scientific Reports*, *8*(5734). doi:10.1038/s41598-018-24076-w
- Huang, W., Weiming, A., Lin, W., Fang, F., Wang, X., Huang, H., Dahlgren, R. A. & Wang, H. (2020). Identification of receptors for eight endocrine disrupting chemicals and their underlying mechanisms using zebrafish as a model organism. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *204*, 111068. doi:10.1016/j.ecoenv.2020.111068
- IDF. (2019a). *Demographic and geographic outline*. Recuperado el 9 de junio de 2021, de IDF Diabetes Atlas: <https://diabetesatlas.org/en/sections/demographic-and-geographic-outline.html>
- IDF. (2019b). *Diabetes is rising worldwide... and is set to rise even further*. Recuperado el 20 de marzo de 2021, de IDF Diabetes Atlas: <https://www.diabetesatlas.org/en/sections/worldwide-toll-of-diabetes.html>

- Jacobs, H. M., Sant, K. E., Basnet, A., Williams, L. M., Moss, J. B., & Timme-Laragy, A. R. (2018). Embryonic exposure to Mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) disrupts pancreatic organogenesis in zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere*, *195*, 498-507. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.12.094
- Janesick, A. & Blumberg, B. (2011). Endocrine disrupting chemicals and the developmental programming of adipogenesis and obesity. *Birth Defects Res C Embryo Today*, *93*(1), 34-50. doi: 10.1002/bdrc.20197
- Janesick, A. & Blumberg, B. (2012). Obesogens, stem cells and the developmental programming of obesity. *Int J Androl*, *35*(3), 437-448. doi:10.1111/j.1365-2605.2012.01247.x
- Kirchner, S., Kieu, T., Chow, C., Casey, S. & Blumberg, B. (2010). Prenatal exposure to the environmental obesogen tributyltin predisposes multipotent stem cells to become adipocytes. *Mol Endocrinol*, *24*(3), 526-539. doi:10.1210/me.2009-0261
- Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., Van der Saag, P. T., Van der Burg, B., Gustafsson, J. A. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, *139*(10), 4252-4263. doi:10.1210/endo.139.10.6216
- Lang, I. A., Galloway, T. S., Scarlett, A., Henley, W. E., Depledge, M., Wallace, R. B., & Melzer, D. (2008). Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA*, *300*(11), 1303-1310. doi:10.1001/jama.300.11.1303
- Le, H. H., Carlson, E. M., Chua, J. P. & Belcher, S. M. (2008). Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicology Letter*, *176*, 149-156. doi:10.1016/j.toxlet.2007.11.001
- Lee, D. H., Porta, M., Jacobs, D. R Jr. & Vandenberg L. N. (2014). Chlorinated persistent organic pollutants, obesity, and type 2 diabetes. *Endocr Rev*, *35*(4), 557-601. doi:10.1210/er.2013-1084
- Lin, Y., Sun, X., Qiu, L., Wei, J., Huang, Q., Fang, C., Ye, T., Kang, M., Shen, H. & Dong, S. (2013). Exposure to bisphenol A induces dysfunction of insulin secretion and apoptosis through the damage of mitochondria in rat insulinoma (INS-1) cells. *Cell Death Dis.*, *4*(1), e460. doi:10.1038/cddis.2012.206
- Makaji, E., Raha, S., Wade, M. G., & Holloway, A. C. (2011). Effect of Environmental Contaminants on Beta Cell Function. *International Journal of Toxicology*, *30*(4), 410-418. doi:10.1177/1091581811405544
- Mao, Z., Xia, W., Chang, H., Huo, W., Li, Y., & Xu, S. (2015). Paternal BPA exposure in early life alters Igf2 epigenetic status in sperm and induces pancreatic impairment in rat offspring. *Toxicology Letters*, *238*(3), 30-38. doi:10.1016/j.toxlet.2015.08.009
- Marroqui, L., Tudurí, E., Alonso-Magdalena, P., Quesada, I., Nadal, A., & Dos Santos, R. S. (2018). Mitochondria as target of endocrine-disrupting chemicals: implications for type 2 diabetes. *J. Endocrinol.*, *239*(2), R27-R45. doi:10.1530/JOE-18-0362
- Matthews, J. B., Twomey, K., & Zacharewski, T. R. (2001). In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem. Res. Toxicol.*, *14*(2), 149-157. doi:10.1021/tx0001833

- Mosmann, T. (1983). Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.
- Müller, A. K., Nielsen, E., & Ladefoged, O. (2013). *Tributyltin compounds (TBT). Evaluation of health hazards and proposal of health based quality criteria for soil and drinking water*. Copenhagen: The Danish Environmental Protection Agency.
- Nadal, A., Alonso-Magdalena, P., Soriano, S., Quesada, I. & Ropero, A. B. (2009) The pancreatic beta-cell as a target of estrogens and xenoestrogens: Implications for blood glucose homeostasis and diabetes. *Mol Cell Endocrinol*, 304(1-2), 63-68. doi:10.1016/j.mce.2009.02.016
- Nadal, A., Fuentes, E., Ripoll, C., Villar-Pazos, S., Castellano-Muñoz, M., Soriano, S., . . . Alonso-Magdalena, P. (2018). Extranuclear-initiated estrogenic actions of endocrine disrupting chemicals: Is there toxicology beyond paracelsus? *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 176, 16-22. doi:10.1016/j.jsbmb.2017.01.014
- NIH. (s.f.). *Resistencia a la Insulina y la prediabetes*. Recuperado el 13 de junio de 2021, de Nacional Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases: <https://www.niddk.nih.gov/health-information/informacion-de-la-salud/diabetes/informacion-general/que-es/resistencia-insulina-prediabetes>
- Nam, S-H., Seo, Y-M. & Kim, M-G. (2010). Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottles with repeated use. *Chemosphere*, 79, 949-952. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.02.049
- Novelli, M., Piaggi, S. & De Tata, V. (2005). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced impairment of glucose-stimulated insulin secretion in isolated rat pancreatic islets. *Toxicol Lett*, 156(2), 307-314. doi:10.1016/j.toxlet.2004.12.004
- Pedersen, G. A., Hvilsted, S., & Petersen, J. H. (2015). Migration of bisphenol A from polycarbonate plastic of different qualities: Environmental project No. 1710 , 2015. Danish Ministry of the Environment. Miljøprojekter No. 1710. Obtenido de <http://mst.dk/service/publikationer/publikationsarkiv/2015/maj/migration-of-bisphenol-a-frompolycarbonate-plastic>
- Penninks, A. H. (1993). The evaluation of data-derived safety factors for bis(tri-nbutyltin)oxide. *Food Addit Contam*, 10, 351-361.
- Reglamento (CE) No 782/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 14 de abril de 2003, relativo a la prohibición de los compuestos organoestánicos en los buques. Diario Oficial de la Unión Europea, de 9 de mayo de 2003. Recuperado de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R0782&from=ES>
- Reglamento (CE) No 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de noviembre de 2009, sobre los productos cosméticos. Diario Oficial de la Unión Europea, de 22 de diciembre de 2009. Recuperado de <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:342:0059:0209:es:PDF>
- Reglamento (UE) No 10/2011 de la Comisión, de 14 de enero de 2011, sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. Diario Oficial de la Unión Europea, de 15 de enero de 2011. Recuperado de <https://www.boe.es/doue/2011/012/L00001-00089.pdf>

- Rodricks, J. V., Swenberg, J. A., Borzelleca, J. F., Maronpot, R. R. & Shipp, A. M. (2010). Triclosan: a critical review of the experimental data and development of margins of safety for consumer products;. *Crit Rev Toxicol.*, *40*, 422-84. doi:10.3109/10408441003667514
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2004). *Assay Guidance Manual*. Recuperado el 11 de febrero de 2021, de NCBI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
- Sandborgh-Englund, G., Adolfsson-Erici, M., Odham, G. & Ekstrand, J. (2006). Pharmacokinetics of triclosan following oral ingestion in humans. *J. Toxicol Environ Health A.*, *69*, 1861-73. doi:10.1080/15287390600631706
- Sandler, S., & Andersson, A. (1982). Short- and long-term effects of dimethyl sulfoxide on mouse pancreatic islet B-cell function in vitro. *Cryobiology*, *19*(3), 299-305. doi:10.1016/0011-2240(82)90158-4
- Sant, K. E., Jacobs, H. M., Borofski, K. A., Moss, J. B., & Timme-Laragy, A. R. (2017). Embryonic exposures to perfluorooctanesulfonic acid (PFOS) disrupt pancreatic organogenesis in the zebrafish, *Danio rerio*. *Environ Pollut*, *220*(Pt B), 807-817. doi:10.1016/j.envpol.2016.10.057
- Sigma. (s.f. de s.f. de s.f.). *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide - Product information sheet*. Recuperado el 11 de febrero de 2021, de Sigmaaldrich: https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/m2128pis.pdf
- Silva, E., Rajapakse, N., & Kortenkamp, A. (2002). Something from "nothing" - eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ Sci Technol.*, *36*(8), 1751-1756. doi:10.1021/es0101227
- Sousa, A. C., Pastorinho, M. R., Takahashi, S., & Tanabe, S. (2014). History on organotin compounds, from snails to humans. *Environ Chem Lett*, *12*, 117–137. doi:10.1007/s10311-013-0449-8
- Steinmetz, R., Brown, N. G., Allen, D. L., Bigsby, R. M., & Ben-Jonathan, N. (1997). The environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release in vitro and in vivo. *Endocrinology*, *138*(5), 1780-1786. doi:10.1210/endo.138.5.5132
- Timme-Laragy, A. R., Sant, K. E., Rousseau, M. E., & Dilorio, P. J. (2015). Deviant development of pancreatic beta cells from embryonic exposure to PCB-126 in zebrafish. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, *178*, 25-32. doi:10.1016/j.cbpc.2015.08.012
- Vandenberg, L. N. (2014). Non-monotonic dose responses in studies of endocrine disrupting chemicals: bisphenol A as a case study. *Dose Response*, *12*, 259-276. doi:10.2203/dose-response.13-020.Vandenberg
- Virtue, S. & Vidal-Puig, A. (2010). Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the metabolic syndrome—an allostatic perspective. *Biochim Biophys Acta*, *1801*(3), 338-349. doi:10.1016/j.bbali.2009.12.006
- Vom Saal, F. S., Timms, B. G., Montano, M. M., Palanza, P., Thayer, K. A., Nagel, S. C., Dhar, M. D., Ganjam, V. K., Parmigiani, S., Welshons, W. V. (1997). Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, *94*, 2056-2061. doi:10.1073/pnas.94.5.2056

- Wan, H. T., Zhao, Y. G., Leung, P. Y., Wong & C. K. (2014). Perinatal exposure to perfluorooctane sulfonate affects glucose metabolism in adult offspring. *PLoS One*, *9*(1), e87137. doi:10.1371/journal.pone.0087137
- Wei, J., Lin, Y., Li, Y., Ying, C., Chen, J., Song, L., Zhou, Z., Lv, Z., Xia, W., Chen, X., & Xu, S. (2011). Perinatal exposure to bisphenol A at reference dose predisposes offspring to metabolic syndrome in adult rats on a high-fat diet. *Endocrinology*, *152*, 3049-3061. doi:10.1210/en.2011-0045
- Wetherill, Y. B., Akingbemi, B. T., Kanno, J., McLachlan, J. A., Nadal, A., Sonnenschein, C., Watson, C. S., Zoeller, R. T. & Belcher S. M. (2007). In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reprod Toxicol*, *24*(2), 178-98. doi:10.1016/j.reprotox.2007.05.010
- Whitehead, R., Guan, H., Arany, E., Cernea, M., & Yang, K. (2016). Prenatal exposure to bisphenol A alters mouse fetal pancreatic morphology and islet composition. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, *25*, 171-179. doi:10.1515/hmbci-2015-0052
- WHO. (2013). *Nuevo informe sobre las sustancias químicas que perturban la función endocrina*. Recuperado el 20 de marzo de 2021, de Organización Mundial de la Salud: https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2013/hormone_disrupting_20130219/es/
- WHO. (2016). *Informe Mundial Sobre la Diabetes*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <https://www.who.int/diabetes/global-report/es/>
- WHO. (13 de abril de 2021). *Diabetes*. Recuperado el 21 de mayo de 2021, de Organización Mundial de la Salud: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>
- WHO-IPCS. (1999a). International Programme on Chemical Safety. Concise international chemical assessment document 14. Tributyltin oxide; Obtenido de <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicad14.htm>
- WHO-IPCS. (1999b). International Programme on Chemical Safety. Tributyl compounds. Environmental health criteria 116. Obtenido de <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc116.htm>
- WHO, UNEP & ILO. (2002). *Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors*. (T. Damstra, S. Barlow, A. Bergman, R. Kavlock, & G. Van Der Kraak, Edits.) Obtenido de https://www.who.int/ipcs/publications/new_issues/endocrine_disruptors/en/
- WHO/UNEP. (2013). *State of the science of endocrine disrupting chemicals - 2012*. (Å. Bergman, J. J. Heindel, S. Jobling, K. A. Kidd, & R. T. Zoeller, Edits.) Obtenido de <https://www.who.int/ceh/publications/endocrine/en/>
- Ziegler, A. G., Pflueger, M., Winkler, C., Achenbach, P., Akolkar, B., Krischer, J. P. & Bonifacio, E. (2011). Accelerated progression from islet autoimmunity to diabetes is causing the escalating incidence of type 1 diabetes in young children. *Journal of Autoimmunity*, *37*(1), 3-7. doi:10.1016/j.jaut.2011.02.004
- Zuo, Z., Wu, T., Lin, M., Zhang, S., Yan, F., Yang, Z., Wang, Y. & Wang, C. (2014). Chronic exposure to tributyltin chloride induces pancreatic islet cell apoptosis and disrupts glucose homeostasis in male mice. *Environmental Science & Technology*, *48*, 5179-5186. doi:10.1021/es404729p