

Cuantificación de Bisfenol-A libre en sangre de cordón umbilical humano a nivel de trazas*

Quantification of free Bisphenol-A in human umbilical cord blood at trace level

Quantificação de Bisfenol-A livre em sangue de cordão umbilical humano a nível de traços

- Gabriel Guillermo Cases^{1a}, Gustavo Javier Calinski², Mariana Laura Méndez³, Flavia Alejandra Vidal^{4b}, Lucas Otaño^{4b}, Gonzalo Luis Mariani^{4b}, Silvana Figar^{4b}, María Isabel Giménez^{1b}

¹ Bioquímico.

² Farmacéutico.

³ Lic. en Ciencias Químicas.

⁴ Médico.

^a Profesional Principal. CPA. CONICET.

^b Integrantes del Programa de Investigación en Salud y Ambiente (PISA).

* Sección Cromatografía y Espectrometría de Masa, Laboratorio Central, Hospital Italiano de Buenos Aires, Perón 4190, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, C1181ACH, Argentina.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

Resumen

El Bisfenol-A (BPA) es ampliamente utilizado en la producción de plásticos de policarbonato, por lo que está presente en productos de uso masivo. Es un disruptor endócrino e incide en el desarrollo gonadal y del sistema nervioso central. La exposición de mujeres embarazadas al BPA es particularmente preocupante para el feto en desarrollo, debido a que atraviesa la placenta pasando a la sangre de cordón y al líquido amniótico. Esto se suma a la escasa o nula actividad enzimática fetal para biotransformarlo en BPA-glucurónido inactivo, causando posibles efectos nocivos a la descendencia a dosis muy bajas y sostenidas. Con el propósito de estudiar la exposición al BPA y sus efectos en la población de Argentina se desarrolló y validó un método analítico por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa, que permite la cuantificación de trazas de BPA libre (forma estrogénica, activa) en plasma de cordón umbilical. La técnica consiste en la precipitación de proteínas de la sangre de cordón por agregado de acetonitrilo y posterior centrifugado e inyección del sobrenadante. Se utilizó una elución isocrática en la cromatografía líquida, y la espectrometría de masa se realizó empleando Electrospray negativo en modo de monitoreo de reacciones múltiples. Los valores de BPA libre cuantificados están en el rango de 1,0 a 12,1 ng/mL, límite de detección: 0,6 ng/mL.

Palabras clave: Bisfenol-A * sangre de cordón * disruptor endócrino * cromatografía líquida-espectrometría de masa

Abstract

Bisphenol-A (BPA) is widely used in the production of polycarbonate plastics and therefore, it is present in products of massive use. It is known as an endocrine disruptor and has an impact on gonadal and central nervous system

development. Exposure of pregnant women to BPA is particularly worrying for the developing fetus because it crosses the placenta into the cord blood and amniotic fluid, coupled with little or no fetal enzymatic activity to biotransform it into inactive BPA-glucuronide, causing possible harmful effects to the offspring at very low and sustained doses. With the aim to study the exposure to BPA and its effects on the population of Argentina, an analytical method was developed and validated by liquid chromatography coupled to mass spectrometry, which allows the quantification of trace amounts of free BPA (estrogenic, active form) in plasma of umbilical cord. The method involves protein precipitation by the addition of acetonitrile and subsequent centrifugation and injection of supernatant. An isocratic elution was used in liquid chromatography, and mass spectrometry was performed using negative Electrospray mode in multiple reaction monitoring. Quantified free BPA values are in the range of 1.0 to 12.1 ng/mL, Detection Limit: 0,6 ng/mL.

Keywords: Bisphenol-A * cord blood * endocrine disruptor * liquid chromatography-mass spectrometry

Resumo

O Bisfenol-A (BPA) é amplamente utilizado na produção de plásticos de policarbonato, portanto está presente em produtos de uso massivo. Ele é um disruptor endócrino e tem um impacto no desenvolvimento gonadal e do sistema nervoso central. A exposição de mulheres grávidas ao BPA é particularmente preocupante para o feto em desenvolvimento, visto que atravessa a placenta passando ao sangue do cordão e ao líquido amniótico. Isso é adicionado à pouca ou nula atividade enzimática fetal para biotransformá-lo em BPA-glicuronídeo inativo, o que causa possíveis efeitos nocivos aos descendentes em doses muito baixas e sustentadas. Visando a estudar a exposição ao BPA e seus efeitos na população da Argentina, foi desenvolvido e validado um método analítico por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa, que permitem a quantificação de vestígios de BPA livre (forma estrogênica, livre) em plasma do cordão umbilical. A técnica consiste na precipitação de proteínas do sangue de cordão por adição de acetonitrila e posterior centrifugação e injeção no sobrenadante. Na cromatografia líquida, foi utilizada uma eluição isocrática, e a espectrometria de massa foi realizada utilizando Electrospray negativo em modo de monitoramento de reações múltiplas. Os valores de BPA livre quantificados estão na faixa de 1,0 a 12,1 ng/mL, limite de detecção: 0,6 ng/mL.

Palavras-chave: Bisfenol-A * sangue do cordão * desregulador endócrino * cromatografia líquida-espectrometria de massa

Introducción

El Bisfenol-A (Bisphenol-A; BPA, por sus siglas en inglés) es el ingrediente principal en la producción de policarbonato, poliéster insaturado, resinas de polisulfona y epoxi. Los materiales que contienen BPA se han utilizado para muchas aplicaciones por lo que está presente en productos de uso cotidiano y masivo, como, por ejemplo, en el barniz del interior de latas de conserva, en envases utilizados para el almacenamiento de productos alimenticios y farmacéuticos, en la producción de componentes de equipos médicos (para diálisis y oxigenación de la sangre), en selladores dentales y prótesis, botellas para la alimentación de lactantes y platos de cocina. Desde hace décadas se conoce la débil estrogenicidad que provoca el BPA debido a su estructura fenólica, imitando la acción de la hormona endógena (17 β -estradiol). Sin embargo, estudios recientes revelan que, en una variedad de tejidos, el BPA no sólo tiene la eficacia del estradiol, sino que es igualmente potente, observándose cambios en la función celular a una dosis de 1 picomol (1). Se lo designa como “disruptor

endócrino” (DE) y sus efectos inciden en el desarrollo gonadal y del sistema nervioso central.

La dieta es la principal fuente de exposición humana a este DE (2). Los niveles de BPA en los alimentos están directamente relacionados con el tiempo de almacenamiento en los envases plásticos, y con las temperaturas utilizadas durante la esterilización, la pasteurización o el calentamiento de los mismos antes del consumo. Además, el BPA puede emigrar al contenido de una lata como consecuencia de factores mecánicos tales como abolladuras y remodelado de latas (3).

Estudios en animales demostraron que el BPA atraviesa la placenta y se distribuye tanto en tejidos placentarios como fetales, hallándose valores de concentración más elevados en ciertos tejidos fetales que en el suero materno luego de la dosificación (4) (5). Diversos estudios en humanos han detectado la presencia de BPA en suero materno, placenta, líquido amniótico, suero de cordón umbilical y en hígado fetal (6). En adultos el BPA es mayormente metabolizado al glucuronido biológicamente inactivo a través de la enzima hepática uridinadifosfatoglucuroniltransferasa (UDPGT),

pero en el hígado fetal humano la actividad de esta enzima es escasa o prácticamente nula (7) (8). Además, se ha encontrado en tejidos placentarios humanos, que la enzima β -glucuronidasa es altamente activa y puede aumentar aún más la exposición fetal al BPA libre por hidrólisis del BPA conjugado que ingresa al compartimiento fetal (9). Por esta razón, la presencia de BPA *in utero* podría ser particularmente perjudicial debido a la exposición prolongada del feto a la forma libre durante los períodos clave de desarrollo (10), y su toxicidad puede darse a dosis muy bajas, más allá de los límites que generalmente se consideraban seguros. Por lo tanto, se ha planteado la necesidad de cuantificar trazas de BPA libre (forma estrogénica activa) en sangre de cordón umbilical para estudiar la exposición fetal al mismo y sus efectos en la población de Argentina. El objetivo del presente trabajo es el desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía líquida de ultra rendimiento acoplada a un detector de espectrometría de masa en tándem (UPLC-ESI-MS/MS), utilizando un isótopo deuterado estable del BPA como estándar interno (BPA-d16), para la detección y cuantificación de trazas de BPA libre en plasma de cordón umbilical.

Materiales y Métodos

Materiales. Los estándares de Bisfenol-A (BPA) y Bisfenol-A d16 (BPA-d16) fueron comprados a Sigma-Aldrich (Argentina). Los solventes metanol y acetonitrilo Optima (grado LC/MS) son de Fisher Scientific. Se utilizó el sistema de Agua Ultrapura Sartorius Arium Pro, tubos de vidrio BD Vacutainer™ con EDTA K₃ y crioviales de polipropileno T310 - Cryovial® Simport.

Preparación de estándares de calibración, controles de calidad, y solución de estándar interno. El estándar de BPA y el estándar interno BPA-d16 fueron disueltos por separado en metanol y se preparó una solución de reserva de 0,1 mg/mL de cada uno. Por diluciones seriadas en metanol de la solución de reserva de BPA se prepararon las soluciones de trabajo que fueron utilizadas para fortificar plasma humano normal. Se obtuvieron los estándares de calibración plasmáticos necesarios para crear la curva de calibración de siete niveles de concentración, en un rango de 1,1 a 12,0 ng/mL. Las muestras de control de calidad plasmáticas (Quality Control; QC, por sus siglas en inglés) fueron preparadas de la misma manera en tres niveles de concentración: 10,0 ng/mL (QC Alto), 5,6 ng/mL (QC Medio) y 3,3 ng/mL (QC Bajo). Por dilución en acetonitrilo de la solución de reserva de BPA-d16 se obtuvo la solución de trabajo de estándar interno de 10,2 ng/mL. Las soluciones de reserva fueron almacenadas a 4 °C. Las soluciones de trabajo fueron almacenadas a 4 °C y al abrigo de la luz por no más de una semana.

Recolección y preparación de muestra. Las muestras de sangre de cordón umbilical fueron recolectadas en el momento del nacimiento en tubos de vidrio con EDTA K₃ como anticoagulante e inmediatamente enviadas al laboratorio, donde fueron centrifugadas a 3.500 rpm por 10 minutos a 4 °C. Cada plasma sobrenadante fue separado por aspiración con pipeta de polipropileno, almacenado en crioviales de polipropileno, y conservado en *freezer* a -20 °C hasta el momento de su análisis. Se analizaron en total 390 muestras de sangre de cordón umbilical de niños nacidos en el Hospital Italiano entre los años 2013-2014. Se les explicó a los padres los objetivos del estudio, se les garantizó la confidencialidad y se obtuvieron sus consentimientos informados por escrito. Las muestras se recolectaron con la aprobación del Comité de Ética de Protocolos de Investigación del Hospital Italiano de Buenos Aires (CEPI, N° de Protocolo: 2008).

Procesamiento de muestras (calibradores, QC's y muestras en estudio). Una alícuota de 225 μ L de plasma se colocó en un vial de vidrio; se agregaron 900 μ L de la solución de trabajo de estándar interno y se homogeneizó en *vortex* durante 30 segundos. La mezcla fue centrifugada a 3.500 rpm y a 4 °C por 10 minutos. Se obtuvo un sobrenadante que fue transferido a otro vial de vidrio y luego inyectado (3 μ L) en el UPLC-MS/MS a través del automuestreador. Todas las muestras fueron procesadas y analizadas en febrero de 2016. Se ha demostrado que el BPA es estable en biofluidos humanos almacenados en *freezer* a -20 °C por más de 20 años (10).

Separación y cuantificación. Los análisis se realizaron utilizando un equipo de cromatografía líquida de ultra rendimiento marca Waters, modelo ACQUITY UPLC H-Class, acoplado al espectrómetro de masa de triple cuadrupolo marca Waters, modelo Xevo TQ S. El programa de control de instrumentos es el MassLynx v.4,1 (adquisición de datos y procesamiento de espectros). El programa TargetLynx fue utilizado para el procesamiento de los datos del monitoreo de reacciones múltiples (MRM). Para la cromatografía analítica se utilizó una columna ACQUITY UPLC BEH C18 (2,1 x 100 mm, 1,7 μ m de Waters) operando a 45 °C. La fase móvil se compone de agua: acetonitrilo (50:50). El flujo fue de 0,4 mL/min en elución isocrática durante 3 minutos, siendo el volumen de inyección de muestra de 3 μ L. La fuente de ionización por electrospray (ESI) fue utilizada en modo negativo. Los parámetros de operación fueron optimizados bajo las siguientes condiciones: voltaje del capilar, 2,69 kV; temperatura de la fuente, 150 °C; temperatura de desolvatación, 550 °C; flujo del gas de desolvatación, 1000 L/hr (N₂); flujo del gas nebulizador (N₂), 7 bares; flujo del gas del cono (N₂), 150 L/hr; flujo de gas de colisión (Ar), 0,10 mL/min. Los datos para la cuantificación y confirmación fueron adquiridos en el modo monitoreo

de reacciones múltiples (MRM). Las transiciones ion precursor a ion producto, las energías de cono y de colisión óptimas para cada analito están listadas en la Tabla I. La concentración de BPA en cada muestra fue medida por interpolación en la curva de calibración de la relación de áreas de pico entre el analito y su estándar interno.

Evaluación de la contaminación por BPA. Para poder evaluar la posible contaminación por el BPA presente en el ambiente del laboratorio analítico y en los materiales utilizados, se prepararon diferentes blancos. Se evaluaron los tubos contenedores de muestra, los crioviales, las puntas para pipetas, viales para automuestreador, etc. Asimismo, se analizó el aporte de BPA proveniente de las tubuladuras del equipo cromatográfico. No se ha detectado la presencia de BPA por encima del límite de detección (LD) en todas las pruebas realizadas. Además, se evaluó el posible aporte de BPA (no deuterado) a partir del BPA d16 (estándar interno) debido a un enriquecimiento isotópico incompleto, y resultó por debajo del LD.

Validación del método. Se utilizó un procedimiento basado en los criterios de validación publicados por la EMA (11). El método de UPLC-MS/MS fue validado para selectividad, linealidad, límite de detección (LD), límite inferior de cuantificación (LIC), exactitud y precisión intradía e interdía.

La selectividad fue evaluada por comparación del área del pico cromatográfico entre el blanco de muestra y la muestra del estándar de calibración. El área del pico en el tiempo de retención esperado para cada analito en las muestras blanco debe ser menor al 20% del promedio de áreas de pico en las muestras del LIC.

La curva de calibración fue construida trazando la relación de áreas de pico entre el analito medido y el estándar interno en el eje de ordenadas (eje Y) con respecto a la concentración nominal del analito en el eje de abscisas (eje X), para cada uno de los calibradores. Se realizó un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados con una ponderación $1/x$, y fueron calculadas la pendiente, la ordenada al origen, y el coeficiente de determinación (R^2) de la curva de calibración (*software* Masslynx 4,1; módulo TargetLynx).

El LIC del ensayo fue definido como la menor concentración de la curva de calibración que se podía cuantificar (LIC, relación señal/ruido (S/N) ≥ 5). El LD fue definido como la menor concentración que se podía detectar (LD, S/N ≥ 3).

La exactitud y precisión del método fue evaluada mediante las muestras de QC's plasmáticas a concentraciones baja, media y alta. Se midieron cinco replicados de cada nivel de concentración para evaluar la precisión y exactitud intra-día, luego se evaluó la interdía durante los cinco días de validación. La precisión del ensayo es expresada como un Coeficiente de Variación Porcentual (CV%) de la concentración medida a cada nivel. La exactitud del ensayo se expresa como un porcentaje de desviación de la concentración medida con respecto a la concentración nominal en cada nivel, y se denomina Error Relativo Porcentual (ER%). La precisión y exactitud intra-día e inter-día no debe exceder de 15%.

Análisis de datos y estadística. Se utilizó el *software* TargetLynx 4,1 para generar "tablas de cuantificación" que contienen: tiempo de retención (Tr), valores del área de señal, y concentración para cada variable en cada muestra. Los cálculos de la relación lineal entre áreas de señal y concentraciones se obtuvieron mediante regresión de mínimos cuadrados ponderados. Los resultados se presentaron como la media \pm desviación estándar.

Resultados

Selectividad. El método analítico permitió diferenciar al BPA y a su estándar interno de otros componentes plasmáticos (Fig. 1).

Linealidad, Límites de Detección y Cuantificación. La curva de calibración preparada en plasma humano normal resultó ser lineal entre 1,1 y 12,0 ng/mL, con un coeficiente de determinación (R^2) mayor a 0,99 (Fig. 2). El Límite de Detección fue de 0,6 ng/mL y el Límite de Cuantificación fue de 1,1 ng/mL (ambos límites fueron analizados para BPA en 225 μ L de plasma).

Tabla I. Transiciones MRM seleccionadas.

Transición	Cono (V)	Colisión (V)	dwel (seg)	Analito	Fragmento perdido
227>212 (Cuantificación)	46	19	0,05	BPA	-CH ₃
227>133 (Confirmación)	46	25	0,05	BPA	-H, -C ₆ H ₅ O
241>223 (Cuantificación, Estándar Interno)	46	20	0,05	BPA-d16	-CD ₃
241>142 (Confirmación, Estándar Interno)	11	26	0,05	BPA-d16	-H, -C ₆ D ₅ O

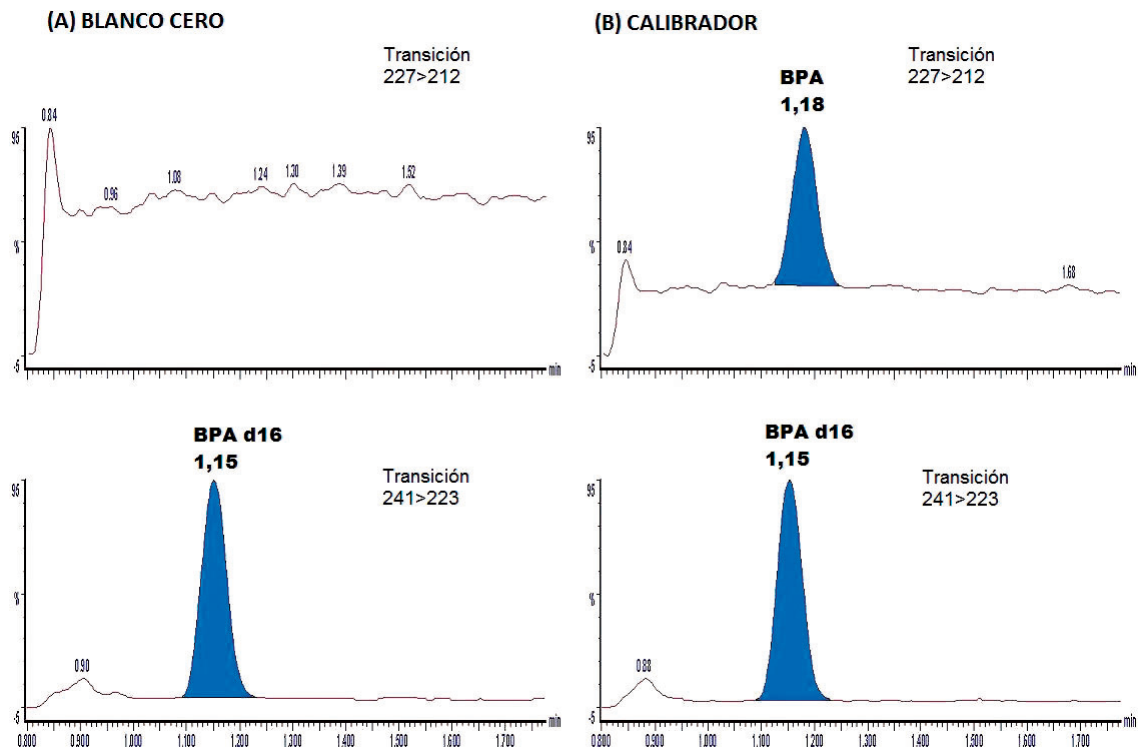


Figura 1. Selectividad.

(A): No se observó pico de BPA (Transición 227>212) en el blanco cero (Plasma Normal + Estándar Interno).
 (B): Presencia de BPA y BPA d16 en el calibrador.

Compound name: BSF A
 Correlation coefficient: $r = 0.995559$, $r^2 = 0.991138$
 Calibration curve: $0.0192385 \cdot x + 0.00315991$
 Response type: Internal Std (Ref 2), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

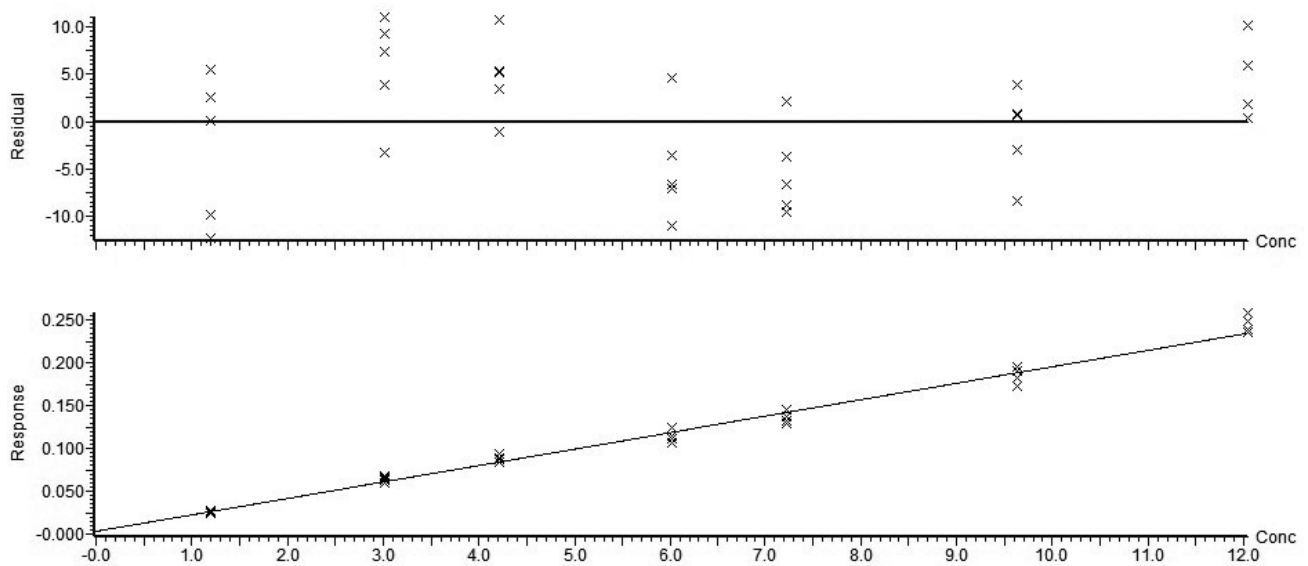


Figura 2. Linealidad. Curva de calibración.

Precisión y Exactitud. En la Tabla II están representados los valores de Precisión (CV%) y Exactitud (ER%) para los tres QC's utilizados, en las mediciones de replicados Intra-Día (n=5) y para las mediciones de replicados Inter-Día (n=13).

Valores de BPA libre hallados en plasma de cordón umbilical. Se detectó la presencia de BPA libre en un 5,1% (20/390) del total de muestras analizadas. La Media obtenida del total de muestras cuantificadas fue de 3,69 ng/mL (desviación estándar: 3,55). Sólo dos muestras (0,5 % del total) resultaron por encima del Límite Superior de Cuantificación (LSC). En la Tabla III están resumidos los valores obtenidos con el método validado.

Discusión y Conclusiones

El mayor desafío por resolver en la cuantificación plasmática de BPA es su presencia como contaminante en la recolección y preparación de muestra, y en el sistema cromatográfico. El BPA está presente en el plástico de la mayoría de los materiales utilizados en el laboratorio (puntas de pipetas, tapas de viales y botellas, viales tipo Eppendorf, etc.). Las tubuladuras del UPLC por donde circulan los solventes (fases móviles) también pueden contener BPA. Algunas marcas comerciales de los solventes utilizados (metanol, acetonitrilo, etc.) presentan contaminación con BPA. El agua ultrapura que se utiliza en el laboratorio puede contener trazas de BPA debido a que los filtros de polisulfona que utiliza el equipo de purificación están hechos a partir del mismo. Por todo lo expuesto, el problema más notorio a sortear en el análisis de ultra trazas de BPA es la "contaminación de fondo" (*background*) que dificulta

lograr bajos límites de detección. Cuando los niveles de contaminación en el blanco de muestra no son estables se pueden producir sub o sobre estimaciones en los resultados analíticos. Es necesaria una rigurosa revisión de las fuentes de contaminación para identificarlas y poder minimizarlas o evitarlas por completo. Incluso el muestreo, el almacenamiento y la filtración de muestras pueden ser fuentes de contaminación.

Luego de un largo y laborioso trabajo, tendiente a reducir la contaminación de fondo de BPA para lograr buena repetitividad en las mediciones a nivel de ultratrazas, el pico cromatográfico de BPA seguía estando presente no solo en la inyección de muestras blanco sino también cuando se hacían inyecciones vacías (sin volumen) utilizando una elución en modo gradiente. Se evaluaron distintas soluciones de lavado del sistema de inyección del equipo ya que se creía que el BPA presente era producto de una deficiente limpieza del sistema cromatográfico. Además, se probaron diferentes gradientes de elución sin obtener resultados satisfactorios. Por último, se decidió cambiar la elución en gradiente por una isocrática, compuesta por partes iguales de fases acuosa y orgánica. Luego de una serie de pruebas se llegó a la misma conclusión que Wilczewska *et al* (12), las trazas de BPA presentes en los solventes utilizados para las fases móviles (incluso los de grado LC/MS) se van reteniendo y enriqueciendo en el frente de la columna durante su acondicionamiento (donde la fuerza de elución de la fase móvil es baja), y se observó que la intensidad del pico de BPA aumentaba proporcionalmente al período de acondicionamiento utilizado. El uso de una fase móvil con mayor poder de elución (50% v/v acetonitrilo) y en un modo isocrático evitó la acumulación de BPA en el frente de la columna cromatográfica.

Tabla II. *Precisión y Exactitud.*

Matriz	Analito	Concentración nominal (ng/mL)	Intra-Día (n=5)			Inter-Día (n=13)		
			Concentración medida (ng/mL)	CV%	ER%	Concentración medida (ng/mL)	CV%	ER%
Plasma	BPA	3,50	3,35±0,25	7,51	7,18	3,64±0,29	8,43	8,32
		5,83	5,40±0,20	3,67	7,40	5,66±0,33	5,71	5,22
		10,49	11,58±0,46	4,00	10,33	11,65±0,37	3,21	11,08

Tabla III. *Resumen de los resultados obtenidos de BPA libre en plasma de cordón umbilical humano.*

BPA libre	Valor de BPA (ng/mL)	Cantidad de muestras (n)	% del total
No detectable (ND)	ND	246	63,1
< LD	Menor a 0,6	124	31,8
≥ LD y < LIC	De 0,6 a 1,1	4	1,0
Cuantificable	De 1,1 a 12,0	14	3,6
> LSC	Mayor a 12,0	2	0,5

De esta manera se obtuvo un método rápido, sensible y selectivo para la medición de BPA en sangre de cordón umbilical que, además, solo requiere de un simple pretratamiento de muestra, teniendo en consideración evitar el uso de material de plástico en todas las etapas, desde la toma de muestra hasta la obtención del extracto a inyectar en el UPLC-MS/MS.

En la Tabla IV están indicados los valores de BPA libre publicados en bibliografía hasta el presente estudio. Se destaca este trabajo por ser el de mayor tamaño muestral y por el uso de la UPLC para la separación de los componentes de la muestra. Los métodos que utilizan la detección por espectrometría de masa poseen mayor selectividad, cualidad necesaria para una cuantificación precisa en matrices biológicas complejas. Los únicos métodos de detección directa de BPA, en los cuales no se utilizó derivatización previa a la cuantificación, corresponden al trabajo de Gerona *et al* (6) y al presente, por lo tanto, en el resto de los estudios existe la posibilidad de pérdida de analito por una deficiente derivatización. La diferencia entre estos dos trabajos radica en cuándo fue el momento en que se realizó la toma de muestra. Gerona *et al* reclutó a mujeres embarazadas que electivamente terminaban su embarazo en el segundo trimestre a diferencia del trabajo realizado en nuestro laboratorio donde las muestras fueron recolectadas al nacimiento.

En resumen, este trabajo es el primero que ha cuantificado BPA en sangre de cordón umbilical humano en Argentina y los resultados obtenidos son de suma importancia para evaluar la exposición fetal al mismo y sus posibles efectos en la población afectada.

CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este protocolo de investigación y su financiación fueron registrados y aprobados por el Comité de Éti-

ca de Protocolos de Investigación del Hospital Italiano de Buenos Aires (CEPI, N° de Protocolo: 2008). Se dio a los participantes una explicación de los objetivos del estudio, se les garantizó la confidencialidad y se obtuvo su consentimiento.

DECLARACIÓN DE CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses para la confección de este manuscrito.

CORRESPONDENCIA

Dr. GABRIEL CASES
Perón 4190, Planta Baja
(C1181ACH) CIUDAD AUTÓNOMA DE BUENOS AIRES,
Argentina
Tel. (54) (11) 49590200 ext. 4900
Tel. *mobile* (54) (11) 1540392791
E-mail: gabriel.cases@hospitalitaliano.org.ar;
ggcases@hotmail.com

Referencias bibliográficas

- Vandenberg LN, Hauser R, Marcus M, Olea N, Welshons WV. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicol* 2007; 24: 139–77.
- Volkel W, Bittner N, Dekant W. Quantitation of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Drug Metab Dispos* 2005; 33: 1748–57.
- Szybiak A, Rutkowska A, Wilczewska K, Wasik A, Namieśnik J, Rachoń D. Daily diet containing canned products significantly increases serum concentrations of endocrine disruptor bisphenol A in young women. *Pol Arch Intern Med* 2017; 127 (4): 278-80.

Tabla IV. Valores publicados de BPA libre en sangre de cordón umbilical.

Estudio	Año	País	Muestreo	n ^a	n ≥ LD ^b	Método	LD (ng/mL)	BPA libre (ng/mL)		
								Media (DE) ^c	Mediana	Rango
Hospital Italiano	2016	Argentina	Al nacer	390	20	UPLC-MS/MS	0,6	3,69 (3,55)	1,70	1,1 – 12,0
Gerona <i>et al</i> (6)	2013	Estados Unidos	Segundo trimestre	85	40	LC-MS/MS	0,05	2,18 (8,10)	<LD	<LD – 52,26
Wan <i>et al</i> (13)	2010	Corea del Sur	Al nacer	25	2	LC-MS/MS	0,1 (LIC)	< 0,6	NR ^d	<0,6 – 0,7
Lee <i>et al</i> (14)	2008	Corea del Sur	Al nacer	300	120	HPLC	0,63	1,13 (1,43)	<LD	<LD – 8,86
Kuroda <i>et al</i> (15)	2003	Japón	Al nacer	9	9	HPLC	0,04	0,62 (0,13)	0,64	0,45 – 0,76
Schonfelder <i>et al</i> (16)	2002	Alemania	Al nacer	37	37	GC-MS	0,01	2,9 (2,5)	2,3	0,2 – 9,2
Ikezuki <i>et al</i> (17)	2001	Japón	Al nacer	32	32	ELISA	0,5	2,2 (1,8)	NR	NR

^an: número de muestras.

^bLD: límite de detección.

^cDE: desviación estándar.

^dNR: no reportado.

4. Takahashi O, Oishi S. Disposition of orally administered 2,2Bis(4-hydroxyphenyl)propane (Bisphenol A) in pregnant rats and the placental transfer to fetuses. *Environ Health Perspect* 2000; 108 (10): 931–5.
5. Balakrishnan B, Henare K, Thorstensen EB, Ponnampalam AP, Mitchell MD. Transfer of bisphenol A across the human placenta. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 202(4): 393 e1–7.
6. Gerona RR, Woodruff TJ, Dickenson CA, Pan J, Schwartz JM, Sen S, *et al.* Bisphenol-A (BPA), BPA glucuronide, and BPA sulfate in midgestation umbilical cord serum in a Northern and Central California population. *Environ Sci Technol* 2013; 47: 12477–85.
7. Coughtrie MWH, Burchell B, Leakey JEA, Hume R. The inadequacy of perinatal glucuronidation: Immunoblot analysis of the developmental expression of individual UDP-glucuronosyltransferase isoenzymes in rat and human liver microsomes. *Mol Pharmacol* 1988; 34 (6): 729–35.
8. Kang JH, Katayama Y, Kondo F. Biodegradation or metabolism of bisphenol A: From microorganisms to mammals. *Toxicology* 2006; 217 (2–3): 81–90.
9. Nishikawa MIH, Yanagisawa R, Koike N, Inoue H, Yokota H. Placental transfer of conjugated bisphenol A and subsequent reactivation in the rat fetus. *Environ Health Perspect* 2010; 118 (9): 1196–203.
10. Edlow AG, Chen M, Smith NA, Lu C, McElrath TF. Fetal bisphenol A exposure: Concentration of conjugated and unconjugated bisphenol A in amniotic fluid in the second and third trimesters. *Reproductive Toxicology* 2012; 34: 1–7.
11. European Medicines Agency (EMA), Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev.1 Corr.2**. Disponible en: URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf. Fecha de acceso: 30 de setiembre de 2016.
12. Wilczewska K, Namieśnik J, Wasik A. Troubleshooting of the determination of bisphenol A at ultra-trace levels by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2016; 408: 1009–13.
13. Wan YCK, Kim S, Ji K, Chang H, Wiseman S, Jones PD, *et al.* Hydroxylated polybrominated diphenyl ethers and bisphenol A in pregnant women and their matching fetuses: placental transfer and potential risks. *Environ Sci Technol* 2010; 44 (13): 5233–9.
14. Lee YJ, Ryu HY, Kim HK, Min CS, Lee JH, Kim E, *et al.* Maternal and fetal exposure to bisphenol A in Korea. *Reprod Toxicol* 2008; 25 (4): 413–9.
15. Kuroda N, Kinoshita Y, Sun Y, Wada M, Kishikawa N, Nakashima K, *et al.* Measurement of bisphenol A levels in human blood serum and ascitic fluid by HPLC using a fluorescent labeling reagent. *J Pharm Biomed Anal* 2003; 30 (6): 1743–9.
16. Schonfelder G, Wittfoht W, Hopp H, Talsness CE, Paul M, Chahoud I. Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit. *Environ Health Perspect* 2002; 110 (11): A703–7.
17. Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y, Kamei Y, Taketani Y. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum Reprod* 2002; 17 (11): 2839–41.

Recibido: 18 de septiembre de 2017

Aceptado: 10 de noviembre de 2017