



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CS. BIOLÓGICAS

Evaluación del bisfenol A y bisfenol S sobre la proliferación,
migración y actividad transcripcional del receptor relacionado a
estrógenos gamma en líneas celulares de cáncer de mama triple
negativo

Tesis para obtener el grado de:
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:
SAMANTA RAMÍREZ RAMÍREZ

DIRECTORA: PAULINA CORTÉS HERNÁNDEZ



ABRIL 2018

DEDICATORIA



A mi familia

Porque el tiempo invertido en este trabajo no sólo fue mío sino también suyo, se los dedico completamente.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco sinceramente al:

Instituto Mexicano del Seguro Social- CTFIS/10RD/012/2011
Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla,
Coordinación Nacional de Becas de Educación Superior
Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado,
Centro de Investigación Biomédica de Oriente,
Academia Mexicana de Ciencias
Vicerrectoría de Docencia.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sincera e infinitamente a mi familia por el apoyo que siempre me han brindado, especialmente a mis padres... sé que jamás habrá forma de pagarles toda una vida de sacrificios, desvelos y preocupaciones. Este pequeño logro también es de ustedes. Los amo.

José Martín Ramírez Zaragoza

Carmina Ramírez Martínez

Fátima Ramírez Ramírez

Pilar Ramírez Ramírez

A todos mis amigos y compañeros del Centro de Investigación Biomédica de Oriente (sin ningún orden particular), quienes sin esperar nada a cambio compartieron conmigo su invaluable conocimiento y amistad... mil gracias.

Miguel Aco	William Toledo	Giovanna Maldonado
Bernardo Galicia	Daniel Máximo	Miriam Goyri
Denisse Cisneros	Gildardo Castro	Mihael Rosano
Marjo Jorge	Verónica Pérez	Adilene Casique
Luis Márquez	Neil Cortés	Manuel Nériz
Maricruz Anaya	Paola Maycotte	Jonathan Guerrero
Julio Reyes	Guadalupe Delgado	Stefany Román
Johari Salgado	Alam Delgado	Benito Montes
Arely Rosas	Israel Cotzomi	Paola García

RESUMEN

INTRODUCCIÓN. El Bisfenol A (BPA), componente esencial de plásticos policarbonados y resinas epoxi, es un disruptor endócrino con propiedades estrogénicas que ha sido estudiado por su amplia presencia en el ambiente y en el cuerpo humano. Además de otros efectos adversos, se ha demostrado que el BPA es capaz de promover la proliferación y migración *in vitro* de células cancerosas de mama.

Por sus efectos, la industria del plástico ha propuesto reemplazarlo por un compuesto estructuralmente similar, el Bisfenol S (BPS). Se han publicado pocos estudios acerca de la bioseguridad del BPS, en torno al cáncer de mama. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de los disruptores endócrinos BPA y BPS en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo, uno de los subtipos más agresivos de cáncer de mama.

MÉTODOS. Se evaluó el efecto del BPA y BPS en ensayos de proliferación y migración en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo humanas y murinas, monitoreadas por el sistema Incucyte Zoom. Además, se midió la actividad transcripcional del receptor nuclear ERR γ , en presencia de BPA y BPS, mediante un reportero transcripcional acoplado a la expresión de luciferasa.

RESULTADOS. La concentración de 10^{-4} M de BPA y BPS resultó tóxica para las células humanas, disminuyendo su proliferación en más del 60% y 40 % respectivamente. Las líneas celulares murinas 66Cl4 y 67NR, tratadas con BPA y BPS 10^{-9} - 10^{-6} M, aumentaron su proliferación pero disminuyeron su capacidad migratoria. La actividad transcripcional de ERR γ se encontró disminuida con BPA y BPS (10^{-7} M), siendo mayor el efecto de BPS.

CONCLUSIÓN. Las concentraciones bajas de BPA y BPS generaron un aumento en la proliferación y disminución en la migración de algunas líneas celulares de cáncer de mama triple negativo. Estos resultados pueden ser mediados por el receptor nuclear ERR γ , puesto que BPA y BPS disminuyeron su actividad transcripcional. Por estos efectos, el BPS propuesto como posible sustituto del BPA, no es un compuesto inerte y debe ser más estudiado para determinar su bioseguridad.

ÍNDICE

a) INTRODUCCIÓN	8
I. Disruptores endócrinos	
II. Bisfenol A, un disruptor endócrino omnipresente	
III. Mecanismo de acción del BPA	
IV. Bisfenol S, un sustituto parcial del BPA	
V. Cáncer de mama	
VI. Receptores relacionados a estrógenos	
b) ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	14
c) JUSTIFICACIÓN	17
d) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
e) HIPÓTESIS	18
f) OBJETIVOS	19
g) MATERIALES Y MÉTODOS	20
I. Líneas celulares	
II. Ensayos de proliferación	
III. Ensayos de migración celular	
IV. Plásmidos utilizados para determinar actividad transcripcional de ERR γ	
V. Transformación de células <i>Escherichia coli</i> DH5- α competentes con los plásmidos necesarios para los ensayos de luciferasa.	

VI. Maxiprep extracción de DNA plasmídico

VII. Ensayos de luminiscencia

VIII. Análisis estadístico

h) RESULTADOS 28

i. Proliferación celular

i.i Línea celular MDA-MB-231

i.ii Línea celular BT-549

i.iii Línea celular 4T1

i.iv Línea celular 66Cl4

i.v Línea celular 67NR

i.vi BPA vs BPS

ii. Migración celular

ii.i Línea celular MDA-MB-231

ii.ii Línea celular BT-549

ii.iii Línea celular 4T1

ii.iv Línea celular 66Cl4

ii.v Línea celular 67NR

iii. Actividad transcripcional de ERR γ

i) DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS 41

j) CONCLUSIONES 44

k) BIBLIOGRAFÍA 45

i) ANEXO 48

a) INTRODUCCIÓN

I. Disruptores endócrinos

Los disruptores endócrinos son agentes exógenos con la capacidad de alterar los sistemas hormonales y homeostáticos del cuerpo, por al menos cuatro mecanismos: 1) actuando como agonistas, 2) actuando como antagonistas, 3) modificando la síntesis y metabolismo de moléculas endógenas o 4) modificando a los receptores de estas moléculas (Yang, Kim, and Weon 2015).

Algunos disruptores endócrinos sintéticos son altamente persistentes en el ambiente. Esto está relacionado a que suelen ser productos útiles en la industria, donde el interés, con frecuencia se centra en compuestos de vida larga. Su persistencia resulta favorable en la industria, pero perjudicial para los seres vivos (Yang, Kim, and Weon 2015).

Aunque las moléculas identificadas como disruptores endócrinos son muy heterogéneas estructuralmente, comparten una dinámica dosis-respuesta muy peculiar. Se ha descrito que a dosis extremadamente bajas, ejercen efectos más poderosos que a dosis elevadas (Diamanti-Kandarakis et al. 2009). Se han planteado tres principales hipótesis que podrían explicar este fenómeno, entre las que se encuentran: 1) la afinidad que poseen por cada receptor al que pueden unirse, es diferente, 2) la inducción de efectos opuestos (agonista *versus* antagonista) al presentar afinidad por más de un receptor, 3) desensibilización de los receptores implicados (Lagarde et al. 2015).

II. Bisfenol A, un disruptor endócrino omnipresente

El Bisfenol A (BPA) es un disruptor endócrino sintético, sólido, incoloro y poco soluble en agua, pero altamente soluble en disolventes orgánicos (Yang, Kim, and Weon 2015). Está formado por dos anillos fenólicos unidos entre sí por un grupo propano (Figura 1).

Cada anillo fenólico posee un grupo hidroxilo que permite el establecimiento de enlaces éster (Rubin 2011).

A pesar de que el BPA fue sintetizado por primera vez en 1891, fue hasta la década de 1950 cuando se descubrió que podría ser polimerizado y usado en la elaboración de plásticos policarbonados y resinas epoxi, representando un hito en la industria de los materiales, al poseer una transparencia y dureza tal que podría sustituir en muchos aspectos tanto al vidrio como al acero (Vogel 2009).

En 2012, la producción mundial de BPA rondó las 6.5 millones de toneladas (Wang, Liu, and Liu 2017), lo que lo sitúa como uno de los productos químicos de mayor fabricación en el mundo. El BPA está presente en muchos aspectos de nuestra vida, tales como contenedores policarbonados, bolsas de plásticos, resinas dentales, revestimientos de latas de alimentos y bebidas, etc., desde donde se libera a los productos de consumo humano. De hecho, el BPA es considerado por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos por sus siglas en inglés) como un aditivo alimentario indirecto, por su capacidad de filtrarse a los productos envasados. Esta liberación depende del tiempo de contacto, temperatura, pH y tipo de alimentos que están expuestos (Hoekstra and Simoneau 2013), (Tabla 1).

Tabla 1. Ejemplos de alimentos en los que se han encontrado niveles detectables de BPA (Vandenberg et al. 2007, Cao et al. 2011).

Alimento	Concentración de BPA (ng/g)
Sopas enlatadas	22.2 - 44.4
Cereal y pan de caja	0.40 - 1.73
Fórmula infantil	0.1 - 13.2
Frutas y verduras enlatadas	< 10.0 - 95.3
Atún enlatado	> 7.1 - 102.7
Jalapeños enlatados	5.59 ± 3.05

Dentro de la clasificación de los plásticos establecida por la Sociedad de la Industria del Plástico en 1988, en la que cada número representa un tipo de plástico, el BPA es un componente de los plásticos con el número 3 (Cloruro de vinilo (PVC) y 7 (Policarbonatos) (Demaid, Spedding, and Zucker 1996)).

Aunque la ingesta de alimentos y bebidas contaminados es la principal fuente de exposición humana al BPA, se creó que no es la única, también se contemplan la inhalación y la absorción cutánea (Wang, Liu, and Liu 2017).

Considerado como un compuesto estrogénico débil puesto que tiene la capacidad de unirse al receptor a estrógenos 1 000 a 10 000 veces menos fuerte comparado con el estrógeno, el BPA ha sido objeto de un gran número de estudios. Se han hallado niveles detectables en muestras de orina, saliva, sangre, líquido amniótico, etc. (Zhang et al. 2016) (Tabla 2).

Tabla 2. Niveles de BPA hallados en fluidos humanos. Tabla tomada y modificada de (Zalmanova et al. 2017, Vandenberg et al. 2010).

Muestra	Nivel de BPA	
Sangre	12.4 - 14.4	ng/ mL
Sangre fetal	0.2 - 9.2	
Orina	0.02 – 21	
Saliva	0.3	
Calostro	1 – 7	
Líquido amniótico	1.1 - 8.3	
Plasma seminal	66 (hombres fértiles) 132 - 179 (hombres infértiles)	pg/ mL
Tejidos placentarios	1.0 - 104.9	ng/ g

El BPA ha demostrado tener efectos negativos para la salud en modelos animales (Yang, Kim, and Weon 2015). Sobre todo la exposición en etapas tempranas del

desarrollo, parece ser crítica para la aparición de algunas patologías y desórdenes en la adultez, por ejemplo, sinaptogénesis reducida, baja calidad espermática, alteración de los ciclos estrales, trastornos en la homeostasis de la glucosa, etc. (Rubin 2011). Dichos efectos se encontraron asociados a una amplia gama de concentraciones exploradas, desde 0.025 hasta 100g de BPA/ kg de peso corporal. Por esta razón, en 2011 la Unión Europea, Canadá y Estados Unidos, prohibió temporalmente el uso de BPA para la fabricación de biberones y en general botellas para bebé, un paso importante en la legislación en torno a este disruptor. Sin embargo, llama la atención que desde 1980 no se ha modificado la dosis de referencia considerada como “segura” para los humanos, establecida en 50 mg por kg de peso corporal al día (Hoekstra and Simoneau 2013), aún con los datos sobre el poder de acción del BPA a dosis bajas.

III. Mecanismo de acción del BPA

A pesar de que el Bisfenol A, es considerado un compuesto estrogénico, el Receptor de Estrógenos (RE), no es el único receptor a través del cual puede producir sus efectos, a continuación se enlistan algunos ejemplos de los receptores que pueden responder al BPA:

- a) Receptor a estrógenos: el BPA puede unirse a dos tipos de RE: RE α , produciendo un cambio conformacional y activación, mientras que al unirse a RE β , produce un cambio conformacional tal que bloquea el dominio de unión a ligando, actuando como antagonista (Lagarde et al. 2015). El BPA no sólo puede unirse a receptores estrogénicos nucleares, sino también al receptor membranal GPR30 (Receptor de estrógeno acoplado a proteína G) (Lagarde et al. 2015).
- b) Receptor de andrógenos (RA): el BPA funciona como un antagonista, al competir con el andrógeno por el RA, inhibiendo su translocación al núcleo (Teng et al. 2013).

- c) Receptor pregnano X (PXR): el BPA actúa como agonista fuerte al unirse a PXR, un conocido receptor nuclear encargado del metabolismo xenobiótico en el intestino e hígado (Acconcia, Pallottini, and Marino 2015).
- d) Receptor de Hormona Tiroidea (RT): se hipotetiza que el BPA tiene la capacidad de unirse al RT y actuar como un antagonista, al inhibir la transcripción mediada por este receptor (Moriyama et al. 2002).
- e) Receptor relacionado a estrógenos gama (ERRγ): el análisis de rayos X del dominio de unión a ligando de ERRγ, acoplado a BPA, indica que esta unión es fuerte, aunque los autores del análisis sugieren que no tiene influencia en la conformación de ERRγ y por tanto, en su actividad (Liu et al. 2014).

IV. Bisfenol S, un sustituto parcial del BPA

Dados las inconsistentes restricciones de uso y controversiales efectos provocados por el BPA, la industria ha propuesto varios análogos para intentar sustituirlo, al menos parcialmente, uno de los más utilizados, aunque no el único, es el bisfenol S (BPS).

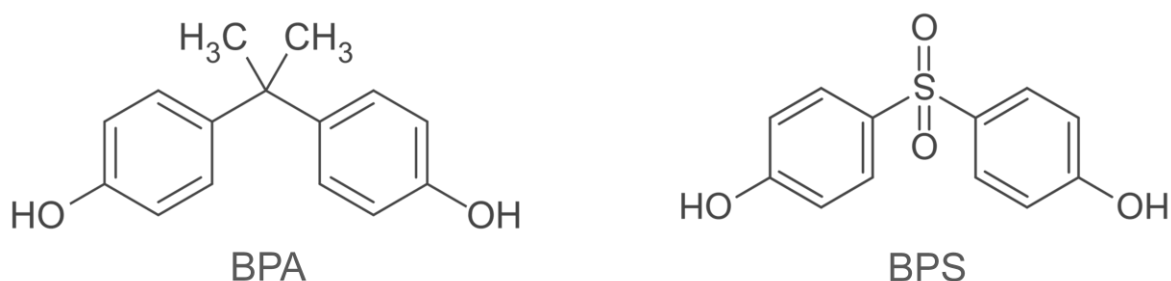


Figura 1. Estructura química de BPA y BPS. La única diferencia entre ambas estructuras, es el grupo que une a los dos anillos fenólicos: grupo propano en el caso del BPA y un grupo dióxido de azufre en el BPS (Mesnage et al. 2017).

El BPS tiene dos anillos fenólicos unidos entre sí por un grupo dióxido de azufre (Figura 1). Se emplea en la fabricación de plásticos, resinas epoxi, papel moneda, biberones, envases de alimentos y bebidas libres de BPA, etc. Por tanto, los productos con BPS con frecuencia se comercializan con la idea de que representan una opción más saludable que los que contienen BPA. Sin embargo, se sabe que el BPS tiene una vida

media más larga, una mejor penetración cutánea que el BPA (Usman and Ahmad 2016), y efectos endócrinos poco estudiados. Lo más preocupante, es que su introducción no está sujeta a ningún tipo de restricción o regulación.

V. Cáncer de mama

El cáncer de mama puede definirse como la proliferación desordenada e incontrolada de las células del epitelio glandular, determinada por una serie de mutaciones imposibles de reparar o que impiden la apoptosis de las células transformadas. Según la OMS (2016), el cáncer de mama es el tipo de cáncer más común entre las mujeres. En México, representa la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres mayores de 20 años (tras todos los tipos de cáncer de órganos digestivos en conjunto) y en más del 70 % de los casos es detectado en etapas avanzadas (INEGI, 2016).

El cáncer de mama se ha subclasificado dependiendo de la presencia o ausencia de algunos biomarcadores como los receptores hormonales (estrógenos y progesterona) y Her2 (receptor al factor de crecimiento epidermal humano de tipo 2) (Jitariu et al. 2017), que se emplean como blancos terapéuticos. El subtipo de cáncer de mama triple negativo, es aquel que no expresa ni receptores hormonales ni Her2. Por lo que es tratado únicamente con terapia citotóxica. Por no contar con una terapia dirigida y por su agresividad, este subtipo viene acompañado de un mal pronóstico.

El cáncer de mama triple negativo, se caracteriza por una gran heterogeneidad genética, pero en la mayoría de los casos el gen *BRCA1* se halla mutado (Pareja et al. 2016). *BRCA1*, es un gen perteneciente a la familia de supresores tumorales, por su capacidad de reparar el DNA. Asimismo, *BRCA1* está implicado en todas las fases de ciclo celular. Además de *BRCA1*, *TP53* (que codifica para la proteína p53) y *PIK3CA* (que codifica para PI3K) son los genes más frecuentemente mutados en el cáncer de mama triple negativo, generando un fenotipo altamente proliferativo, comparado con los otros subtipos de cáncer de mama (Pareja et al. 2016, Podo 2010). A pesar de que su poder metastásico es similar al de los otros subtipos, posee una mayor recurrencia y

menor supervivencia (Pinto et al. 2016). Los sitios más comunes a los que este subtipo de cáncer de mama hace metástasis son: hígado, pulmón y sistema nervioso central.

Además, el cáncer de mama triple negativo en particular, afecta más comúnmente a mujeres afroamericanas e hispanas, que de cualquier otra raza/ grupo étnico (Wu et al. 2013). En un estudio publicado en 2011 (Lara-Medina et al. 2011), realizado con muestras de pacientes mexicanas, hallaron que la edad media al diagnóstico del cáncer de mama triple negativo, fue de 50 ± 12 años. Esto es, aproximadamente 10 años más jóvenes que para los otros subtipos de cáncer de mama y 11 años más jóvenes que la edad promedio reportada en Estados Unidos (Lara-Medina et al. 2011).

VI. Receptores relacionados a estrógenos (ERR's)

Los receptores relacionados a estrógenos (ERR) son una subfamilia de receptores hormonales nucleares que consta de tres miembros: $ERR\alpha$, $ERR\beta$ y $ERR\gamma$. Estas proteínas, exhiben gran similitud estructural con los receptores a estrógenos (ER), aún así, no comparten funciones (Deblois and Giguere 2013).

Los ERR están formados por:


- a) Dominio de unión a ligando (LBD),
- b) Dominio amino terminal no conservado (NTD)
- c) Dominio de unión a DNA (DBD): formado por dos motivos dedos de zinc (Giguere 2008), tiene la capacidad de reconocer y unirse a secuencias cortas de DNA, conocidas como Elementos de Respuesta a ERR (ERRE), como un monómero, homodímero o como complejos heterodiméricos formados por dos isoformas diferentes de ERR (Sladek, Bader, and Giguere 1997). Los ERRE consisten de la secuencia consenso 5' TNAAGGTCA 3', la cual se ha encontrado en los promotores de más de 100 genes, la mayoría implicados en la glucólisis, ciclo de Krebs, fosforilación oxidativa y el metabolismo de lípidos (Deblois and Giguere 2013).


Los ERR, han sido clasificados como a) receptores nucleares huérfanos, porque no se han encontrado ligandos endógenos que se unan a ellos (Deblois and Giguere 2013), y b) reguladores maestros del metabolismo energético celular en diversos tejidos y contextos, al controlar bastas redes de genes implicados en la homeostasis energética, así como la biogénesis y función mitocondrial (Giguere 2008). A pesar de ser receptores huérfanos, su actividad puede modularse farmacológicamente y se han descrito múltiples ligandos de ERR, algunos de los cuales se unen a más de un tipo de Receptor Relacionado a Estrógenos (Deblois and Giguere 2013).


La sobreexpresión de ERR α y ERR γ ha sido estudiada en tumores de mama, donde ERR γ se asocia con la expresión de marcadores de buen pronóstico (Deblois, St-Pierre, and Giguere 2013), mientras que la alta expresión de ERR α correlaciona con un mal pronóstico (Bianco et al. 2009), principalmente porque opera cambios metabólicos que favorecen la proliferación celular, y permite la adaptación de las células cancerosas a hipoxia.

ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

La controversia desatada por la bioseguridad y posible relación entre el bisfenol A y el cáncer, ha propiciado un gran número de estudios en torno a su efecto en líneas celulares de cáncer de mama.

Para determinar el efecto del BPA sobre la proliferación celular, mediante ensayos de MTT , Song et al. (Song et al. 2015), evaluaron una amplia gama de concentraciones (de 10^{-10} a 10^{-5} M) de este disruptor sobre las líneas MCF7 (línea celular positiva a receptores hormonales) y SkBr3 (línea celular Her2 positiva). A todas las concentraciones exploradas hubo un aumento en la proliferación celular comparadas con el control. La concentración que mostró un mayor aumento en la proliferación 10^{-8} M, fue evaluada de 0-96 hrs y la proliferación aumentó con el tiempo. Los autores encontraron que los efectos del BPA (a concentración de 10^{-8} M) son independientes de ER α o GPER y mediados por ERR γ , cuya actividad se encontró regulada por ERK1/2 (Song et al. 2015).

Por su parte, Zhang et al. (Zhang et al. 2016) no hallaron efectos en la proliferación medida por MTT  de un par de líneas celulares de cáncer de mama triple negativo: MDA-MB-231 y BT-549, en presencia de tres concentraciones diferentes de BPA (10^{-9} , 10^{-8} y 10^{-7} M). Sin embargo, en sus ensayos de migración celular, el cierre de herida fue significativamente mayor en las células tratadas con 10^{-8} M de BPA. La misma concentración de BPA, logró incrementar dos veces el número de células invasivas en los ensayos realizados (Zhang et al. 2016). Los resultados que encontraron Zhang et al. fueron independientes de GPER (receptor membranal a estrógenos), pero mediados por ERR γ cuya expresión se encontró regulada por ERK1/2. La expresión de ERK 1/2 evaluada por Western Blot, disminuyó en presencia de BPA 10^{-8} M y al emplear un inhibidor de ERK 1/2, disminuyó drásticamente la capacidad migratoria de las células

 MTT: ensayo que se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiliazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan). Este método es utilizado para medir supervivencia/ proliferación celular.

tratadas con BPA (10^{-8} M) (Zhang et al. 2016). Sus conclusiones coinciden con lo propuesto por Song et al (Song et al. 2015).

Por otro lado, Castillo-Sánchez et al. (Castillo Sanchez, Gomez, and Perez Salazar 2016), reportaron que las líneas celulares epiteliales de mama no tumorigénicas MCF10A y MCF12A, no mostraron diferencias en los ensayos de migración e invasión, mientras que la línea de cáncer triple negativo MDA-MB-231 mostró un incremento en la migración e invasión cuando fue tratada con 1 y 2 μ M de BPA. Los autores plantean que el BPA promueve este incremento a través de GPER (Castillo Sanchez, Gomez, and Perez Salazar 2016).

El trabajo más representativo que se ha realizado en torno a la comparación *in vitro* de BPA versus BPS, fue publicado hace poco por Mesnage et al. (Mesnage et al. 2017), ellos compararon la proliferación (mediante ensayos de MTT) en tres líneas celulares de cáncer de mama: MCF7 (RH+), T47D (RH+) y MDA-MB-231 (triple negativo). Las líneas T47D y MDA-MB-231, proliferaron igual a las concentraciones de 10^{-11} a 10^{-4} M de BPS y 10^{-11} a 10^{-5} M de BPA. Mientras que las tres líneas celulares tratadas con BPA 10^{-4} M, disminuyeron su proliferación a la mitad en el caso de T47D y MDA-MB-231, y cuatro veces en la línea MCF7, respecto a las tratadas con BPS (Mesnage et al. 2017). El estradiol, generó mayor proliferación que el BPA o el BPS en las líneas celulares MCF7 y T47D, a las concentraciones de 10^{-11} a 10^{-6} M. Tras evaluar la inducción de la transcripción mediada por los elementos de respuesta a estrógenos en ensayos de luciferasa en presencia de BPA y BPS, los autores concluyeron que el BPA es un compuesto más estrogénico que el BPS (Mesnage et al. 2017).

c) JUSTIFICACIÓN

El Bisfenol A (BPA), componente esencial de plásticos policarbonados y resinas epoxi, es un disruptor endócrino omnipresente con propiedades estrogénicas que ha sido estudiado por su amplia presencia en el ambiente y en el cuerpo humano. Además de otros efectos adversos, se ha demostrado que el BPA es capaz de promover la proliferación y migración *in vitro* de células cancerosas de mama.

Por sus efectos potencialmente dañinos, la industria del plástico ha propuesto reemplazarlo por un compuesto estructuralmente similar, el Bisfenol S (BPS), para el que poco se ha evaluado su bioseguridad. En este trabajo, proponemos estudiar tanto la proliferación como migración de líneas celulares de cáncer de mama triple negativo en presencia de BPA y BPS, así como evaluar la actividad transcripcional de ERR γ , a fin de explorar al menos un blanco directo del BPA, que no se ha explorado para el BPS. Las líneas celulares triple negativo, permitirán delimitar nuestras conclusiones fuera de la vía del receptor a estrógenos y al mismo tiempo, estudiar más a fondo uno de los subtipos de cáncer de mama más agresivos.

d) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El BPA al ser un producto estrogénico sintético, ha dado pie a un gran número de trabajos en diversas líneas celulares de cáncer de mama, principalmente las positivas a receptores hormonales.

Recientemente se publicó una comparación de BPA y otros bisfenoles como BPS, donde evaluaron la proliferación de tres líneas celulares, entre ellas MDA-MB-231, que presentó el mismo patrón en todas las concentraciones exploradas tanto de BPA y BPS, sin embargo no se ha evaluado el efecto del BPS sobre la migración celular.

Dada la heterogeneidad del cáncer de mama triple negativo, en este trabajo se estudió la proliferación y migración de diversas líneas celulares de cáncer de mama triple negativo de origen humano y murino, en presencia de BPA o BPS a diferentes concentraciones. Además, se evaluó la actividad transcripcional del receptor nuclear ERR γ , un conocido blanco directo del BPA, que no se ha explorado con el BPS.

e) HIPÓTESIS

El BPA y BPS, compuestos estructuralmente parecidos, se comportarán de forma similar, al no producir modificaciones en la proliferación, potenciar la migración y mantener niveles basales de la actividad transcripcional de ERR γ de las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo.

f) OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar el efecto del Bisfenol A y Bisfenol S en la proliferación, la migración y la actividad transcripcional de ERR γ en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo humanas y murinas.

PARTICULARES

- Analizar la proliferación de las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo en presencia de BPA o BPS, mediante monitoreo en el sistema Incucyte ZOOM.
- Evaluar el efecto del BPA y BPS sobre la migración de las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo mediante ensayo de cierre de herida, monitoreado en el sistema Incucyte ZOOM.
- Evaluar el efecto de BPA y BPS en la actividad transcripcional de ERR γ utilizando un reportero de luciferasa.

g) MATERIALES Y MÉTODOS

I. Líneas celulares

Las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo que se emplearon para este trabajo se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Líneas celulares de cáncer de mama triple negativo usadas. Las líneas celulares murinas, fueron aisladas de un mismo tumor mamario que se originó espontáneamente en un ratón BALB/c-cfC3H (Aslakson and Miller 1992). Todas las líneas celulares pueden establecer un tumor primario en el modelo *in vivo* del ratón BALBc, pero la capacidad metastásica, difiere en cada caso.

Origen	Humano		Ratón		
Línea celular	BT-549	MDA-MB-231	4T1	66Cl4	67NR
Condiciones de cultivo	RPMI Insulina	DMEM-F12	DMEM		
	SFB 10%, Penicilina/Estreptomicina 1%				
Potencial metastásico	Pulmón, hígado, hueso, cerebro.	Pulmón, hígado, nódulos linfáticos, hueso, cerebro.	Pulmón, hígado, hueso, nódulos linfáticos, sangre, cerebro.	Pulmón	No es capaz de establecer metástasis

II. Ensayos de proliferación celular

Se sembraron ~2 400 células por pozo de cada una de las líneas celulares en placas de 96 pozos, en su respectivo medio de cultivo con 10 % SFB. Cuatro horas después se trataron con 10^{-9} a 10^{-4} M de BPA o BPS y se les permitió proliferar por 96 hrs. Tanto el BPA como el BPS se disolvieron en DMSO. La concentración final de DMSO en el medio fue de 0.1 %. Las células control se trataron con un volumen equivalente del

vehículo. El porcentaje de confluencia fue determinado por el sistema Incucyte Zoom[®] (Essen BioScience, Ann Arbor, MI), por medio de imágenes tomadas cada 4 horas con objetivo 20x.

III. Ensayos de herida

Para medir la migración, se realizaron ensayos de cierre de herida. Las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo, se sembraron en placas de 96 pozos (3.5×10^4 / pozo) en su respectivo medio de cultivo con 10% SFB. Cuatro horas después, las células fueron tratadas con el vehículo DMSO, BPA o BPS de la misma forma que en el ensayo de proliferación. 24 horas después de la siembra, la herida fue hecha en cada pozo empleando la herramienta “96-well WoundMaker” (IncuCyte, Essen BioScience, Ann Arbor, MI), mediante barrido mecánico para retirar una franja de células simultáneamente en toda la placa, después se hizo un lavado y se colocó medio fresco con antibiótico sin SFB, para medir la migración en condiciones de baja proliferación. La anchura y confluencia de la herida fue vigilada durante 24 horas por el sistema Incucyte Zoom[®] (Essen BioScience, Ann Arbor, MI), que tomó imágenes cada 4 horas con un objetivo 4x. Se evaluó el porcentaje de confluencia en la herida en cada tratamiento *versus* el control.

IV. Plásmidos utilizados para determinar actividad transcripcional de ERRγ

Para los ensayos de actividad transcripcional, se emplearon los plásmidos que se detallan en la Tabla 4. Los plásmidos p3xERRE, pERRα y pERRγ, fueron recuperados siguiendo las indicaciones del repositorio Addgene. A fin de obtener material suficiente para transfectar las líneas celulares de cáncer de mama triple negativo, se transformaron bacterias DH5α, con los plásmidos.

IV. Transformación de células *Escherichia coli* DH5-α competentes con los plásmidos necesarios para los ensayos de luciferasa

Para la replicación de los plásmidos, se empleó un método de transferencia de material genético horizontal, llamado transformación, que consiste en introducir material



Incucyte Zoom, es un sistema que consiste en una cabina con microscopio que se coloca dentro de una incubadora y un controlador externo que colecta y analiza imágenes. El software identifica las células en las fotografías dibujando una máscara que discrimina entre células y espacio vacío, para la cuantificación.

genético obtenido con anterioridad, a bacterias químicamente competentes. Todos los procedimientos enlistados a continuación se realizaron a temperatura ambiente a menos que se indique una temperatura particular.

Tabla 4. Características de los plásmidos empleados para medir los ensayos de luciferasa. Los nombres clave que se detallan, hacen referencia al nombre con que se designan los plásmidos en este documento. "Vector backbone", se refiere a los plásmidos utilizados como "esqueleto" para la generación de los plásmidos que utilizamos. El plásmido pGL4.72 nos fue donado, el resto fue adquirido a través del repositorio Addgene.

Nombre clave	"Vector backbone"	Inserto	Tamaño (pb)	Resistencia a antibióticos	Código Addgene
pGL4.72	pGL4	Expresión de luciferasa (<i>Renilla reniformis</i>)	3 704	Ampicilina	
p3xERRE	pGL3 promoter	3 copias de ERRE separación de 10 pb entre ellas río arriba de luciferasa (<i>Photinus pyralis</i>)	5 071	Ampicilina	37851
		61 pb			
pERRα	pCMV Tag2	Expresión de ERR α	5 630	Kanamicina	10975
		1270 pb			
pERRγ	pSG5	Expresión de ERR γ	5 516	Ampicilina	37849
		1416 pb			

Las bacterias *E. coli* DH5- α competentes se prepararon de la siguiente forma: de un pre-cultivo anterior, se tomaron 500 μ L y se sembraron en 100mL de medio LB fresco y se incubó la mezcla por 2 horas a 37 °C, para después centrifugar a 4 000 rpm/ 5 minutos.

Para recubrir a las células con un catión divalente, se descartó el sobrenadante y resuspendieron las células en 50 mL de CaCl_2 0.1 M a 4°C. Se centrifugó nuevamente a 4000 rpm/ 5 minutos/ TA y el pellet resultante se resuspendió en 4 mL de CaCl_2 0.1 M a 4° C. La mezcla se le agregó 1 mL de glicerol al 80 % para alcanzar una concentración final de 15-20 %, se dividió en alícuotas de 300 μL y almacenó a -80°C.

Una vez preparadas las bacterias competentes, se transformaron con uno de los reporteros a la vez. En una alícuota de 300 μL de *E. coli* DH5- α competentes, se agregó 1 μL de plásmido: pCMV flag ERR alpha (pERR α) (Ichida, Nemoto, and Finkel 2002), pSG5-HA-ERR3 S45A (pERR γ) (Heckler et al. 2014), 3xERRE-luciferase (pERRE) (Heckler et al. 2014) o pGL4.72 (de Promega) y se incubó en hielo por 30 minutos.

Para facilitar la entrada del material genético a las bacterias, se dio un choque térmico a 42 °C por 1 minuto y 30 segundos, se colocó en hielo por 5 minutos más, después se agregó 1mL de medio LB sin antibiótico y se incubó a 250 rpm/ 37 °C/ 1 hora para permitir la recuperación de las células.

Finalmente, se recuperaron las bacterias centrifugando a 4 000 rpm por 5 minutos, se desechó el sobrenadante y resuspendió el pellet en 20 μL de LB fresco, mezcla que se sembró en placas Petri de LB agar con Ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o Kanamicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) según el plásmido, e incubó a 37 °C toda la noche.

V. Extracción por lisis alcalina y purificación de DNA

Para corroborar la presencia de los plásmidos de interés, primero se realizó una extracción de DNA por lisis alcalina en volúmenes reducidos (Miniprep), que se analizó mediante restricción con endonucleasas.

Para la realización de la técnica de Miniprep: de las placas anteriormente sembradas, se eligió una colonia para cada plásmido y se sembró en 5 mL de medio LB con antibiótico, los cultivos se incubaron por ~18 horas, a 37 °C para posteriormente centrifugarlos a 250 rpm, se retiró el sobrenadante, dejando la pastilla lo más seca posible. A temperatura ambiente, se resuspendió la pastilla en 100 μL de solución I estéril (Glucosa 50 mM, TrisHCl pH 8.0 25 mM y EDTA pH 8.0 10 mM), para lisar las

células se añadieron 200 μ L de solución II recién preparada (NaOH 0.2N, SDS 1 %), se mezcló invirtiendo rápidamente el microtubo, se añadieron 150 μ L de Solución III (Acetato de sodio 3M) para renaturalizar el DNA y precipitar el SDS, lípidos y proteínas. Se incubó a -20°C por 30 minutos.

Se centrifugó la mezcla durante 15 minutos/ 14 000 rpm, se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo con 0.5 μ L de RNAsa y se incubó por 60 minutos. Para precipitar el DNA, se agregó 1 mL de etanol absoluto y se dejó reposando por 40 min a -20°C , después se centrifugó por 15 minutos a 14 000 rpm. La pastilla resultante fue lavada con 1 mL de etanol al 70 %, para remover todo el remanente de sales y SDS. Se centrifugó nuevamente por 10 minutos/ 14 000 rpm, se retiró el sobrenadante y se dejó secar al aire por \sim 10 minutos. Finalmente, el DNA plasmídico se resuspendió en 20-25 μ L de TE pH 8.0.

Para conocer la concentración de DNA obtenido, se midió la absorbancia de la muestra resultante mediante un espectrofotómetro (QIAxpert System) a una longitud de onda de 260 nm (para calcular la concentración de ácidos nucleicos) y 280 nm (para calcular la concentración de proteínas en la muestra y estimar el grado de pureza, considerándose valores entre 1.8 y 2.0 como óptimos).

El DNA plasmídico se analizó por restricción y fue sometido a electroforesis en gel de agarosa al 1% con el agente intercalante bromuro de etidio (0.0025%). El gel se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta, el tamaño de los fragmentos se calculó con ayuda de un marcador de peso molecular de 1 kb marca Promega.

VI. Maxiprep para extracción de DNA plasmídico

Para producir más DNA plasmídico a partir de las clonas bacterianas identificadas como positivas para cada plásmido, se rastreó la colonia bacteriana de cada plásmido que mostró el patrón de restricción esperado y se inició un pre-cultivo (5 mL de LB con antibiótico) de 5 horas de los plásmidos individualmente. Las bacterias del pre-cultivo se inocularon en 200 mL de LB con antibiótico, y se incubaron por \sim 16 horas a $37^{\circ}\text{C}/200$ rpm. Se centrifugó el cultivo bacteriano por 10 minutos a 5 000 rpm y se descartó el sobrenadante dejando la pastilla lo más seco posible, el cual se resuspendió en 5 mL

de solución I, después se añadieron 10 mL de solución II se mezcló vigorosamente y se agregaron 7.5 mL de solución III fría, la mezcla se almacenó en hielo por 20 minutos (las soluciones I, II y III, son las mismas que se usaron en Miniprep).

El lisado bacteriano se centrifugó a 5 000 rpm por 15 minutos a 4°C, para aislar el sobrenadante, se filtró por tres capas de gasa estéril, se añadieron 0.6 volúmenes de isopropanol y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Los ácidos nucleicos se recuperaron centrifugando a 5 000 rpm por 15 minutos a TA, se descartó el sobrenadante y enjuagó la pastilla y las paredes del tubo con 200 µL de etanol al 70 % a TA. El pellet resultante se disolvió en 1.5 mL de TE (pH 8.0) y se añadieron 1.5 mL de solución LiCl 5 M fría, se mezcló y centrifugó a 10 000 rpm por 4 minutos a 4° C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, donde se añadió un volumen igual de isopropanol. Se centrifugó el precipitado a 10 000 rpm por 10 minutos a TA. Se decantó el sobrenadante, la pastilla y las paredes del tubo se lavaron con etanol al 70 % a TA, mismo que fue retirado enseguida. La pastilla resultante se disolvió en 250 µL de TE (pH 8.0) y se dejó incubando a TA por 30 minutos con 2.5 µL de RNAsa (20 µg/ mL). Se añadieron 250 µL de NaCl 1.6 M con polietilenglicol (PEG 8000) al 13 % (w/v) para dejar incubando a 4 °C durante 1 hora.

El DNA plasmídico se recuperó por centrifugación a 10 000 rpm por 5 minutos a 4 °C. La pastilla se disolvió en 250 µL de TE (pH 8.0) y 250 µL de Fenol/Tris se centrifugó a 10 000 rpm por 5 minutos/ TA, se tomó la capa superior (acuosa), y se transfirió a un tubo nuevo con 250 µL de la mezcla fenol/ cloroformo, se centrifugó a 10 000 rpm por 5 minutos, se tomó la capa superior (acuosa), de nuevo con 250 µL de cloroformo para remover todo rastro de fenol.

Nuevamente se conservó la fase acuosa y se le añadieron 62.5 µL de acetato de amonio 10 M, y 450 µL de etanol absoluto frío. Se dejó incubando un par de horas a 4 °C. La mezcla se centrifugó durante 5min a 10, 000 rpm/ 4 °C, se removió el sobrenadante y añadieron 100 µL de etanol al 70 % para lavar la pastilla.

Después de que se hubo evaporado el etanol, la pastilla se resuspendió en 200 μL de TE (pH 8.0), se determinó la concentración por espectrometría como se describió para la Miniprep y almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta su uso.

VII. Ensayos de luminiscencia

Para determinar la actividad transcripcional de ERR γ , se realizaron ensayos de luminiscencia para la línea celular 67NR y concentración de 10^{-7} M de BPA y BPS a los cuales hallamos los efectos más dramáticos en proliferación y migración. Es importante destacar el BPA, BPS y el fármaco XCT-790 a una concentración de 1.5×10^{-5} M (agonista inverso de ERR α), se aplicaron a manera de pre-tratamiento, 96 hrs antes de realizar la transfección con Lipofectamina 3 000, siguiendo las indicaciones del fabricante y las concentraciones que se detallan a continuación: pGL4.72 60 ng, 3xERRE 600 ng y ERR γ 600 ng.

Para medir luminiscencia se empleó el producto Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, USA). El ensayo de luminiscencia, a manera de resumen, funciona de la siguiente manera: ERR γ (vector de expresión), tiene la capacidad de reconocer los elementos de respuesta presentes en el plásmido p3xERRE, mismo que codifica para luciferasa de luciérnaga. La cantidad de luz que se mida, será proporcional a la cantidad de enzima que se haya producido a través del plásmido y a la actividad transcripcional de ERR γ . El plásmido pGL4.72 se ocupó para normalizar la actividad de p3xERRE (Tabla 4), y como control interno de transfección, debido a que cuenta con un promotor débil seguido de un gen de luciferasa de *Renilla reniformis* (Tabla 4). Ambas luciferasas pueden medirse de manera independiente y no requieren el mismo sustrato para trabajar.

Las células se lavaron con PBS y se lisaron con 100 μL de Passive Lysis Buffer (PLB) por pozo durante 15 minutos a temperatura ambiente. De este lisado se tomaron 20 μL , a los cuales se les agregaron 20 μL de Luciferase Assay Reagent II. La primera lectura corresponde a la actividad de la luciferasa de *Photinus pyralis* y una vez tomada se agregaron 20 μL de Stop & Glo que apaga la primera reacción y contiene el sustrato para la luciferasa de *Renilla reniformis*. Las lecturas de

ambas luciferasas se determinaron en el mismo lisado celular en un luminómetro Glomax 20/20.

IX. Análisis estadístico

Los datos fueron presentados como promedios \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. El valor de cada control se tomó como 100% de proliferación o migración según fue el caso. Los datos fueron analizados mediante la prueba t de Student y ANOVA de una vía con comparaciones múltiples de Bonferroni, usando GraphPadPrism versión 5.0.

h) RESULTADOS

i. Proliferación celular

Las líneas celulares empleadas para este trabajo, fueron tratadas con BPA o BPS y monitoreadas a intervalos de 4 horas, durante 96 horas, por lo que se cuenta con los datos de cinética de proliferación para cada línea celular (ejemplificada en la Figura 2). El punto marcado como 0 horas en la Figura 2, es la primera lectura realizada por el sistema Incucyte después de 4 horas de haberse sembrado las células.

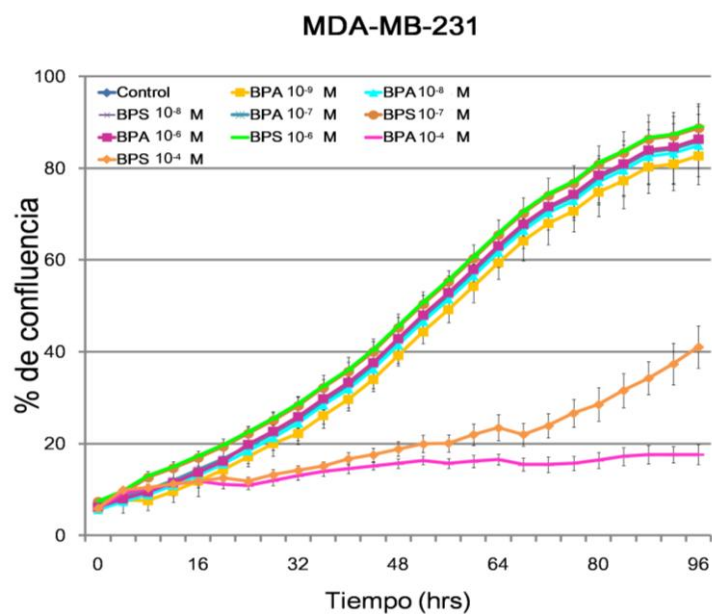


Figura 2. Proliferación de la línea MDA-MB-231 durante 96 hrs en presencia de BPA o BPS. La gráfica muestra datos obtenidos cada 4 hrs de todas las concentraciones exploradas de BPA y BPS en la línea celular MDA-MB-231, monitoreada por el sistema Incucyte ZOOM. Los datos representan el promedio del porcentaje de confluencia de un experimento representativo (Promedio \pm DE).

De acuerdo a los datos obtenidos, el efecto del BPA y BPS fue dependiente del tiempo, la proliferación después de 48 hrs, fue significativamente menor en las líneas celulares

MDA-MB-231, 66Cl4 y 67NR en las concentraciones de 10^{-8} a 10^{-4} M (Figura 3A), mientras que, después de 72 hrs de proliferación sólo 10^{-4} M de BPA y BPS generó una disminución significativa en la línea MDA-MB-231 (Figura 3B). Las líneas 66Cl4 y 67NR, presentaron una tendencia a proliferar más respecto a su control sin tratamiento, sin llegar a ser un aumento significativo.

i.i MDA-MB-231

La mayor concentración usada en esta línea, 10^{-4} M, resultó tóxica para las células, tras 48, 72 y 96 hrs de tratamiento, los grupos tratados con BPA (Figura 3A), proliferaron 55.7, 65.1 y 80 % menos ($p < 0.001$) respectivamente que las células control, mientras que las tratadas con BPS, sólo 46, 43 y 40% menos respectivamente (Figura 3B). El resto de las concentraciones exploradas, sólo produjeron una inhibición significativa en la proliferación cuando se evaluaron a 48 hrs (Figura 2).

i.ii BT-549

Para esta, y el resto de las líneas celulares, la máxima concentración empleada, fue de 10^{-6} M. Esta fue la única concentración de BPA que produjo un efecto significativo en la proliferación (11% mayor, respecto al control sin tratamiento $P < 0.05$. Figura 3C), que se observó únicamente después de 96 hrs de proliferación. En contraste, la misma concentración de BPS, no aumentó significativamente la proliferación de esta línea celular. Las células tratadas con 10^{-8} M de BPS, mostraron una tendencia a aumentar la proliferación tras 96 hrs de tratamiento, sin llegar a ser significativo este aumento (Figura 3C).

i.iii 4T1

Esta línea, que exhibe el mayor poder metastásico *in vivo* de las líneas murinas utilizadas, no presentó diferencias significativas en su proliferación a ninguna de las concentraciones exploradas, con BPA ni con BPS. El tratamiento con 10^{-8} M de BPS (Figura 3B), generó una tendencia a aumentar la proliferación a las 96 hrs, pero que no fue significativa.

i.iv 66C14

Esta línea celular presentó una disminución de la proliferación en todas las concentraciones evaluadas de BPA a las 48 hrs que fluctuó entre 20 y 13 % (Figura 3A). Esta disminución en la proliferación también se observó con BPS pero fue significativa sólo a partir de 10^{-8} M y su magnitud fue del 18 al 12 %. Esta inhibición en la proliferación no se observó a las 72 hrs de tratamiento. Por el contrario, tanto a las 72 (Figura 3B) como a las 96 hrs hubo un aumento de la proliferación que fue significativo sólo a las 96 hrs, con una magnitud de entre 30 y 44 % a las diversas concentraciones de BPA, alcanzando el máximo efecto a 10^{-7} M (Figura 3C). El tratamiento con BPS a todas las concentraciones estudiadas, también produjo un aumento significativo en la proliferación a las 96 hrs, que osciló entre 33 a 37 % respecto al control (Figura 3C).

i.v 67NR

Las concentraciones de 10^{-9} hasta 10^{-6} M de BPA, generaron una disminución significativa en la proliferación, de entre el 11 y 19 % a las 48 hrs (Figura 3A). Esta disminución en la proliferación también se observó con BPS (48 hrs) pero fue significativa sólo a partir de 10^{-8} M y su magnitud fue del 11 al 18 % (Figura 3A). Por el contrario, tanto a las 72 como a las 96 hrs hubo un aumento de la proliferación que fue significativo sólo a las 96 hrs (Figura 3B-3C), con una magnitud de entre 16 y 27 % a las diversas concentraciones de BPA. Sólo 10^{-9} , 10^{-8} y 10^{-7} M de BPS provocaron un aumento en la proliferación celular que fue menor que con BPA, correspondiendo a un 13, 10 y 25 % respectivamente (Figura 3C).

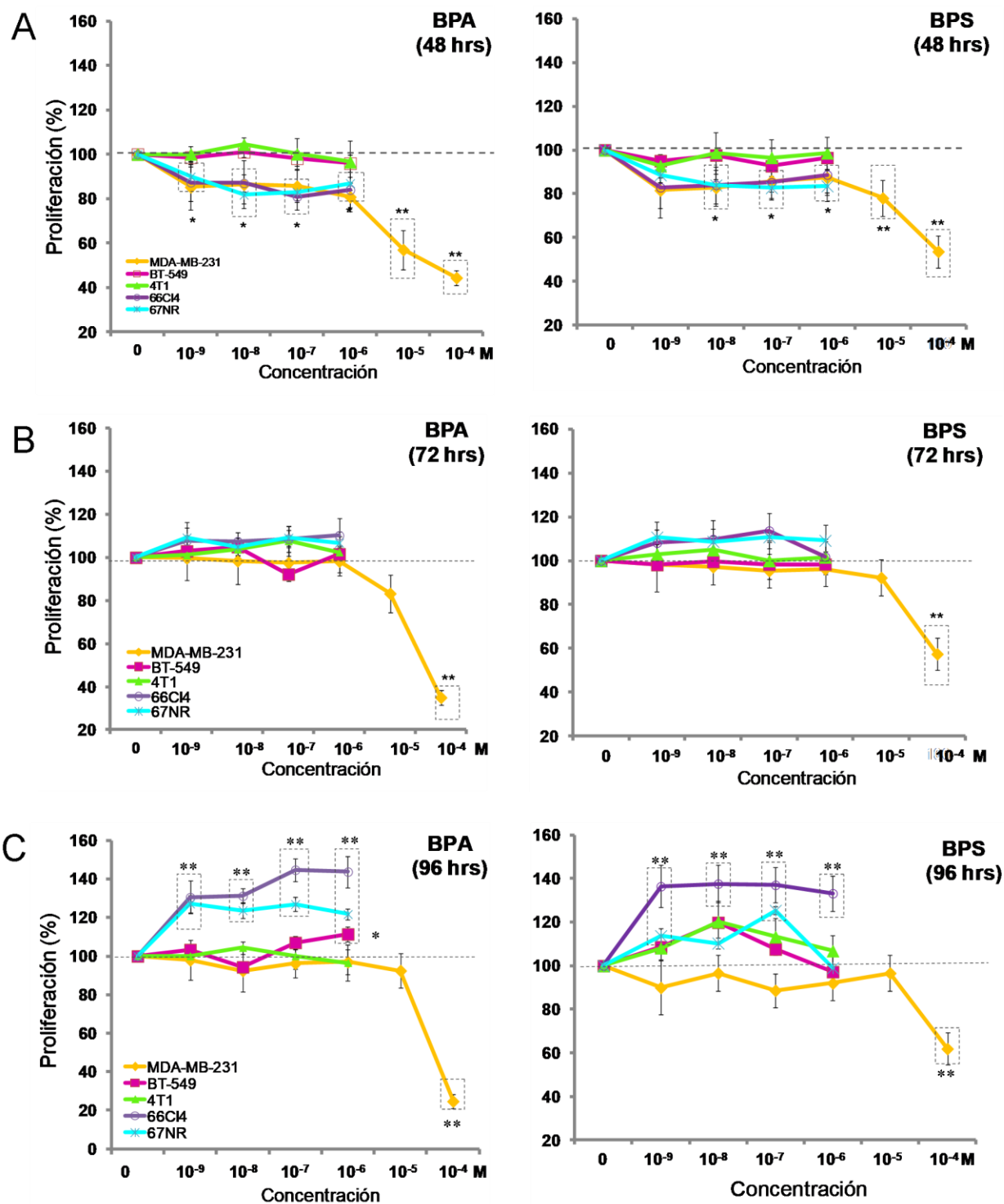


Figura 3. Proliferación de las 5 líneas celulares estudiadas tras 48, 72 y 96 hrs de tratamiento con BPA o BPS. Cinco líneas celulares de cáncer de mama triple negativo fueron tratadas con 10^{-9} - 10^{-4} M de BPA o BPS por 48 A), 72 B) o 96 hrs C). Los datos representan el promedio del porcentaje de confluencia respecto al control (cada línea celular sin tratamiento, de tres experimentos independientes (Promedio

±DE). *P<0.05 vs. Control sin tratamiento. **P<0.001 vs. Control sin tratamiento. Los rectángulos punteados engloban resultados estadísticamente significativos.

i.vi BPA vs BPS

Tal como se menciona en la introducción, los efectos negativos probados del BPA en modelos animales, se generan en la adultez como consecuencia de la exposición a este disruptor endócrino en etapas tempranas del desarrollo, o en muchos casos, las consecuencias son más bien generacionales (Yang, Kim, and Weon 2015). Además, todos estamos expuestos constantemente al BPA y probablemente al BPS, por lo que el tiempo 96 hrs es el que más se discute en este trabajo.

Los datos obtenidos después de permitir que las líneas celulares proliferaran por 96 hrs en presencia de los compuestos aquí estudiados, fueron utilizados para comparar el efecto del BPA vs BPS para cada concentración explorada y en cada línea celular, mediante la prueba estadística ANOVA de una vía con comparaciones múltiples de Bonferroni (Figura 4).

Sólo en la línea celular MDA-MB-231, la disminución de la proliferación observada en las células tratadas con 10^{-4} M de BPA, fue significativamente mayor que la generada por el BPS a la misma concentración, sugiriendo por la morfología propia de células que están entrando en apoptosis, que el BPA es más tóxico que el BPS a esa concentración.

En las líneas celulares murinas, el aumento en la proliferación generado por BPA 10^{-7} M en 66Cl4 y 10^{-9} - 10^{-8} M en 67NR, fue significativamente mayor comparado con el BPS (en las mismas condiciones). El resto de líneas celulares y concentraciones evaluadas, no arrojaron diferencias significativas en el comportamiento BPA vs BPS a las 96 hrs.

Esto sugiere que el BPA tiene más efecto biológico que el BPS sobre la proliferación de las líneas celulares estudiadas, aunque esta diferencia no fue significativa en la mayoría de condiciones evaluadas en este trabajo.

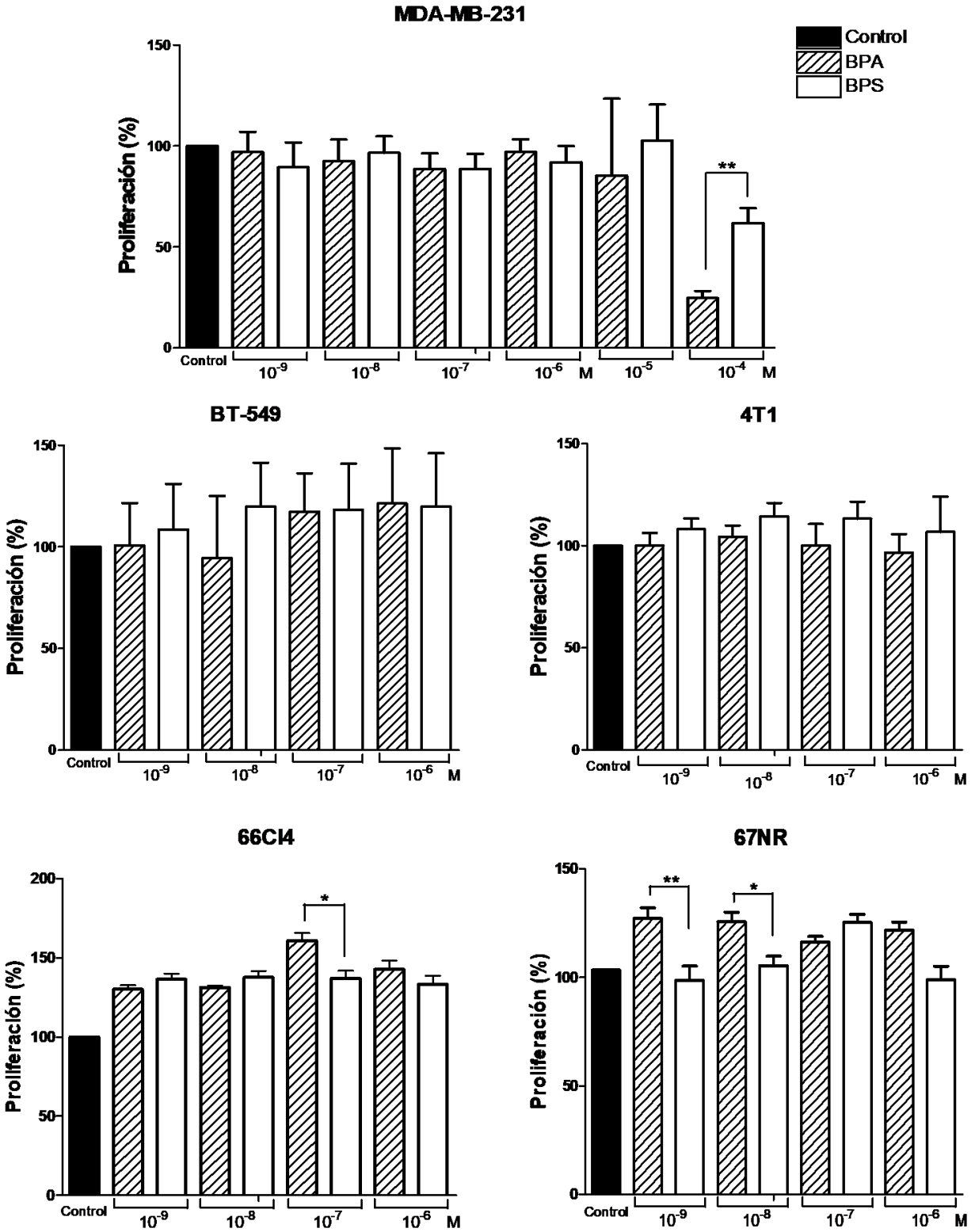


Figura 4. Efecto del BPA vs BPS en la proliferación de líneas celulares de cáncer de mama triple negativo. Las gráficas de barras representan el promedio del porcentaje de confluencia respecto al

control, de tres experimentos independientes (Promedio \pm DE), y la comparación de los compuestos BPA vs BPS después de 96 hrs de proliferación. Sólo 10^{-6} M de BPA tuvo un efecto significativamente menor que BPS en la línea MDA-MB-231. Mientras que en 66Cl4 y 67NR el BPA a 10^{-7} M y 10^{-9} - 10^{-8} M respectivamente, generó mayor proliferación que el BPS. * $P < 0.05$ y ** $P < 0.001$.

ii. Migración celular

Todas las líneas celulares fueron tratadas 24 hrs antes de realizar el ensayo de cierre de herida, para el cual fue retirada una franja de células mecánicamente, se renovó el medio de cultivo (sin SFB) con su respectivo tratamiento y se monitoreó la migración celular cada 4 hrs, durante 24 hrs (Figura 6).

ii.i MDA-MB-231

Para este ensayo se probaron las concentraciones más comúnmente utilizadas en la bibliografía, dejando de lado 10^{-5} y 10^{-4} M. Estas concentraciones altas se descartaron porque resultaron tóxicas en los ensayos de proliferación y durante la estandarización de los ensayos de migración, las células estaban tan dañadas que al momento de hacer los lavados, se barría prácticamente todo el tapete celular.

El resto de las concentraciones 10^{-9} a 10^{-6} M tanto de BPA como de BPS no produjeron cambios significativos en la migración de estas células (Figura 5), contrario a lo reportado en la literatura con esta línea celular tratada con BPA (Zhang et al. 2015, Zhang et al. 2016)

ii.ii BT-549

El tratamiento con 10^{-6} M de BPA (Figura 5A), produjo un decremento del 18% en la migración de las células mientras que las células tratadas con 10^{-9} , 10^{-8} y 10^{-7} M de BPS migraron 30, 26 y 18 % menos respectivamente, comparadas con el control (Figura 5B).

ii.iii 4T1

El tratamiento 10^{-9} M de BPA, fue el único que produjo cambios significativos en el patrón de migración, mostrando 21% menos migración que el control (Figura 5A).

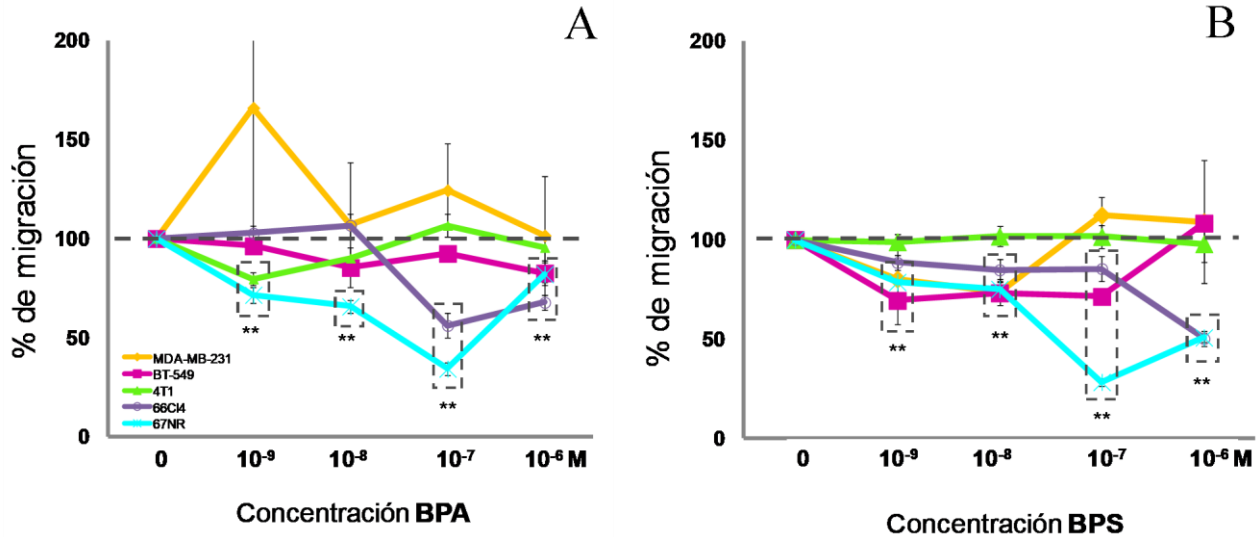


Figura 5. Migración de líneas celulares de cáncer de mama triple negativo en presencia de BPA o BPS. Cinco líneas celulares de cáncer de mama triple negativo fueron tratadas con 10⁻⁹-10⁻⁶ M por 24hrs de a) BPA o b) BPS. Los datos representan el promedio del porcentaje de migración en la herida, respecto al control (Promedio ± DE), de tres experimentos independientes. *P<0.05 vs. Control. **P<0.001 vs. Control. Los rectángulos punteados engloban los puntos que resultaron estadísticamente significativos.

ii.iv 66Cl4

Las células tratadas con 10⁻⁹ y 10⁻⁸ M de BPA migraron muy parecido al control sin tratamiento. El resto de las concentraciones exploradas de BPA 10⁻⁷ y 10⁻⁶ M, redujeron la migración 44 y 33 % respectivamente (Figuras 5-6). Mientras que todos los tratamientos de BPS redujeron significativamente la migración celular. El efecto máximo encontrado fue a la concentración de 10⁻⁷ M tanto de BPA como de BPS (Figuras 5-6).

Cabe mencionar que esta línea celular fue la que mostró una menor migración comparada con el resto de líneas, al simplemente formar largas proyecciones hacia la herida, tal como lo describieron Lou et al. en 2008 (Lou et al. 2008).

ii.v 67NR

En esta línea celular, la concentración de 10⁻⁶ M de BPA, fue la única que no generó ningún cambio en la migración. El resto de tratamientos, disminuyeron la migración

significativamente, siendo 10^{-7} M de BPA y BPS la concentración que mostró el mayor porcentaje de disminución en la migración con 66 y 72 % respectivamente (Figuras 5-6).

iii. Actividad transcripcional de ERR γ

Para los ensayos de actividad transcripcional, se purificaron plásmidos que se visualizaron en gel de agarosa (Figura 7), previa cuantificación de su concentración (Tabla 5).

Tabla 5. Información de los plásmidos purificados. Datos tomados en cuenta para la planeación de la restricción y posterior análisis en gel de agarosa.

Plásmido	Tamaño del plásmido (pb)	Enzimas usadas	Fragmentos esperados (pb)	Concentración (ng/ μ L)
pGL4.72	3 704	<i>EcoRV</i>	3 160 544	3 240
pERR α	5 630	<i>EcoRI</i>	4 323 1 307	5 716
pERR γ	5 516	<i>KpnI</i>	5516	5 687
p3xERRE	5 071	<i>NcoI</i>	5 071	6 002

Por el momento, sólo se emplearon células de la línea murina 67NR que fueron expuestas a un pre-tratamiento con 10^{-7} M de BPA, BPS o DMSO (como control) de 96 hrs

Se transfectaron con los plásmidos tal como se detalló en la metodología y finalmente los lisados celulares se emplearon en los ensayos de luciferasa para medir la actividad transcripcional de ERR γ .

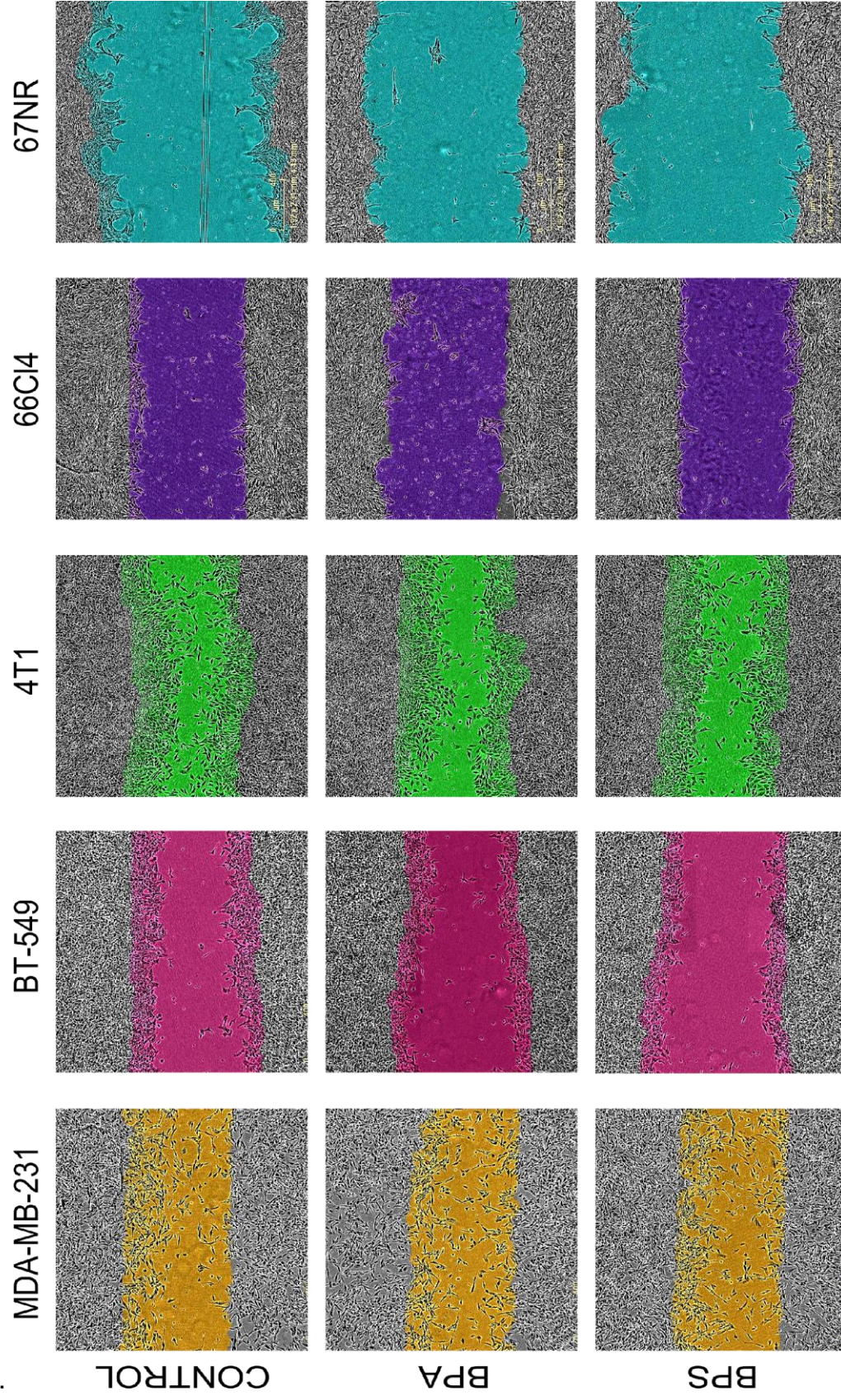


Figura 6. Migración de líneas celulares de cáncer de mama triple negativo después de 24 hrs. Fotografías representativas tomadas mediante microscopía de contraste de fases en el sistema Incucyte Zoom, 24 hrs después de haberse hecho la herida y 48 hrs después del tratamiento con DMSO (vehículo), BPA o BPS 10^{-7} M. Es evidente la diferencia en la capacidad migratoria de las diversas líneas celulares utilizadas: 4T1, fue la línea que más migra en 24 hrs

La serie de ensayos de luciferasa, sugieren que el tratamiento con 10^{-7} M de BPA y BPS en la línea celular 67NR, provocó una disminución de la actividad transcripcional de ERR γ , en mayor magnitud con BPS que con BPA (Figura 8).

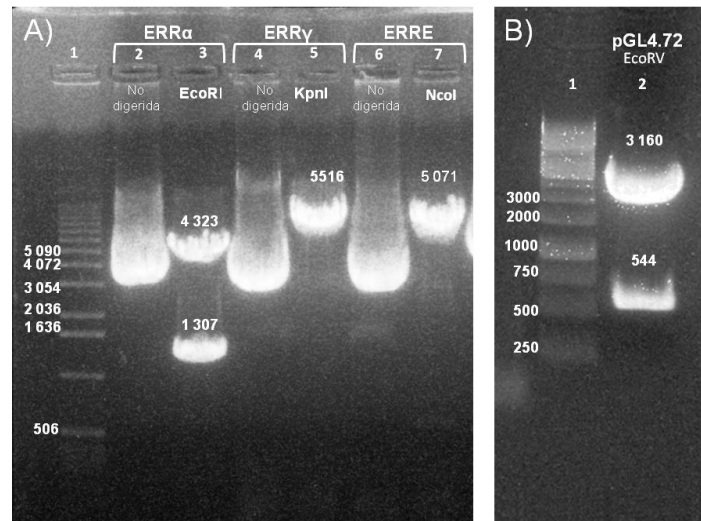


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de los plásmidos purificados. A) Carril 1: marcador de peso molecular de 1kb, carril 2: plásmido ERR α no digerido, carril 3: plásmido ERR α digerido con *EcoRI*, carril 4: plásmido ERR γ no digerido, carril 5: plásmido ERR γ digerido con *KpnI*, carril 6: plásmido ERRE no digerido, carril 7: plásmido ERRE digerido con *NcoI*. **B)** Carril 1: marcador de peso molecular de 1kb, carril 2: pGL4.72 digerido con *EcoRV*. En todos los casos se obtuvo el patrón esperado.

Como se menciona anteriormente, los ERRE's son comunes para todos los miembros de la familia de receptores relacionados a estrógenos, por lo que para explorar el papel que pueda estar jugando ERR α en los resultados obtenidos, pre- tratamos a las células control con el agonista inverso de ERR α , XCT-790 a una concentración de 1.5×10^{-5} M. Obteniendo un resultado muy similar al del grupo no tratado (Figura 8).

Por el momento sólo hemos estudiado el papel de ERR γ , pero al contar también con el vector de expresión de ERR α purificado, planeamos explorar su posible papel en este sistema.

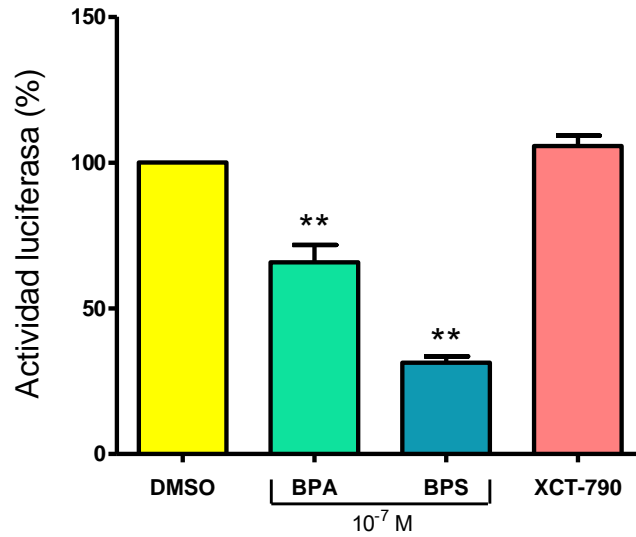


Figura 8. Actividad transcripcional de ERR γ . La gráfica muestra la actividad transcripcional de ERR γ en células 67NR tratadas con 10⁻⁷ M de BPA o BPS. En ambos casos disminuyó la actividad transcripcional, siendo el grupo tratado con BPS el que presenta la mayor inhibición. La señal no se vio modificada cuando se usó el agonista inverso de ERR α , XCT-790 una concentración de 1.5 x 10⁻⁵ M, sugiriendo que la actividad de luciferasa se debe a ERR γ . Los datos representan el promedio de la actividad de luciferasa de luciérnaga normalizado con la actividad de luciferasa de *Renilla*, respecto al control (Promedio \pm DE), de tres experimentos independientes. **P<0.001 vs. Control.

i) DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

El Bisfenol A (BPA), componente esencial de plásticos policarbonados y resinas epoxi, es un disruptor endócrino con propiedades estrogénicas que ha sido estudiado por su amplia presencia en el ambiente y en el cuerpo humano (Vogel 2009).

Además de otros efectos adversos, se ha demostrado que el BPA es capaz de promover la proliferación y la migración *in vitro* de células cancerosas de mama (Song et al. 2015, Zhang et al. 2016). Por sus efectos, la industria del plástico ha propuesto reemplazarlo por un compuesto estructuralmente similar, el Bisfenol S (BPS), del que poco se sabe acerca de su bioseguridad, su papel en el cáncer de mama y más aún, en el cáncer de mama triple negativo (Mesnage et al. 2017).

En este estudio, se utilizaron 5 líneas celulares de cáncer de mama triple negativo, cuyo potencial proliferativo y migratorio llama la atención, puesto que resultó sustancialmente diferente, aún cuando todas son del subtipo triple negativo.

Coincidiendo con otros trabajos (Zhang et al. 2016, Zhang et al. 2015), la proliferación de la línea MDA-MB-231, no se vio afectada a bajas concentraciones de BPA y BPS (10^{-9} a 10^{-5} M). Pero una concentración mayor, 10^{-4} M de BPA y BPS, resultó tóxica para las células. Las concentraciones de 10^{-5} ni 10^{-4} M, no son equivalentes a las halladas en fluidos o tejidos humanos, tal como se muestra en la Tabla 2, por lo que decidimos descartarlas de los experimentos en el resto de las líneas celulares.

Un resultado similar al de MDA-MB-231 se obtuvo con las células BT-549, para las cuales han reportado que el BPA a concentraciones de 10^{-9} a 10^{-7} M no produce diferencias en la proliferación (Zhang et al. 2016). Sin embargo, la concentración de 10^{-6} M de BPA, para la cual no hallamos antecedente, sí generó un aumento significativo en la proliferación.

La línea celular murina 4T1, es sumamente parecida a MDA-MB-231 en cuanto a su comportamiento metastásico *in vivo*, como se esperaba, no produjo diferencias significativas en la proliferación en presencia de BPA ni BPS.

Frecuentemente, la línea celular MDA-MB-231, es utilizada como un modelo que representa fielmente al subtipo triple negativo, aunado a que hasta el momento no se han caracterizado las vías de las que depende la proliferación de las líneas celulares murinas, se supuso que el resto de las líneas celulares evaluadas se comportarían de forma similar por el simple hecho de ser triple negativo. Al contrario, 66Cl4 y 67NR, mostraron un aumento significativo en la proliferación en todos los tratamientos explorados de BPA (10^{-9} a 10^{-6} M) y en tres de cuatro concentraciones de BPS (10^{-9} a 10^{-7} M).

Diversos autores han reportado que concentraciones nanomolares de BPA promueven una mayor capacidad migratoria en líneas celulares como MDA-MB-231, BT-549, y SkBr3 (Zhang et al. 2016, Zhang et al. 2015). Sin embargo, en nuestros experimentos, ninguna de las concentraciones o líneas estudiadas, generaron un aumento en la migración.

Mientras que MDA-MB-231 no mostró cambios significativos en la migración comparada con su control, en el resto de las líneas celulares al menos una concentración generó una disminución significativa en la migración. De manera importante, las líneas celulares murinas 66Cl4 y 67NR, cuya capacidad migratoria es muy limitada (Lou et al. 2008), los tratamientos de BPA y BPS casi la anularon por completo, al generar muy pocas o ninguna prolongación hacia la herida, aún después de haber transcurrido las 24 hrs del experimento. Después de analizar más a detalle la proliferación después de 48 y 72 hrs de tratamiento, en las cuales primero hay una disminución significativa y después una tendencia al alta, sería muy interesante estudiar la migración de las líneas celulares después de un pre-tratamiento de 96 hrs.

ERR γ , receptor nuclear cuya actividad favorece la fosforilación oxidativa, es un blanco directo del BPA (Liu et al. 2014) que puede estar mediando el fenotipo altamente proliferativo exhibido por las líneas celulares 66Cl4 y 67NR. Con el afán de evaluar su

actividad transcripcional en presencia de BPA y BPS, realizamos ensayos de luciferasa. Nuestros resultados no coinciden con lo que hipotetizaban Liu X. y col (Liu et al. 2014), quienes a partir de la estructura cristalina de ERR γ unida al BPA, sugirieron que la actividad de ERR γ , no se modificaría con este ligando. Nuestros datos muestran una disminución de la actividad transcripcional de ERR γ en presencia de 10^{-7} M de BPA y BPS, de 35 y 69 % respectivamente. Por su parte, 1.5×10^{-5} M del agonista inverso de ERR α , XCT-790, no disminuyó la actividad de luciferasa, sugiriendo que la señal obtenida se debe a la actividad transcripcional de ERR γ .

Se ha propuesto que una baja expresión y actividad de ERR γ en células cancerosas, favorece la glucólisis por sobre la fosforilación oxidativa (Deblois and Giguere 2013), por lo que su inhibición mediada por el BPA y BPS, muy probablemente esté beneficiando un aumento significativo en la proliferación de algunas líneas celulares (66Cl4 y 67NR), al contribuir no sólo a la producción de energía, sino también biomasa. Sin embargo, las necesidades energéticas para la migración tal vez sean diferentes.

Esta hipótesis sólo será cierta a la luz de más experimentos, en primer lugar y dada la tendencia de proliferación a través del tiempo, es necesario realizar más ensayos de migración tomando en cuenta la exposición previa al BPA y BPS. Además, efectuar ensayos de luciferasa 1) sin el vector de expresión de ERR γ , y 2) agregando el vector de expresión de ERR α , para descartar su participación en igualdad de condiciones (concentración en las células).

j) CONCLUSIONES

Independientemente de la concentración o tratamiento per se, resulta interesante cómo la proliferación y migración intrínseca de cada línea celular es distinta, aún cuando todas pertenecen al subtipo triple negativo. Las líneas celulares evaluadas, representan un excelente modelo que enmarca la heterogeneidad de un tumor de cáncer de mama triple negativo.

Ambos disruptores endócrinos evaluados, pueden generar un aumento en la proliferación, pero disminuyen la migración de varias de las líneas celulares utilizadas.

La actividad transcripcional de ERR γ , disminuyó con BPA y BPS, por lo que los resultados celulares obtenidos, podrían ser mediados por este receptor nuclear, aunque en definitiva, no se descarta la participación de otros receptores o vías celulares.

Nuestros datos muestran que el BPS, un posible sustituto del BPA que ya se usa en la fabricación de muchos productos, no es un compuesto inerte y provoca modificaciones importantes en la biología de nuestro modelo de estudio, por lo que creemos debe ser utilizado con precaución entretanto se genera más información en torno a su bioseguridad.

k) BIBLIOGRAFÍA

- Acconcia, F., V. Pallottini, and M. Marino. 2015. "Molecular Mechanisms of Action of BPA." In *Dose Response*. Sage CA: Los Angeles, CA.
- Aslakson, C. J., and F. R. Miller. 1992. "Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor." *Cancer Res* 52 (6):1399-405.
- Bianco, S., O. Lanvin, V. Tribollet, C. Macari, S. North, and J. M. Vanacker. 2009. "Modulating estrogen receptor-related receptor-alpha activity inhibits cell proliferation." *J Biol Chem* 284 (35):23286-92. doi: 10.1074/jbc.M109.028191.
- Cao, X. L., C. Perez-Locas, G. Dufresne, G. Clement, S. Popovic, F. Beraldin, R. W. Dabeka, and M. Feeley. 2011. "Concentrations of bisphenol A in the composite food samples from the 2008 Canadian total diet study in Quebec City and dietary intake estimates." *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 28 (6):791-8. doi: 10.1080/19440049.2010.513015.
- Castillo Sanchez, R., R. Gomez, and E. Perez Salazar. 2016. "Bisphenol A Induces Migration through a GPER-, FAK-, Src-, and ERK2-Dependent Pathway in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells." *Chem Res Toxicol* 29 (3):285-95. doi: 10.1021/acs.chemrestox.5b00457.
- Deblois, G., and V. Giguere. 2013. "Oestrogen-related receptors in breast cancer: control of cellular metabolism and beyond." *Nat Rev Cancer* 13 (1):27-36. doi: 10.1038/nrc3396.
- Deblois, G., J. St-Pierre, and V. Giguere. 2013. "The PGC-1/ERR signaling axis in cancer." *Oncogene* 32 (30):3483-90. doi: 10.1038/onc.2012.529.
- Demaid, Adrian, V Spedding, and John Zucker. 1996. "Classification of plastics materials." *Artificial intelligence in engineering* 10 (1):9-20.
- Diamanti-Kandarakis, E., J. P. Bourguignon, L. C. Giudice, R. Hauser, G. S. Prins, A. M. Soto, R. T. Zoeller, and A. C. Gore. 2009. "Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement." In *Endocr Rev*, 293-342.
- Giguere, V. 2008. "Transcriptional control of energy homeostasis by the estrogen-related receptors." *Endocr Rev* 29 (6):677-96. doi: 10.1210/er.2008-0017.
- Heckler, M. M., H. Thakor, C. C. Schafer, and R. B. Riggins. 2014. "ERK/MAPK regulates ERRgamma expression, transcriptional activity and receptor-mediated tamoxifen resistance in ER+ breast cancer." *Febs j* 281 (10):2431-42. doi: 10.1111/febs.12797.
- Hoekstra, E. J., and C. Simoneau. 2013. "Release of bisphenol A from polycarbonate: a review." *Crit Rev Food Sci Nutr* 53 (4):386-402. doi: 10.1080/10408398.2010.536919.
- Ichida, M., S. Nemoto, and T. Finkel. 2002. "Identification of a specific molecular repressor of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma Coactivator-1 alpha (PGC-1alpha)." *J Biol Chem* 277 (52):50991-5. doi: 10.1074/jbc.M210262200.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2016. Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama (19 de octubre).
- Jitariu, A. A., A. M. Cimpean, D. Ribatti, and M. Raica. 2017. "Triple negative breast cancer: the kiss of death." *Oncotarget*. doi: 10.18632/oncotarget.16938.
- Lagarde, F., C. Beausoleil, S. M. Belcher, L. P. Belzunces, C. Emond, M. Guerbet, and C. Rousselle. 2015. "Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment." In *Environ Health*. London.

- Lara-Medina, F., V. Perez-Sanchez, D. Saavedra-Perez, M. Blake-Cerda, C. Arce, D. Motola-Kuba, C. Villarreal-Garza, A. M. Gonzalez-Angulo, E. Bargallo, J. L. Aguilar, A. Mohar, and O. Arrieta. 2011. "Triple-negative breast cancer in Hispanic patients: high prevalence, poor prognosis, and association with menopausal status, body mass index, and parity." *Cancer* 117 (16):3658-69. doi: 10.1002/cncr.25961.
- Liu, X., A. Matsushima, M. Shimohigashi, and Y. Shimohigashi. 2014. "A Characteristic Back Support Structure in the Bisphenol A-Binding Pocket in the Human Nuclear Receptor ERR γ ." In *PLoS One*, edited by J. M. Vanacker. San Francisco, USA.
- Lou, Y., O. Preobrazhenska, U. auf dem Keller, M. Sutcliffe, L. Barclay, P. C. McDonald, C. Roskelley, C. M. Overall, and S. Dedhar. 2008. "Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is not sufficient for spontaneous murine breast cancer metastasis." *Dev Dyn* 237 (10):2755-68. doi: 10.1002/dvdy.21658.
- Mesnage, R., A. Phedonos, M. Arno, S. Balu, J. Christopher Corton, and M. N. Antoniou. 2017. "Transcriptome profiling reveals bisphenol A alternatives activate estrogen receptor alpha in human breast cancer cells." *Toxicol Sci*. doi: 10.1093/toxsci/kfx101.
- Moriyama, K., T. Tagami, T. Akamizu, T. Usui, M. Saijo, N. Kanamoto, Y. Hataya, A. Shimatsu, H. Kuzuya, and K. Nakao. 2002. "Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist." *J Clin Endocrinol Metab* 87 (11):5185-90. doi: 10.1210/jc.2002-020209.
- Pareja, F., F. C. Geyer, C. Marchio, K. A. Burke, B. Weigelt, and J. S. Reis-Filho. 2016. "Triple-negative breast cancer: the importance of molecular and histologic subtyping, and recognition of low-grade variants." *NPJ Breast Cancer* 2:16036. doi: 10.1038/npjbcancer.2016.36.
- Pinto, Joseph A, Jhajaira Araujo, Nadezhda K Cardenas, Zaida Morante, Franco Doimi, Tatiana Vidaurre, Justin M Balko, and Henry L Gomez. 2016. "A prognostic signature based on three-genes expression in triple-negative breast tumours with residual disease." *npj Genomic Medicine* 1:15015.
- Podo, F. 2010. "Triple-negative breast cancer: Present challenges and new perspectives." In, edited by A. L. Børresen-Dale, T. Sørli and V. N. Kristensen, 209-29.
- Rubin, B. S. 2011. "Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects." *J Steroid Biochem Mol Biol* 127 (1-2):27-34. doi: 10.1016/j.jsbmb.2011.05.002.
- Sladek, R., J. A. Bader, and V. Giguere. 1997. "The orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha is a transcriptional regulator of the human medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase gene." *Mol Cell Biol* 17 (9):5400-9.
- Song, H., T. Zhang, P. Yang, M. Li, Y. Yang, Y. Wang, J. Du, K. Pan, and K. Zhang. 2015. "Low doses of bisphenol A stimulate the proliferation of breast cancer cells via ERK1/2/ERR γ signals." *Toxicol In Vitro* 30 (1 Pt B):521-8. doi: 10.1016/j.tiv.2015.09.009.
- Teng, C., B. Goodwin, K. Shockley, M. Xia, R. Huang, J. Norris, B. A. Merrick, A. M. Jetten, C. P. Austin, and R. R. Tice. 2013. "Bisphenol A affects androgen receptor function via multiple mechanisms." *Chem Biol Interact* 203 (3):556-64. doi: 10.1016/j.cbi.2013.03.013.
- Usman, A., and M. Ahmad. 2016. "From BPA to its analogues: Is it a safe journey?" *Chemosphere* 158:131-42. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.05.070.
- Vandenberg, L. N., I. Chahoud, J. J. Heindel, V. Padmanabhan, F. J. R. Paumgarten, and G. Schoenfelder. 2010. "Urinary, Circulating, and Tissue Biomonitoring Studies Indicate Widespread Exposure to Bisphenol A." In *Environ Health Perspect*, 1055-70.
- Vandenberg, L. N., R. Hauser, M. Marcus, N. Olea, and W. V. Welshons. 2007. "Human exposure to bisphenol A (BPA)." *Reprod Toxicol* 24 (2):139-77. doi: 10.1016/j.reprotox.2007.07.010.
- Vogel, S. A. 2009. "The Politics of Plastics: The Making and Unmaking of Bisphenol A "Safety"." In *Am J Public Health*, S559-66.

- Wang, Z., H. Liu, and S. Liu. 2017. "Low-Dose Bisphenol A Exposure: A Seemingly Instigating Carcinogenic Effect on Breast Cancer." In *Adv Sci (Weinh)*. Hoboken.
- Wu, Y., M. Sarkissyan, Y. Elshimali, and J. V. Vadgama. 2013. "Triple negative breast tumors in African-American and Hispanic/Latina women are high in CD44+, low in CD24+, and have loss of PTEN." *PLoS One* 8 (10):e78259. doi: 10.1371/journal.pone.0078259.
- Yang, O., H. L. Kim, and J. I. Weon. 2015. "Endocrine-disrupting Chemicals: Review of Toxicological Mechanisms Using Molecular Pathway Analysis." In, 12-24.
- Zalmanova, T., K. Hoskova, J. Nevoral, K. Adamkova, T. Kott, M. Sulc, Z. Kotikova, S. Prokesova, F. Jilek, M. Kralickova, and J. Petr. 2017. "Bisphenol S negatively affects the meiotic maturation of pig oocytes." *Sci Rep* 7 (1):485. doi: 10.1038/s41598-017-00570-5.
- Zhang, X. L., N. Liu, S. F. Weng, and H. S. Wang. 2016. "Bisphenol A Increases the Migration and Invasion of Triple-Negative Breast Cancer Cells via Oestrogen-related Receptor Gamma." *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 119 (4):389-95. doi: 10.1111/bcpt.12591.
- Zhang, X. L., H. S. Wang, N. Liu, and L. C. Ge. 2015. "Bisphenol A stimulates the epithelial mesenchymal transition of estrogen negative breast cancer cells via FOXA1 signals." *Arch Biochem Biophys* 585:10-6. doi: 10.1016/j.abb.2015.09.006.

I) ANEXO

ANOVA	Analysis of Variance
BPA	Bisfenol A
BPS	Bisfenol S
BRCA1	Breast Cancer 1
CaCl	Cloruro de Calcio
DE	Desviación Estandar
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM-F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ERK 1/ 2	Extracellular Signal-regulated Kinase-1/ 2
ERR α / β / γ	Receptor Relacionado a estrógenos alfa/ beta/ gamma
FDA	Food and Drug Administration
GPR30	Receptor de Estrógeno acoplado a Proteína G
Her2	Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal Humano tipo 2
LB	Luria Bertanicaldo
MCF10A	Michigan Cancer Foundation-10A
MCF12A	Michigan Cancer Foundation-12
MCF7	Michigan Cancer Foundation-7
MDA-MB-231	MD Anderson -metastásico de mama-231
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
NaCl	Cloruro de Sodio
NaOH	Hidróxido de Sodio
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Phosphate-buffered saline
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3Kinase Catalytic Subunit α
PVC	Policloruro de Vinilo
PXR	Receptor Pregnano X
RA	Receptor a Andrógenos
RE	Receptor a Estrógenos
rpm	revoluciones por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Receptor de hormona Tiroidea
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SFB	Suero Fetal Bovino
TA	Temperatura ambiente
TE	Solución amortiguadora Tris-EDTA
TP53	Tumor Protein p53