



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DESARROLLO DE UN BIOENSAYO PARA DETERMINAR LA
CITOTOXICIDAD POR EXPOSICIÓN INVOLUNTARIA A BPA EN
LOS ALIMENTOS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

KARLA LUCÍA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS

Dr. ROEB GARCÍA ARRAZOLA



Ciudad Universitaria, CD. MX. 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: JUAN DIEGO ORTIZ PALMA PÉREZ

VOCAL: Profesor: VERÓNICA GARCÍA SATURNINO

SECRETARIO: Profesor: ROEB GARCÍA ARRAZOLA

1er. SUPLENTE: Profesor: TANIA GOMEZ SIERRA

2° SUPLENTE: Profesor: SOFÍA MORAN RAMOS

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: UNIDAD DE INVESTIGACIÓN
PRECLÍNICA (UNIPREC) Y L-313 (CONJUNTO E DAYB)**

ASESOR DEL TEMA:

ROEB GARCÍA ARRAZOLA

SUSTENTANTE:

KARLA LUCÍA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

INTRODUCCIÓN

Los contaminantes emergentes son un problema ambiental de la época industrial moderna, corresponden en la mayoría de los casos a contaminantes no regulados, que pueden ser candidatos a regulación futura dependiendo de investigaciones sobre sus efectos potenciales en la salud y los datos de monitoreo con respecto a su incidencia (Mollo Tangara & Montaña Cabrera, 2005). Ejemplo de los compuestos que han emergido recientemente son: surfactantes, productos farmacéuticos, aditivos industriales, esteroides, hormonas y fenoles.

La característica de estos grupos de contaminantes es que no necesitan persistir en el ambiente para causar efectos negativos, puesto que sus altas tasas de transformación/remoción se pueden compensar por su introducción continua en el ambiente. Para la mayoría de estos contaminantes emergentes, la incidencia, la contribución de riesgo y los datos toxicológicos no están disponibles, así que es difícil predecir qué efectos de salud pueden tener en seres humanos y organismos (Bravo, 2009). Algunos de estos contaminantes emergentes pueden afectar el sistema endocrino e interferir con el desarrollo de procesos bioquímicos importantes en los seres humanos y animales (Valsecchi, Polesello, Mazonni, Rusconi, & Petrovic, 2015).

Los disruptores endócrinos (DE's) se definen como agentes químicos hormonalmente activos que interfieren en el funcionamiento del sistema hormonal ya sea suplantando a las hormonas naturales, bloqueando su acción, aumentando o disminuyendo sus niveles (Shaw, 2008).

El bisfenol A (BPA) se ha descrito como un compuesto químico con gran actividad como disruptor endocrino y un alto riesgo de que el monómero se

transfiera a los alimentos. El bisfenol A interactúa en el sistema hormonal como antagonista de los receptores de estrógeno, lo cual podría afectar la fertilidad y la reproducción en los seres vivos (Shaw, 2008).

La ingesta es considerada la principal fuente de exposición de BPA en humanos, en 2015 la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) estableció una ingesta Diaria Tolerable de 4 µg/kg peso corporal/día (EFSA, 2015).

La EFSA, en su última opinión científica acerca del BPA, concluye que, este compuesto no presenta riesgos para la salud y por tanto, actualmente en la Unión Europea, el BPA se considera un producto autorizado como material destinado a entrar en contacto con los alimentos. Sin embargo, se continúa investigando sobre el BPA y sus posibles efectos adversos (García, Gallego, & Font, 2015).

La evaluación toxicológica de compuestos químicos se ha basado en el empleo de ensayos *in vitro*, expresando la toxicidad en función de los efectos agudos provocados por la acción de una única administración de la sustancia objeto de estudio. Concretamente, la dosis letal media o concentración citotóxica (LD₅₀, CC50), equivalente a la cantidad de sustancia necesaria para producir la muerte del 50% de la población de un ensayo, ha sido empleada como valor de referencia para indicar la potencia de cualquier tipo de tóxico.

Por lo tanto, en este trabajo de tesis se propuso desarrollar un bioensayo en líneas celulares 3T3-L1 (fibroblasto de ratón), MCF7 (cáncer de mama) que son receptores de estrógeno y PC3 (cáncer de próstata); para medir el potencial citotóxico que puede tener el BPA utilizando las concentraciones que ingerimos involuntariamente a través de los alimentos.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	3
CONTAMINANTES EMERGENTES	6
DISRUPTORES ENDOCRINOS.....	8
ESTRADIOL Y RECEPTORES ESTRÓGENOS (ER)	11
BISFENOL A (BPA) Y SU METABOLISMO	13
NONILFENOL (NP)	16
BIOENSAYOS ASOCIADOS A LA DISRUPCIÓN ENDÓCRINA	17
ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD	18
LÍNEAS CELULARES EN PRUEBAS TOXICOLÓGICAS.....	19
LÍNEA CELULAR MCF-7	21
LÍNEA CELULAR 3T3.....	21
LÍNEA CELULAR PC3.....	22
OBJETIVOS	23
GENERAL.....	23
OBJETIVOS PARTICULARES.....	23
METODOLOGÍA	24
MATERIALES Y MÉTODOS	25
DESCONGELAMIENTO Y PROLIFERACIÓN CELULAR.....	28
TRIPSINIZACIÓN.....	28
EXPOSICIÓN DE LA LÍNEAS CELULARES A CONTAMINANTES EMERGENTES PARA PRUEBA DE CITOTOXICIDAD	29
FIJACIÓN.....	30
TINCIÓN	30
CUANTIFICACIÓN CELULAR	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
ETANOL (EtOH)	34
17-β-ESTRADIOL	37
BISFENOL A (BPA)	40
CONCLUSIONES	48
TRABAJO FUTURO	49
ANEXO	50
REFERENCIAS	52

CONTAMINANTES EMERGENTES

El término de contaminantes emergentes (CE) generalmente se utiliza para referirse a compuestos cuya presencia en el ambiente no se considera significativa en términos de distribución y/o concentración; no obstante, tienen el potencial de acarrear un impacto ecológico, así como efectos adversos sobre la salud (Gil & Soto, 2012).

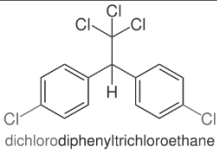
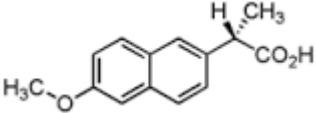
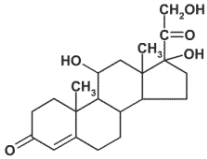
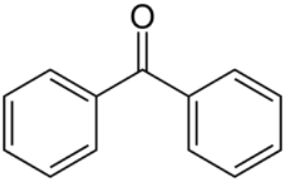
Los contaminantes emergentes corresponden en la mayoría de los casos a contaminantes no regulados, que pueden ser candidatos a regulación futura dependiendo de investigaciones sobre sus efectos potenciales en la salud y los datos de monitoreo con respecto a su incidencia (Mollo Tangara & Montaña Cabrera, 2005).

Para la mayoría de estos contaminantes emergentes, la incidencia, la contribución de riesgo y los datos ecotoxicológicos no están disponibles, así que es difícil predecir qué efectos de salud pueden tener en seres humanos y otros organismos (Bravo, 2009). Ejemplo de los compuestos que han emergido recientemente son: surfactantes, productos farmacéuticos, aditivos industriales, esteroides, hormonas y fenoles.

Una importante característica de este grupo de contaminantes es que no necesitan persistir en el ambiente para causar efectos negativos, puesto que sus altas tasas de transformación/remoción se pueden compensar por su introducción continua en el ambiente (Bravo, 2009).

En la tabla 1 se muestra una clasificación de los contaminantes emergentes

Tabla 1. Clasificación general de los Contaminantes Emergentes

Compuesto	Ejemplo	Ejemplo de estructura
Pesticidas o Plaguicidas	DDT, Atrazina, malatión, arsénico, paraquat	 <p>dichlorodiphenyltrichloroethane</p>
Productos Farmacéuticos	Naproxeno, ibuprofeno, diclofenaco, anfetaminas	
Hormonas Esteroideas	Testosterona, cortisol, progesterona, B-estradiol	
Productos de cuidado Personal	Benzofenona, triclosan, metilbencildenalcanfor	

Fuente: Adaptado de (Bergman, Heindel, & Jobling, 2012).

Algunos de los contaminantes emergentes pueden afectar el sistema endocrino e interferir con el desarrollo de procesos bioquímicos importantes en los seres humanos y animales. Consecuentemente, también a los contaminantes

emergentes se les conoce como disruptores endocrinos (Valsecchi, Polesello, Mazonni, Rusconi, & Petrovic, 2015).

DISRUPTORES ENDOCRINOS

La Sociedad de Toxicología Ambiental y Química de Estados Unidos (SETAC, por sus siglas en inglés) define a los disruptores endocrinos como: “sustancias químicas en el ambiente, de origen sintético o natural que alteran las funciones normales del sistema endocrino y sus hormonas tanto en los seres humanos como en la vida silvestre” (Nollet, 2011).

En la actualidad se ha demostrado que los disruptores endocrinos (DE) pueden ocasionar disminución de los niveles de antioxidantes, hormonas, actividad enzimática, entre otras (Scaglia & Chichizola, 2009). Lo anterior se ha asociado con padecimientos tales como: diabetes y obesidad, pubertad temprana, reducción de la cantidad de espermatozoides, enfermedades de próstata y cáncer de próstata, cáncer de mama, alteraciones cromosómicas, daño cerebral, deterioro de la función inmune y cambios en el comportamiento (López, Barceló, Farréc, & Martínez, 2009).

Se ha observado que los disruptores endocrinos son agentes químicos hormonalmente activos que interfieren en el funcionamiento del sistema

hormonal ya sea suplantando a las hormonas naturales, bloqueando su acción y aumentando o disminuyendo sus niveles .Tal y como se ilustra en la figura 1 (Serrano, Warden, & Cabrera, 2008).

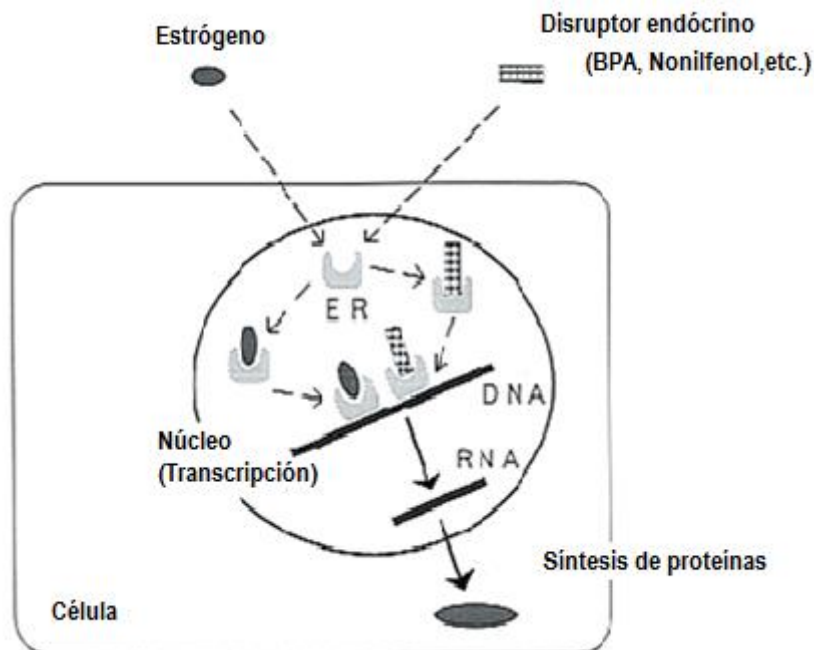


Figura 1. Esquema de competencia entre la hormona y el disruptor endocrino para la unión al receptor. Fuente: (Ministry of the Environment Government of Japan , 2018).

La exposición a disruptores endócrinos en la etapa fetal o neonatal del desarrollo humano es clínicamente más relevante que en la edad adulta (Giusti, Iwamoto, Hatch, & E, 1995). Lo anterior es debido que los efectos protectores que se encuentran en la etapa adulta, tales como: reparación del ADN, un sistema inmunológico competente, enzimas hepáticas desintoxicantes, no están

completamente funcionales en la etapas fetal y neonatal (García-Mayora & Larranaga Vidal, 2012). En la tabla 2 pueden observarse algunos efectos sobre la función fisiológica con base a la exposición a disruptores endócrinos y los receptores asociados.

Tabla 2. Disruptores endocrinos y algunos ejemplos de sus efectos sobre la función fisiológica

<i>Receptor</i>	Nombre	Función Fisiológica	Ligando endógeno	Disruptor Endócrino
<i>Estrógeno</i>	ER, α, β	Desarrollo sexual femenino	Estradiol	BPA, furanos, metales pesados
<i>Hormona Tiroidea</i>	TR, α, β	Metabolismo, frecuencia cardíaca	Hormona tiroidea	BPA, furanos, percloratos
<i>Progesterona</i>	PR	Desarrollo sexual femenino	Progesterona	BPA, fungicidas, herbicidas
<i>Peroxisoma activador de proliferación</i>	PPAR, α, β	Homeostasis lipídica	Lípidos/ácidos grasos	BPA, organoestánicos
<i>Glucoticoide</i>	GR, α, β	Metabolismo, desarrollo al estrés	Cortisol	BPA, arsénico, ftalatos

Fuente: Adaptado (García-Mayora & Larranaga Vidal, 2012).

ESTRADIOL Y RECEPTORES ESTRÓGENOS (ER)

De acuerdo con sus propiedades de solubilidad, se tienen dos grandes grupos de hormonas: las hidrosolubles y las liposolubles. Las hormonas hidrosolubles tales como: la insulina, la hormona folículo-estimulante, los factores de crecimiento y los factores inductores de diferenciación, tienen en común su naturaleza proteica. Su base es una cadena de aminoácidos que pueden estar combinadas con carbohidratos (hormonas folículo-estimulante, luteinizante y estimulante de la tiroides). El segundo grupo que está integrado por moléculas liposolubles, con excepción de algunas hormonas constituidas por aminoácidos modificados (hormonas tiroideas), tiene la estructura básica del ciclopentano-perhidrofenantreno característico del colesterol. Ejemplos de estos últimas son progesterona, estradiol, la testosterona y glucocorticoides (Egea, Klaholz, & Moras, 2000).

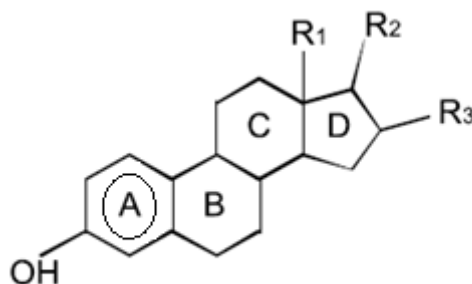


Figura 2. Estructura básica de las hormonas liposolubles. Fuente: (Olea & Fernández, 2001).

Los estrógenos son hormonas cuya molécula está basada en la estructura del fenantreno. Son producidos en los ovarios de las hembras en respuesta a señales del cerebro y otros órganos, y están presentes en vertebrados e invertebrados. En todos los vertebrados, incluido el ser humano, los estrógenos principales son estrona, estradiol y estriol. De ellos, el estradiol es el más potente, pues tiene la mayor afinidad con los receptores de estrógenos (Egea, Klaholz, & Moras, 2000).

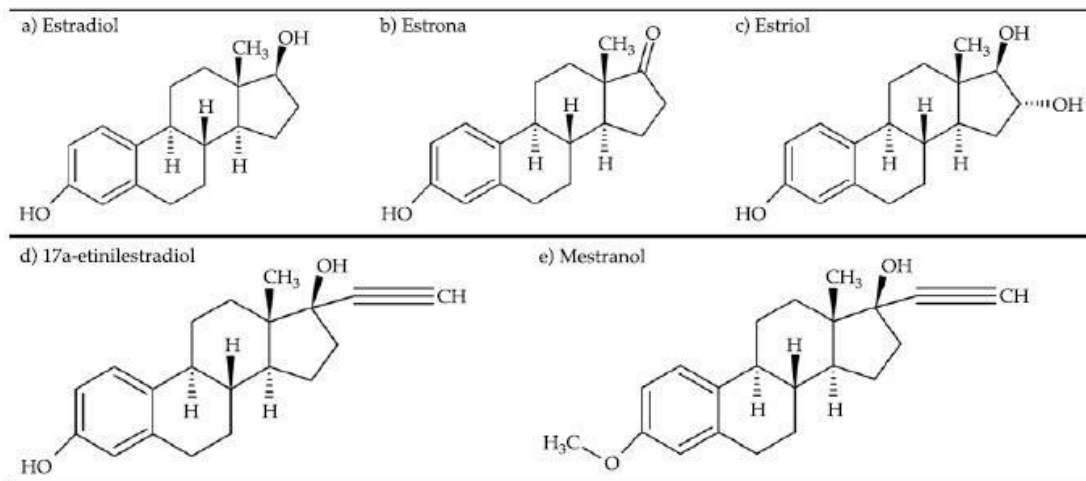


Figura 3: Estructura química de los estrógenos: (a, b y c) estrógenos naturales; (d y e) estrógenos semisintéticos. Fuente: (Ramirez, 2015).

Los receptores estrogénicos son miembros de la superfamilia de receptores nucleares, integrada por varias familias, que han sido nombradas de acuerdo con los tipos de hormonas a las que se unen de manera selectiva. Estas subfamilias son los receptores para andrógenos (AR), estrógenos (ER), progestágenos (PR), glucocorticoides (GR), hormonas tiroideas (TR), de ácido

retinoico (RXR) y receptores huérfanos (OR) (Heinlin & Chang, 2002). Hasta la fecha han sido identificados dos isoformas de receptores estrogénicos (ER): los ER α y los ER β , los cuales residen en el núcleo de las células blanco (Angoa & Arancibia, 2006) formados por una sola cadena de 565 y 530 aminoácidos, respectivamente (Filardo E. , Graeber, Quinn, & Resnick, 2006).

BISFENOL A (BPA) Y SU METABOLISMO

El bisfenol A (BPA) o (2,2-bis (4-hidroxifenil) propano (véase figura 4), es un compuesto orgánico formado por dos anillos fenólicos conectados por un solo carbono unido a dos grupos metilo (Allard, 2014). Se utiliza como monómero en la fabricación de policarbonatos y resinas epoxi y, como aditivo en plásticos. Los policarbonatos se usan en materiales que entran en contacto con alimentos, como botellas de bebidas reutilizables, biberones para bebés, vajillas (platos y tazas) y recipientes de almacenamiento. Las resinas epoxi se usan en revestimientos protectores para latas y recipientes de alimentos y bebidas. (EFSA, 2014), equipamiento deportivo, dispositivos médicos y dentales, sellantes, anteojos, CD y DVD, y electrodomésticos varios. (Centre for Food Safety Food and Environmental Hygiene Department The Government of the Hong Kong Special Administrative Region, 2008). En el año 2012, los polímeros a base de BPA fueron los más usados en el área de la industria alimenticia,

siendo la producción de resinas epoxi mayor a 2.5 millones de toneladas al año (Schechter & Malik, 2012).

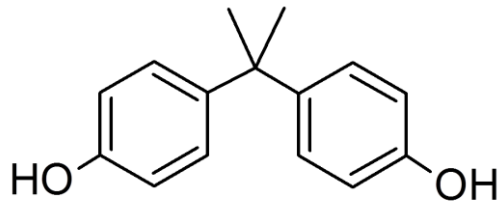


Figura 4. Estructura química del BPA. Fuente (Wagner, 2014).

En la figura 5 se muestran las concentraciones de BPA que se han encontrado en distintos alimentos.

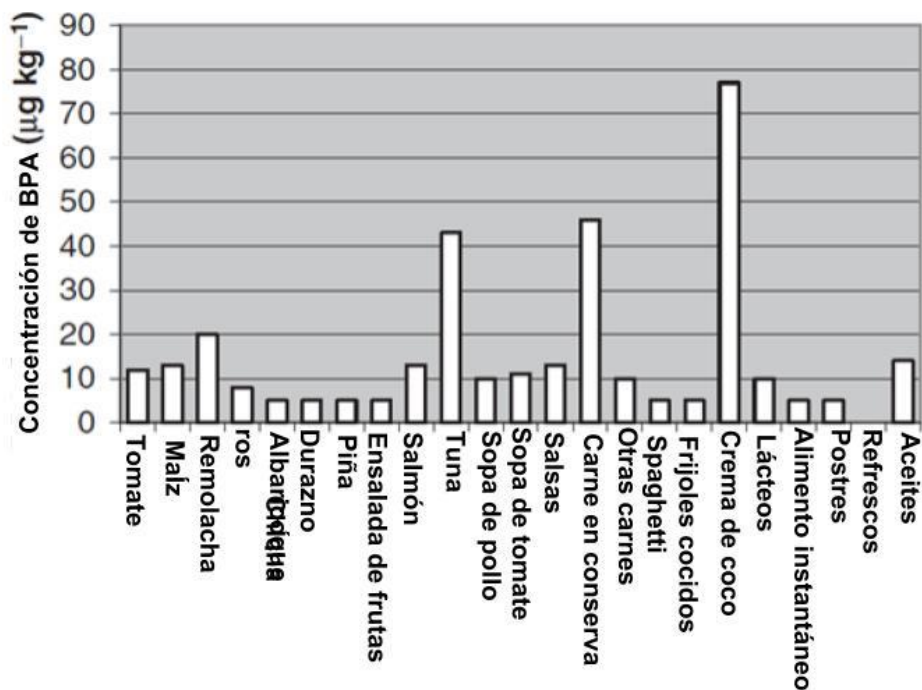


Figura 5. Concentración media de bisfenol A para diferentes grupos de alimentos. Fuente adaptado de (Thomson & Grounds, 2005)

El bisfenol A se ha descrito como un compuesto químico con gran actividad de disrupción endocrina al ser identificado como un antagonista de los receptores de estrógeno y afectar la fertilidad y la reproducción. (Shaw, 2008) .Tras numerosas investigaciones realizadas, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) estableció una ingesta diaria tolerable (IDT) para el BPA de 0,05 mg/kg de peso corporal/día lo que supone 3 mg/día para una persona de 60 kg de peso.

Un estudio realizado en Estado Unidos en 2014 indica que la exposición a Bisfenol A por vías no alimentarias (polvo, aire, agua) representan solo un rango del 1,4% al 2% de la exposición total de BPA en un rango de edad de 1-20 años, y alimentos no enlatados representaron <1%, lo que sugiere que alrededor del 97% de las exposiciones de BPA son debido al consumo de alimentos enlatados (Christensen & Lorber, 2014) .

METABOLISMO DEL BPA

El BPA es absorbido principalmente por vía oral, a través de la dieta. Sin embargo, también se ha demostrado que el BPA presente en el ambiente es absorbido por las vías inhalatoria y dérmica (Vandenberg, Hauser, Marcus, & Olea, 2007). Tras la ingesta de alimentos y bebidas, este compuesto es absorbido rápidamente en la forma hidrosoluble BPA-glucurónido (BPAG) dentro

de las paredes del intestino y en el hígado por la enzima uridina difosfato glucosiltransferasa (UGT). En menor concentración, el BPA es transformado a BPA-sulfato. La vía de eliminación de los metabolitos difiere en los seres vivos. En los humanos, aproximadamente un 80% es excretado a través de la orina con un tiempo medio de eliminación inferior a 6 horas (Vandenberg, Hauser, Marcus, & Olea, 2007).

NONILFENOL (NP)

El nonilfenol (NP, por sus siglas en inglés nonylphenol) (Figura 6), es un compuesto xenobiótico, sintetizado por primera vez en 1940. Puede usarse como agentes humectantes, dispersantes, emulsionantes, solubilizantes y agentes espumantes. Son importantes para una serie de aplicaciones industriales, incluyendo pulpa y papel, textiles, revestimientos, pesticidas agrícolas, aceites lubricantes y combustibles, metales y plásticos, se usan en la preparación de resinas fenólicas, polímeros, estabilizadores térmicos, antioxidantes y agentes de curado (Ying, 2002).

El nonilfenol ha sido calificado como un metabolito crítico por su altísima resistencia a la biodegradación, y porque al ser altamente lipofílico tiende a acumularse no solo en los sedimentos, sino también en los tejidos grasos de los organismos acuáticos (Arukwe, 2000).

Los estudios han encontrado que el NP posee la capacidad de imitar hormonas naturales al interactuar con el receptor de estrógeno. Los niveles de NP presente

en el medio ambiente puede estar muy por encima del umbral necesario para inducir alteraciones endocrinas en la vida silvestre (Ying, 2002).

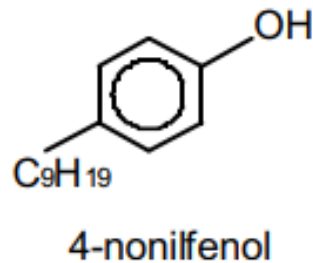


Figura 6. Estructura química del NP. Fuente (Serrano N. , 2001).

BIOENSAYOS ASOCIADOS A LA DISRUPCIÓN ENDÓCRINA

Los ensayos biológicos son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Estos efectos pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, evaluados por la reacción de los organismos. Los efectos pueden manifestarse a diferentes niveles, desde estructuras subcelulares o sistemas de enzimas, hasta organismos completos, poblaciones o comunidades (Castillo, 2004).

Tabla 3. Principales ensayos propuestos de disrupción endocrina *in vitro*

Procedimientos de unión a receptores
Proliferación celular: Empleando la línea celular humana MCF-7 detecta estrógenos (y antiestrógenos), o versiones similares usando levaduras
Expresión de genes informadores
Inhibición de aromatasas y por tanto de la síntesis estrogénica

Fuente: Adaptado de (Repetto, Del Peso, & Zurita, 2012).

ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD

La toxicidad es la capacidad de una sustancia para ejercer un efecto nocivo sobre un organismo; depende de las propiedades químicas del compuesto y su concentración, la duración y frecuencia de la exposición y, su relación con el ciclo de vida del organismo. La toxicidad aparente evaluada en un ensayo biológico es el resultado de la interacción entre la sustancia y el sistema biológico (Castillo, 2004).

La evaluación toxicológica de compuestos químicos se ha basado históricamente en el empleo de ensayos *in vitro*, expresando la toxicidad en

función de los efectos agudos provocados por la acción de una única administración de la sustancia objeto de estudio (Andersen & Krewsk, 2010).

La dosis letal media o concentración citotóxica (LD50, *Lethal Dose 50*; CC₅₀) es equivalente a la cantidad de sustancia necesaria para producir la muerte del 50% de la población (véase figura 7) y, ha sido empleada tradicionalmente como valor de referencia para indicar la potencia de cualquier tipo de tóxico (Castillo, 2004).

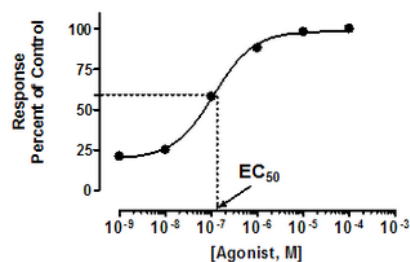


Figura 7. Modelo de CC₅₀ Fuente:PRISMAGRAPH 6

LÍNEAS CELULARES EN PRUEBAS TOXICOLÓGICAS

Aunque existe una amplia gama de sistemas experimentales para investigar las consecuencias derivadas de la exposición a productos químicos, los cultivos celulares constituyen probablemente el mejor compromiso entre la aproximación reduccionista *in vitro* y la predicción de la toxicidad en humanos. Dentro de los distintos tipos de cultivo, las líneas celulares establecidas representan un modelo

alternativo atractivo que posibilita la obtención de resultados muy reproducibles.

Las líneas celulares ofrecen gran homogeneidad y son de fácil manipulación, lo que permite tener bajo control todas las condiciones de crecimiento del cultivo (temperatura, pH, humedad, composición del medio de cultivo) y realizar diseños experimentales muy versátiles que combinen la evaluación de grandes rangos de concentración con múltiples tiempos de exposición (Mothersill & Austin, 2003).

Se define como citotoxicidad a los efectos adversos o interferencias con estructuras y/o propiedades esenciales para la supervivencia, la proliferación y/o la función celular. Incluye la integridad de la membrana plasmática y del citoesqueleto, el metabolismo, la síntesis y degradación de constituyentes celulares, la regulación de iones y la división celular (Andersen & Krewsk, 2010).

Algunas de estas dianas resultan ser más susceptibles que otras ante el daño producido por la exposición a compuestos xenobióticos. La sensibilidad de determinados parámetros puede variar de forma significativa dependiendo del tipo de línea celular, por lo que su adecuada monitorización resulta fundamental en este tipo de estudios (Leist, Hartung, & Nicotera, 2008).

Las líneas celulares de mamífero son las más utilizadas en la actualidad en las pruebas de citotoxicidad (Zuccoa, De Angelisb, Testaib, & Stamatib, 2004) y

diversos trabajos enfatizan la importancia del uso de líneas de origen humano como herramienta para estudiar las relaciones dosis-respuesta, definir rutas de daño y dilucidar los mecanismos de acción tóxica de sustancias potencialmente nocivas para la salud humana (Andersen, 2010). A continuación se da una breve descripción de las líneas celulares empleadas en el presente estudio:

LÍNEA CELULAR MCF-7

La línea celular de cáncer de mama MCF-7 deriva de una efusión de pleural de un adenocarcinoma de mama metástico, la paciente tenía 69 años de edad y su enfermedad respondía a la terapia hormonal. Posteriormente se realizaron distintas investigaciones sobre esta línea celular identificando los receptores para glucocorticoides, progestina, andrógenos y receptores a estrógenos. Debido a sus características y a la manera a la que responde a los estrógenos, son un excelente modelo *in vitro* para el estudio de los mecanismos de respuesta de tumores a terapias endocrinas (Filardo E. J., Graeber, Quinn, & Resnick, 2006).

LÍNEA CELULAR 3T3

Las células 3T3 son, en origen, fibroblastos, no obstante, su destino es convertirse en adipocitos. A falta de estímulos hormonales que provocarían la diferenciación a adipocitos, su morfología es la de un fibroblasto típico. Se describen como células hipertriploides con 68 cromosomas en el 30% de los

casos, a diferencia de las células normales de ratón que poseen 40. Una característica peculiar es que estas células tienen una elevada sensibilidad a la inhibición por contacto, además, son muy útiles en estudios de DNA (CLAVIJO & GÓMEZ, 2007).

LÍNEA CELULAR PC3

La línea celular de cáncer de próstata PC3 se usa a menudo como modelo para estudiar la metástasis ósea y fue aislado originalmente de un cáncer de próstata metastásico óseo (Prasenjit Dey, 2012). Las células PC3 no responden a andrógenos glucocorticoides, ni a los factores de crecimiento epidérmico o fibroblástico y representa un modelo para el estudio de cáncer de próstata andrógeno independiente (Yiwei Li, 2002).

OBJETIVOS

GENERAL

Desarrollar un bioensayo *in vitro* en tres líneas celulares hormono-dependientes, a saber, MCF7 (cáncer de mama), PC3 (cáncer de próstata) y 3T3 (fibroblastos como célula sana) para medir la citotoxicidad del BPA en concentraciones asociadas con la ingesta alimentaria.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Exponer las líneas celulares MCF7, PC3 y 3T3 a siete diferentes concentraciones de BPA.
- Exponer las líneas celulares MCF7, PC3 y 3T3 a siete diferentes concentraciones de estradiol y EtOH para comparar la respuesta citotóxica.
- Determinar el CC_{50} (concentración citotóxica del 50%) en las tres líneas celulares.

METODOLOGÍA

A continuación, se presenta el esquema relacionado con la metodología experimental empleada para el presente proyecto.

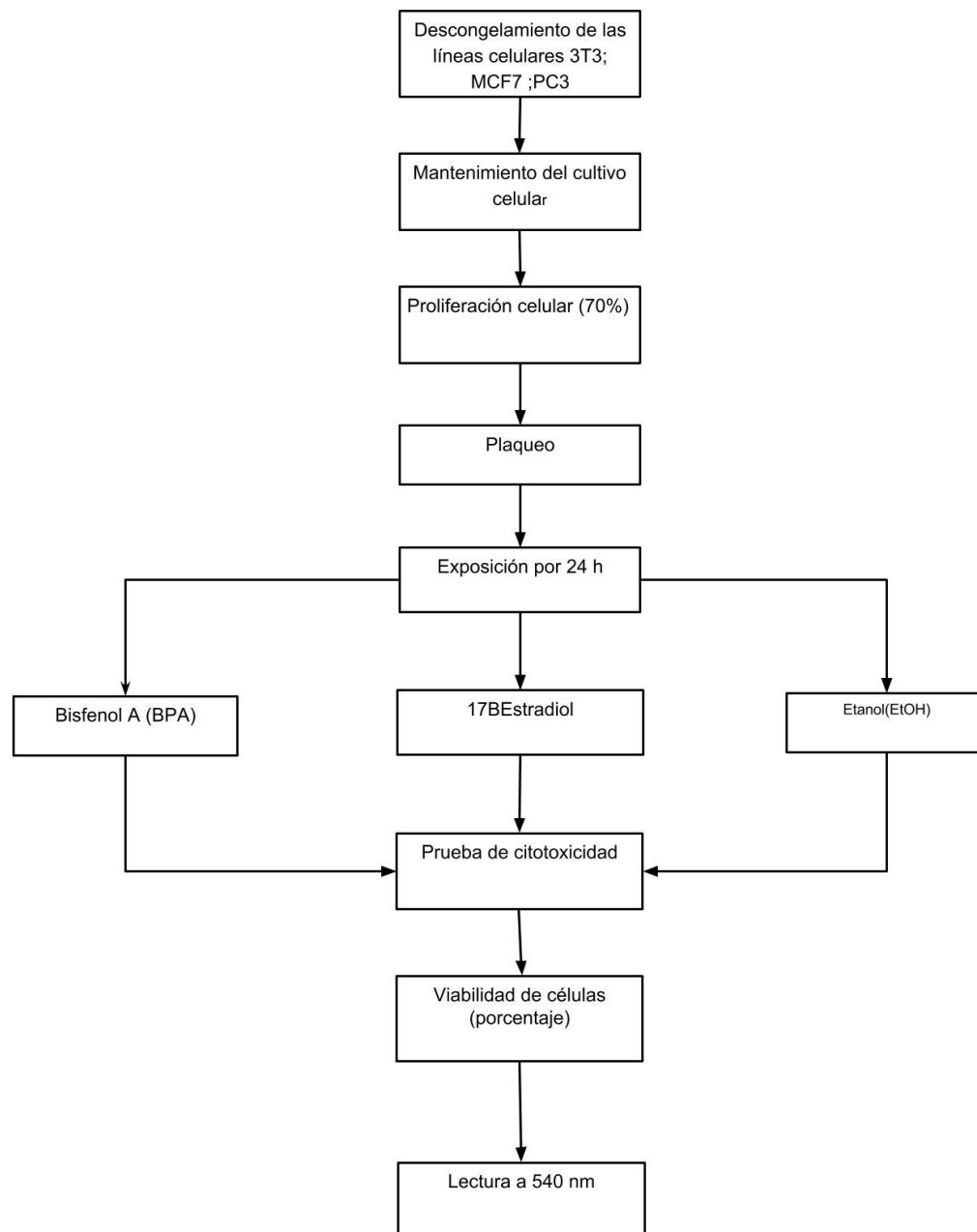


Figura 8. Esquema de la metodología utilizada.

Así mismo, se presenta el esquema de tiempo promedio para el cultivo celular para cada línea:

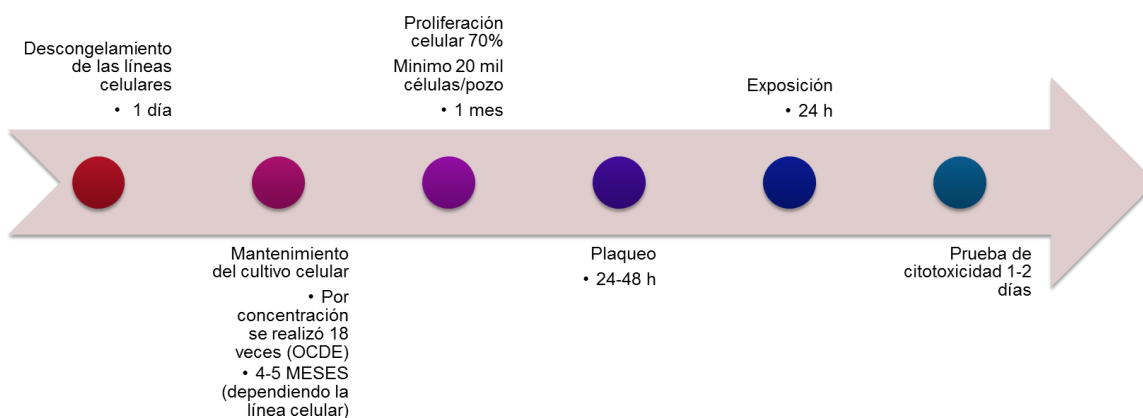
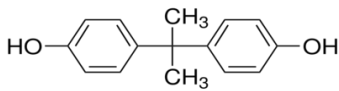
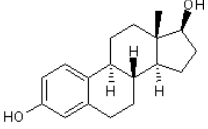
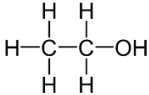


Figura 9. Esquema de tiempo de la metodología del proyecto

MATERIALES Y MÉTODOS

En la tabla 4 se muestran los compuestos utilizados en este estudio

Tabla 4. Principales características químicas de los compuestos objeto de estudio

	BPA	17B-ESTRADIOL	ETANOL
no CAS	80-05-7	50-28-2	64-17-5
Molécula			
Fórmula molecular	$(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$	$\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_2$	$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$
Peso molecular	228.29	272.38	46.06

Líneas celulares

Tabla 5: Principales características de la línea celular MCF7


 <p>Fuente: SIGMA</p>	código	86012803 SIGMA
	organismo	Adenocarcinoma de mama
	origen	Humano
	tipo de célula	Epitelial
	receptores	Se informa para expresar el estrógeno y el receptor de progesterona

Tabla 6: Principales características de la línea celular PC3

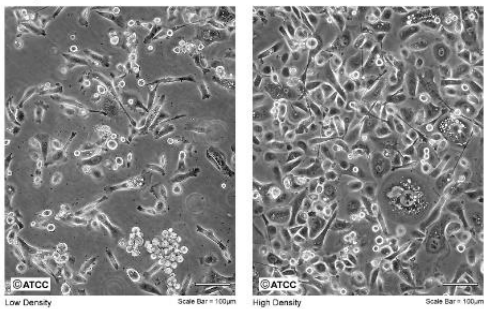
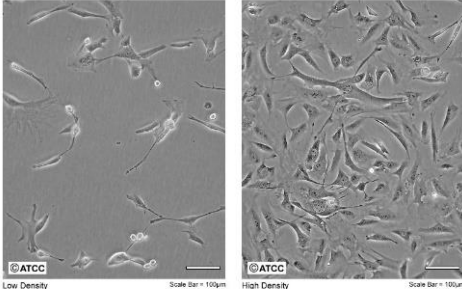
<p>ATCC Number: CRL-1435 Designation: PC-3</p>  <p>Fuente: ATCC</p>	código	PC-3 (ATCC® CRL-1435™)
	organismo	Próstata; derivados del sitio metastático
	origen	Humano
	tipo de célula	Epitelial
	receptores	No especificados

Tabla 7: Principales características de la línea celular 3T3

ATCC Number: CL-173 Designation: 3T3-L1	código 86052701 SIGMA
	organismo embrión
	origen Embrión de ratón
	tipo de célula fibroblastos
	receptores No especificados

Fuente: SIGMA

CULTIVO DE LAS LINEAS CELULARES

- Medio para el crecimiento de la línea celular 3T3

Medio DMEM (GIBCO) suplementado al 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO), 1%(v/v) antibióticos, 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales, L-glutamina y glucosa 4.5 g/L.

- Medio para el crecimiento de la línea celular PC3

Medio F12K (ATCC) suplementado al 10% de SFB (GIBCO)

- Medio para el crecimiento de la línea celular MCF7
- Medio DMEM (GIBCO) suplementado al 10% (v/v) de SFB (GIBCO), 1%(v/v) antibióticos, 1% (v/v) de aminoácidos no esenciales, L-glutamina y glucosa 4.5 g/L.

CUANTIFICACION CELULAR Y PRUEBA DE CITOTOXICIDAD

- Tripsina (GIBCO)
- Rojo oleoso (Sigma-Aldrich)
- Placas de 20 pozos
- Buffer de fosfatos (PBS)

DESCONGELAMIENTO Y PROLIFERACIÓN CELULAR

Las células se encuentran en criotubos a un $T^0 = -70^{\circ}\text{C}$, se descongelaron a una temperatura de 37°C . Al tener la suspensión celular dentro de la campana se traspasó a un tubo con 10 mL de solución de lavado, se centrifugó a 1500 rpm x 5 min. Se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 1 mL de medio DMEM suplementado con 10% SFB. Se colocó una cantidad estimada de suspensión celular en cajas de cultivo y se colocaron 7 mL de medio DMEM suplementado con 10% SFB, se homogenizó y se incubó a 37°C , 5% con CO_2 el tiempo requerido para la confluencia necesaria. Cuando la confluencia se encontró entre el 70 y el 90% se procedió a la cuantificación y en caso de tener la cantidad requerida de células, se procede al plaqueo.

TRIPSINIZACIÓN

Se aspiró el medio de cultivo, se adicionaron entre 2-3 mL de tripsina-EDTA, se incubó a 37°C hasta que la monocapa se desprendió, la suspensión se centrifugó a 1500 rpm, 5 min. Desechamos el sobrenadante y resuspendimos el botón en medio DMEM suplementado con 10% SFB

CUANTIFICACIÓN CELULAR

En un tubo Eppendorf de 1.5 mL se adicionó 20 μL de suspensión celular y 20 μL de solución de azul tripano, se homogenizó y se transfirió 10 μL a cada una de las secciones de la Cámara de Neubauer. La cámara se colocó en el microscopio óptico utilizando objetivo de 10x y se contaron las células (Moreno MJ, 2002); (Celis & Lizcano Losada, 2006); (Fernández, 2013).

EXPOSICIÓN DE LA LÍNEAS CELULARES A CONTAMINANTES EMERGENTES PARA PRUEBA DE CITOTOXICIDAD.

Utilizamos 20,000 células/pozo, llegando a un volumen final de 100 μL de suspensión celular e incubamos a 37°C con 5% de CO_2 , mínimo 12 h para la fijación de las células.

EXPOSICIÓN AL COMPUESTO

Pesamos 2 mg de cada uno de los compuestos a los cuáles se iban a exponer las células y los diluimos en 200 μL del disolvente (agua estéril), [dilución 1]. Al término de las 24 h se aspira el medio y se adicionan 10 μL de cada una de las concentraciones de los CE y se dejan en incubación por 24 h o el tiempo que sea necesario a 37°C y 5% CO_2 .

(Considerando esta la dilución 1) del disolvente correspondiente y se hicieron las siguientes diluciones, tal como se muestra en la tabla 8

Tabla 8. Diluciones y concentraciones finales de los compuestos utilizados

μL de la solución	μL de agua estéril	Concentración final del compuesto	Concentración final (medio + compuesto)
100 μL de la dilución (1)	900 μL	1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (2)	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
500 μL de la solución (2)	500 μL	500 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (3)	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$
200 μL de la solución (3)	800 μL	100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (4)	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$
500 μL de la solución (4)	500 μL	50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (5)	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
200 μL de la solución (5)	800 μL	10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (6)	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
100 μL de la solución (6)	900 μL	1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (7)	0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$
100 μL de la solución (7)	900 μL	0,1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (7)	0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$

FIJACIÓN

Al término de la incubación se aspiró el medio y se fijó colocando 100 μ L de ácido tricloroacético al 10% y en refrigeración a 4°C durante 1 h. Después se lavó con agua destilada.

TINCIÓN

Se adicionó 50 μ L de la solución de Sulforrodamina B al 0.4% en ácido acético al 1% a cada uno de los pozos con células, se dejaron en incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente y cubriéndolos de la luz. Terminado ese tiempo se retiró el exceso de colorante lavando con ácido acético al 1% y se dejó secar completamente a temperatura ambiente. El colorante se solubilizó añadiendo 100 μ L de Tris base 10 mM (pH 10.5) con agitación mecánica suave por 5 minutos y hasta observar la solubilización y homogenización del mismo.

CUANTIFICACIÓN CELULAR

Lectura e interpretación de la prueba: Se leyó en un lector de microplaca a una longitud de onda de entre 490 a 550 nm que es en la cual se detecta la sulforrodamina (Camacho, 2002); (León, 2006); (Linamaría, Alfonso R, & Aristizábal, 2009).

Para obtener el número de células después de la tripsinización, es decir, las células que se encuentran en suspensión, se realiza el siguiente cálculo:

$$\text{Número de células por mL de suspensión (C)} = \tilde{N} \times 10^4 \times 2$$

$$\text{Número de células por mL de suspensión (C)} = 75 \times 10^4 \times 2$$

$$\text{Número de células por mL de suspensión (C)} = 1,500,000$$

Donde: C= Células por mililitro, \tilde{N} = Promedio de células contadas vivas, 10^4 = Factor de conversión de la cámara, 2= Factor de dilución (50% suspensión celular, 50% solución azul tripano).

Diseño Experimental

A pesar de su alto grado de organización estructural y funcional, los organismos multicelulares reaccionan ante los cambios ambientales principalmente a nivel celular. Dependiendo de la severidad y la duración del estrés pueden distinguirse diferentes respuestas celulares que incluyen mecanismos de reparación, procesos adaptativos y activación de vías de apoptosis. Sin embargo, aunque las respuestas celulares ante situaciones de estrés son un mecanismo universal de importancia fisiológica y patológica, no todos los tipos de células presentan la misma capacidad de resistencia y defensa frente a los estímulos nocivos. (Spriggs, Bushell, & Willis, 2010).

La evaluación *in vitro* de las respuestas celulares asociadas a la exposición a productos tóxicos requiere un diseño experimental que incluya la utilización de diferentes líneas celulares, la elección de los tiempos de exposición y la selección de los parámetros de ensayo más adecuados para definir el perfil toxicológico del compuesto objeto de estudio (Andersen & Krewski, The Vision of Toxicity Testing in the 21st Century: Moving from Discussion to Action, 2010).

Durante este proyecto se trabajaron con concentraciones de BPA en un rango de 0,01 a 100 $\frac{\mu g}{mL}$, estas concentraciones son las que reporta Thomson en “Bisphenol A in canned foods in New Zealand: An exposure assessment”, es decir, concentraciones que ingerimos involuntariamente a través del consumo de los alimentos (Thomson & Grounds, 2005).

Se utilizaron 3 líneas celulares, MCF-7, 3T3 (células sin diferenciar) con receptores estrógeno, PC3 con receptores andrógenos. Véase la imagen de células en proliferación.

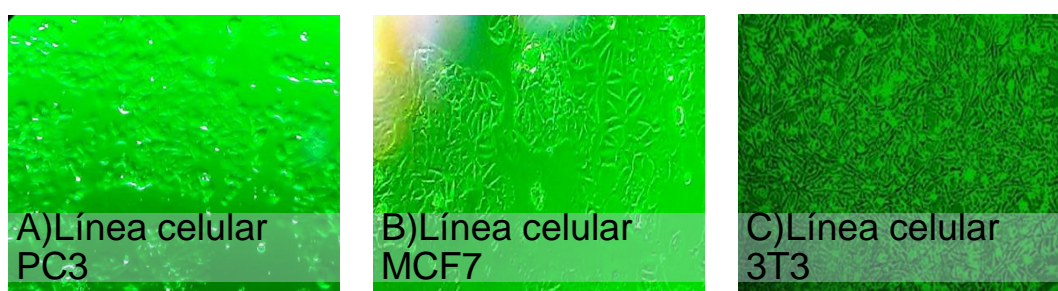


Figura 10. Proliferación celular de las líneas celulares utilizadas en el estudio
FUENTE: Fotografías tomada en la unidad de investigación pre- clínica (UNIPREC), con un objetivo 10x; donde se muestra el 70% de proliferación celular.

Porcentaje de Viabilidad (memoria de cálculo)

Obtenidas las absorbancias de las placas, realizamos la determinación del porcentaje de células adheridas al final del experimento, el cual indica el porcentaje de células viables al momento de la fijación. Se considera la proliferación celular máxima (100%) de los pozos que no reciban tratamiento del compuesto de prueba (control negativo). El cálculo es el siguiente:

$$\text{Porcentaje de viabilidad} = \left(\frac{T_{oc} - T_{ec}}{T_{oc}} \right) \times 100$$

$$\text{Porcentaje de viabilidad} \left(BPA 100 \frac{\mu g}{mL} \right) = \left(\frac{100,000 - 48,500}{100,000} \right) \times 100 = 51.5\%$$

Dónde: T_{oc} = Total de células contadas (Vivas y muertas), T_{ec} = Células teñidas.

Las curvas de CC_{50} se generaron con datos expresados como el porcentaje de viabilidad celular, presentados con la media \pm desviación estándar y con los log de las concentraciones utilizadas. El análisis estadístico para el cálculo de CC_{50} se utilizó GraphPad Prism 6.0® para Windows (GraphPad Software Inc., EE. UU.). Ver anexos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tres líneas celulares, a saber, MCF7, PC3 y 3T3 fueron expuestas a BPA, 17 β -estradiol y EtOH (como control) para evaluar la citotoxicidad por exposición a bisfenol A (véase Materiales y Métodos). A continuación, se presentan los resultados por compuesto.

ETANOL (EtOH)

En la Tabla 9, se agrupan los resultados de proliferación celular al exponer cada línea celular a EtOH.

TABLA 9. VC: Viabilidad Celular; DE: desviación estándar y se tomó una n=18, Proliferación celular de las líneas celulares MCF7; PC3 y 3T3, expuestas a EtOH.

	MCF7			PC3			3T3		
	VC (%)	DE	N	VC (%)	DE	N	VC (%)	DE	N
0,01	91,581	5,854	18	84,485	18,882	18	111,010	10,697	18
0,1	95,715	7,486	18	88,195	14,119	18	114,490	10,055	18
1	101,203	5,313	18	99,397	12,308	18	125,220	8,880	18
5	102,475	6,912	18	103,408	19,329	18	136,690	11,302	18
10	103,743	8,378	18	108,689	15,917	18	136,920	16,601	18
50	105,591	8,214	18	108,359	12,389	18	126,240	10,324	18
100	103,740	8,284	18	106,240	10,075	18	115,840	9,517	18

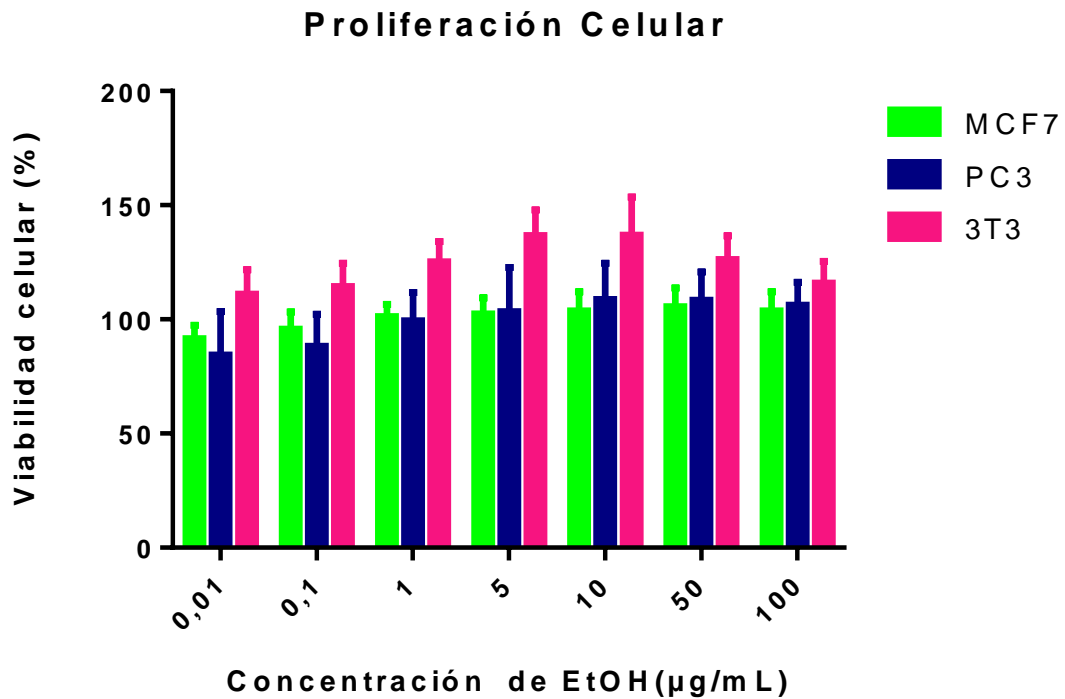


Figura 11. Gráfica de Proliferación Celular después de 24 h de ser expuestas a EtOH, estos resultados representan el promedio de los tres experimentos \pm D.E

Después de 24 h se midió la viabilidad celular y se observa que el EtOH no afecta la viabilidad celular como era de esperarse, es decir, no hay diferencia significativa entre el porcentaje de células vivas a las diferentes concentraciones expuestas.

TABLA 10. VC: Viabilidad Celular; DE: desviación estándar. Linealización de la proliferación celular de las líneas celulares MCF7; PC3 y 3T3, expuestas a EtOH.

Log(EtOH)	MCF7		PC3		3T3	
	VC (%)	DE	VC (%)	DE	VC (%)	DE
-2,000	91,581	5,854	84,485	8,947	111,010	10,697
-1,000	95,715	7,486	88,195	18,882	114,490	10,055
0,000	101,203	5,313	99,397	14,119	125,220	8,880
0,698	102,475	6,912	103,408	12,308	136,690	11,302
1,000	103,743	8,378	108,689	19,329	136,920	16,601
1,698	105,591	8,214	108,359	15,917	126,240	10,324
2,000	103,740	8,284	106,240	12,389	115,840	9,517

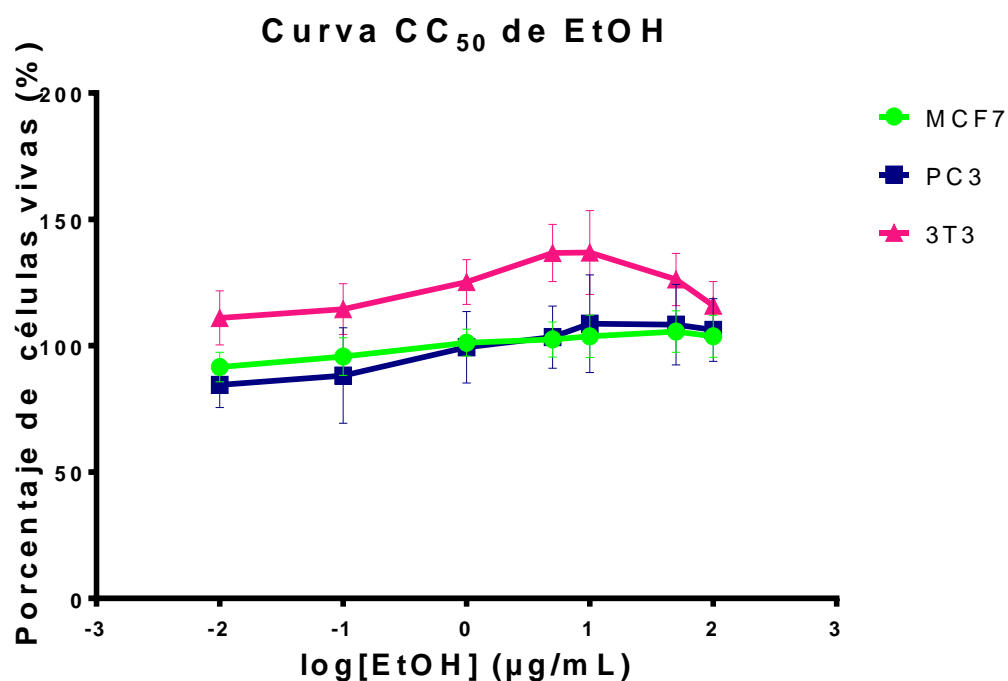


Figura 12. Gráfica Curva de CC₅₀ de EtOH, en las líneas celulares MCF-7, PC3 y 3T3.

Se obtuvo una CC_{50} de $0,0 \frac{\mu g}{mL}$ para las tres líneas celulares (MCF7, PC3 y 3T3).

Esto quiere decir que las células expuestas a etanol no presentaron inhibición, ni proliferación como se esperaba. La población se mantuvo constante, ya que el EtOH (como blanco) no reporta unión a los receptores estrogénicos de las líneas celulares.

17-β-ESTRADIOL

A continuación, se presenta en la Tabla 11, los resultados de proliferación celular al exponer cada línea celular a 17β-estradiol.

TABLA 11. VC: Viabilidad Celular; DE: desviación estándar y se tomó una n=18. Proliferación celular de las líneas celulares MCF7; PC3 y 3T3, expuestas a 17β-estradiol

	MCF7			PC3			3T3		
	VC (%)	DE	N	VC (%)	DE	N	VC (%)	DE	N
0,01	50,080	37,106	18	90,804	36,540	18	52,190	37,814	18
0,1	44,526	33,055	18	80,300	38,430	18	50,710	36,606	18
1	47,340	37,971	18	75,899	43,123	18	52,860	41,585	18
5	55,158	43,159	18	76,597	46,676	18	58,730	44,870	18
10	44,765	18,086	18	80,581	39,708	18	69,740	37,654	18
50	53,081	8,613	18	84,203	18,669	18	85,780	15,173	18
100	69,354	8,430	18	87,941	8,947	18	85,390	11,031	18

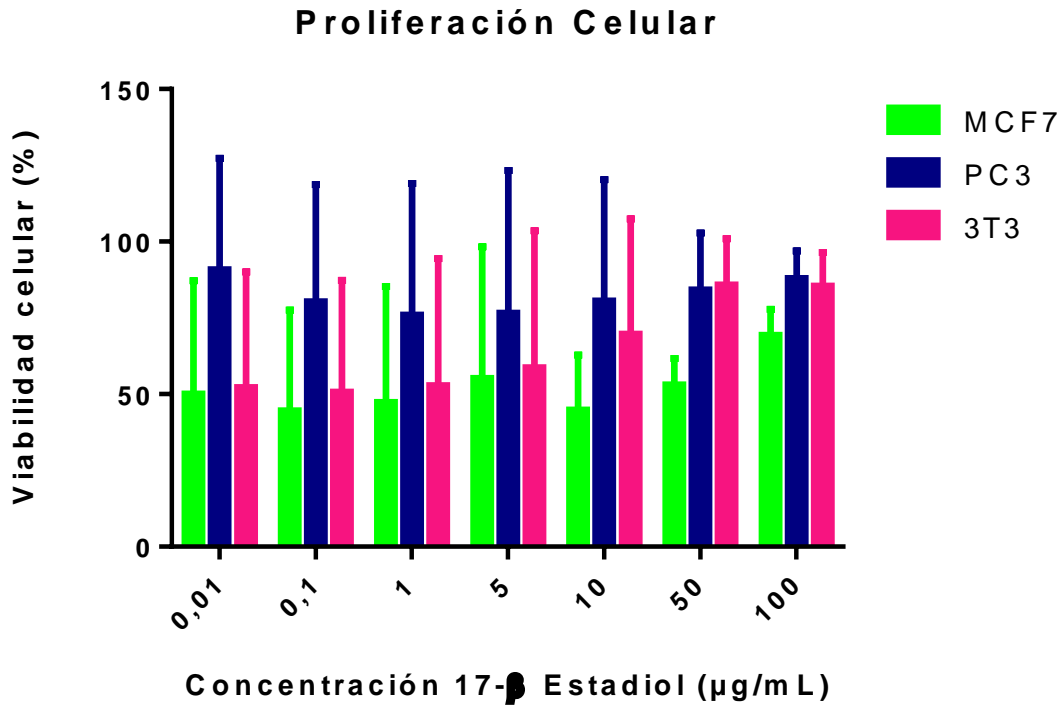


Figura 13. Gráfica Proliferación Celular 24 h después de ser expuestas a 17β-estradiol, estos resultados representan el promedio de los tres experimentos ± D.E

En la figura 13 se observa que no existe un efecto adverso por exposición a 17β-estradiol en ninguna de las líneas celulares. Sin embargo, podría visualizarse una tendencia de incremento en los porcentajes de viabilidad celular para MCF7 y 3T3. En el caso particular de 3T3, esta tendencia es más clara y concuerda con Moreno, 2012, en que la naturaleza multipotencial de esta línea celular potencia su crecimiento en presencia de compuestos hormonales para alcanzar su diferenciación en adipocitos.

TABLA 12. VC: Viabilidad Celular; DE: desviación estándar. Linealización de la proliferación celular de las líneas celulares MCF7; PC3 y 3T3, expuestas a 17 β -estradiol

log[Estradiol]	MCF7		PC3		3T3	
	VC (%)	DE	VC (%)	DE	VC (%)	DE
-2,000	50,080	37,106	90,804	36,540	52,190	37,814
-1,000	44,526	33,055	80,300	38,430	50,710	36,606
0,000	47,340	37,971	75,899	43,123	52,860	41,585
0,698	55,158	43,159	76,597	46,676	58,730	44,870
1,000	44,765	18,086	80,581	39,708	69,740	37,654
1,698	53,081	8,613	84,203	18,669	85,780	15,173
2,000	69,354	8,430	87,941	8,947	85,390	11,031

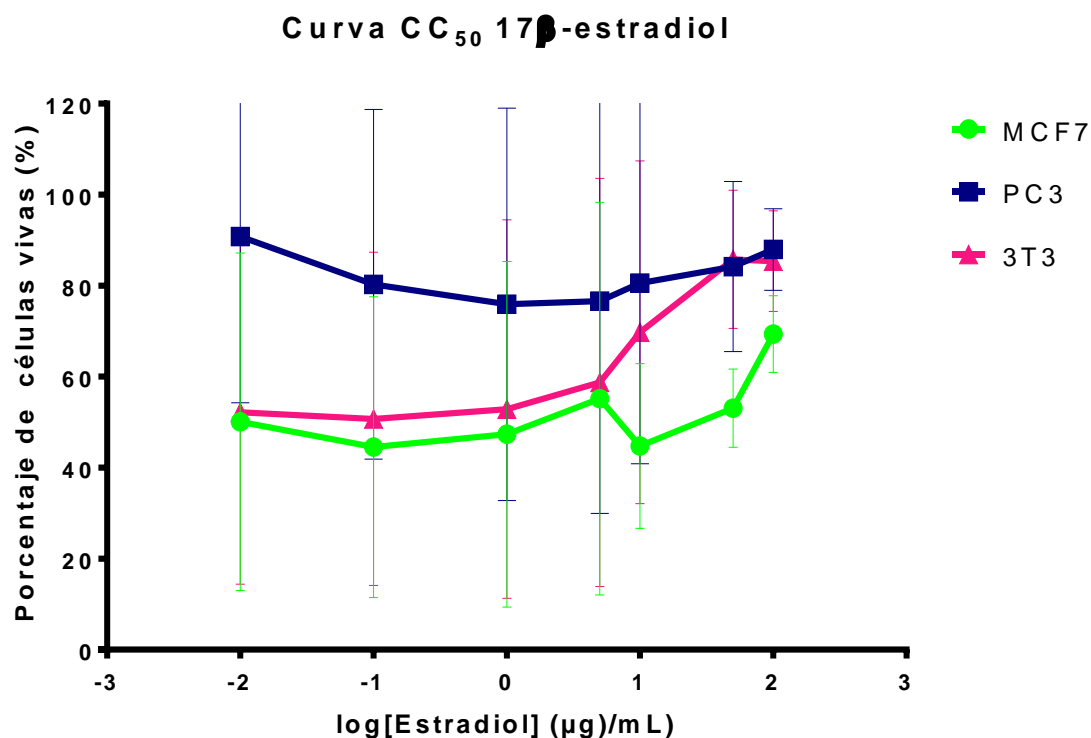


Figura 14. Gráfica Curva de CC₅₀ de 17 β -estradiol, en las líneas celulares MCF-7, PC3 y 3T3

Para el 17 β -estradiol igualmente se obtiene un CC₅₀ de 0,0 $\frac{\mu g}{mL}$, lo que concuerda con que este estrógeno sintético no ha sido asociado con un efecto adverso a las concentraciones que se manejaron.

BISFENOL A (BPA)

A continuación, se presenta en la Tabla 13 los resultados de proliferación celular al exponer cada línea celular a BPA.

TABLA 13. VC: Viabilidad Celular; DE: desviación estándar y se tomó una n=18. Proliferación celular de las líneas celulares MCF7; PC3 y 3T3, expuestas a BPA

	MCF7			PC3			3T3		
	VC (%)	DE	N	VC (%)	DE	N	VC (%)	DE	N
0,01	83,616	25,537	18	85,841	24,543	18	118,840	31,517	18
0,1	89,491	26,040	18	92,911	21,881	18	125,750	29,051	18
1	96,831	29,335	18	102,238	12,157	18	133,730	30,963	18
5	98,709	32,132	18	101,751	12,041	18	138,530	34,106	18
10	101,749	35,550	18	110,371	10,861	18	132,140	33,081	18
50	64,725	16,609	18	81,110	9,053	18	97,290	35,708	18
100	26,265	6,468	18	39,217	15,889	18	39,760	12,443	18

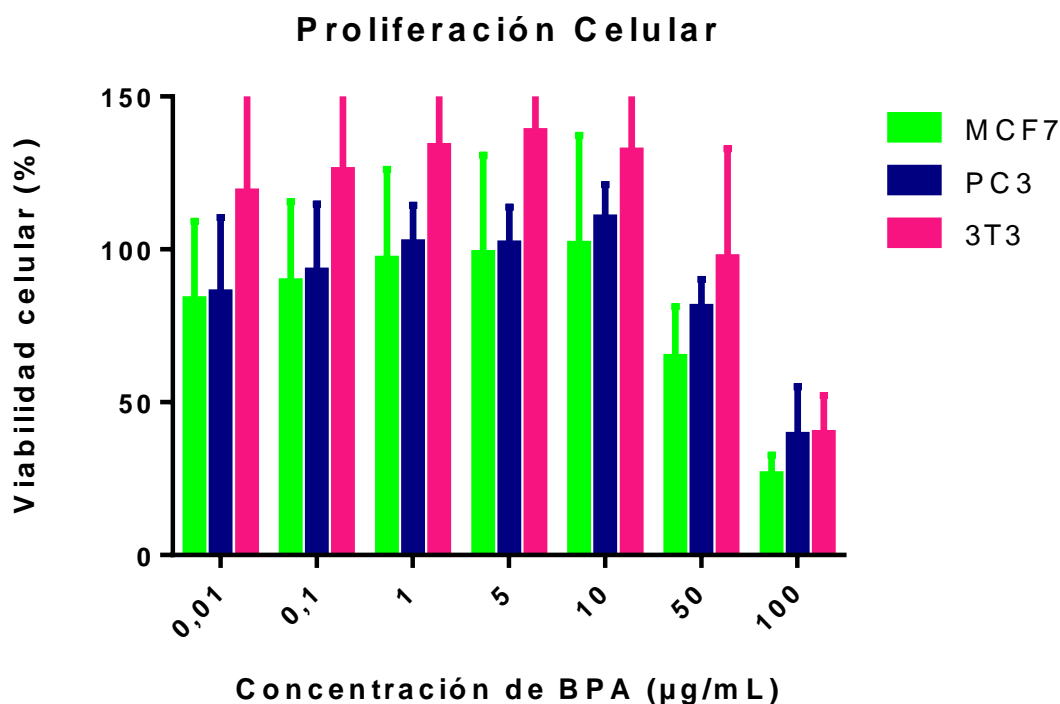


Figura 15. Gráfica Proliferación Celular 24 h después de ser expuestas a BPA estos resultados representan el promedio de los tres experimentos \pm D.E

En la figura 15 se muestra la viabilidad celular a las diferentes concentraciones de BPA, como se puede observar una tendencia de reducción en la viabilidad celular a partir de una concentración de BPA de $10 \frac{\mu g}{mL}$. En específico, la disminución se da primero en la línea celular MCF7 a una concentración de $50 \frac{\mu g}{mL}$ donde se observa que disminuye a un 60% aproximadamente y a $100 \frac{\mu g}{mL}$ de BPA, la viabilidad celular es de un 30%. Además, en el caso de las líneas celulares PC3 y 3T3 se reduce a un 40% de ambas poblaciones celulares en $100 \frac{\mu g}{mL}$ de BPA.

TABLA 14. VC: Viabilidad Celular; DE: desviación estándar. Linealización de la proliferación celular de las líneas celulares MCF7; PC3 y 3T3, expuestas a BPA

Concentración de BPA	MCF7		PC3		3T3	
	VC (%)	DE	VC (%)	DE	VC(%)	DC
-2,000	83,616	25,537	85,841	24,543	118,840	31,517
-1,000	89,491	26,040	92,911	21,881	125,750	29,051
0,000	96,831	29,335	102,238	12,157	133,730	30,963
0,698	98,709	32,132	101,751	12,041	138,530	34,106
1,000	101,749	35,550	110,371	10,861	132,140	33,081
1,698	64,725	16,609	81,110	9,053	97,290	35,708
2,000	26,265	6,468	39,217	15,889	39,760	12,443

En la figura 16 se pueden observar los resultados obtenidos para la determinación del efecto citotóxico del BPA. En el caso de MCF7 se estimó un valor de CC_{50} de $64,67 \frac{\mu g}{mL}$. Para las líneas celulares PC3 y 3T3, la disminución de la viabilidad celular es similar con un valor CC_{50} de $85,17 \frac{\mu g}{mL}$ y $88,48 \frac{\mu g}{mL}$, respectivamente.

Es importante recalcar que existen únicamente cuatro artículos científicos que estudian el efecto observable de la citotoxicidad *in vitro* del BPA en líneas celulares.

En específico, existe un reporte para células monocito (U937) en el cual se alcanza una viabilidad del 50% a partir de $1.5 \frac{ng}{mL}$ de BPA (Neri, 2015)(Neri et al.,

2015). Además, Wang *et al.* (2012) evaluaron el efecto protector del ginseng en la citotoxicidad de BPA (observable a partir de 50 μM) para un cultivo de células Sertolli (15P-1) (Wang, 2012).

En el caso de MCF7, Zhang *et al.*, 2012 identificaron la inhibición génica por efecto citotóxico del BPA a una concentración de 1 μM por 48 h (Zhang, 2012).

Recientemente, (Aghajanpour-Mir, Zabihi, & Akhavan-Niaki, 2016) reportó un daño cromosómico por efecto citotóxico de BPA a partir de 100 $\frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$.

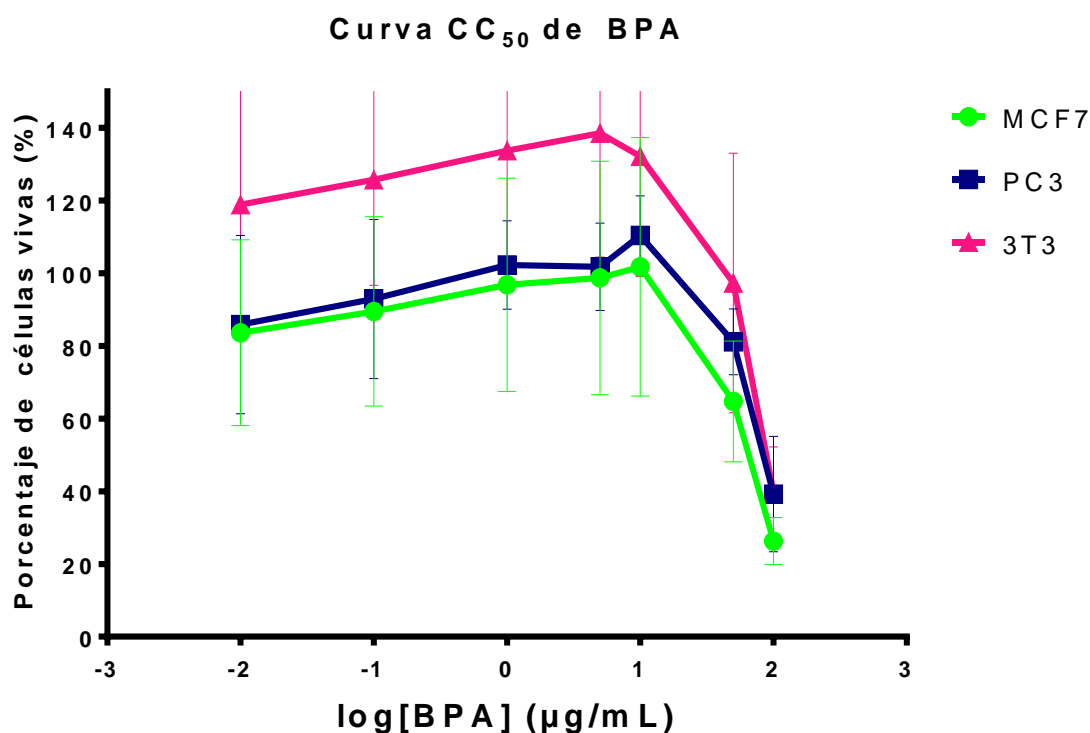


Figura 16. Gráfica Curva de CC_{50} de BPA, en las líneas celulares MCF7, PC3 y 3T3.

El mecanismo por el cual es posible un efecto citotóxico del BPA se ha explicado a través de la dinámica entre los compuestos hormonales con receptores de estrógenos y actividades del receptor nuclear en la célula (Kenichi, 2004). La interacción que se lleva a cabo entre la hormona y el receptor es una acción dinámica de unión y separación que depende de las constantes de asociación y disociación de los receptores (Pérez-Rivero, Aguilar-Setién, Villa-Godoy, & Serrano, 2005). Consecuentemente, el receptor debe tener gran afinidad para su compuesto hormonal o diversos sitios de unión que actúen sinérgicamente entre sí. Debido a que estas interacciones son del orden de picogramos o nanogramos y que el número de receptores es finito, existe una alta posibilidad de saturación en los receptores estrogénicos (Pérez-Rivero, Aguilar-Setién, Villa-Godoy, & Serrano, 2005).

En el caso del BPA, se sigue el mismo mecanismo de activación hormona-receptor. Sin embargo, el ligando receptor-BPA induce un cambio conformacional, lo cual impide una dinámica de asociación-disociación y eventualmente una disfunción celular que puede llevar a la citotoxicidad al saturarse los receptores estrogénicos (Montano, Müller, Trobaugh, & Katzenellenbogen, 1995).

En la figura 17, se representa esquemáticamente los enlaces entre el receptor estrógeno (ER) y el estradiol (E2). Como se puede observar, esta unión se lleva a cabo por interacciones débiles entre los hidrógenos del estradiol y el ácido

glutámico (aminoácido del receptor estrogénico) que es un compuesto hidrofóbico atraído por los grupos -OH del estradiol. Como ya se ha mencionado, la debilidad del enlace para preservar la conformación molecular en la interacción receptor-hormona es vital para la continuidad de la función celular (Tabb & Blumberg, 2006).

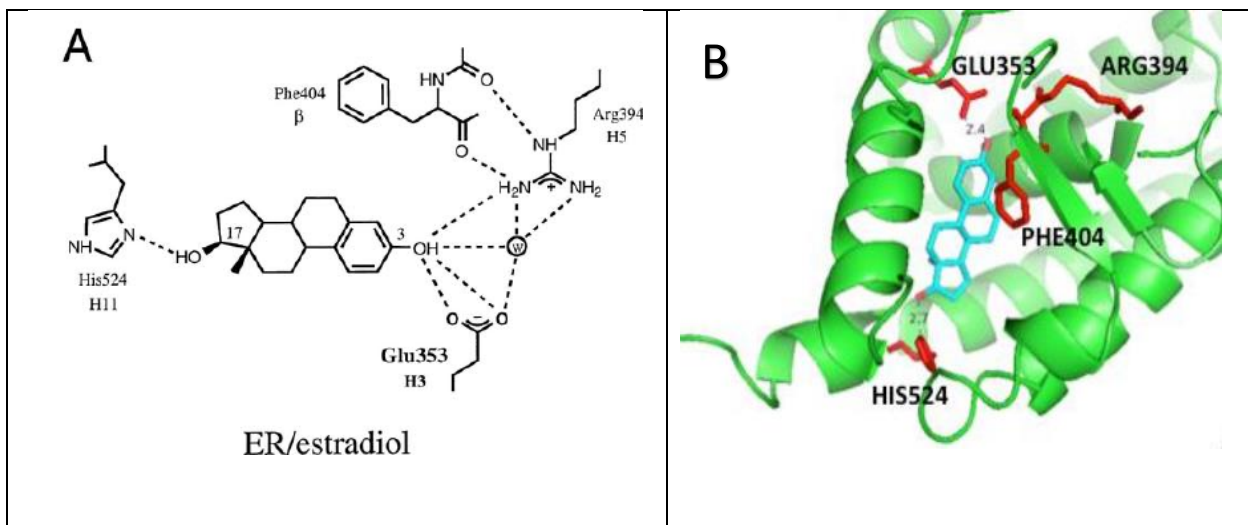


Figura 17. En la imagen A se muestra una representación esquemática de las redes de enlaces de hidrógeno entre estradiol y ER: (Pascal, Egea, Klaholz, & Moras, 2000) mientras que en la imagen B se observa el receptor estrogénico α en su estructura terciaria (ER α) FUENTE: (Miller, 2015).

En la figura 18 se muestran las moléculas de estradiol y el BPA. Como puede observarse, el BPA contiene dos grupos -OH que pueden unirse al ácido glutámico del ER de manera similar al E2 (Tabb & Blumberg, 2006).

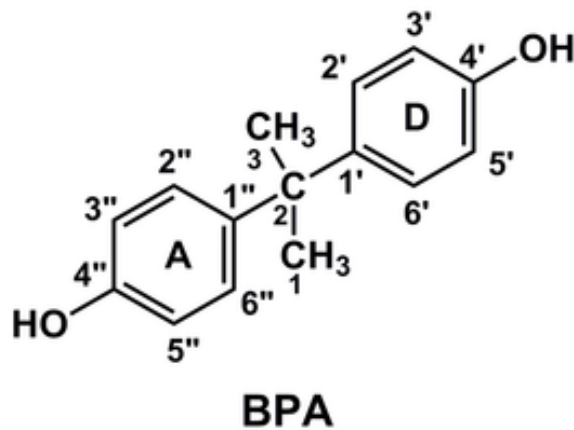
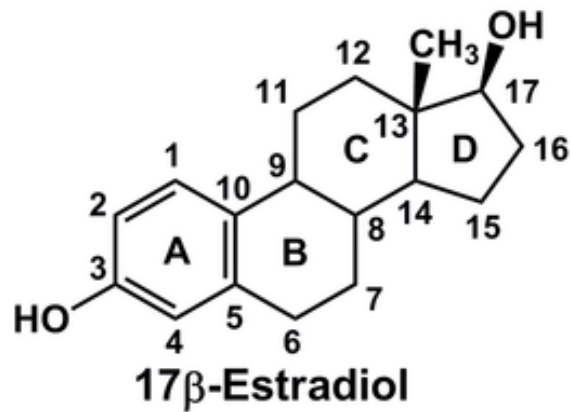


Figura 18. Comparación de estructuras Bisfenol A (BPA) y Estradiol.

Otra molécula similar al BPA, por contener un grupo hidroxilo que interacciona con el ER, es el nonilfenol (NP) (Soares, 2008). No existen reportes *in vitro* sobre la citotoxicidad del nonilfenol. Sin embargo, la CC_{50} del NP ha sido reportado en un rango de 96-280 $\frac{\mu g}{mL}$ (Aronzon, 2013) ; (Bevan, Porter, & Prasad, 2003) para estudios *in vivo* de *Xenopus laevis* y *Rhinella (Bufo) arenarum*, respectivamente.

En este proyecto se trabajaron con líneas celulares de diferente origen, a saber, MCF7 de cáncer de mama, PC3 de cáncer de próstata y 3T3 de fibroblasto. Con base en la literatura, se ha encontrado que la isoforma del receptor estrogénico

ER α se expresa predominantemente en la hipófisis, el útero, el ovario (oviducto y epitelio germinal), la glándula mamaria, el testículo, el epidídimo y el riñón. Por su parte, la isoforma ER β es la forma predominante en regiones del hipotálamo, ovario (células de la granulosa), próstata glándula, pulmón y vejiga (Katzenellenbogen, 2000) (Routledge, White, Parker, & Sumpter, 2000) (Filardo E. , Graeber, Quinn, & Resnick, 2006).

La concentración citotóxica (CC₅₀) para MCF7 es de $64,67 \frac{\mu g}{mL}$ y de acuerdo con lo mencionado anteriormente se tiene que es tejido blanco con mayor proporción de ER α . Por su parte, PC3 y 3T3, observaron una CC₅₀ de $85,17 \frac{\mu g}{mL}$ y $88,48 \frac{\mu g}{mL}$; respectivamente y ambas líneas celulares provienen de tejidos blancos donde predomina la isoforma β del receptor estrogénico. Lo anterior podría ser un indicativo de la sensibilidad de la isoforma del receptor ante BPA.

CONCLUSIONES

Se desarrolló con éxito un bioensayo *in vitro* para determinar la citotoxicidad del BPA en diferentes líneas celulares; MCF7 (cáncer de mama), PC3 (cáncer de próstata) y 3T3 (célula sana).

Los resultados indican que el bisfenol A comienza a ser citotóxico a partir de $50 \frac{\mu g}{mL}$. En específico, PC3 y 3T3 observaron una CC50 de $85,17 \frac{\mu g}{mL}$ y $88,48 \frac{\mu g}{mL}$ respectivamente; en contraste, MCF7 observó una CC50 de $64,67 \frac{\mu g}{mL}$.

Lo anterior se podría explicar con base a las isoformas de los receptores celulares. Las líneas celulares PC3 y 3T3 reportan mayor cantidad de receptores tipo β , mientras que MCF7 reporta mayor cantidad de receptores tipo α .

El efecto citotóxico de BPA se observó a partir de $50 \frac{\mu g}{mL}$, cuyo valor se ha asociado con la exposición involuntaria a bisfenol A en población humana por alimentación.

TRABAJO FUTURO

En este trabajo quedó demostrada la citotoxicidad del BPA y un siguiente paso sería el evaluar un daño a nivel DNA. Por ejemplo, se ha reportado que la disrupción endocrina a nivel celular puede generar un cambio en el patrón global de metilación, verificable a través de la técnica de transformación con bisulfito. Al respecto de una potencial alteración al RNA por exposición de BPA, podría plantearse su extracción para verificar algún cambio en la expresión de genes.

El BPA es uno de los principales disruptores endocrinos presentes en los alimentos. Sin embargo, existen otros compuestos, tales como el nonilfenol y del DEHP, cuya citotoxicidad sería valioso estudiar también.

El BPA ha sido reportado como potencial obesógeno y la línea celular 3T3 en presencia de fuente hormonal llega a diferenciarse en adipocito. Por lo tanto, se podría exponer estas células diferenciadas a concentraciones citotóxicas del BPA para asociar exposición al padecimiento de la obesidad

ANEXO

A continuación se muestran los datos calculados por GraphPad Prism® para obtener el valor de CC₅₀ de para cada compuesto utilizado en ese trabajo.

	MCF7	PC3	3T3
LogEC50	-0,2507	53,78	-1,009
HillSlope	0,05926	-0,01251	0,1601
EC50	0,5614		0,09794
LogEC50	0,9480	221,9	0,6532
HillSlope	0,03861	0,05199	0,06031
95% Confidence Intervals			
LogEC50	-2,688 to 2,187	-516,6 to 624,2	-2,688 to 0,6703
HillSlope	-0,04001 to 0,1585	-0,1462 to 0,1212	0,005032 to 0,3152

Tabla 1. CC₅₀ de EtOH para cada línea celular calculados por el programa estadístico GraphPad Prism®.

Tabla 2. CC₅₀ de 17 β estradiol para cada línea celular calculados por el programa estadístico GraphPad Prism®

	3T3	MCF7	PC3
LogEC50	-2,377	16,06	-164,8
EC50	0,004200	1,140e+016	0,0
LogEC50	5,548	10,09	45,46
HillSlope	0,002850	0,001044	0,0008185
95% Confidence Intervals			
LogEC50	-17,78 to 13,02	-11,96 to 44,08	-291,0 to -38,64
HillSlope	0,003207 to 0,01903	0,0007827 to 0,006581	0,001040 to 0,005585

Tabla 3. CC₅₀ de BPA para cada línea celular calculados por el programa estadístico GraphPad Prism®

	MCF7	PC3	3T3
LogEC50	1,811	1,930	1,947
HillSlope	-2,408	-2,799	-3,393
EC50	64,67	85,17	88,48
LogEC50	0,05427	0,04798	0,0006673
HillSlope	0,8567	0,9788	0,01982
95% Confidence Intervals			
LogEC50	1,671 to 1,950	1,807 to 2,054	1,945 to 1,949
HillSlope	-4,610 to -0,2052	-5,315 to -0,2825	-3,444 to -3,342

REFERENCIAS

- Aghajanpour-Mir, S. M., Zabihi, E., & Akhavan-Niaki, H. (2016). The Genotoxic and Cytotoxic Effects of Bisphenol-A (BPA) in MCF-7 Cell Line and Amniocytes. *Int J Mol Cell Med Winter ; Vol 5 No 1* , 21-29.
- Allard, P. (2014). Bisphenol A. In : Biomarkers in Toxicology . *Gupta USA*, 459-474.
- Andersen, M. E. (2010). The Future of Toxicity Testing. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 163-196.
- Andersen, M. E., & Krewsk, D. (2010). The Vision of Toxicity Testing in the 21st Century: Moving from Discussion to Action. *Toxicological Sciences, Volume 117, Issue 1*, 17–24.
- Andersen, M. E., & Krewski, D. (2010). The Vision of Toxicity Testing in the 21st Century: Moving from Discussion to Action. *TOXICOLOGICAL SCIENCES 117(1)*, 17–24.
- Angoa, M., & Arancibia, S. (2006). Acciones protectoras de los estrógenos en el sistema nervioso central. *Rev Fac Med UNAM Vol.49 No.6*, 248-251.
- Aronzon, C. (2013). *Evaluación de la toxicidad de los contaminantes Cobre, Nonilfenol y Diazinón sobre embriones y larvas de Rhinella (Bufo) arenarum*. Buenos Aires.

- Arukwe, A. T. (2000). In vivo and in vitro metabolism and organ distribution of nonylphenol in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicology* 49(4), 289-304.
- Bergman, Å., Heindel, J., & Jobling, S. (2012). *State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals*. United Nations Environment Programme and the World Health Organization,.
- Bevan, C. L., Porter, D. M., & Prasad, A. (2003). Environmental Estrogens Alter Early Development in *Xenopus laevis*. *Environmental Health Perspectives*, 488-496.
- Bravo, J. E. (2009). Contaminantes emergentes. *Revista Digital Universitaria*, 2-7.
- Camacho, C. P. (2002). Evaluación preliminar in vitro de citotoxicidad de extractos vegetales, empleando métodos colorimétricos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 4(1), 100-106.
- CASTILLO, G. (2004). CONCEPTOS GENERALES. En G. CASTILLO, *ENSAYOS TOXICOLÓGICOS Y MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE CALIDAD DE AGUAS* (págs. 18-22). OTTAWA: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.
- Castillo, G. (2004). *Ensayos Toxicológicos Y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas*. Chile: IDRC.
- Celis, D., & Lizcano Losada, F. (2006). Efecto de la modulación del receptor nuclear PPAR y en la diferenciación de fibroblastos. *NOVA - PUBLICACIÓN CIENTÍFICA - ISSN:1794-2470 VOL.*

- Centre for Food Safety Food and Environmental Hygiene Department The Government of the Hong Kong Special Administrative Region. (2008). Endocrine Disrupting Chemicals in Food . 25-27.
- Christensen, K. L., & Lorber, M. (2014). Exposure to BPA in Children—Media-Based and Biomonitoring-Based Approaches. *Toxics* , 2(2), 134-157.
- CLAVIJO, M. A., & GÓMEZ, D. (2007). ADIPOGÉNESIS IN VITRO DE CÉLULAS 3T3-L1. *Revista Med*, vol. 15, núm. 2,, 170-176.
- EFSA. (2014). *Draft Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs*. Obtenido de <http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/consultation/140117.pdf>
- Egea, P., Klaholz, B. P., & Moras, D. (2000). Ligand-protein interactions in nuclear receptors of hormones. *FEBS Letters* 476 , 62-67 .
- Fernández, M. (2013). Bisfenol-A: un ejemplo paradigmático en alteración endocrina. *Rev. salud ambient.13(Espec Congr)*, 63-82.
- Filardo, E. J., Graeber, C. T., Quinn, J. A., & Resnick, M. (2006). Distribution of GPR30, a Seven Membrane–Spanning Estrogen Receptor, in Primary Breast Cancer and its Association with Clinicopathologic Determinants of Tumor Progression. *Clinical Cancer Research*, 6359-6366.
- Filardo, E., Graeber, C., Quinn, J., & Resnick, M. .. (2006). Distribution of GPR30, a Seven Membrane–Spanning Estrogen Receptor, in Primary Breast Cancer and its Association with Clinicopathologic Determinants of Tumor Progression. *Clin Cancer Res ;12(21)*, 6359-6366.

- García, A., Gallego, C., & Font, G. (2015). Toxicidad del Bisfenol A: Revisión. *Rev. Toxicol* 32, 144-160.
- García-Mayora, R. V., & Larranaga Vidal, A. (2012). Disruptores endocrinos y obesidad: obesógenos. *Endocrinología y nutrición*, 261-267.
- Gil, M. J., & Soto, A. M. (2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción + Limpia Vol.7, No.2* , 52-73.
- Giusti, R., Iwamoto, K., Hatch, & E. (1995). Diethylstilbestrol revisited: a review of the long term health effects. *Ann Intern Med.*, 778-788.
- Heinlin, C., & Chang, C. (2002). Androgen Receptor (AR) Coregulators: An Overview. *Endocrine Reviews* 23(2), 175–200.
- Katzenellenbogen, B. S. (2000). Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 74 , 279–285.
- Kenichi, S. (2004). Bisphenol A affects glucose transport in mouse 3T3-F442A adipocytes. *British Journal of Pharmacology* 141 , 209–214.
- Leist, M., Hartung, T., & Nicotera, P. (2008). The dawning of a new age of toxicology. *KOPS*, 103-114.
- Leòn, C. J. (2006). Sensitivity profile of a panel of cell lines designed for the evaluation of in vitro cytotoxicity. *Biomédica*, vol.26, n.1. ISSN 0120-4157., 161-168.

- Linamaría, E. M., Alfonso R, P. A., & Aristizábal, F. A. (2009). Valoración de dos métodos de tinción en ensayos de. *Revista Colombiana de Biotecnología* 11.2, 49-56.
- López, M., Barceló, D., Farréc, M., & Martínez, E. (2009). Relación entre la exposición a disruptores endocrinos durante el período fetal y perinatal y la tasa de oligospermia. *Revista Internacional de Andrología*, 41-49.
- Miller, C. (2015). *A brief on the structure and function of estrogen receptor alpha*.
- Ministry of the Environment Government of Japan . (10 de Enero de 2018). *Health & Chemicals*. Obtenido de Strategic Programs on Environmental Endocrine Disruptors '98 (SPEED '98):
<https://www.env.go.jp/en/chemi/ed/speed98/sp98f3.html>
- Mollo Tangara, J. C., & Montaña Cabrera, L. A. (2005). Endocrine Disruptors in Plastic(Bisphenol A and Phthalates). *SCientífica – Facultad de Medicina UMSA*.
- Mollo Tangara, J. C., & Montaña Cabrera, L. A. (2005). Endocrine Disruptors in Plastic(Bisphenol A and Phthalates). *SCientífica – Facultad de Medicina UMSA*.
- Montano, M., Müller, V., Trobaugh, A., & Katzenellenbogen, B. (1995). The carboxyterminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol Endocrinol* ;9, 814-825.

- Moreno MJ, M. J. (2002). El tejido adiposo: órgano de almacenamiento y órgano secretor. *An Sist Sanit Navar 25 Suppl 1*, 29-39.
- Moreno, J. (2012). Adpocyte Differentiation. 17-38.
- Mothersill, C., & Austin, B. (2003). *In Vitro Methods in Aquatic Ecotoxicology*. Springer Science & Business Media.
- Neri, M. (2015). In vitro Cytotoxicity of Bisphenol A in Monocytes Cell Line. *Blood Purif. ;40(2):180-6*.
- Nollet, L. (2011). *Analysis of Endocrine Disrupting Compounds in Food*. Wiley.
- Olea, N., & Fernández, M. F. (2001). DISRUPTORES ENDOCRINOS.EL CASO PARTICULAR DE LOS XENOBIOTICOS ESTROGENICOS I. ESTROGENOS NATURALES. *Rev. Salud Ambient* , 6-11.
- Pascal, F., Egea, B., Klaholz, P., & Moras, D. (2000). Ligand[^]protein interactions in nuclear receptors of hormones. *FEBS Letters 476* , 62-67.
- Pérez-Rivero, J. J., Aguilar-Setién, Á., Villa-Godoy, A., & Serrano, H. (2005). Relación entre estructura y función de receptores para hormonas esteroidales:Receptores estrogénicos. *Vet. Méx.*, 36 (4) , 437-452.
- Prasenjit Dey, P. J. (2012). Estrogen Receptors b1 and b2 Have Opposing Roles in Regulating Proliferation and Bone Metastasis Genes in the Prostate Cancer Cell Line PC3. *Mol Endocrinol*, 26(12), 1991–2003.
- Ramirez, I. (2015). Efectos de los estrógenos como contaminantes emergentes en la salud y el ambiente. *Tecnología y ciencias del agua*, 31-42.

- Repetto, D., Del Peso, A., & Zurita, L. (2012). *La aplicaci3n de procedimientos in vitro en la evaluaci3n toxicol3gica alimentaria*. Madrid: DIAZ DE SANTOS.
- Routledge, E. J., White, R., Parker, M. G., & Sumpter, J. P. (2000). Differential Effects of Xenoestrogens on Coactivator Recruitment by Estrogen Receptor (ER) a and ERb. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol. 275, No. 46,, 35986–35993.
- Scaglia, H., & Chichizola, C. (2009). Disruptores endocrinos. Composici3n qu3mica, mecanismo de acci3n y efecto sobre el eje reproductivo. *Reproducci3n - Vol 24 / N3 2* , 74-86.
- Schechter, A., & Malik, N. (2012). Bisphenol A (BPA) in U.S. Food. *Environ. Sci. Technol.* , 44, 9425–9430.
- Serrano, N. (2001). DISRUPTORES ENDOCRINOS. EL CASO PARTICULAR DE LOS XENOBI3TICOS ESTROG3NICOS. II ESTR3GENOS SINT3TICOS. *Rev. Salud Ambient;*1(2), 64-72.
- Serrano, N. O., Warden, C. F., & Cabrera, M. F. (2008). Seguridad farmacol3gica y ambiental: disrupci3n endocrina. *Endocrinolog3a y Nutrici3n*, 63-68.
- Shaw, I. (2008). *Endocrine-Disrupting chemicals in food*. Nueva Zelanda: Woodhead Publishing Limited.
- Shughrue, P. J., Lane, M. V., Scrimo, P. J., & Merchenthaler, I. (1998). Steroids. 498-504.

- Soares, A. (2008). Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International*, 1033-1049.
- Spriggs, K. A., Bushell, M., & Willis, A. E. (2010). Translational Regulation of Gene Expression during Conditions of Cell Stress. *Molecular Cell* 40, October 22, 228-235.
- Tabb, M., & Blumberg, B. (2006). New Modes of Action for Endocrine-Disrupting. *Molecular Endocrinology* 20(3), 475–482.
- Thomson, B. M., & Grounds, P. (2005). Bisphenol A in canned foods in New Zealand: An exposure assessment. *Food Additives & Contaminants*, 65-72.
- Valsecchi, S., Polesello, S., Mazonni, M., Rusconi, M., & Petrovic, M. (2015). One line samle extraction and purification for the LC.MS determination of emerging contaminants in environmental samples. *Trends in Enviromental Analytical Chemestry* .
- Vandenberg, L. N., Hauser, R., Marcus, M., & Olea, N. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology* 24, 139–177.
- Wagner, C. (11 de MARZO de 2014). *Food Packaging Forum*. Obtenido de Bisfenol A: <http://www.foodpackagingforum.org/es/envasado-de-alimentos-y-salud/bisfenol-a>
- Wang, L. (2012). Protective effects of ginsenosides against Bisphenol A-induced cytotoxicity in 15P-1 Sertoli cells via extracellular signal-

regulated kinase 1/2 signalling and. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 111(1).

Ying, G.-G. (2002). Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates—a review. *Environment International* 28 , 215 – 226.

Yiwei Li, F. H. (2002). Down-regulation of invasion and angiogenesis-related genes identified by cDNA microarray analysis of PC3 prostate cancer cells treated with genistein. *Cancer Letters* 186, 157-164.

Zhang. (2012). Effect of bisphenol A on the EGFR-STAT3 pathway in MCF-7 breast cancer cells. *Mol Med Rep.* ;5(1).

Zuccoa, F., De Angelisb, I., Testaib, E., & Stamatib, A. (2004). Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. *Toxicology in Vitro* 18, 153–163.