



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA**

TÍTULO DEL TEMA ESCRITO

Tesis. “Efecto de la exposición a Bisfenoles (A, F y S) en una línea celular de cáncer de próstata independiente de andrógenos (PC3).”

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

Laura Daniela Palomino Navarrete

CDMX

AÑO: 2021





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: PLASENCIA DE LA PARRA FRANCISCO JAVIER

VOCAL: Profesor: DEL VALLE PEREZ PAULINA

SECRETARIO: Profesor: RODRÍGUEZ DORANTES MAURICIO (ASESOR)

SUPLENTE 1: Profesor: ORTEGA VAZQUEZ ALBERTO

SUPLENTE 2: Profesor: CUEVAS VELAZQUEZ CESAR LUIS

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA (INMEGEN)

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes

SUPERVISOR TÉCNICO (Si lo hay):

QFB. Sergio Alberto Cortés Ramírez

SUSTENTANTE (S):

Laura Daniela Palomino Navarrete

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES:

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

A la Facultad de Química

Al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN)

Al programa de becas para la Titulación por Alto Rendimiento Académico de
la UNAM

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca
otorgada para Proyectos de Investigación: CB-2017-2018-A1-S-26446-2878

CONTENIDO

I.	Agradecimientos Institucionales	3
II.	Resumen	7
III.	Marco Teórico	8
1.	Disruptores endócrinos	8
	a. Tipos (Mecanismos de disrupción endocrina)	
	b. Disruptores más comunes	14
	c. Disruptores endócrinos y CaP	15
2.	Bisfenoles	17
	a. Bisfenoles y CaP	
3.	Cáncer	20
	a. Definición	
	b. Incidencia a nivel mundial	22
4.	Cáncer de Próstata	23
	a. Incidencia y mortalidad a nivel mundial	
	b. Incidencia y mortalidad en México	25
	c. Anatomía e Histología del CaP	26
	d. Historia natural de la enfermedad	28
	e. Papel de las hormonas en CaP	35
	f. Papel de los Andrógenos en CaP	36
	g. Papel de los Estrógenos en CaP	36
IV.	Justificación	40
V.	Hipótesis	42
VI.	Objetivo General	42
VII.	Objetivos particulares	42
VIII.	Materiales y métodos	42
IX.	Resultados y Discusión	49
X.	Conclusiones	77
XI.	Referencias	78

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS DE	13
Figura 2. COMPUESTOS HORMONALES ACTIVOS Y CaP	16
Figura 3. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL BISFENOL A	17
Figura 4. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA HORMONA LUTEINIZANTE (LH)	19
Figura 5. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH)	19
Figura 6. LOS SELLOS DISTINTIVOS DEL CÁNCER	21
Figura 7. INCIDENCIA Y MORTALIDAD A NIVEL MUNDIAL POR CaP	24
Figura 8. CASOS NUEVOS DE DISTINTOS TIPOS DE CÁNCER EN HOMBRES EN MÉXICO	26
Figura 9. POSICIÓN ANATÓMICA DE LA PRÓSTATA	27
Figura 10. PATRONES DE GLEASON BASE	33
Figura 11. ANDRÓGENOS MÁS ABUNDANTES EN HOMBRES	35
Figura 12. SÍNTESIS DE LAS HORMONAS ESTEROIDEAS QUE ACTÚAN SOBRE LA PRÓSTATA	38
Figura 13. CULTIVO CELULAR DE PC3	43
Figura 14. EXTRACCIÓN DEL RNA	45
Figura 15. ELECTROFORESIS	47
Figura 16. VIABILIDAD CELULAR DE PC3	49
Figura 17. PLOTS DE ABSORBANCIA	53
Figura 18. PLOTS DE ABSORBANCIA	53
Figura 19. ELECTROFEROGRAMA IDEALIZADO CON RIN DE APROXIMADAMENTE 10	56
Figura 20. ELECTROFEROGRAMAS DE BIOANALIZADOR	57
Figura 21. ANÁLISIS TRANSCRIPTOMICO (RESUMEN)	58
	59

Figura 22. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS	
Figura 23. GENES REGULADOS AL ALZA Y A LA BAJA: BISFENOL A	59
Figura 24. <i>VOLCANO PLOT: BISFENOL A</i>	60
Figura 25. MAPA DE CALOR: BISFENOL A	61
Figura 26. ANÁLISIS DE SOBRRERREPRESENTACIÓN DE VÍAS: BISFENOL A	62
Figura 27. MODELO DE VÍA DE ACTIVACIÓN: BISFENOL A	64
Figura 28. GENES REGULADOS AL ALZA Y A LA BAJA: BISFENOL F	65
Figura 29. VOLCANO PLOT: BISFENOL F	66
Figura 30. MAPA DE CALOR: BISFENOL F	67
Figura 31. ANÁLISIS DE SOBRRERREPRESENTACIÓN DE VÍAS: BISFENOL F	71
Figura 32. GENES REGULADOS AL ALZA Y A LA BAJA: BISFENOL S	72
Figura 33. <i>VOLCANO PLOT: BISFENOL S</i>	73
Figura 34. MAPA DE CALOR: BISFENOL S	73
Figura 35. ANÁLISIS DE SOBRRERREPRESENTACIÓN DE VÍAS: BISFENOL S	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS DE	14
Tabla 2. CARACTERÍSTICAS MORFOLOFICAS DE LOS GRADOS DE GRUPOS PRONÓSTICOS	34
TABLA 3. ANALISIS DE CALIDAD DEL RNA	52

II. RESUMEN

El cáncer es la tercera causa de muerte en México, después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. Según las estimaciones del Observatorio Global del Cáncer (GLOBOCAN), el cáncer de próstata (CaP) es el tipo de cáncer más común en la población varonil con una tasa de incidencia de 29.3%, y es considerada la primera causa de muerte en hombres por neoplasias, con cerca de 7,000 muertes al año.

La causa exacta de la aparición del CaP se desconoce, sin embargo, ciertos factores pueden aumentar el riesgo de desarrollar la afección, por ejemplo, los disruptores endocrinos, compuestos capaces de alterar el equilibrio hormonal y la regulación del desarrollo embrionario y, por tanto, provocar efectos adversos sobre la salud de un organismo o de su progenie. Dentro de los disruptores endocrinos, se encuentran los Bisfenoles. Estos forman parte de múltiples objetos que están en contacto directo con el ser humano como: envases de alimentos/bebidas, recubrimientos de conservas, platos, tazas, platos de microondas, botellas de plástico, copas, latas, etc. Los plásticos producidos con Bisfenoles también tienen otras aplicaciones como son: la fabricación de CDs o DVDs, papel térmico, dispositivos médicos, gafas de sol, etc. Dentro de estos compuestos químicos se tienen al Bisfenol A (BPA), Bisfenol F (BPF) y Bisfenol S (BPS). Se sabe que el BPA incentiva la sobreexpresión o la inhibición de ciertos genes y proteínas reguladoras de los procesos apoptóticos o factores determinantes del crecimiento celular provocando el crecimiento de tumores y el desarrollo de cáncer, en particular, el Cáncer de Próstata (CaP). De igual manera, dicho compuesto es capaz de interrumpir la amplificación del centrosoma y la dinámica de los microtúbulos lo que contribuyen a la transformación neoplásica de las células prostáticas promoviendo dicho Cáncer.

Si bien se ha reportado en la literatura el efecto que tiene el BPA en distintas líneas celulares de CaP, no hay hasta la fecha, estudios en los que se evalúe el efecto del BPA y sus análogos en una línea celular de cáncer de próstata independiente de andrógenos, simulando de esta manera, el CaP metastásico y resistente a la castración (mCRPC), dado que las muertes por el cáncer de próstata típicamente son el resultado del mCRPC, se requiere abordar el tema desde esta perspectiva. Razón por la que en el presente trabajo, se expuso a concentraciones bajas (5 nM) de BPA y sus análogos (BPF y BPS) *in vitro* en la línea celular de cáncer de Próstata independiente de andrógenos (PC3). Se observó que dichos disruptores endocrinos inducían cambios a nivel transcripcional, provocando una regulación al alza de 420, 253 y 248 genes, respectivamente para BPA, BPF y BPS comparando contra el control (Vehículo). Posteriormente, estos genes que se encontraron regulados al alza, se seleccionaron y se realizó un análisis de sobrerrepresentación de vías. En dicho análisis se observó que mientras que el BPA y el BPF ocasionaron una sobrerrepresentación de vías involucradas en el ciclo celular, reparación a daño del DNA y vías de señalización apoptótica, el BPS ocasionó sobrerrepresentación de vías involucradas en la activación y regulación de proteínas. Sin embargo, dado que las vías que se encontraron sobrerrepresentadas, se asocian con la progresión del CaP, estos compuestos se consideran un factor de progresión de dicho Cáncer.

III. MARCO TEÓRICO

1. Disruptores endócrinos

a. Tipos (Mecanismos de disrupción endocrina)

El concepto disruptores endocrinos (DE) fue propuesto en 1991 por la Dra. Theo Colborn definiéndolo como: compuestos capaces de alterar el equilibrio hormonal y la regulación del desarrollo embrionario y, por tanto, con capacidad de provocar efectos adversos sobre la salud de un organismo o de su progenie. (Scaglia et al., 2009)

Los DE causan efectos adversos en el sistema endocrino principalmente al interactuar con los receptores de hormonas nucleares (NR) Balaguer et al., 2017). Impiden la interacción de las hormonas endógenas con sus receptores, por lo que la toxicidad reproductiva de los mismos es mediada principalmente por los receptores a estrógenos y andrógenos, actuando como agonistas o antagonistas. Esta acción altera el equilibrio fisiológico hormonal en ambos sexos induciendo fenómenos patológicos en los respectivos ejes reproductivos (Wedel Herrera, 2019).

Se encuentran en el medio ambiente debido a una gran variedad de procesos manufactureros, y por su condición tóxica, son motivo de preocupación ya que los seres humanos están expuestos a ellos diariamente. Pese a que su concentración es muy baja, dado que no son transportados por proteínas sus niveles son biológicamente activos pudiendo alterar el delicado balance hormonal comprometiendo la salud reproductiva y pudiendo estar involucrados en procesos de carcinogénesis (Scaglia et al., 2009).

Los mecanismos por los cuales las hormonas y los DE ejercen sus efectos dependen de acciones específicas a nivel celular y tisular, así como de los ritmos circadianos, los cambios estacionales, la etapa de la vida y el sexo. Además, el patrón de desarrollo, circadiano o pulsátil de la secreción de hormonas puede ser un componente importante de su mecanismo de señalización y los DE pueden interferir con este patrón. De hecho, el riesgo de efectos adversos para la salud de por vida aumenta cuando los períodos de exposición a los DE coinciden con la formación y diferenciación de los sistemas de órganos en el desarrollo temprano (Merrill et al., 2020).

Los mecanismos de acción de los DE estudiados hasta la fecha incluyen 10, si bien, dichos mecanismos exhiben cómo podrían interferir con los sistemas endócrinos, no se ha dilucidado si estos mecanismos son excluyentes entre sí o participan en conjunto. Dentro de dichos mecanismos se encuentran (Merrill et al., 2020) **(Fig. 1):**

I. Interacción con los receptores hormonales o su activación

Todas las hormonas actúan uniéndose a un receptor o receptores específicos. La activación inadecuada del receptor puede tener profundos efectos negativos sobre el desarrollo y la salud. Así bien, cuando un DE activa inapropiadamente los receptores de estrógeno (ER α y ER β) durante el desarrollo, aumentan el riesgo de infertilidad en ambos sexos, así como de cáncer del tracto reproductivo en mujeres y cáncer de próstata en hombres (Merrill et al., 2020).

II. Actuar como agonista de los receptores hormonales

Los DE pueden inhibir o bloquear los efectos de las hormonas endógenas actuando como agonistas de los receptores. Un ejemplo de ello son los plaguicidas organoclorados que inhiben la unión de la dihidrotestosterona al AR. Si esto ocurre durante la diferenciación sexual masculina, puede desmasculinizar permanentemente a los fetos masculinos y provocar malformaciones del tracto genital (Merrill et al., 2020).

III. Alteran o modifican la expresión del receptor hormonal

Dado que los receptores hormonales median las acciones hormonales, su patrón de expresión fisiotemporal dicta su respuesta a las señales hormonales. Por ejemplo, la abundancia de receptores puede determinar tanto la concentración de hormonas que produce un efecto como la magnitud del propio efecto en algunas situaciones. Sin embargo, los DE pueden modular la expresión, internalización y degradación del receptor hormonal (Merrill et al., 2020).

IV. Alteran la traducción de señales en células que responden a hormonas

La unión de una hormona a un receptor desencadena respuestas intracelulares específicas que dependen del receptor y de las propiedades específicas del tejido de la célula diana, en este sentido, se sabe que algunos DE alteran la transducción de señales mediada a través de receptores hormonales tanto de membrana como intracelulares (receptores nucleares de hormonas esteroide) atenuando o potenciando la acción hormonal (Merrill et al., 2020).

V. Inducen modificaciones epigenéticas en células productoras de hormonas o que responden a estas

Se sabe que las hormonas pueden ejercer efectos permanentes, especialmente durante el desarrollo y la diferenciación, al modificar los procesos epigenéticos, incluidas las modificaciones de ADN e histonas y la expresión de ARN no codificante. Por su parte, los DE que interfieren con la acción hormonal, puede interferir con la capacidad de una hormona para inducir estos cambios epigenéticos (por ejemplo, alterando la expresión o acción de un receptor hormonal o la transcripción de genes sensibles a hormonas) (Merrill et al., 2020).

VI. Alteran la Síntesis Hormonal

La síntesis de hormonas está regulada por mecanismos de retroalimentación endocrina intracelular y distante. Se sabe que algunos DE interfieren con la síntesis de hormonas, siendo los ftalatos un ejemplo de esto, dado que se ha descubierto que pueden reducir la síntesis de testosterona en los testículos de ratas fetales, lo que resulta en insuficiencia de testosterona (Merrill et al., 2020).

VII. Alteran el transporte de hormonas a través de las membranas celulares

Las hormonas pueden moverse a través de las membranas de forma pasiva o activa, con la ayuda de transportadores de membrana. Así bien, algunos DE son capaces de interrumpir estos procesos de transporte selectivo y pasivo. Un ejemplo bien delineado de transporte selectivo alterado por una sustancia química exógena es el BPA en dosis bajas, que reduce la entrada de calcio en las células β pancreáticas de ratón para reducir la secreción de insulina de las vesículas (Merrill et al., 2020).

VIII. Alteran la distribución hormonal o los niveles circulantes de hormonas

Las hormonas normalmente circulan por todo el cuerpo en la sangre en concentraciones bajas, los DE pueden alterar la biodisponibilidad hormonal al interferir con la distribución de hormonas en tejidos que responden a hormonas o con la circulación de hormonas, incluso desplazando las hormonas de sus proteínas

de unión a suero, lo que puede conducir a una administración de hormonas activa deficiente a los tejidos diana (Merrill et al., 2020).

IX. Alteran el metabolismo o el aclaramiento hormonal

Los DE pueden alterar las tasas de inactivación, incluida la degradación metabólica o el aclaramiento, de hormonas, lo que podría alterar las concentraciones hormonales y, en última instancia, su actividad (Merrill et al., 2020).

X. Alteran el destino de las células productoras de hormonas o que responden a las hormonas

Los DE pueden alterar el número total o la posición de las células en los tejidos productores de hormonas o que responden a las hormonas al interrumpir o promover la diferenciación, la proliferación, la migración o la muerte celular. Por ejemplo, la hormona tiroidea controla la proliferación celular y la apoptosis en el cerebelo en desarrollo y los PCB pueden interferir con la señalización de la hormona tiroidea y causar una morfología anormal más adelante en la vida (Merrill et al., 2020).

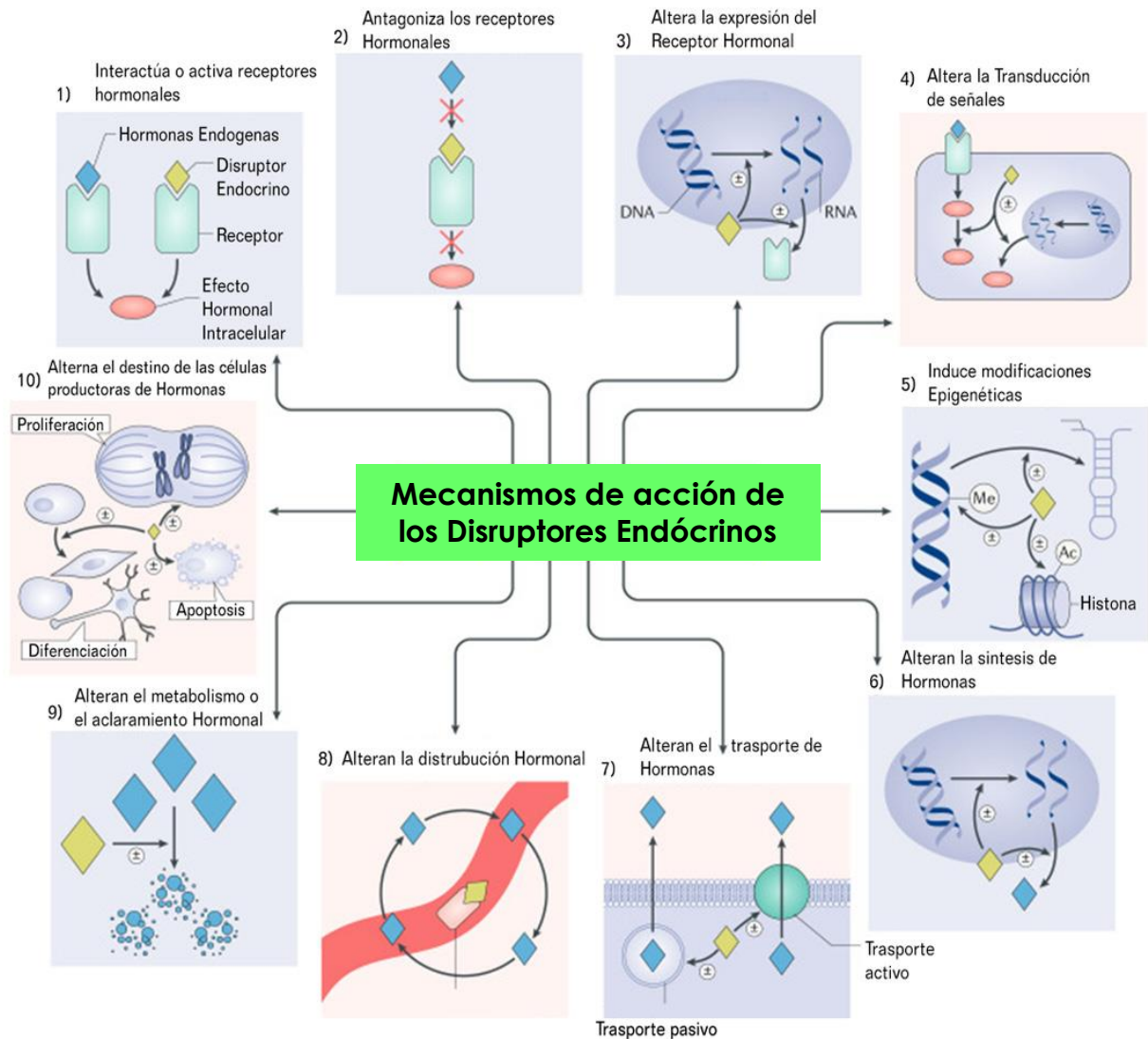


Figura 1. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS DE

Las flechas identifican las diez características clave específicas (KC) de los DE. El símbolo \pm indica que un DE puede aumentar o disminuir procesos y efectos. KC1 afirma que un DE puede interactuar o activar receptores hormonales. KC2 afirma que un EDC puede antagonizar los receptores hormonales. KC3 afirma que un DE puede alterar la expresión del receptor hormonal. KC4 establece que un DE puede alterar la transducción de señales (incluidos cambios en la expresión de proteínas o ARN, modificaciones postraduccionales y /o flujo de iones) en células que responden a hormonas. KC5 afirma que un DE puede inducir modificaciones epigenéticas en células productoras de hormonas o que responden a hormonas. KC6 afirma que un DE puede alterar la síntesis de hormonas. KC7 afirma que un DE puede alterar el transporte de hormonas a través de las membranas celulares. KC8 afirma que un DE puede alterar la distribución hormonal o los niveles hormonales circulantes. KC9 afirma que un DE puede alterar el metabolismo o el aclaramiento hormonal. KC10 afirma que un DE puede alterar el destino de las células productoras de hormonas o que responden a las hormonas. Las acciones de DE representadas incluyen amplificación y atenuación de efectos. Ac, grupo acetilo; Yo, grupo metilo. Imagen modificada de: DOI: [10.1038 / s41574-019-0273-8](https://doi.org/10.1038/s41574-019-0273-8)

b. Disruptores más comunes

La tabla 1 resume los mecanismos de acción de algunos disruptores endocrinos, siendo estos los más comunes tanto por su frecuencia en diversos productos de uso como porque podrían afectar la salud en el humano (ISTAS, 2012).

Tabla 1. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS DE

Contaminante	Uso	Mecanismo de Acción
Atrazina	Herbicida	Incremento expresión aromatasa
Bisfenoles	Resinas, papel térmico, envases alimentos, tintas	Se unen al ER, PPAR, pueden formar uniones débiles con AR
Dioxinas cloradas	Contaminante generado durante procesos industriales y de combustión (Por ejemplo: incineración de residuos)	Se unen a AR
Pesticidas organoclorados	Agricultura	Antiandrógenicos, fijación del ER
Ftalatos	Conservadores en cosméticos Tintes para el cabello, plásticos	Estrogénicos
Alquifenoles	Detergentes industriales Agentes de secado Industria textil y curtidores	Débilmente estrogénicos Interfieren en metabolismo de la testosterona
Bisfenoles policlorados (PCBs)	Lubricante industrial, refrigerantes	Alteración de la ruta del glutamato. Mimetizan el estrógeno

Abreviaturas: ER: receptor de estrógeno; AR: receptor de andrógeno; PRGR: receptor de progesterona

c. Disruptores Endócrinos y CaP

Se conoce poco acerca de la etiología del CaP. Sin embargo, se ha propuesto que la presencia de compuestos exógenos llamados disruptores endócrinos provoca cambios en la función endocrina, contribuyendo al desarrollo de dicho Cáncer. (Sánchez-de-Badajoz et al., 2017). Ya que en estudios *in vitro* con células de próstata humana y estudios *in vivo* en modelos animales se han observado asociaciones entre los DE y cáncer de próstata, carcinogénesis y / o susceptibilidad (Prins, 2008).

Esto es particularmente cierto para los DE que albergan actividad estrogénica, conocidos como compuestos disruptores endocrinos estrogénicos. Dada su similitud con los estrógenos endógenos, se ha formulado la hipótesis de que la presencia de estos puede alterar la acción de los andrógenos o el crecimiento y desarrollo de la próstata (Hess-Wilson & Knudsen, 2006).

Es sabido que la acción de los DE puede ser agonista o antagonista y su efecto no suele ser inmediato, sino que actúan de forma crónica a lo largo de los años, incluso sus efectos pasan a la descendencia, presentándose un fenómeno conocido como “salto transgeneracional”. Provocan efectos a dosis muy bajas, sin embargo, la sobreexposición a los mismos hace que el sistema de detoxificación sea insuficiente y el organismo desarrolle patologías como tumores, especialmente los hormono-dependientes, como el CaP (Sánchez-de-Badajoz et al., 2017).

Uno de los primeros disruptores endocrinos conocidos fue el estrógeno sintético dietilestilbestrol (DES), se utilizó para el engorde artificial de ganado y como tratamiento hormonal en el cáncer de próstata (**Figura 2**). Sin embargo, se retiró del mercado después de constatarse que daba lugar a numerosos tumores malformaciones y enfermedades cardiovasculares. Además, se ha podido comprobar que individuos expuestos prenatalmente al DES tienen más riesgo de padecer cáncer de próstata. Otro disruptor endocrino bien conocido es el dicloro difenil tricloroetano (DDT) que se utilizó en la segunda guerra mundial como insecticida y plaguicida. Fue prohibido entre otras cosas porque en la próstata, es un inhibidor de la 5- alfa-reductasa y actúa disminuyendo el tamaño de la glándula

sin que haya evidencia de que produzca cáncer. De igual manera, en 1955 la talidomida, fármaco utilizado como antiemético y ansiolítico usado en las embarazadas, que demostró tener graves efectos teratógenos.

Particularmente, los policloro bifenilos (PCB) o piralenos que se encuentran en aislantes eléctricos, son compuestos liposolubles que se acumulan en el cuerpo humano, tienen actividad estrogénica lo cual altera la función sexual y se ha demostrado que son carcinógenos prostáticos (**Figura 2**) (Sánchez-de-Badajoz et al., 2017).

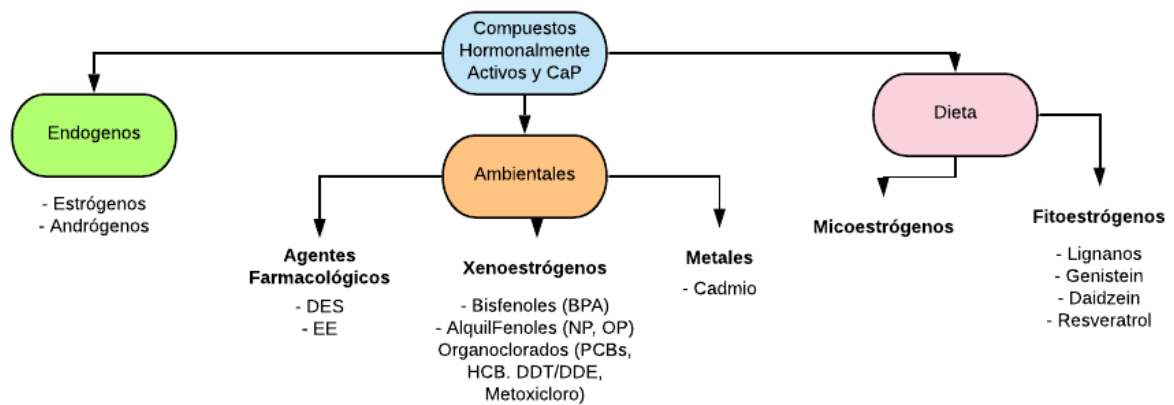


Figura 2. COMPUESTOS HORMONALES ACTIVOS Y CaP

Ilustración de las diferentes fuentes de compuestos hormonalmente activos que pueden afectar el desarrollo, la progresión o el tratamiento del cáncer de próstata (CaP). DES, dietilestilbestrol; EE, etinilestradiol; BPA, bisfenol A; PCB, bisfenoles policlorados; HCB, hexaclorobenceno; DDT, diclorodifeniltricloroetano; DDE, diclorodifeniltricloroetileno; NP, nonilfenol; OP, octofenol; Cd, cadmio.

Modificada de:

[https://sci-hub](https://sci-hub.st/https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304383505009158?via%3Dihub)

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304383505009158?via%3Dihub>

2. Bisfenoles

a. Bisfenoles y CaP

Dentro de los Bisfenoles, el Bisfenol A (BPA; p,p'-isopropylidenebisphenol), es uno de los más usados a nivel mundial. Se usa en la fabricación de plásticos lo cual es preocupante, dado que en 2018 se produjeron 359 millones de toneladas de plásticos, que fue el 3,16% más que en 2017. Además, se usa en resinas epoxi, envases de plástico, utensilios de cocina, en la producción de equipos para el cuidado de la salud (varios dispositivos médicos, lentes de contacto, sondas, inhaladores, cánulas intravenosas, catéteres, incubadoras neonatales o aparatos de hemodiálisis), compuestos dentales, juguetes, medios de almacenamiento y láminas para ventanas, y en la producción de papel para impresión térmica en cajas registradoras y terminales de tarjetas de pago. Por lo que presenta un amplio contacto con el ser humano (Flores Sandí, 2019).

El BPA se obtiene por la condensación de dos moléculas fenol con una molécula de acetona en presencia de ácido clorhídrico, dicha estructura fenólica tiene la capacidad de imitar las acciones de los estrógenos. Por lo que se le conoce como “Disruptor Endócrino”, como ya se mencionó (**Figura 3**) (Juan-García A * & Gallego C, 2015).

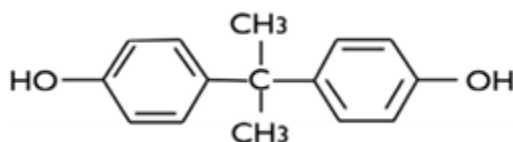


Figura 3. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL BISFENOL A

Se muestra la estructura química del Bisfenol A (BPA), el cual es un compuesto orgánico que consiste de dos grupos fenol unidos por un grupo propilo.

La exposición al BPA puede ocurrir a través de la ingesta dietética, la inhalación y el contacto cutáneo u oral. Actualmente se han detectado cantidades extremadamente grandes de BPA (incluso más de 1 mg / kg) en muestras de alimentos, como vegetales, probablemente como resultado de dispositivos de riego de plástico. (Di Donato et al., 2017)

El BPA se metaboliza en el hígado por la uridina 5'-difosfooglucuronil transferasa (UGT), para formar glucurónido de bisfenol A y, en su mayoría, en esta forma se excreta con la orina, lo que demuestra la eficacia del primer paso hepático del metabolismo, una vez que es metabolizado, sólo una pequeña cantidad de BPA libre puede unirse a los receptores estrogénicos (ER) produciendo la alteración hormonal y los consiguientes efectos adversos. Presenta una vida media en el cuerpo humano se estima en 5-4 horas. (Juan-García A * & Gallego C, 2015)

Su efecto como disruptor endocrino se basa en que tiene una estructura similar al Dietilestilbestrol, que es el agonista del receptor de estrógenos (ER), y se une a los ER α y β nucleares, así como al receptor GPR30 asociado a la membrana celular, aunque con una menor afinidad. También se une a otros receptores nucleares, como el receptor de andrógenos (AR), de igual manera se une al receptor gamma relacionado con el estrógeno (ER γ), que se expresa en gran medida en la placenta, lo que facilita la acumulación de BPA y, por lo tanto, aumenta la exposición del feto en desarrollo a este compuesto. Además, muestra una unión limitada a las proteínas séricas, en particular a la alfa-fetoproteína, que se cree que protege a los tejidos de la exposición excesiva al Estradiol (E2) durante el desarrollo. (Flores Sandí, 2019)

Por lo que la carcinogenicidad del BPA puede ser atribuible a los efectos proliferativos que surgen de sus actividades de disrupción endocrina, ya que la mayoría de los tejidos diana afectados son órganos reproductores, lo que lleva a cambios en la proliferación celular, la apoptosis o la migración y, por lo tanto, contribuye al desarrollo y la progresión del cáncer. Sin embargo, no se puede descartar el daño directo al ADN causado por el BPA, por lo que se han evaluado la expresión de diferentes genes involucrados en la regulación central del eje hipotálamo-hipófisis-testicular expuestos a BPA. Los análisis muestran un aumento en la liberación de los receptores de la hormona gonadotropina, la hormona luteinizante (**Figura 4**) y la hormona folículo estimulante (**Figura 5**). También un aumento de los receptores estrogénicos y androgénicos. De igual manera se observa una disminución de la actividad mitocondrial. Por lo que se demuestra que en una dosis considerada no toxica, el BPA pone en peligro la funcionalidad correcta

del sistema reproductivo masculino y disrumpe el eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal. (Wisniewski et al., 2015).

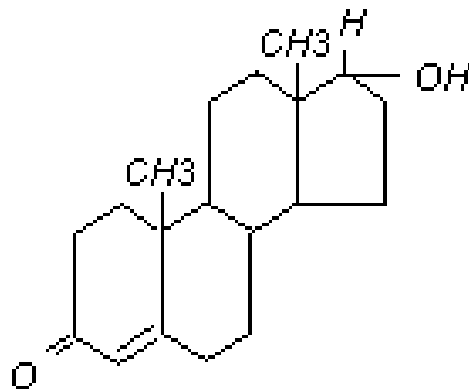


Figura 4. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA HORMONA LUTEINIZANTE (LH)

Es una hormona gonadotrópica de naturaleza glicoproteica que, al igual que la hormona FSH, es producida por el lóbulo anterior de la hipófisis o pituitaria. Estimula la producción de testosterona por las células de Leydig. Obtenida de: <http://hormonaluteinizante.blogspot.com/2010/07/caracteristicas-generales.html>

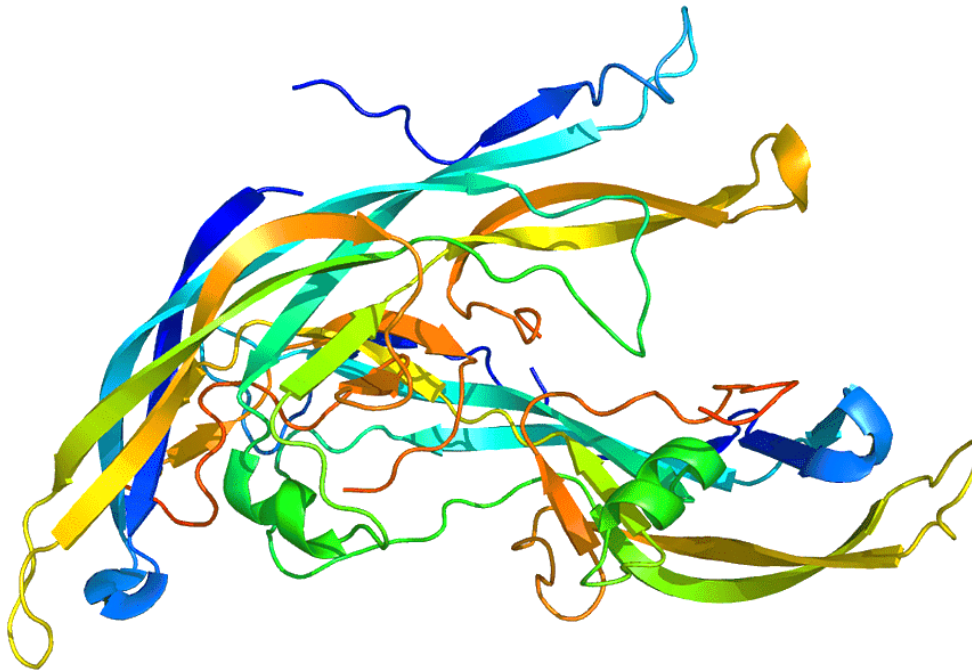


Figura 5. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH)

Es una hormona del tipo gonadotropina. Es sintetizada y secretada por células gonadotropas de la parte anterior de la glándula pituitaria. La FSH regula el desarrollo, el crecimiento, la maduración puberal y los procesos reproductivos del cuerpo. Obtenida de: <https://www.pngegg.com/es/png-xqsce>.

3. Cáncer

a. Definición

De acuerdo con la definición establecida por la American Cancer Society, el cáncer es un grupo de enfermedades caracterizado por el crecimiento descontrolado y propagación de células anormales, es una enfermedad compleja, heterogénea y altamente dinámica con múltiples componentes moleculares en evolución (Moses et al., 2018).

Inicialmente, en 2000, Hanahan y Weinberg propusieron un marco lógico integral para el estudio funcional del cáncer.

Describieron seis capacidades adquiridas durante la tumorigénesis y el desarrollo de tumores: proliferación sostenida, evasión de señales supresoras de crecimiento, resistencia a la muerte celular, inmortalidad replicativa, incitar la angiogénesis, activar la invasión y la metástasis (England et al., 2016) , (Stucchi et al., 2016).

Sin embargo, en 2011, los mismos autores extendieron sus seis características originales para abarcar la próxima generación de características e identificaron dos características que permiten el desarrollo y la progresión del cáncer en las que mencionan: Promoción tumoral de inflamación e inestabilidad genómica y Mutación, además destacaron la extensa heterogeneidad celular de los tumores (**Figura 6**) (Hanahan & Weinberg, 2011).

Por otra parte, la desregulación de la energía celular y la evasión de la respuesta inmune también se reconocieron como características distintivas del cáncer "emergente"(Moses et al., 2018).



Figura 6. LOS SELLOS DISTINTIVOS DEL CÁNCER

Propuesta por Hanahan y Weinberg (2011) donde los autores defienden que la noción de "sellos distintivos del cáncer" representa un principio de organización para racionalizar la diversidad y complejidad de las enfermedades neoplásicas. Donde reconocen el impacto y la importancia de la adquisición por parte de las células tumorales de la capacidad de evitar su destrucción por el sistema inmune. Imagen modificada extraída de: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros135/cancer.pdf>

Las causas del cáncer no han sido completamente comprendidas, sin embargo, se sabe que numerosos factores incrementan su incidencia, incluidos muchos que son modificables (p. ej.: el consumo de tabaco y exceso de peso corporal) y otros que son no modificables (p. ej.: mutaciones genéticas hereditarias) (Institute, 2020).

Dentro de las no modificables, se han descubierto mutaciones que producen oncogenes, con ganancia dominante de función y genes supresores de tumores con pérdida recesiva de función (Stucchi et al., 2016).

Los mecanismos de cada gen supresor de tumores y sus productos proteicos son complejos e interrelacionados con otras vías de señalización celular. Dentro de los mecanismos mejor conocidos se encuentran:

- El gen de la retinoblastoma que codifica la proteína RB que normalmente funciona para evitar que la célula ingrese a la fase S del ciclo celular. Bloqueando la transcripción de genes necesarios para la replicación del ADN.

- El gen supresor de tumores *TP53* conocido también el "guardián del genoma", ya que sirve para identificar el daño del ADN, pausar la progresión del ciclo celular para permitir la reparación y, cuando la reparación no es posible, inducir la apoptosis.
- El gen homólogo de fosfatasa y tensina (*PTEN*) que regula negativamente la fosfoinositida-3-quinasa (PI3K) -AKT y el objetivo de las vías de señalización de mTOR, que son vitales para la proliferación celular, la progresión del ciclo celular y la apoptosis.
- Los genes supresores de tumores *BRCA1* y *BRCA2* que codifican las proteínas involucradas en la reparación de las rupturas de doble cadena de ADN a través de la vía de reparación de recombinación homóloga. Y el gen *APC* que codifica una proteína supresora de tumores que bloquea la vía de señalización de Wnt, por lo que funciona para mejorar el diseño de ejes de las células durante la embriogénesis, la migración celular y la proliferación celular. La proteína APC también está involucrada en la apoptosis (Catherine, 2020).

De este modo, el cáncer es una enfermedad multifactorial, en la que las mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores son importantes, pero no determinantes, por lo que una gran cantidad de factores podrían causarlo actuando simultáneamente o en secuencia.

b. Incidencia a nivel mundial

El cáncer es, hoy en día, una de las cinco primeras causas de muerte, tanto en países desarrollados como en desarrollo (Cristina, 2013). Sin embargo, algunos hallazgos sugieren una distribución desproporcionada de nuevos casos de cáncer y muertes concomitantes en ciertas regiones del mundo, observando que la relación Incidencia/ Mortalidad (MIR) tiene un valor más bajo en las poblaciones con mejor educación, mayores ingresos y menores desigualdades (McDaniel et al., 2019).

En 2018 el (GLOBOCAN) reportó que la carga mundial de cáncer aumentó a 18.1 millones de casos nuevos y 9.6 millones de muertes. Y los patrones globales muestran que, para hombres y mujeres, se estima que casi la mitad de los casos

nuevos y más de la mitad de las muertes por cáncer en todo el mundo en dicho año ocurren en Asia, esto debido a que posee casi el 60% de la población mundial, mientras que Europa posee el 9.0% de la población mundial y representa el 23.4% de los casos globales de cáncer y el 20.3% de muertes por el mismo, respecto a América, este tiene 13,3% de la población mundial y representan 21.0% de incidencia y 14.4% de mortalidad a nivel mundial por cáncer.

A diferencia de otras regiones del mundo, las proporciones de muertes por cáncer en Asia y África (57.3% y 7.3%, respectivamente) son más altas que las proporciones de casos incidentes (48.4% y 5.8%, respectivamente), atribuyendo esto a que estas tienen mayor frecuencia de ciertos tipos de cáncer asociados con peor pronóstico y tasas de mortalidad más altas, además del acceso limitado al diagnóstico y tratamiento oportunos en muchos de sus países (World Health Organization (WHO), 2018).

Así mismo, se sabe que el cáncer es un problema importante de salud pública a nivel mundial y se espera que los 14 millones de casos nuevos de cáncer diagnosticados en 2012 aumenten a 24 millones para 2030 (Bray et al., 2015).

4. Cáncer de próstata

a. Incidencia y mortalidad a nivel mundial

El cáncer de próstata (CaP) a nivel mundial es el segundo cáncer diagnosticado con más frecuencia y la quinta causa principal de muerte por cáncer entre los hombres, con un estimado de 1.1 millones de casos nuevos diagnosticados y 307,000 muertes en 2012 (Zhou et al., 2016).

En los países más desarrollados, la incidencia de CaP es 5 veces mayor que la observada en los países menos desarrollados. Sin embargo, la mortalidad asociada es solo 1.5 veces mayor (Torres-Sánchez et al., 2016). Las tasas de incidencia más altas se han reportado en América del Norte, Oceanía y Europa del Norte y Occidental. Aunque las tasas más bajas se identifican en Asia y África del Norte, las tasas de incidencia y mortalidad tienden a aumentar en países como Polonia y

algunos países asiáticos como Japón y Singapur, donde las pruebas de Antígeno Prostático específico (PSA) no se usan comúnmente. **(Figura 7)** (Taitt, 2018).

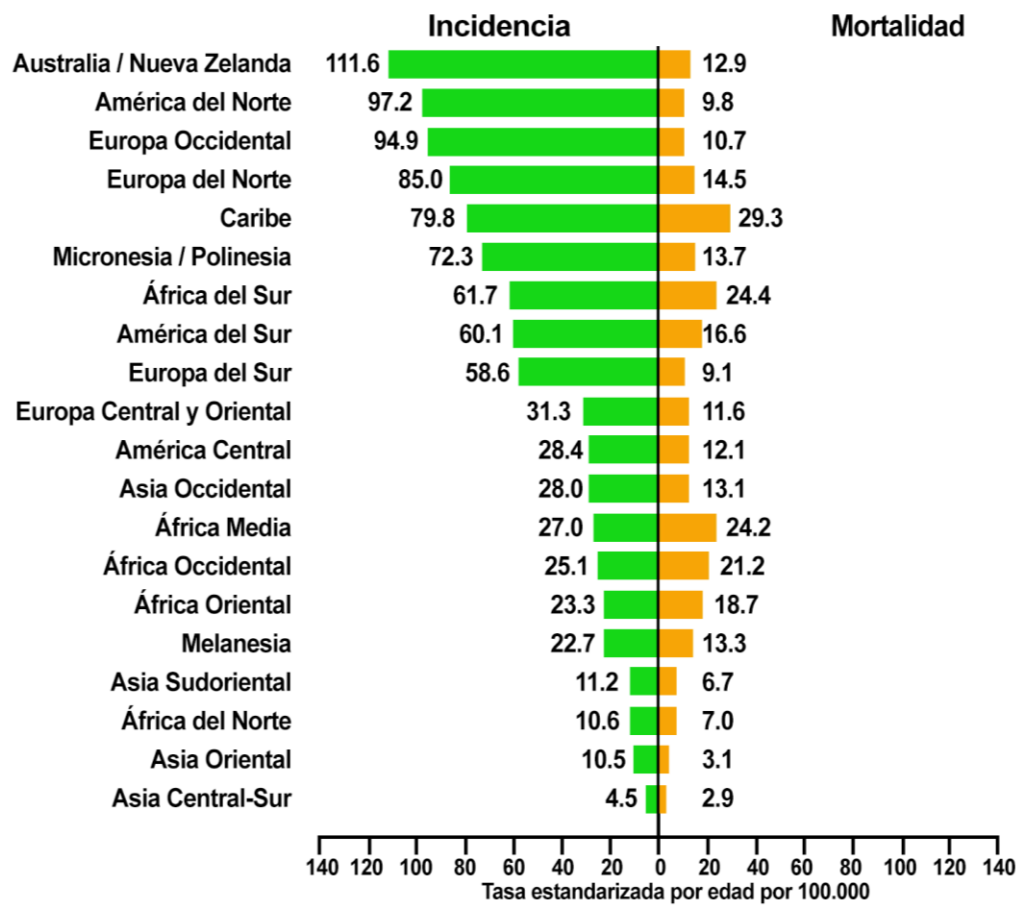


Figura 7. INCIDENCIA Y MORTALIDAD A NIVEL MUNDIAL POR CaP

Tasas de incidencia (barras color verde) y tasas de mortalidad (barras color naranja) por cáncer de próstata tomando en cuenta su área geográfica. De "Global Cancer Statistics, 2012", por LA Torre, F. Bray, R. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieventy y AJ Jemal, 2015, CA: A Cancer Journal for Clinicians, 65, p. 87.

Por otra parte, se ha observado que el envejecimiento de la población ha contribuido sustancialmente al creciente número de nuevos casos de cáncer en todo el mundo. En 2012 se estimaron 6,7 millones de casos nuevos de cáncer en adultos de 65 años o más, lo que representa el 47,5% del número total de nuevos casos de cáncer en todo el mundo, mientras que el 8% de la población mundial tenía 65 años o más. La mayoría de los nuevos casos de cáncer ocurrieron en Europa (1.9 millones, 29% del total mundial) y Asia (2.8 millones, 42%) incluyendo 1.5 millones de casos diagnosticados en China (22% del total mundial= mientras que las personas de 65

años o más en estas regiones respectivas representaban el 22, 39 y 31% de la población mundial más vieja, respectivamente (Pilleron et al., 2019).

b. Incidencia y mortalidad en México

Dentro de los países de Latinoamérica, México presenta una de las incidencias de CaP más bajas (27.3 casos por cada 100 000 hombres) y tasas de mortalidad (11.3 muertes por cada 100 000 hombres). Sin embargo, el CaP es la principal causa de morbilidad y mortalidad relacionada con el cáncer en todo el país, provocando incluso, mayor mortalidad que otros tipos de Cáncer como el de mama, pulmón, cervicouterino, etc.

Según las clasificaciones histológicas en el momento del diagnóstico, una alta proporción (~ 80%) de los casos en el momento del diagnóstico se clasifican como agresivos y tienen un mal pronóstico. Con respecto a la mortalidad, los pocos estudios que existen reportan un aumento significativo entre las décadas de 1970 y 1990, seguido de un aumento anual constante del 2% (Torres-Sánchez et al., 2014). Tras evaluar las tendencias estatales en México de mortalidad por CaP de 2000-2010 se concluyó que los estados y regiones socioeconómicas que presentaron las mayores tasas de mortalidad fueron Sinaloa (años 2000, 2004, 2005), Sonora (2001), Baja California Sur (2002, 2003, 2010), Nayarit (2006, 2007, 2009), Colima (2008) (Sánchez-Barriga, 2018).

Por otra parte, en 2018 se reportó que el CaP presentaba 25,049 casos nuevos (29.3%) tomando en cuenta todos los tipos de cáncer en varones de todas las edades (**Figura 8**) (World Health Organization (WHO), 2018).

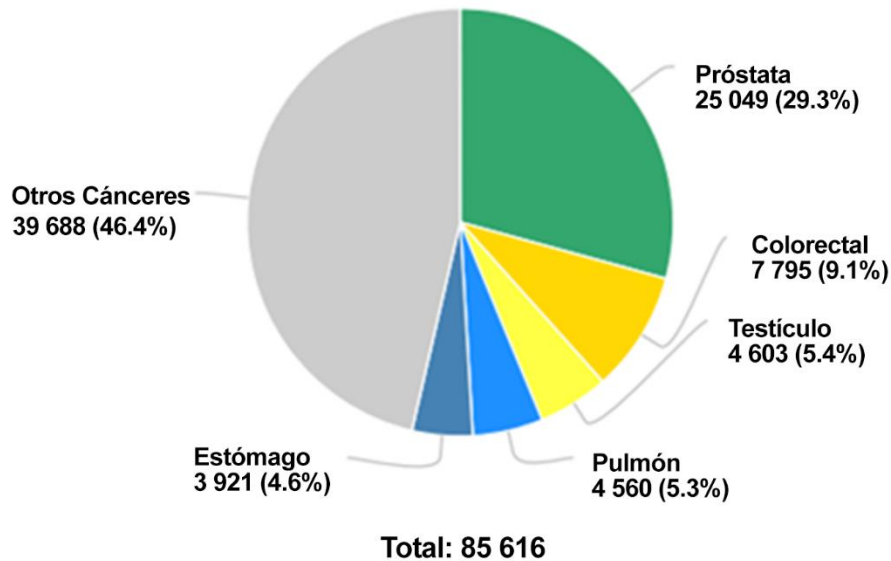


Figura 8. CASOS NUEVOS DE DISTINTOS TIPOS DE CÁNCER EN HOMBRES EN MÉXICO

Gráfico de Pastel que muestra el número de casos nuevos con distintos tipos de cáncer en hombres de todas las edades. En dicho gráfico, se observa que el CaP presenta, después de otros tipos de cáncer el mayor número de casos. Datos obtenidos de GLOBOCAN 2018.

c. Anatomía e histología del CaP

La próstata es una glándula exocrina túbulo-alveolar, de color gris y consistencia dura que rodea la porción inicial de la uretra masculina; presenta interrelaciones endocrinas, testiculares e hipotalámicas y un elevado grado de potencialidad oncogénica (Ruiz López et al., 2017).

Se ha dividido en 4 regiones o zonas: periférica, de transición, anterior y central (**Figura 9**) (Varnero et al., 2001).

- Zona central: Rodea los conductos eyaculadores, que comprenden aproximadamente el 25% del volumen normal de la próstata. Los conductos de esta zona se vacían oblicuamente en la uretra prostática, por lo que son bastante inmunes al reflujo de orina.
- Zona de transición: ubicada en el centro y que rodea la uretra, que comprende aproximadamente el 5-10% del volumen normal de la próstata.
- Zona periférica: constituye el cuerpo principal de la glándula (aproximadamente el 70%) y se encuentra en la parte posterior. Esta zona es principalmente el área que se siente contra el recto en un examen rectal digital (DRE), que tiene un valor insustituible en el diagnóstico de CaP. Los

conductos de sus glándulas se vacían verticalmente en la uretra prostática; eso puede explicar la tendencia de estas glándulas a permitir el reflujo de orina. Además, esto podría explicar la alta incidencia de inflamación aguda y crónica que se encuentra en estos compartimentos, un hecho que puede estar relacionado con la alta incidencia de carcinoma de próstata en la zona periférica.

- Zona Anterior: esta zona carece de glándulas, presenta contacto con la cara anterior de la uretra preprostática y prostática y posee Fibras de la capa externa del detrusor entremezcladas a nivel craneal (Carballo Quintá, 2012; Holmberg & Van Hemelrijck, 2014).

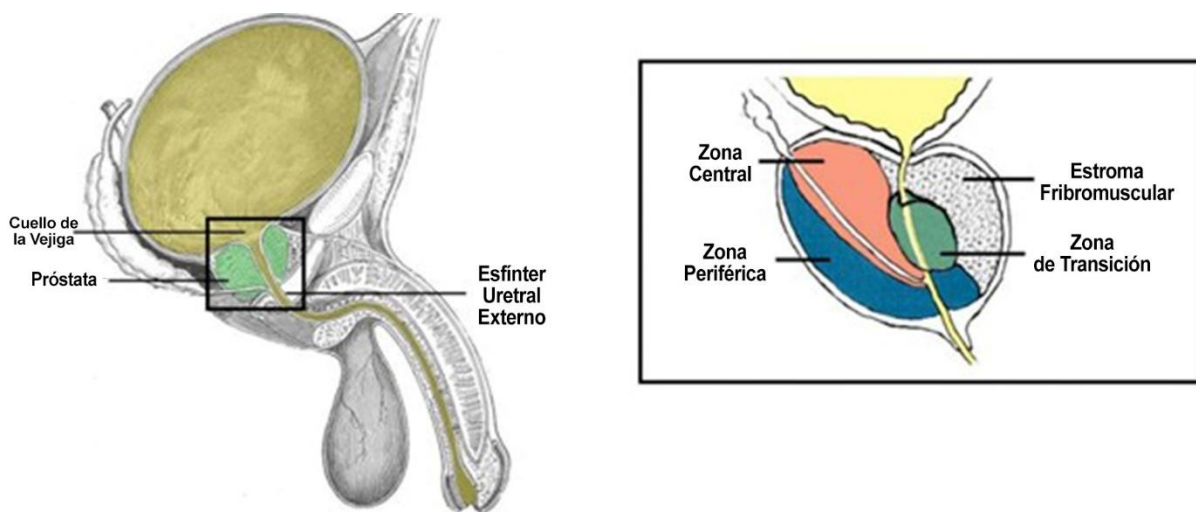


Figura 9. POSICIÓN ANATÓMICA DE LA PRÓSTATA

La Próstata está situada debajo de la vejiga, alrededor de la uretra (que es el conducto a través del cual se expulsan del cuerpo la orina y el semen), de igual manera se muestran las zonas en las que histológicamente se ha dividido (zona central, periférica, fibromuscular y de transición). Obtenida de: http://www.gallegadeurologia.es/descargas/XII_Sesion_URO-MIR_2012/D

Respecto a la histología de la próstata, se sabe que ésta, se compone de glándulas ramificadas, con conductos que están revestidos con células epiteliales secretoras y células basales, de igual manera, están presentes células neuroendocrinas dispersas y se cree que proporcionan una función paracrina en la glándula.

- Las células epiteliales secretoras representan el principal tipo de linaje celular, dependen del andrógeno para el crecimiento y producen antígeno prostático específico (PSA) y fosfatasa ácida prostática.

- La capa de células basales no depende del andrógeno para su crecimiento y se cree que contiene la población de células madre para las células de la próstata epitelial.

Alrededor de la glándula hay un estroma que incluye fibroblastos, músculo liso, nervios y linfáticos. Las interacciones estromal-epiteliales siguen siendo poco conocidas, pero las ideas recientes sugieren que el estroma produce múltiples factores de crecimiento importantes para el crecimiento y el desarrollo de la próstata normal y el cáncer de próstata (William et., al 2003).

d. Historia natural de la enfermedad

- Etiología

Existe un amplio espectro de estudios con el objetivo de demostrar las causas y los factores de riesgo en el desarrollo del cáncer de próstata. En general, los agentes que causan la aparición del cáncer de próstata son desconocidos. Se han identificado algunos factores de riesgo, sin embargo, lo más probable es que el cáncer se deba a una interacción compleja de factores (Grozescu T, Popa F, 2017). Dentro de estos factores se encuentran los siguientes:

Edad, ya que se sabe que el aumento en la edad eleva el riesgo de CaP, así como un desequilibrio hormonal endógeno (Narod et al., 2008).

De igual manera, factores genéticos, dentro de los cuales se encuentran los reportados por Tomlins y sus colaboradores, quienes identificaron dos factores de transcripción, ERG y EtV1, que estaban sobre expresados en el tejido del cáncer de próstata. Más aún, La proteasa 2 (TMPRSS2) de la serina de la transmembrana, proteína que se expresa en células epiteliales de la próstata y es necesaria para la función normal de la próstata, la cual se detectó fusionada a los genes ya mencionados, lo que sugiere que la fusión era responsable de la sobreexpresión. Al parecer, esta reorganización genética es la que se identifica con más frecuencia en el cáncer de próstata ya que la fusión TMPRSS2: ERG se ha identificado en casi 50% de los tumores de próstata y es probable que represente un evento molecular temprano en carcinogénesis. De igual manera, dicha fusión

puede arrojar un fenotipo distintivo con una historia natural más agresiva (Narod et al., 2008).

Además, se sabe que ciertas condiciones constituyen otro factor de riesgo, incluida una dieta grasa, dado que en estudios epidemiológicos se ha encontrado que la incidencia de CaP con significancia clínica es mucho menor en partes del mundo donde la población se alimenta mayormente de vegetales, bajos en grasa. Observando de esta manera que la ingesta total de grasas, la ingesta de grasa animal y de carne roja están relacionadas con un aumento en el riesgo de CaP, mientras que la ingesta de pescado está relacionada con una reducción en este riesgo. Adicionalmente, se ha encontrado que la ingesta de licopeno, selenio, ácidos grasos omega-3 (pescado) y vitamina E es protectora, mientras que la vitamina D y el calcio aumentan el riesgo (Rubin & De Marzo, 2004).

– Origen

El carcinoma prostático es un tumor maligno que deriva del epitelio acinar y ductal de la próstata, que puede variar considerablemente en su diferenciación glandular, anaplasia, comportamiento, patrones metastásicos y respuestas a la terapéutica (Da Silva, 2002).

Las características citológicas de esta neoplasia se caracterizan por presentar en sus células núcleos hipercromáticos y agrandados, con citoplasma abundante y teñido de azul. La ausencia de tinción de inmunohistoquímica de queratina en las células basales de la próstata es consistente con un adenocarcinoma de próstata. Aunque este cáncer suele ser multifocal se presenta mayormente en la zona periférica de la glándula. La penetración de la cápsula prostática es un evento que sucede con mucha frecuencia y ocurre a lo largo de los espacios perineurales (Da Silva, 2002).

– Síntomas

En etapas tempranas de esta neoplasia, la mayoría de los pacientes son asintomáticos. La presencia de síntomas sugiere enfermedad con avance local o metástasis y estos son: irritativos u obstructivos, afectando sobre todo la micción; esto se debe al crecimiento local del tumor en la uretra o el cuello de la vejiga (Ruiz López et al., 2017).

– Diagnóstico

Para el diagnóstico de esta enfermedad se realiza un examen físico general que está destinado a detectar la presencia del tumor y su repercusión en el resto del organismo (Herranz Amo et al., 2006). Además, para un diagnóstico certero, se realizan pruebas en las que se utilizan el tacto rectal (TR), la concentración del antígeno prostático específico (PSA) y la ecografía transrectal (ETR).

El antígeno prostático específico (PSA) es una serina proteasa de la familia de la calicreína (hK) producida por tejidos prostáticos benignos y cancerosos, por lo que su concentración en presencia de otros trastornos como prostatitis, hiperplasia prostática benigna (BHP) y daño perineal producido por uso prolongado de bicicletas e instrumentación uretral puede estar elevada, produciendo resultados falsos positivos, sin embargo, es una herramienta que se usa como primera elección para el diagnóstico de CaP y como medio de estratificación de riesgo de tumores de próstata conocidos. Actualmente en la práctica clínica el límite superior del PSA es 4.0 ng/ml, sin embargo, este punto de corte es incapaz de detectar alrededor de un 25-30% de pacientes con cáncer de próstata con PSA entre 2.6 y 4.0 ng/ml, dado que es específico de la próstata, no del cáncer *de próstata* (Moiran, 2019).

Respecto al grado de diferenciación, este generalmente se clasifica según los patrones de formación de glándulas y, lo que es menos importante, según los detalles citológicos. El esquema de clasificación más ampliamente aceptado para el adenocarcinoma de próstata es el desarrollado por Gleason (William et al, 2003). Este consiste en observar los patrones arquitectónicos primario (predominante) y secundario (el segundo en cuanto a prevalencia), estos son identificados y se les asigna un grado de 1 a 5, siendo 1 el más diferenciado, como dichos patrones

influyen en el pronóstico, existe una suma o puntuación que se obtiene por la adición de ambos grados (**Tabla 2**). Y en caso de que un tumor tenga solo un patrón histológico, por razones de uniformidad a los patrones primario y secundario se les asigna el mismo grado. Así bien, la puntuación de Gleason varía de 2 (que representa tumores de composición uniforme con patrón 1 de Gleason) hasta 10 (que representa a tumores totalmente indiferenciados, dicho de otra manera, cuanto más baja sea la puntuación, menor la probabilidad de diseminación del tumor. Como los patrones primario y secundario (Bolaños Morera & Chacón Araya., 2017).

El sistema clásico de Gleason define cinco patrones de crecimiento histológico (**Figura 10**):

- Patrón 1: caracterizado por una lesión nodular bien circunscrita compuesta por glándulas bien diferenciadas de tamaño moderado, compactas y discretas. Este patrón es extremadamente raro, si no inexistente. La mayoría de los que fueron descritos por el Dr. Gleason en su estudio original pueden ser realmente lesiones que imitan estas características como la adenosis o la hiperplasia adenomatosa atípica, más que un cáncer en sí (Bolaños Morera & Chacón Araya., 2017).
- Patrón 2: puede mostrar variaciones en el tamaño de las glándulas neoplásicas, con un incremento ligero del estroma entre las glándulas y leve irregularidad en la periferia del nódulo. También es considerado como un patrón muy raro (Bolaños Morera & Chacón Araya., 2017).
- Patrón 3: parece ser el más común, es representado por glándulas neoplásicas discretas y distintas, agrupadas o individuales, típicamente pequeñas, pero es frecuente que sus tamaños sean variables e infiltren en el estroma entre las glándulas benignas. Este patrón originalmente incluye estructuras cribiformes, algunas con contornos irregulares y algunas dentro de espacios glandulares redondeados, pequeños y suaves o una formación de "glándula en glándula" (Bolaños Morera & Chacón Araya., 2017).

- Patrón 4: glándulas fusionadas, que ya no se encuentran de manera individual o distintiva, sino que forman un patrón cribiforme, fusionado e irregular. Una variante es el patrón hipernefromatoide con capas de células con abundante citoplasma claro (Bolaños Morera & Chacón Araya., 2017).
- Patrón 5: cuando la necrosis se involucra en el contexto de estas estructuras (tipo comedocarcinoma), que también involucra crecimiento sólido o infiltración por células individuales del tumor con cualquier trazo de formación glandular(Bolaños Morera & Chacón Araya., 2017).

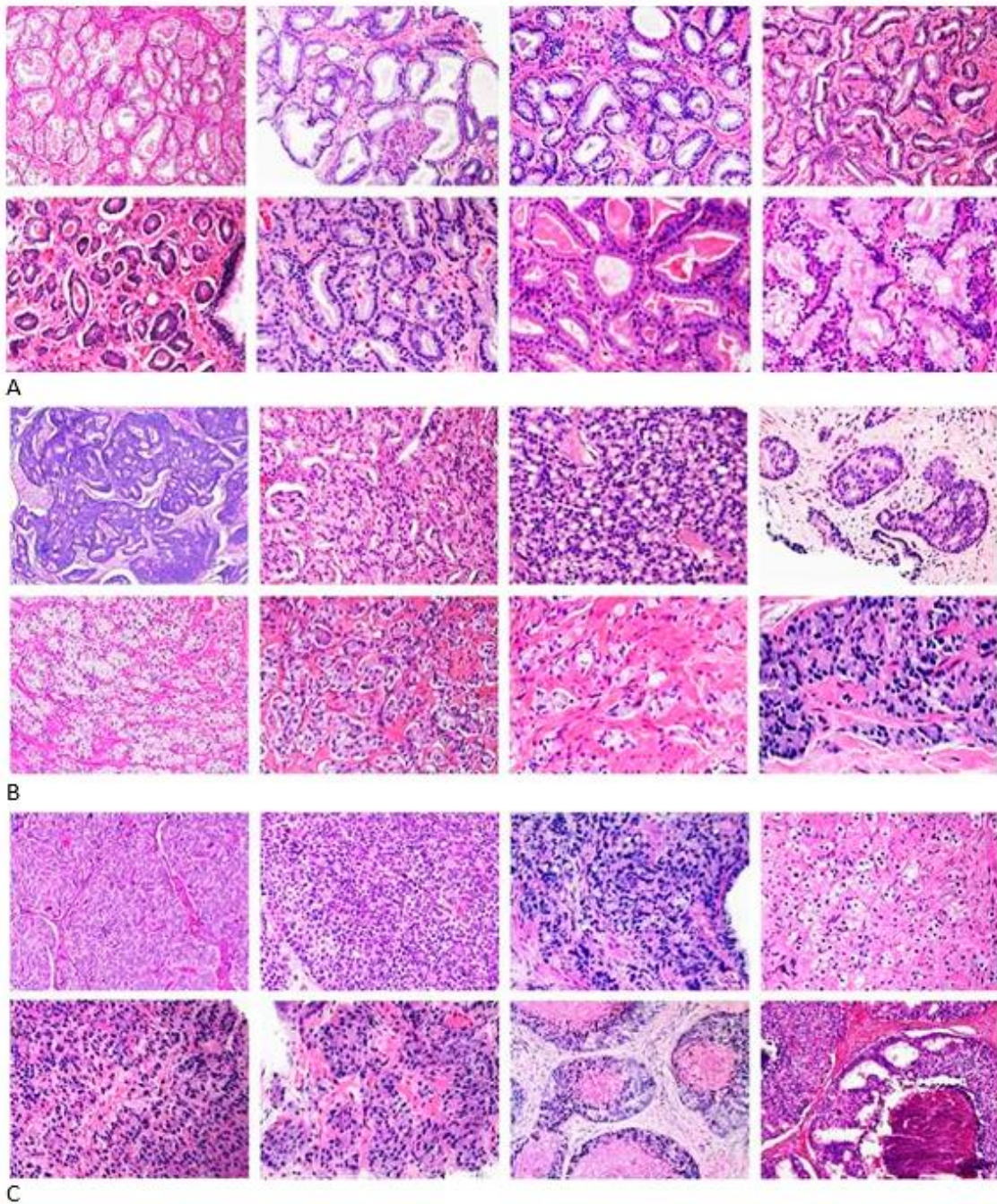


Figura 10. PATRONES DE GLEASON BASE

En la Figura se muestran los patrones de Gleason base para la asignación de los grados de grupos pronósticos. El inciso A corresponde a patrones de Gleason 1-3: Glándulas individuales y bien diferenciadas; El inciso B corresponde a patrones de Gleason 4: Glándulas pobremente formadas, fusionadas y cribriformes, El inciso C corresponde a un Patrón de Gleason 5: en el que se observan nidos sólidos, sábanas, cordones, células individuales y necrosis. Imagen Adaptada de Epstein JL. Prostate cancer grading: a contemporary photomontage. *Am J Surg Pathol* 2016; 40:137.8. The Johns Hopkins University & Jonathan I Epstein. Obtenida de: <http://www.revurologia.sld.cu/index.php/rcu/article/view/270/307>

Tabla 2. CARACTERÍSTICAS MORFOLOFICAS DE LOS GRADOS DE GRUPOS PRONÓSTICOS

Grado	Puntaje de Gleason	Patrones de Gleason	Características
1	≤ 6	1, 2 y 3	Únicamente glándulas individuales y bien diferenciadas
2	3 + 4 = 7	3 y 4	Predominio de glándulas bien formadas con un componente menor de glándulas pobremente formadas, fusionadas y/o cribiformes
3	4 + 3 = 7	3 y 4	Predominio de glándulas pobremente formadas, fusionadas y/o cribiformes con un componente menor de glándulas bien formadas*
4	8	4	Únicamente glándulas pobremente formadas, fusionadas y/o cribiformes (patrón combinado 4+4)
		3 y 5	Predominio de glándulas bien formadas con un componente menor no glandular** (patrón combinado 3+5)
		3 y 5	Predominio de componente no glandular con un menor componente de glándulas bien formadas** (patrón combinado 5+3)
5	9-10	4 y 5	Ausencia de formación glandular (o con necrosis) con/sin glándulas pobremente formadas, fusionadas y/o cribiformes*

Tabla 2. Muestra el Sistema Gleason modificado por la Sociedad Internacional Society of Urologic Pathology (ISUP), el cual se las observaciones originales de Gleason y es el resultado de la evolución gradual de la comprensión de la naturaleza biológica y de los distintos patrones morfológicos del cáncer de próstata. Consta de 5 grados (GG): grado 1 (GG1: Gleason ≤ 6); grado 2 (GG2: Gleason 3 + 4= 7); grado 3 (GG3: Gleason 4 + 3= 7); grado 4 (GG4: Gleason 8), y grado 5 (GG5: Gleason 9-10). Obtenida de: <http://www.revurologia.sld.cu/index.php/rcu/article/viewFile/270/307/1762>

e. Papel de las Hormonas en CaP

Las hormonas son sustancias producidas por glándulas en el cuerpo que funcionan como señales químicas. Afectan las acciones de las células y los tejidos en varios lugares del cuerpo, a menudo alcanzan sus objetivos viajando a través del torrente sanguíneo.

Los andrógenos (hormonas sexuales masculinas) son una clase de hormonas que controlan el desarrollo y el mantenimiento de las características masculinas. La testosterona y la dihidrotestosterona (DHT) son los andrógenos más abundantes en los hombres (**Figura 11**) (NIH, 2019).

La testosterona ejerce sus efectos al unirse a los receptores de andrógenos en órganos diana como la glándula prostática, y dentro de la próstata se convierte en dihidrotestosterona (DHT) por la enzima 5-alfa reductasa. La testosterona y su metabolito más potente DHT son esenciales para el crecimiento normal de la próstata y, por lo tanto, se cree que juegan un papel en el desarrollo del cáncer de próstata. Por lo tanto, la estrategia principal de la terapia hormonal es disminuir la producción de testosterona por parte de los testículos o bloquear la acción de la testosterona. Esta terapia tiene como objetivo retrasar el crecimiento del cáncer de próstata y reducir su tamaño general (Drudge-Coates, 2005).

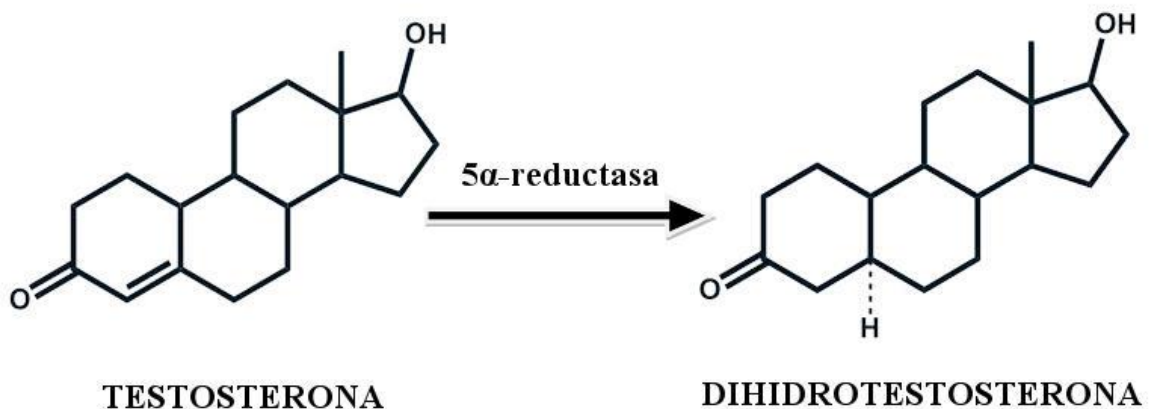


Figura 11. ANDRÓGENOS MÁS ABUNDANTES EN HOMBRES

Se muestra la Testosterona y la Dihidrotestosterona, estas hormonas son las más abundantes en hombres. La Testosterona es considerada una prohormona ya que necesita una modificación enzimática para ser activa y poder actuar sobre sus receptores específicos. Para ello, con acción

de la enzima 5 α -reductasa se logra pasar de la testosterona a 4,5 α -dihidrotestosterona, es decir, la forma activa de este andrógeno. Obtenida de: <https://powerexplosive.com/ciclos-con-winstrol-informacion-objetiva/>

f. Papel de los andrógenos en CaP

Aunque los andrógenos séricos por sí solos pueden no promover la carcinogénesis de la próstata, la acción de los andrógenos y el estado funcional del Receptor de Andrógenos (AR) son mediadores importantes de la progresión del cáncer de próstata (Heinlein & Chang, 2004). Una vez activado, el receptor de andrógenos estimula la expresión de genes específicos que hacen crecer las células de la próstata (Hååg et al., 2005).

Se ha encontrado que los niveles bajos de testosterona en suero en hombres con cáncer de próstata recién diagnosticado y no tratado se correlacionan con una mayor expresión de AR, una mayor densidad de vasos capilares dentro del tumor y una mayor puntuación de Gleason (**Tabla 2**). Además análisis recientes de muestras clínicas de cáncer de próstata también recolectadas de pacientes sin tratamiento preoperatorio demostraron que la alta expresión de AR se correlacionó con una menor supervivencia libre de recurrencia y progresión de la enfermedad (Heinlein & Chang, 2004).

g. Papel de los estrógenos en CaP

Por otra parte, tomando en cuenta que la próstata es como una inmensa red de interacción homeostática, y la función de este órgano está muy vinculada con el eje hipotálamo-hipófisis-testículo (**Figura 12**), se ha planteado que el papel de los andrógenos en la carcinogénesis prostática es solo una cara del problema, ya que el desarrollo tumoral frecuentemente ocurre en edades avanzadas, donde los niveles de la testosterona están en declive, en contraste, con los niveles de estradiol (E₂) dado que estos no se reducen con la edad, de manera que permanecen sin cambios o se incrementan ligeramente (García-Figueredo et al., 2015).

El estradiol pertenece a la familia de estrógenos, estas hormonas sexuales tienen una estructura de anillo de carbono derivada de la biosíntesis de colesterol, se sintetiza a partir de la célula en las células de Leydig de los testículos de mamíferos,

por algunas células germinales y por las células de Sertoli de mamíferos inmaduros. Siendo su función principal el evitar la apoptosis de las células germinales (Dobbs et al., 2019).

En estudios realizados *in vitro* y en animales, se han identificado una serie de mecanismos, en los que participan los estrógenos, potencialmente carcinogénicos, incluyendo la genotoxicidad directa, la hiperprolactinemia, la inflamación crónica y los cambios en el equilibrio hormonal medio por los receptores de estrógenos. Además, existe una conversión de andrógenos en estrógeno, lo que provoca un desequilibrio en la proporción Testosterona/Estradiol ocasionando una disminución, lo que favorece el desarrollo del cáncer prostático (García-Figueroa et al., 2015).

Adicionalmente, se sabe que la próstata expresa tanto el receptor de estrógenos alfa ($RE\alpha$) como el receptor de estrógeno beta ($RE\beta$). La mayoría de la evidencia sugiere que $RE\alpha$ media los efectos dañinos del estrógeno en la próstata, mientras que $RE\beta$ es supresor de tumores, pero los ensayos de agentes selectivos de $RE\beta$ no se han traducido en mejores resultados clínicos. El papel de $RE\beta$ en la próstata sigue sin estar claro y hay cada vez más pruebas de que las isoformas de $RE\beta$ pueden ser oncogénicas, ya que a medida que la expresión de $RE\beta$ disminuye con el desarrollo del cáncer de próstata, los niveles de la subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1A) aumentan, lo que da como resultado la desdiferenciación epitelial y el crecimiento de tumores agresivos de alto grado (Nelson et al., 2020).

Además, se ha encontrado evidencia de que el $RE\beta$ puede tener un efecto dual: protector contra el desarrollo del cáncer e inductor del cambio de hormono-sensible a hormono-refractario, lo cual podría explicar ciertos resultados discordantes en los estudios epidemiológicos, para probar la relación entre los estrógenos y el riesgo al cáncer prostático. (García-Figueroa et al., 2015) Así bien, es importante mencionar, que cuando el CaP se encuentra en un estadio avanzado puede convertirse en cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC). Este proceso

está mediado por la síntesis de ligandos intratumorales o por mutaciones o aberraciones del receptor de andrógenos (AR) o sus cofactores.

En este sentido se ha demostrado que en células CRPC se presenta una regulación negativa de ER β que provoca la regulación positiva de la expresión de AR, por lo que se ha propuesto regular a la baja al AR por activación de ER β con ligandos selectivos de subtipo que podrían lograr una inhibición completa de AR, incluidas mutaciones de AR de ganancia de función promiscuas y variantes de empalme adquiridas en tratamientos anteriores. Dado que la activación o regulación al alza de ER β inhibe la progresión tumoral e induce la detención del ciclo celular y la apoptosis en el CaP (Gehrig et al., 2017).

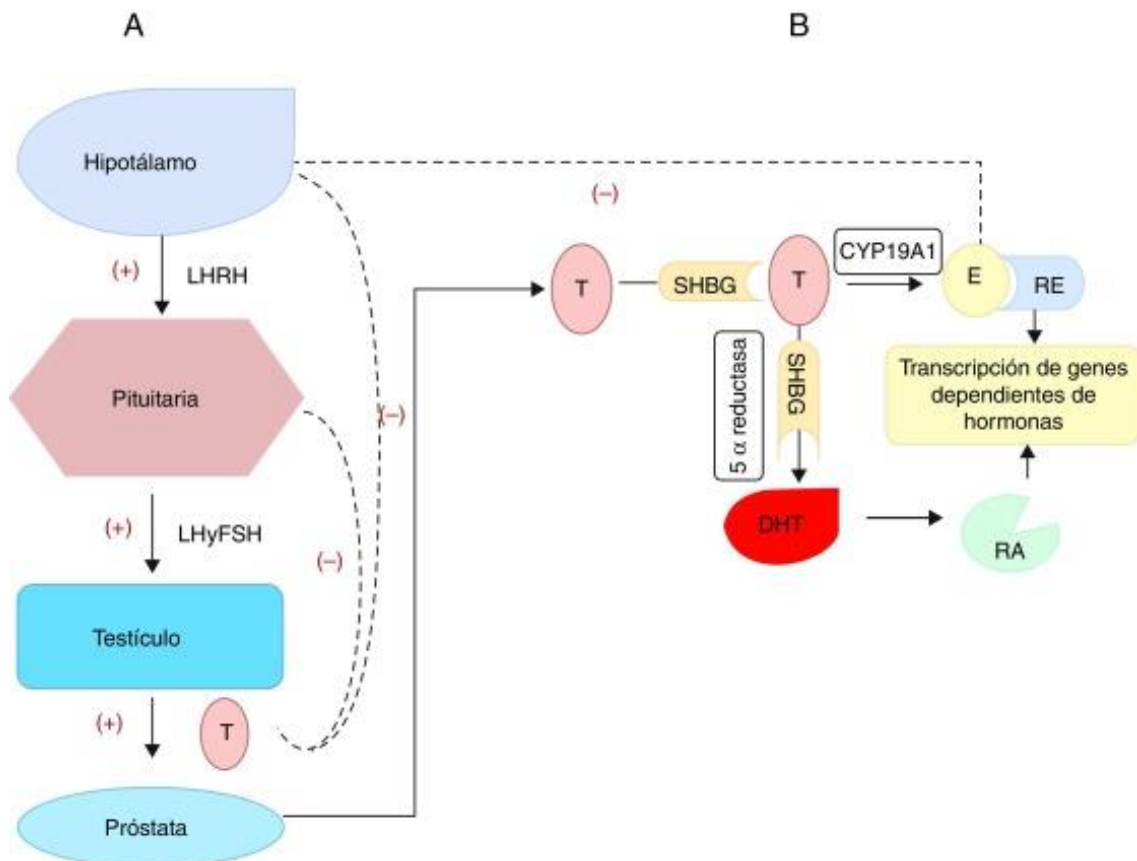


Figura 12. SÍNTESIS DE LAS HORMONAS ESTEROIDEAS QUE ACTÚAN SOBRE LA PRÓSTATA

A) Representa la regulación de la síntesis y liberación de la testosterona (T) por los testículos, a través del eje hipotálamo-hipófisis-testículo. Donde las líneas continuas representan la activación (+) y la promoción de la liberación de las hormonas. Las líneas discontinuas representan una retroalimentación negativa, dada por la liberación de los niveles inhiben negativamente la liberación de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), la hormona luteinizante (LH) y la estimulación de los folículos (FSH).

B) Representa la síntesis prostática de la dihidrotestosterona (DHT) gracias a la acción de la enzima 5α reductasa a partir de la testosterona. Una porción de la T y de la DHT se encuentra en el plasma a la proteína de unión a las hormonas sexuales (SHBP). La DHT se une al receptor de andrógenos (RA) y esta unión hormona-receptor se transloca al núcleo para unir a los elementos de respuesta en el ADN para actuar su acción. También existe una conversión de T a estradiol (E_2), gracias a la acción de la aromatasa citocromo P450 prostática (CYP19A1). Este estradiol se une a su receptor (RE) y al igual que sucede con el receptor de andrógenos, se une a sus elementos de respuesta en el núcleo lo que promueve la transcripción de los genes dependientes de estas hormonas. (García-Figueroa et al., 2015)

IV. JUSTIFICACIÓN

Considerando que el cáncer de próstata es el segundo cáncer más frecuente en el hombre y, uno de cada 6 hombres desarrollará cáncer de próstata a lo largo de su vida y es probable que la incidencia absoluta de CaP continúe en aumento, incluso en regiones geográficas mexicanas donde la incidencia y las tasas de mortalidad se encuentran estables, (Sánchez-Barriga, 2018) es de suma importancia realizar estudios para explorar la etiología de dicha neoplasia para entender las tendencias epidemiológicas, como se mencionó anteriormente, uno de los factores que podrían influir en su incidencia son los disruptores endócrinos, y en particular, los Bisfenoles dentro de los cuales se tienen al Bisfenol A (BPA), Bisfenol F (BPF) y Bisfenol S (BPS). Se ha demostrado, por su parte, que el BPA tiene afinidad por los receptores de estrógeno ($ER\alpha$ y $Er\beta$). Además, puede estimular otros receptores de hormonas nucleares, incluido el receptor gamma relacionado con los estrógenos (ESRRG), el receptor de andrógenos (NR3C4), formar uniones débiles con el receptor de la hormona tiroidea (THR), los receptores acoplados a proteína G (GPER), los receptores de glucocorticoides y mineralocorticoides (NR3C1 y NR3C2), y el receptor X de pregnano (NR1 / 2). También se ha demostrado que el BPA interfiere con los receptores endocannabinoides CNR1 y CNR2. Siendo esta promiscua afinidad a múltiples receptores la causante de que dicho disruptor produzca efectos estrogénicos y se relacione con la función y desarrollo de la próstata, la mama, el cerebro, sistemas reproductivo e inmune así como con el metabolismo (Zhang, 2020), (Rementeria, 2016)

De igual forma, se descubrió que la exposición de pequeñas dosis (nM) de BPA incentiva la sobreexpresión o la inhibición de ciertos genes y proteínas reguladoras de los procesos apoptóticos o factores determinantes del crecimiento celular provocando el crecimiento de tumores y el desarrollo de cáncer, en particular, con el Cáncer de Próstata (CaP) dado que al tener actividad estrogénica podría llegar a afectar la proliferación celular y la migración de las células del CaP de igual manera se ha demostrado que el BPA interrumpe la amplificación del centrosoma y la

dinámica de los microtúbulos que contribuyen a la transformación neoplásica de las células prostáticas promoviendo dicho Cáncer. (Beltrones, 2017).

Adicionalmente se ha descrito que existe una correlación entre los hombres afectados por CaP y niveles más altos de BPA en orina que aquellos sin la enfermedad, lo que sugiere que los niveles urinarios de BPA pueden tener valor pronóstico para CaP. (Gallego & Font, 2015)

Por otro lado, en Estados Unidos se ha detectado BPA en el 93% de las 2.517 muestras de orina recogidas tanto de adultos como de niños, lo que indica una exposición generalizada a este contaminante, además según los datos de múltiples fuentes, se sabe que existen diferentes vías de exposición al mismo: vía oral, vía inhalatoria y vía cutánea, sin embargo, las fuentes más importantes de exposición son a través de: la dieta, el agua, el polvo, el contacto con papel térmico, materiales dentales, y dispositivos o aparatos (Calafat et al., 2008).

Dado que es un contaminante con presencia ubicua, resulta fundamental observar el efecto no sólo del BPA sino de sus análogos BPF y BPS en una etapa del CaP cuando se considera independiente de andrógenos, puesto que, al momento, no hay registro de ningún estudio que se centre en el efecto de estos disruptores endocrinos en un estadio avanzado del CaP. Razón por la que en el presente trabajo se simuló el estadio avanzado del CaP, utilizando una línea celular de cáncer de próstata independiente de andrógenos (PC3) y se exponiéndola mediante ensayos *in vitro* a concentraciones bajas (5 nM) de BPA y sus análogos (BPF y BPS).

V. HIPÓTESIS

En la línea celular de cáncer de próstata independiente de andrógenos (PC3), la exposición a bajas concentraciones de Bisfenoles (A, F y S), inducirá cambios a nivel transcripcional, provocando la progresión de la enfermedad.

VI. OBJETIVO GENERAL

Determinar si la exposición a bajas concentraciones de bisfenoles (nM) en la línea celular de CaP (PC3) es capaz de inducir cambios al transcriptoma, como posible factor de progresión del cáncer.

VII. OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto citotóxico de los bisfenoles en la línea celular de CaP independiente de andrógenos.
- Determinar el efecto transcripcional de los Bisfenoles en línea celular PC3 de CaP.
- Mediante ensayos *in silico* caracterizar el efecto en el transcriptoma, sobre las vías asociadas a la progresión de la enfermedad.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo Celular

La experimentación (*in vitro*) se realizó con una la línea celular PC3 obtenida de la empresa ATCC “American Tissue Culture Collection”. Esta línea celular no expresa Receptor de andrógenos (AR) y Antígeno prostático específico (PSA), además su proliferación es independiente del andrógeno. Se obtuvieron en el año 1979 de una metástasis ósea de un hombre caucásico de 62 años con cáncer de próstata en grado IV.

Dichas células se crecieron en frascos de 25 cm² con medio RPMI 1640 con rojo de fenol, suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%. Se mantuvieron en incubación a 37°C con atmósfera al 5% de CO₂ (**Figura 13**).

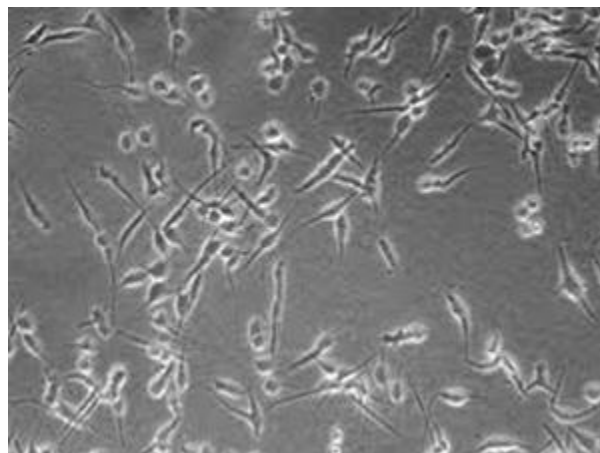


Figura 13. CULTIVO DE CÉLULAS PC3

Cultivo de células PC3, 24 horas después de la siembra. Imagen obtenida por microscopio óptico. (10x)

- ***Primera parte: Viabilidad celular***

Se colocaron 500 células por pozo en placas de 96 pozos. Las células se dejaron crecer por 48 hrs para permitir su adherencia. Posterior a este tiempo, se realizó la depleción hormonal cambiando el medio RPMI + Rojo de fenol, por medio RPMI sin rojo de Fenol y SFB filtrado por Columna de carbono (Charcoal strip) con la intención de que el efecto no sea enmascarado por las hormonas del medio y se dejaron crecer durante 24 hrs, luego de este tiempo se aplicaron los tratamientos, es decir, los Bisfenol A, S y F (Sigma-Aldrich) a concentraciones de 1 nM, 5 nM y 10 nM. Por lo que se pesaron 1.14mg de BPA, 1.25mg de BPS y 1.05mg de BPF y se disolvieron en 50mL de Etanol filtrado (Vehículo). Posteriormente se hicieron diluciones de estas disoluciones de 10 en 10 hasta obtener las concentraciones ya mencionadas. Se utilizó como Control negativo el Vehículo en el que se disolvieron los Bisfenoles.

Las placas se dejaron incubar otras 48 hrs para permitir que la sustancia actúe en todas las células y transcurrido este tiempo se colocaron 50 µL del reactivo MTT para 200 µL de medio en pozos de 48 y se incubaron por 3hrs a 37°C en atmósfera con CO₂ para permitir la formación de cristales de formazán. Pasadas las dos horas, se agregaron 100 µL de SDS al 10%, las placas se cubrieron con papel aluminio y

se dejaron toda la noche en temperatura ambiente. Dicho ensayo se realizó por triplicado.

La lectura se realizó al día siguiente en un equipo Epoch TM (Biotek, Microplate Spectrophotometer) a una absorbancia de 570 nm.

- **Segunda Parte: Extracción de RNA**

Se hicieron crecer durante 48 hrs las células PC3 en 12 frascos de 25 cm² con medio RPMI 1640 con rojo de fenol, suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 10%. Al observar una confluencia del 50%, se realizó la depleción hormonal como ya se mencionó anteriormente y se dejaron en crecimiento durante 24 hrs.

Posteriormente, se realizaron los tratamientos a las mismas por triplicado con BPA, BPS, BPF utilizando concentraciones de 5 nM por 48 hrs, además se realizó como control el vehículo utilizado para disolver los Bisfenoles, es decir, etanol filtrado, el vehículo se encontraba al 1% v/v para evitar el efecto tóxico del etanol.

Una vez transcurrido este tiempo, se procedió a la extracción del RNA (**Figura 14**). Utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen™) con el objetivo de preservar la integridad del RNA, mediante la inhibición de RNAsas.

El protocolo de extracción se efectuó de la siguiente manera:

1. Se utilizó Tripsina para separar la monocapa de células PC3 formada en los frascos de 25 cm².
2. Se centrifugó por 15 min a 12,500rpm a 4°C.
3. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 mL y se agregaron 200 µL de cloroformo frío y se homogeneizó en un vórtex (1 min en vórtex, 1 min en hielo) y se dejó reposar por 5 min.
4. Se centrifugó a 12,500 rpm/20min a 4°C.
5. Se colectó la fase acuosa con pipeta de 200 µL lentamente, cuidando no tomar proteínas. Se colocó la fase acuosa en un tubo estéril de 1.5 mL y se situó en hielo.
6. Se agregó el mismo volumen obtenido de muestra de isopropanol frío y se mezcló por inversión.
7. Se dejó precipitar toda la noche a -20°C.

8. Se centrifugó a 12500 rpm/15 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante por decantación sin perder el botón.
9. Se agregaron 700 uL de etanol al 75% frío.
10. Se centrifugó a 12500 rpm/15 min a 4°C y se retiró el sobrenadante por decantación, nuevamente, sin perder el botón.
11. Se agregaron 700 µL de etanol absoluto frío.
12. Se centrifugó a 12500 rpm/15 min a 4°C y se retiró el sobrenadante por decantación teniendo especial cuidado en no perder el botón.
13. Se dejó secar 7 min y se retiró el exceso de etanol con una punta amarilla sin tocar el botón.
14. Se resuspendió en 30 µL de agua libre de RNAsas (DEPC) fría, para su posterior cuantificación.

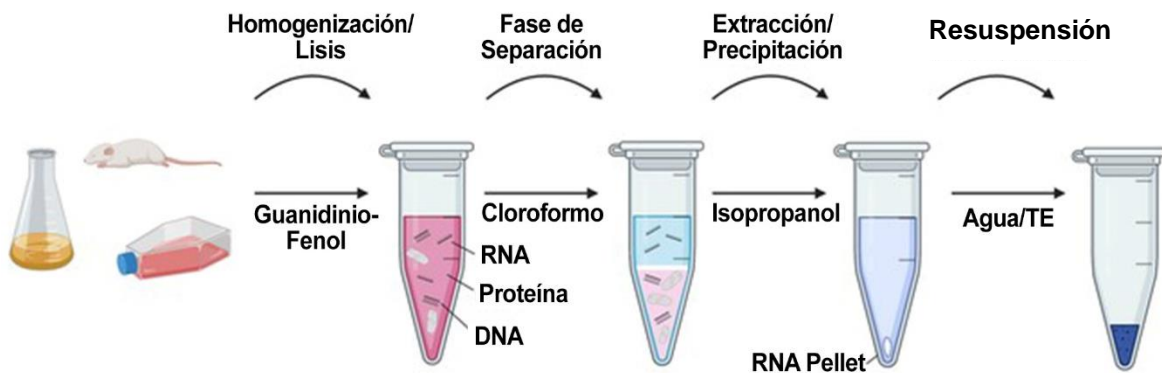


Figura 14. EXTRACCIÓN DEL RNA

Diagrama en el que se ejemplifican los pasos realizados para la extracción de RNA de las células PC3 tratadas con los distintos Bisfenoles a 5 nM de cada uno.

a. Cuantificación de RNA

Se cuantifico el RNA obtenido mediante el Espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 UV-Vis de Thermo Fisher Scientific. Para ello, se tomó 1 μL de agua DEPC en la platina del Espectrofotómetro, para tomar este, como Blanco. Posteriormente se limpió la platina y se colocó 1 μL de la muestra. Por último, se determinó la absorbancia a 260 nm, para obtener de esta manera la concentración de RNA en $\text{ng}/\mu\text{L}$.

Adicionalmente, dicho equipo nos permite conocer el coeficiente 260/280 el cual indica si existe una contaminación con proteínas y el coeficiente 260/230, el cual, por su parte, indica si existe contaminación con moléculas como Fenoles o guanidina. El valor del coeficiente 260/280 deber ser aproximadamente 2.0 para poder afirmar que se tiene un RNA libre de proteínas, mientras que el valor del coeficiente 260/230 oscila entre 1.8- 2.2. Y al estar en este rango, se considera aceptable para considerar que se carece de moléculas contaminantes en el RNA que se extrajo. El RNA del ensayo realizado, cumplió con ambas condiciones.

b. Integridad del RNA

Para evaluar la integridad del RNA, se realizó una electroforesis en gel de agarosa. Se preparó dicho Gel con Agarosa UltraPure™ al 1.5%, a esta preparación, de igual forma, se le añadieron 50 μL de agente intercalante GelRed.

Posteriormente, se montó el caster para verter el gel, se colocó la peiqueta con los pozos y se esperó hasta la gelificación. Una vez gelificado, se trasladó el gel a la cámara de electroforesis que fue llenada con TBE 0.5x. Se colocaron 2 μL de muestra, 2 μL de Buffer de carga y 1 μL de Gel Red 1x.

La electroforesis fue efectuada a 75 V durante 90 minutos (**Figura 15**). Una vez transcurrido el tiempo de la electroforesis, se reveló la integridad del RNA mediante el sistema BioRad en el que se observaron las bandas.

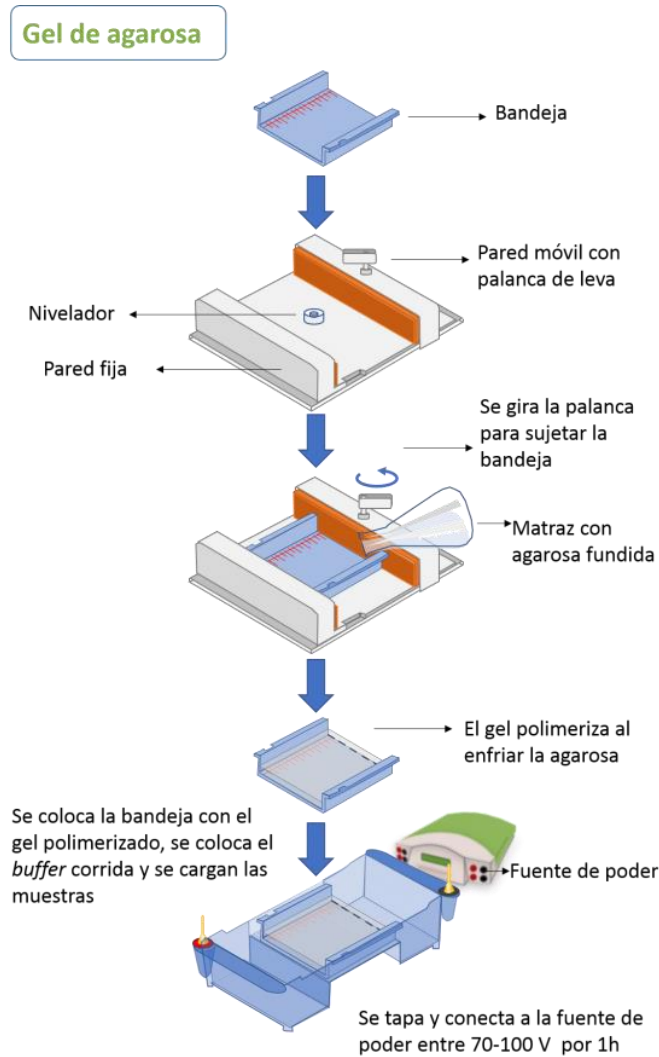


Figura 15. ELECTROFORESIS

Diagrama que ejemplifica la manera en la que se realizó la Electroforesis para evaluar la integridad del RNA obtenido.

c. Análisis de Calidad del RNA

Las muestras obtenidas de RNA disueltas en agua libre de RNAsas, fueron debidamente etiquetadas y analizadas por el departamento de Proteómica del INMEGEN.

En dicho análisis, se calcula el número de integridad de cada muestra de RNA como una medida cuantitativa de la calidad para el posterior análisis de Microarreglos. En este sentido, se utiliza el algoritmo del RIN dado que permite la clasificación de las muestras de RNA eucariótico total con base en un sistema numérico de 1 a 10, siendo 1 el valor para una muestra de RNA totalmente degradada y 10 el valor

obtenido para una muestra intacta. Este sistema permite comparar cuantitativamente la integridad de todas las muestras de RNA del experimento, ya que para que los resultados de microarreglos sean comparables todas las muestras deben tener una calidad similar.

Una vez hecho el análisis de calidad y ser aprobado, se procedió al análisis de microarreglos.

- ***Tercera parte: Microarreglos de Expresión***

Dado que era un Microarray de expresión, miRNA y splicing se incluyó el “Análisis Bioestadístico de datos” (limma o anova) dado que se trata de 3 o más réplicas: se procesaron los datos de fluorescencia (datos brutos) y se llevó a cabo la normalización robusta del promedio multichip (RMA), se realizó su valor de cambio de expresión de una condición respecto a su referencia, con los parámetros estadísticos apropiados para establecer un grado de credibilidad (p-value) y anotaciones sobre los transcritos (número de identificación de Affymetrix, símbolo del gen, nombre del gen y descripción con el número de acceso del transcrito correspondiente).

De igual forma, se utilizó el software gratuito de Affymetrix, TAC (*Transcriptome Analysis Console Software*) (TAC 4.0) basándonos en un estudio de variantes de splicing mediante Clariom D Array Human con sondas en exones y en las zonas de unión y alternativamente con los “Exon Array” que consta de 4 sondas/exón y 40 sondas/gen (10 exones). Para estudios de niveles de expresión génica y a nivel de exones.

Se utilizó un $pval \leq 0.05$, $FDR = False$, $-2 > FC < 2$, $DASH \geq 70\%$.

Tras obtener los genes que se encontraban mayormente expresados respecto al control y se sometieron a un análisis de sobre representación de vías utilizando la plataforma “Enrichr”. Este análisis computacional comprueba si un conjunto de genes de entrada se superpone significativamente con conjuntos de genes anotados.

IX.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Primera parte: Viabilidad celular

Para evaluar la viabilidad celular, se realizó un ensayo de MTT, el cual se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido.

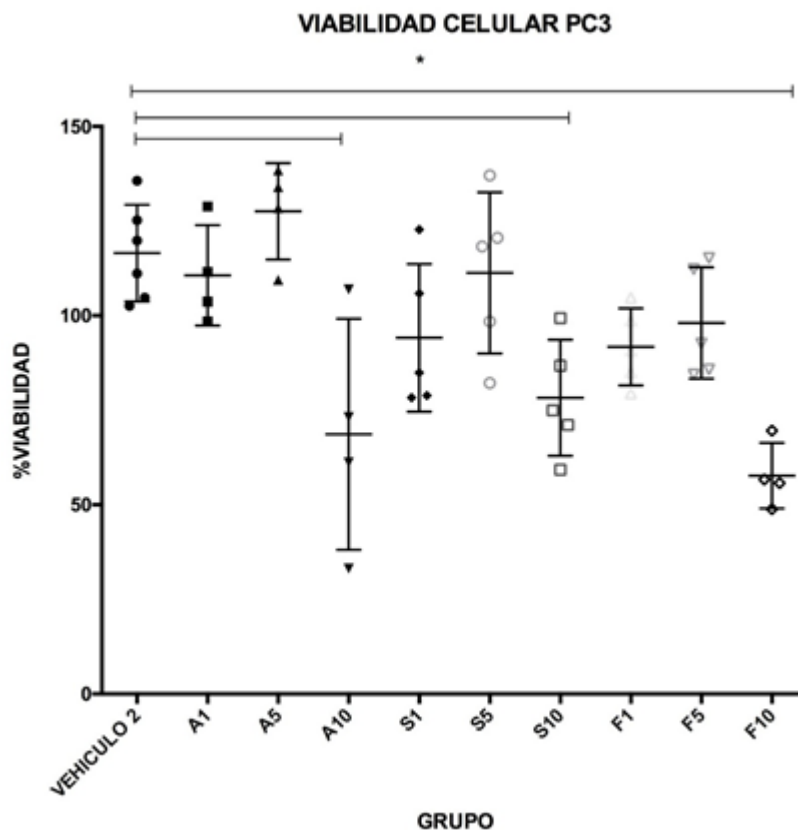


Figura 16. VIABILIDAD CELULAR DE PC3

Mediante prueba Anova de una vía para medir la variabilidad de los diferentes tratamientos: BPA, BPS y BPF ($P < 0.0001$ $\alpha < 0.05$). A1: Bisfenol A al 1 nM, A5: Bisfenol A al 5 nM, A10: Bisfenol A al 10 nM; S1: Bisfenol S al 1 nM, S5: Bisfenol S al 5 nM, S10: Bisfenol S al 10 nM; F1: Bisfenol F al 1 nM, F5: Bisfenol F al 5 nM, F10: Bisfenol F al 10 nM. En la figura se muestran los porcentajes de viabilidad del Vehículo y los tratamientos una vez que estos fueron normalizados respecto a un control, en el

que se utilizaron células sin ningún tratamiento, es decir, sólo con Medio RPMI + Rojo de Fenol como se ha descrito anteriormente en la metodología.

Se utilizaron como control células PC3 en medio RPMI + Rojo de fenol, apartir de los porcentajes de viabilidad obtenidos de dicho control, se normalizaron el resto de los tratamientos a los que fueron sometidas las líneas celulares (Bisfenoles y Vehículo). Como se observa en la **Figura 16**, el vehículo presentó porcentajes de viabilidad superiores al 100%. Dicho efecto, podría deberse a la normalización previa realizada con el Control.

Por otra parte y de igual manera, al observar la **Figura 16**, cuando se sometió a la línea celular PC3 a concentraciones bajas (5nM) de Bisfenoles (A, F y S), se presentó un decaimiento en la viabilidad celular. Esto es consistente con pruebas en modelos de roedores y líneas celulares de próstata humana en la que el BPA influye en la carcinogénesis al modular la viabilidad de células de cáncer de próstata. (Renaud et al., 2019)

Adicionalmente, en el mismo gráfico, se observa un comportamiento ambivalente, este comportamiento se ha caracterizado y nombrado como modelo de Relaciones Dosis-Respuesta No Monotonico (NMDR), el cual se ha observado en algunos disruptores endocrinos, incluidos el BPA.

La hipótesis más frecuente propuesta para explicar los perfiles de NMDR, está asociada con la inducción de efectos opuestos y se propone que podría ser iniciado por varias dianas moleculares (predominantemente receptores), activadas diferencialmente por la misma sustancia a diferentes niveles de concentración y dependerían de la afinidad de las dianas por la sustancia. Así bien, el BPA, dada su afinidad por ER α y ER β , podría inducir efectos opuestos en diversas células, tejidos u órganos a niveles específicos y a distintas concentraciones. Otra hipótesis comúnmente propuesta para explicar una NMDR son los mecanismos de regulación por retroalimentación negativa relacionados con el control endocrino fisiológico de las acciones hormonales. De igual manera, la desensibilización de los receptores también podría explicar las relaciones NMDR, siendo este fenómeno el resultado de un mecanismo que implica fosforilación de proteínas, endocitosis o represión de la expresión del receptor diana, lo que conduce a una disminución de la actividad del

receptor y a la insensibilidad de las células/tejidos a los ligandos a dosis más altas. Adicionalmente, se encontró en tres estudios que la desensibilización, presumiblemente a través de la expresión disminuida de los receptores diana (receptores de estrógeno) después de administrar una dosis alta de sustancia (disruptores endócrinos), era responsable de la NMDR observada. También se ha propuesto que la modulación de la expresión génica debido a la formación de dímeros de ligandos mixtos de receptores de hormonas esteroides puede explicar una NMDR (Lagarde et al., 2015).

Por otra parte, se considera que el BPA exhibe una actividad estrogénica débil basada en la afinidad de unión relativa del compuesto por los receptores nucleares ER α y ER β , que es \sim 1,000-10,000 veces menor que la afinidad del compuesto por el estradiol. ER α y ER β pueden estar involucrados en la regulación de la transcripción. Generalmente, ER α promueve la hiperplasia de las células epiteliales prostáticas, mientras que ER β posee efectos antiproliferativos, que contribuye al mantenimiento de un equilibrio dinámico entre la promoción y la inhibición del crecimiento celular. BPA se combina con ER y las respuestas de ER α y ER β a BPA difieren ya que BPA se une a ER α con una afinidad menor en comparación con ER β , lo que en consecuencia, promueve la proliferación e inhibición celular observando dicho efecto mayormente notorio en las células tratadas con dosis más bajas, 0.01-1 nM, de Bisfenoles, mientras que a dosis de Bisfenoles 5nM pueden mostrar solo leves efectos citotóxicos (Huang et al., 2017).

Segunda Parte: Extracción de RNA

- Análisis de Calidad del RNA

DATOS:

Número de Muestras: 12

CHIP: Eukaryote Total RNA Nano

TABLA 3. ANALISIS DE CALIDAD DEL RNA

#	ID Muestra	[RNA] (ng/ μ L)	260/280	260/230	RIN
1	PC3-Ctrl1	94.15	1.83	2.29	9.50
2	PC3-Ctrl2	66.17	1.80	2.24	9.00
3	PC3-Ctrl3	92.31	1.83	2.42	10.0
4	PC3-A5-1	87.68	1.90	1.79	8.80
5	PC3-A5-2	105.9	1.83	2.35	9.30
6	PC3-A5-3	95.06	1.80	2.36	10.0
7	PC3-S5-1	101.37	1.91	1.74	9.80
8	PC3-S5-2	100.95	1.84	2.28	9.60
9	PC3-S5-3	88.08	1.89	2.33	9.90
10	PC3-F5-1	104.28	1.84	2.23	9.70
11	PC3-F5-2	110.05	1.84	2.29	9.20
12	PC3-S5-3	111.93	1.87	2.26	10.0

Tabla.3 Se muestra el análisis de calidad realizado a todas las muestras de RNA obtenido con los tratamientos de BPA (PC3-A5-1, 2 y 3), BPS (PC3-FS-1, 2 y 3) y BPF (PC3-F5-1, 2 y 3) a 5 nM así como las muestras control (PC3-Ctrl1, 2 y 3) para la línea celular PC3.

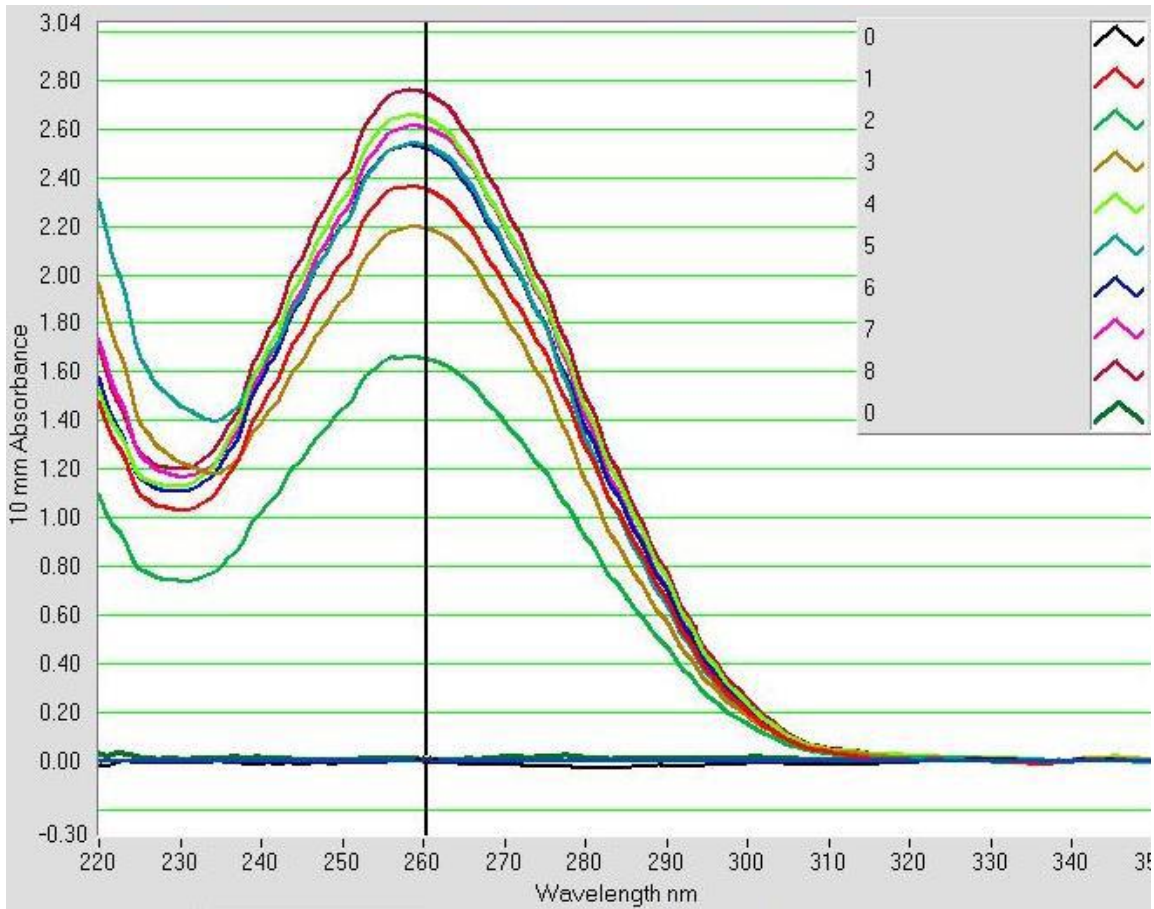


Figura 17. PLOT DE ABSORBANCIA

Se muestran los Plots de Absorbancia de las muestras control, BPA, BPS y BPF 1 y 2. Donde el valor máximo de absorbancia corresponde al RNA (260 nm), mientras que la absorbancia que corresponde a 230 nm y 280 nm indican la presencia de contaminantes y proteínas, respectivamente.

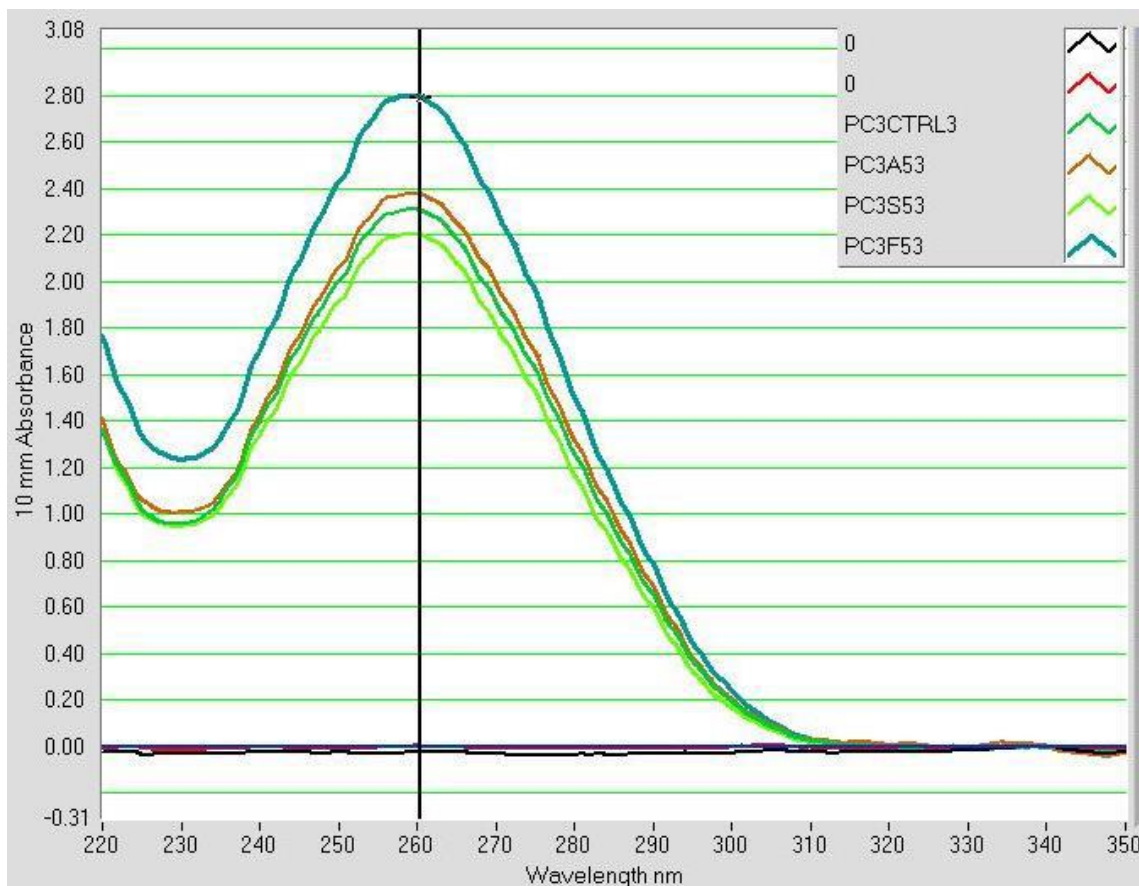


Figura 18. PLOTS DE ABSORBANCIA

Se muestran los Plots de Absorbancia de las muestras Control, BPA, BPS y BPF que corresponden al número 3. Donde el valor máximo de absorbancia corresponde al RNA (260 nm), mientras que la absorbancia que corresponde a 230 nm y 280 nm indican la presencia de contaminantes y proteínas, respectivamente.

Uno de los componentes que introduce variación al ensayo de Microarreglos es la muestra en sí, el éxito de este ensayo depende en gran parte de la calidad de la muestra obtenida. El RNA total debe estar intacto y puro, no debe contener proteínas ni DNA contaminante (González, 2010). Mediante espectrofotometría se logró determinar la concentración y la pureza de las muestras de RNA control y tratadas con BPA y sus análogos, basándonos en la capacidad de los ácidos ribonucleicos de absorber eficientemente luz ultravioleta (UV), debido a la presencia de las bases aromáticas nitrogenadas o nucleótidos, los cuales contribuyen de manera diferente a la propiedad total de absorción de UV de una molécula de RNA a 260 nm es por eso que en los Plots de absorbancia obtenidos (**figuras 17 y 18**) se observa el máximo pico de absorbancia en esta longitud de onda, lo cual indica

la presencia de RNA. De igual manera, la espectrofotometría nos permite conocer los picos de absorbancia a las longitudes de onda: 230 nm y 280 nm (**figuras 17 y 18**), estos valores son útiles para obtener los coeficientes 260/280 y 260/230 los cuales indican si existe una contaminación con proteínas o con moléculas como Fenoles o guanidina. Así, el valor del coeficiente 260/280 deber ser aproximadamente 2.0 para poder afirmar que se tiene un RNA libre de proteínas, mientras que el valor del coeficiente 260/230 oscila entre 1.8- 2.2 y como se observa en la **tabla 3** las muestras de RNA obtenido con los tratamientos de BPA, BPS y BPF a 5 nM así como las muestras control para la línea celular PC3, tuvieron valores que se encuentran en los rangos anteriormente mencionados. En el caso del coeficiente 260/280 los valores obtenidos son mayores a 1.8, por lo que se considera que el RNA extraído posee una pureza óptima (Salamanca, 2020).

Por otro lado, los valores del coeficiente 260/230 a excepción de los valores de las muestras PC3-S5-1 y PC3-A5-1, son mayores a 2.0 por lo que se consideraron muestras con pureza óptima. Respecto a las muestras PC3-S5-1 y PC3-A5-1, que poseen valores menores a 1.8, se consideran muestras contaminadas con sales, fenol, entre otros. No obstante, esta relación resulta mucho más variable que la relación A260/280 dependiendo de factores como la concentración de ARN o de la composición del vehículo en el que se resuspenden las muestras. Sin embargo, la impureza en estas muestras, se consideró irrelevante ya que no podría comprometer su funcionalidad (Salamanca, 2020).

Adicionalmente, mediante el equipo Agilent que combina la tecnología de microelectroforesis y fluorescencia. Pequeñas cantidades de muestra de ARN fueron separadas por su tamaño molecular y detectadas mediante fluorescencia. El resultado se visualiza en un electroferograma donde la cantidad de fluorescencia medida se correlaciona con la cantidad de ARN de un tamaño determinado (**Figura 20**). El software del equipo de dicha tecnología calcula un algoritmo a partir de la información obtenida del análisis electroforético teniendo en cuenta el electroferograma resultante. El valor obtenido se denomina RIN (número de integridad de ARN) y proporciona un valor numérico a la integridad del RNA. En este

sistema numérico, se asignan valores del 1 al 10, en el que se asignan siendo 1 el valor para una muestra de RNA totalmente degradada y 10 el valor obtenido para una muestra intacta. (Schroeder, 2006)

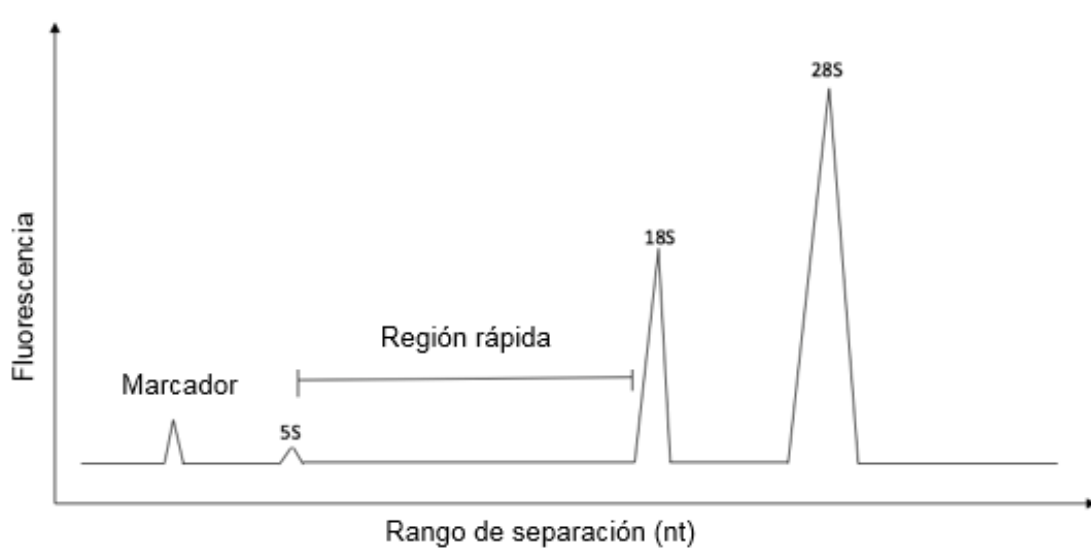


Figura 19. ELECTROFEROGRAMA IDEALIZADO CON RIN DE APROXIMADAMENTE 10.

Se muestra una versión etiquetada e idealizada del rastro del electroferograma. En un electroferograma real, habría muchos picos pequeños, especialmente en la región rápida correspondiente a los ARNm. En este electroferograma se muestran los picos 5S a los 121 nt aproximadamente, 18S a los 1869 nt y 28S a los 5070 nt. Imagen modificada de: http://www.ihb.ac.cn/fxcsczx/fxcsc_xgxz/201203/P020120322529861139260.pdf

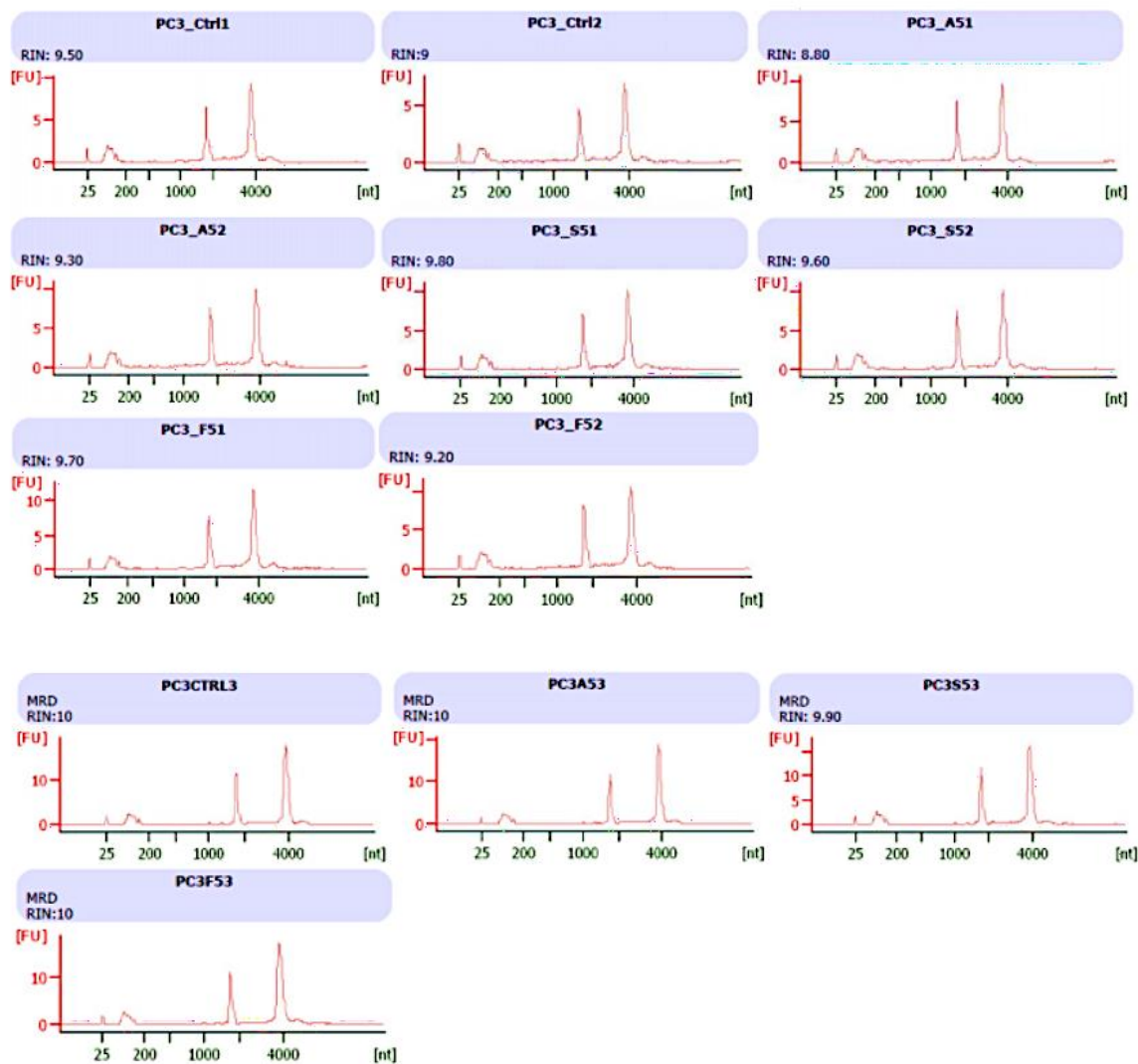


Figura 20. ELECTROFEROGRAMAS DE BIOANALIZADOR

En estos Electroferogramas se evalúa el Algoritmo RIN para la línea celular de CaP (PC3) tratada con Bisfenol A y sus análogos a una concentración de 5 nM, se muestra un valor de RIN adecuado para todas las muestras, correspondiendo a muestras intactas.

Tomando en cuenta el Electroferograma idealizado con un RIN de 10 y utilizándolo como referencia (**Figura 19**). Se compararon los Electroferogramas de bioanalyzer obtenidos para las muestras de RNA (**Figura 20**), considerando ambos Electroferogramas (ideal y experimental) bastante parecidos. Además se tomaron en cuenta los valores de RIN obtenidos, y dado que las muestras tuvieron valores de RIN mayores a 7, se consideraron muestras con integridad alta, por lo que se pudieron utilizar para el posterior estudio de expresión génica (Salamanca, 2020).

- **Tercera parte: Microarreglos de Expresión**

Analysis 6

Data Created: 09/08/2020 11:08:47 a. m.
 Array Type: Clariom_D_Human
 Analysis Type: Expression (Gene + Exon)
 Analysis Version: version 2
 Summarization Method: Gene + Exon - SST-RMA
 Pos vs Neg AUC Threshold: 0.7
 Genome Version: hg38 (Homo sapiens)
 Annotation: Clariom_D_Human.r1.na36.hg38.a1.transcript.csv
 Map File: Clariom_D_Human.r1.map
 Condition (Comparison): BPA 5nM; BPF 5nM; BPS 5nM; CTRL -

Expression Analysis Settings:

- Gene-Level Fold Change < -2 or > 2
- Gene-Level P-Value < 0.05
- Splicing Index < -2 or > 2
- Exon-Level P-Value < 0.05
- Anova Method: ebayes
- A Probeset (Gene/Exon) is considered expressed if ≥ 70% samples have DABG values below DABG Threshold.
- DABG < 0.05
- Event Algorithm Method: Both
- Event Pointer P-Value < 0.1
- Event Score > 0.2

Figura 21. ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO RESUMEN

En dicha figura se muestran las condiciones del análisis realizado en el programa Transcriptome Analysis Console (TAC 4.0). Se utilizó el método Bayesiano, el cual, en todo un número de eventos, interpreta la probabilidad como frecuencia. Se utilizó un Fold Change de 2 veces más y 2 veces menos en los que se considera que tan mayor o mejor está expresado un gen respecto al control. De igual manera, un pValue <0.05 para que este análisis se considere significativo. De igual manera, se asignó un porcentaje igual o mayor al 70% para determinar que la expresión de los genes es mayor al ruido, además porque se utilizaron 3 replicas de cada muestra y el control.

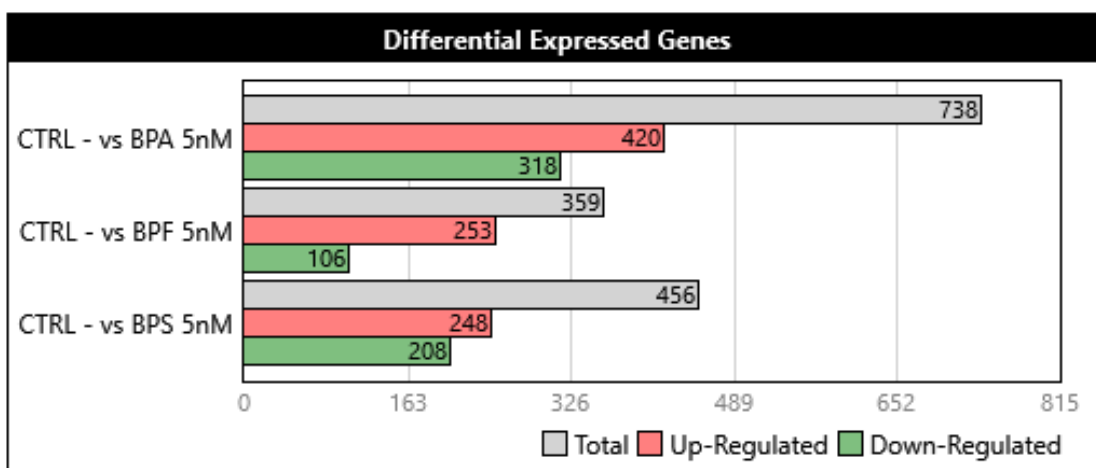


Figura 22. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS

Resumen de los Genes expresados diferencialmente comparando el Control vs los tratamientos con BPA, BPF y BPS (5 nM). Se muestran los genes que están positivamente regulados con coloración roja y negativamente regulados con coloración verde. En el caso de BPA se obtuvieron 738 genes,

de los cuales 420 se encontraron regulados positivamente y 318 negativamente. Para el BPF se obtuvo un total de 359 genes, de los cuales, 253 se encontraron regulados positivamente mientras que 106 se encontraron regulados negativamente. Y, por ultimo, en el caso de BPS, se obtuvieron un total de 456 genes, de los cuales 248 se encontraron regulados postivamente y 208 negativamente, En términos generales, los tratamientos regularon mayor numero de genes positivamente que negativamente, respecto al control.

Bisfenol A (5 nM)

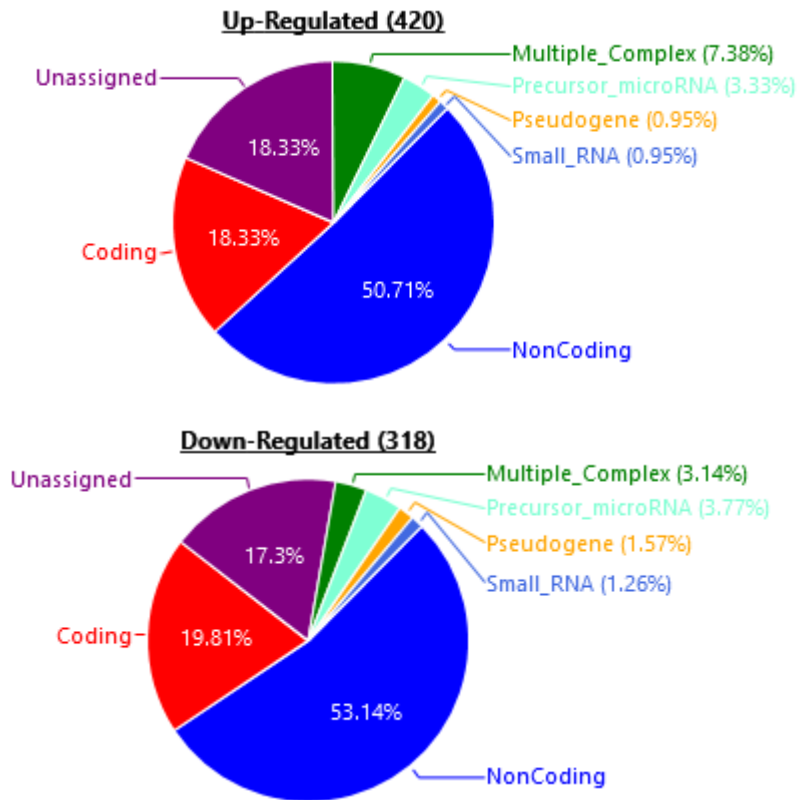


Figura 23. GENES REGULADOS AL ALZA Y A LA BAJA: BISFENOL A

Se muestra mediante Gráficos de Pastel, en cantidad los genes que están regulados al alza y a la baja al comparar el Control vs BPA 5nM. De igual manera, en porcentajes, se muestran cuáles de estos genes pertenecen a complejos múltiples (color verde), Precursores de microRNA (color turqués), Pseudogenes (color anaranjado), RNAs pequeños (color azul claro), cuales son no codificantes (color azul rey), codificantes con color rojo y no asignados con color morado. Si bien, se encontraron mayor numero de genes no codificantes regulados al alza y a la baja tras el tratamiento de BPA, no se consideraron para el posterior analisis de sobrerepresentacion de vías ya que se requeriria de herramientas más sofisticadas.

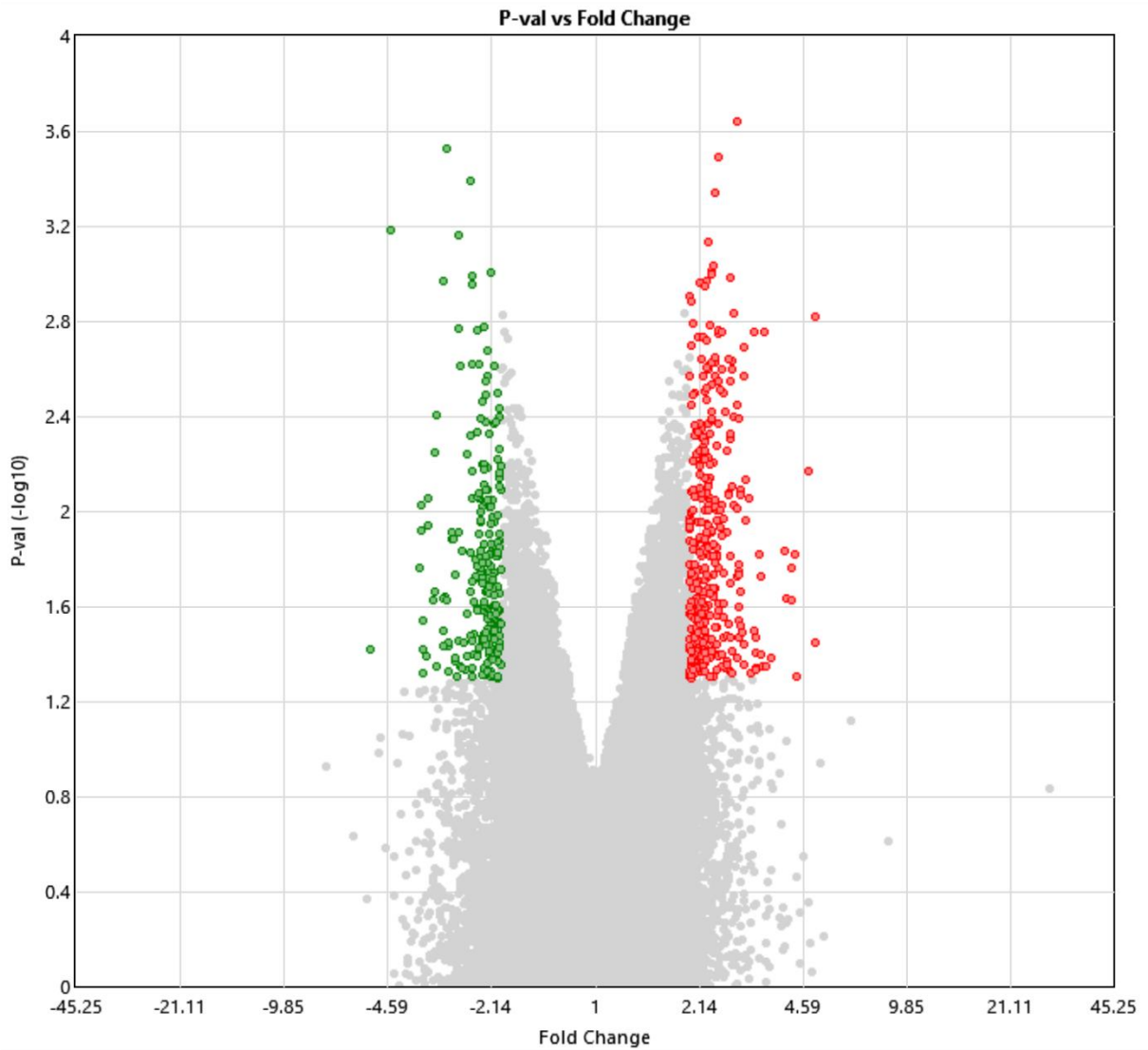


Figura 24. VOLCANO PLOT: BISFENOL A

En este gráfico Volcano Plot, destaca de colores azul y rojos aquellos que pasan los umbrales para los valores de Fold Change asignados <-2 o >2 y $-\log_{10}$ de pValue, es decir, $-\log(0.05)=1.3$. En este sentido, los genes representados por puntos rojos, son aquellos que están regulados al alza (420) mientras que los puntos que corresponden al color verde (318).

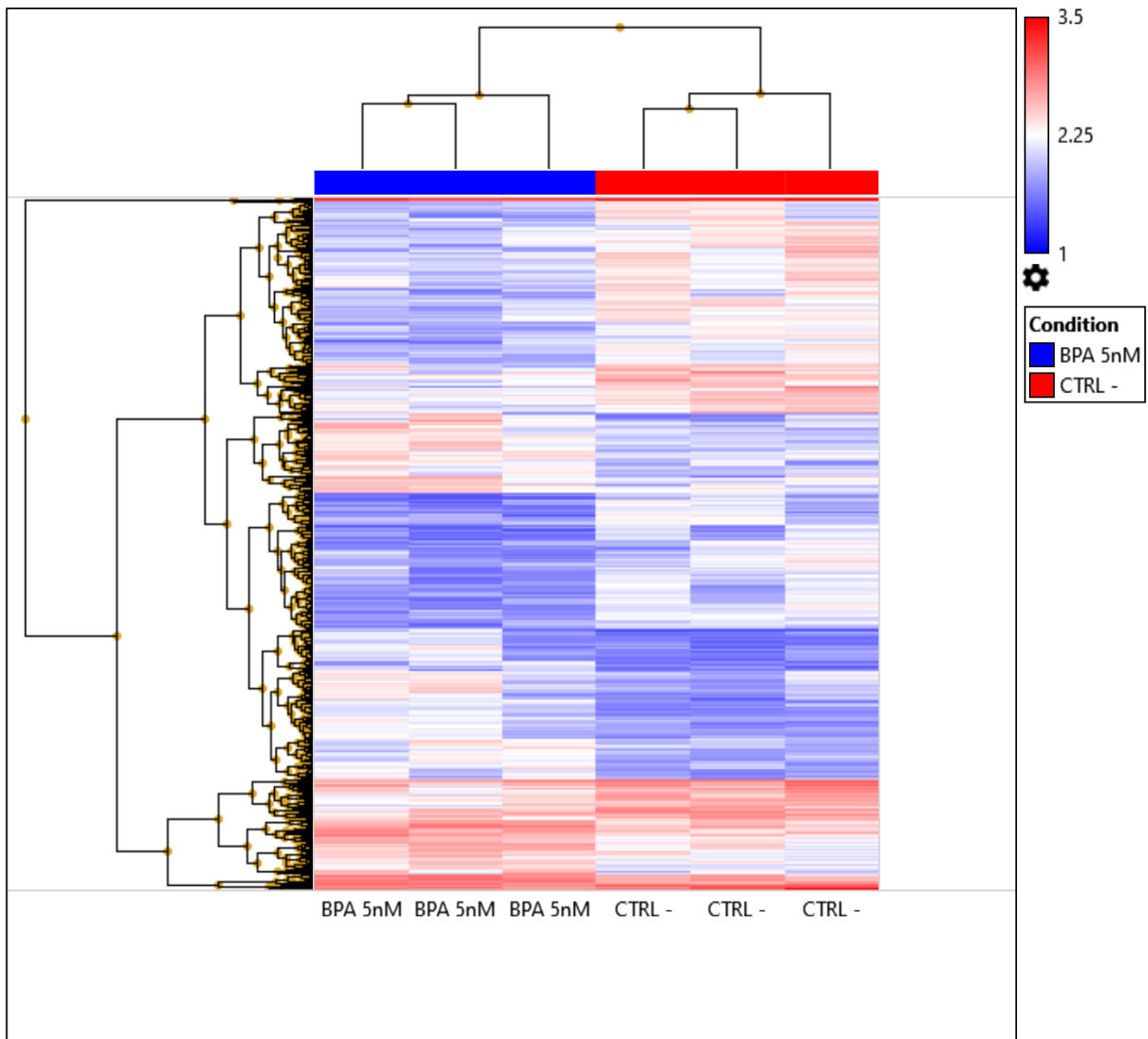


Figura 25. MAPA DE CALOR: BISFENOL A

Se muestra un mapa de calor, en el los niveles de expresión génica, nos permite diferenciar los patrones observados en las células tratadas con BPA 5 nM vs Control. De esta manera, es posible ver dos grandes clusters en los que podemos mencionar que los genes de color azul, poseen una expresión baja mientras que los genes que posee una expresión alta son de color rojo. Así se puede observar que ciertos genes en el Control poseen alta expresión y se observan de color rojo y por el contrario, esos mismos genes poseen baja expresión tras someter a las células PC3 a BPA 5 nM. Estos patrones de expresión génica son de utilidad para inferir que hay diferencia en los niveles de expresión genica en las células PC3 al ser tratadas con BPA 5 nM vs el Control (Vehículo).

Tras haber seleccionado todos los genes que se encontraban regulados positivamente en las células PC3 tras ser tratadas con BPA 5 nM, estos se sometieron a posterior análisis (sobrerrepresentación de vías) en el que se evidencian las posibles vías biológicas en las que están involucrados (**Figura 26**).

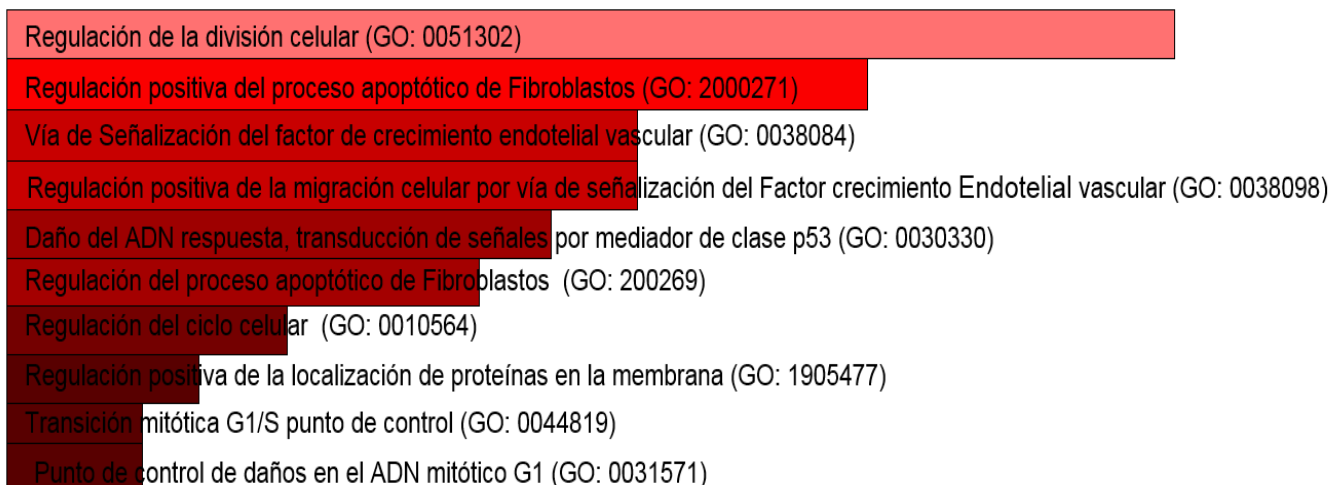


Figura 26. ANÁLISIS DE SOBRRERREPRESENTACIÓN DE VÍAS: BISFENOL A

Análisis de Enriquecimiento de vías PC3 tratadas con BPA (5 nM). Base de Datos GO Biological Process 2018. En dicha figura se destacan distintas vías biológicas sobrerrepresentadas mediante un gráfico de barras, ordenado por significancia, es decir, cuanto mayor longitud tiene la barra y cuanto más claro sea el color rojo que la colorea, el término será más significativo. De esta manera, se observa que la regulación de la división celular es el término más significativo, seguido de la regulación positiva del proceso apoptótico de fibroblastos y la vía de señalización del factor del crecimiento endotelial vascular. Además, aunque con menos significancia, se observa una sobrerrepresentación de vías involucradas en el daño al DNA y la regulación del ciclo celular. Lo cual, nos permite dilucidar el efecto que tiene el BPA a nivel transcripcional en la línea celular PC3.

Como se observa en la **Figura 26**, el tratar a la línea celular PC3 con BPA 5 nM ocasionó la sobrerrepresentación de diversas vías biológicas, dentro de las que se destacan: vías que regulan el ciclo celular, la reparación del ADN y vías de señalización apoptótica.

Por su parte, la vía de señalización apoptótica, dado que es un mecanismo mediante el cual se regulan una serie de funciones tales como: la morfogénesis, la proliferación, el control del número de células en los organismos multicelulares, así como la eliminación de células que presentan alteraciones o daño a nivel genético, si esta se encuentra sobrerrepresentada, podría ocasionar un decaimiento en la proliferación celular puesto que al ser expuestas a un xenobiotico como es el BPA,

se compensaría el daño ocasionado a las células tratadas mediante la eliminación de estas. (“Redalyc.Cáncer de Próstata y Apoptosis.” 2011).

Por su parte, las vías de reparación del ADN se consideran clave para el desarrollo del cáncer y al estar sobrerrepresentadas tras el tratamiento con BPA, podría ser indicativo de que se han generado defectos en alguno de los procesos pertenecientes a esta vía lo cual a su vez, ocasiona acumulación de estos daños y a la larga alterarán el comportamiento de la célula, logrando que se multiplique más rápidamente y se desprenda del tejido de origen para diseminarse hacia otras partes del cuerpo (Lagunas, 2018).

De igual manera, como se observa en la Figura 26 hay una sobrerrepresentación de la vía biológica relacionada con el factor de crecimiento endotelial y la angiogénesis, esta vía cobra relevancia en la proliferación y la diseminación metastásica de células cancerosas puesto que estas dependen de un suministro adecuado de oxígeno, nutrientes y de la eliminación de productos de desecho, el cual es favorecido mediante el crecimiento de la red vascular. En este sentido se ha demostrado que el BPA promueve la angiogénesis más adelante en la vida después de la exposición prenatal (Renaud et al., 2019).

Por otra parte, respecto a la detección del ciclo celular que provoca la exposición a BPA a las líneas celulares de CaP, se ha planteado una hipótesis que podría explicarla. En dicha hipótesis se argumenta que depende de una activación fuerte y rápida del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que estimula la quinasa regulada por señal extracelular (ERK), esto, a su vez, induce la expresión de p53 y su fosforilación en el residuo Ser15, por tanto, se estabiliza p53. Esto da como resultado un aumento de los niveles de expresión de p27 y p21 y una regulación negativa de la proteína ciclina D1, lo que conduce a la detención del ciclo celular (**Figura 27**) (Derouiche et al., 2013) (Bilancio et al., 2017).

Sin embargo, actualmente también se propone que *in vivo*, el BPA induce la apoptosis de las células germinales mediante un mecanismo que implica la activación de la metaloproteasa ADAM17 (Urriola-Muñoz et al., 2018).

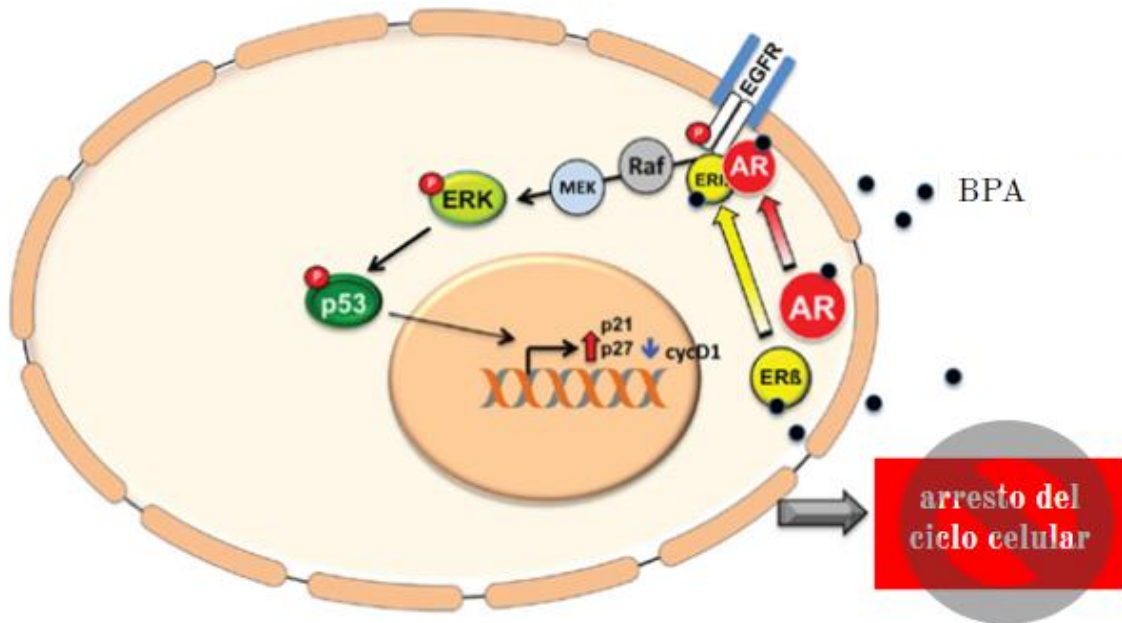


Figura 27. MODELO DE VÍA DE ACTIVACIÓN: BISFENOL A

El bisfenol A estimula la fosforilación del EGFR y desencadena el ensamblaje del complejo EGFR / AR / ERβ. El tratamiento con BPA induce la actividad de ERK y la consiguiente fosforilación de p53 en el residuo Ser15 y, por tanto, la estabilización de p53. Esto da como resultado un aumento de los niveles de expresión de p27 y p21 y una regulación negativa de la proteína ciclina D1, lo que conduce a la detención del ciclo celular. Fuente: <https://www.oncotarget.com/article/23360/text/>

Bisfenol F (5 nM)

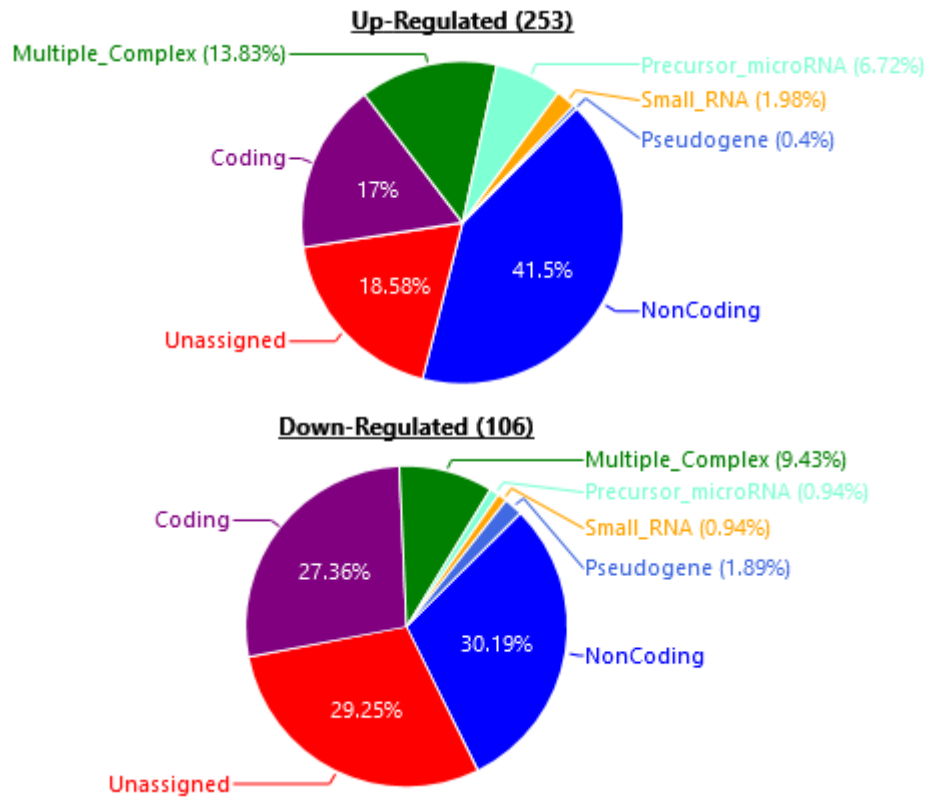


Figura 28. GENES REGULADOS AL ALZA Y A LA BAJA: BISFENOL F

Se muestra mediante Gráficos de Pastel, en cantidad los genes que están regulados al alza y a la baja al comparar el Control vs BFA 5nM. De igual manera, en porcentajes, se muestran cuáles de estos genes pertenecen a complejos múltiples (color verde), Precursores de microRNA (color turqués), Pseudogenes (color anaranjado), RNAs pequeños (color azul claro), cuales son no codificantes (color azul rey), codificantes con color rojo y no asignados con color morado. Si bien, se encontraron mayor numero de genes no codificantes regulados al alza y a la baja tras el tratamiento de BPF como se observó para el BPA en la figura 26, no se consideraron para el posterior analisis de sobrerepresentacion de vías ya que se requeriria de herramientas más sofisticadas.

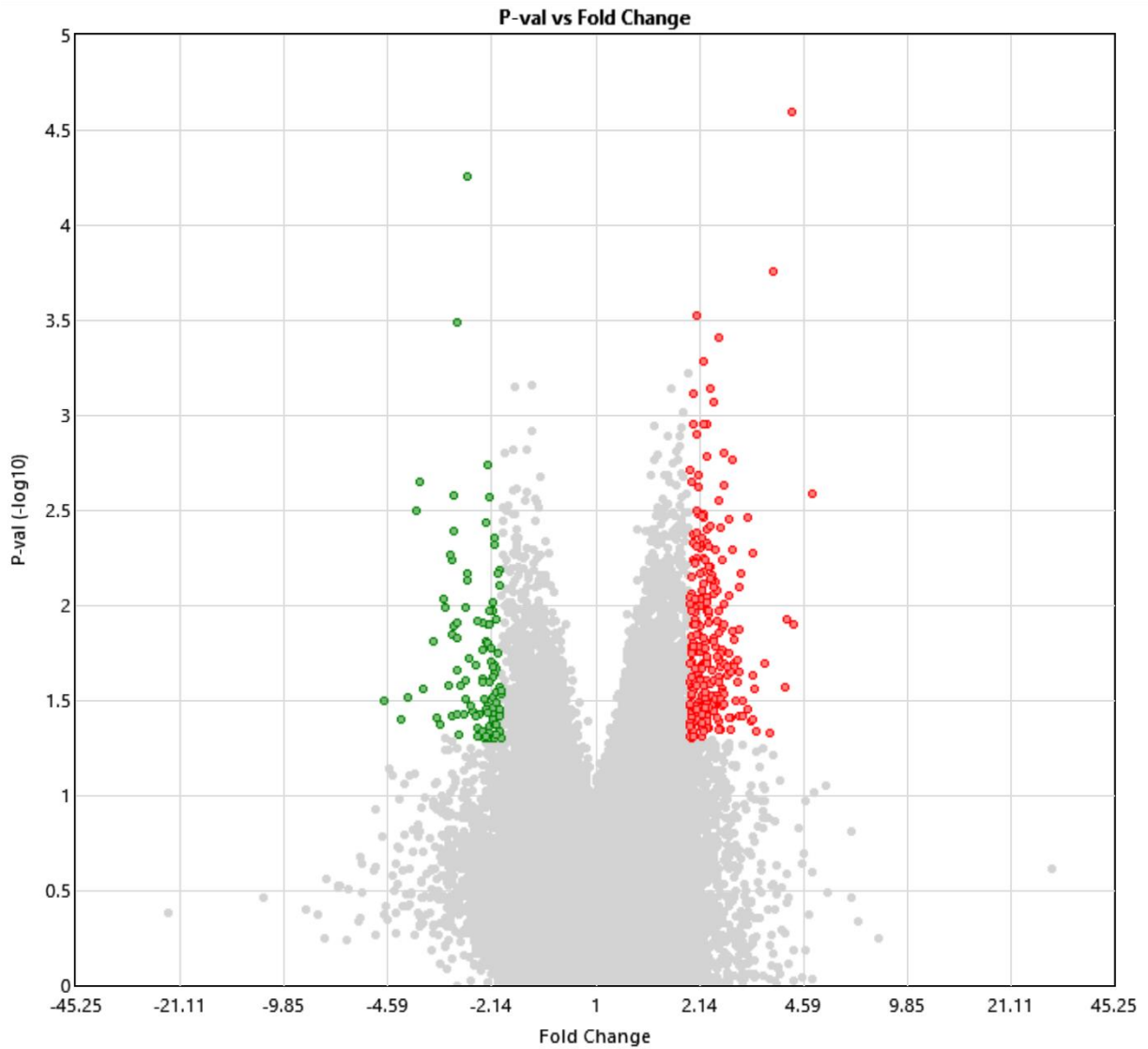


Figura 29. VOLCANO PLOT: BISFENOL F

En este gráfico Volcano Plot, destaca de colores azul y rojos aquellos que pasan los umbrales para los valores de Fold Change asignados <-2 o >2 y $-\log_{10}$ de pValue, es decir, $-\log(0.05)=1.3$. En este sentido, los genes representados por puntos rojos, son aquellos que están regulados al alza (253) mientras que los puntos que corresponden al color verde (106).

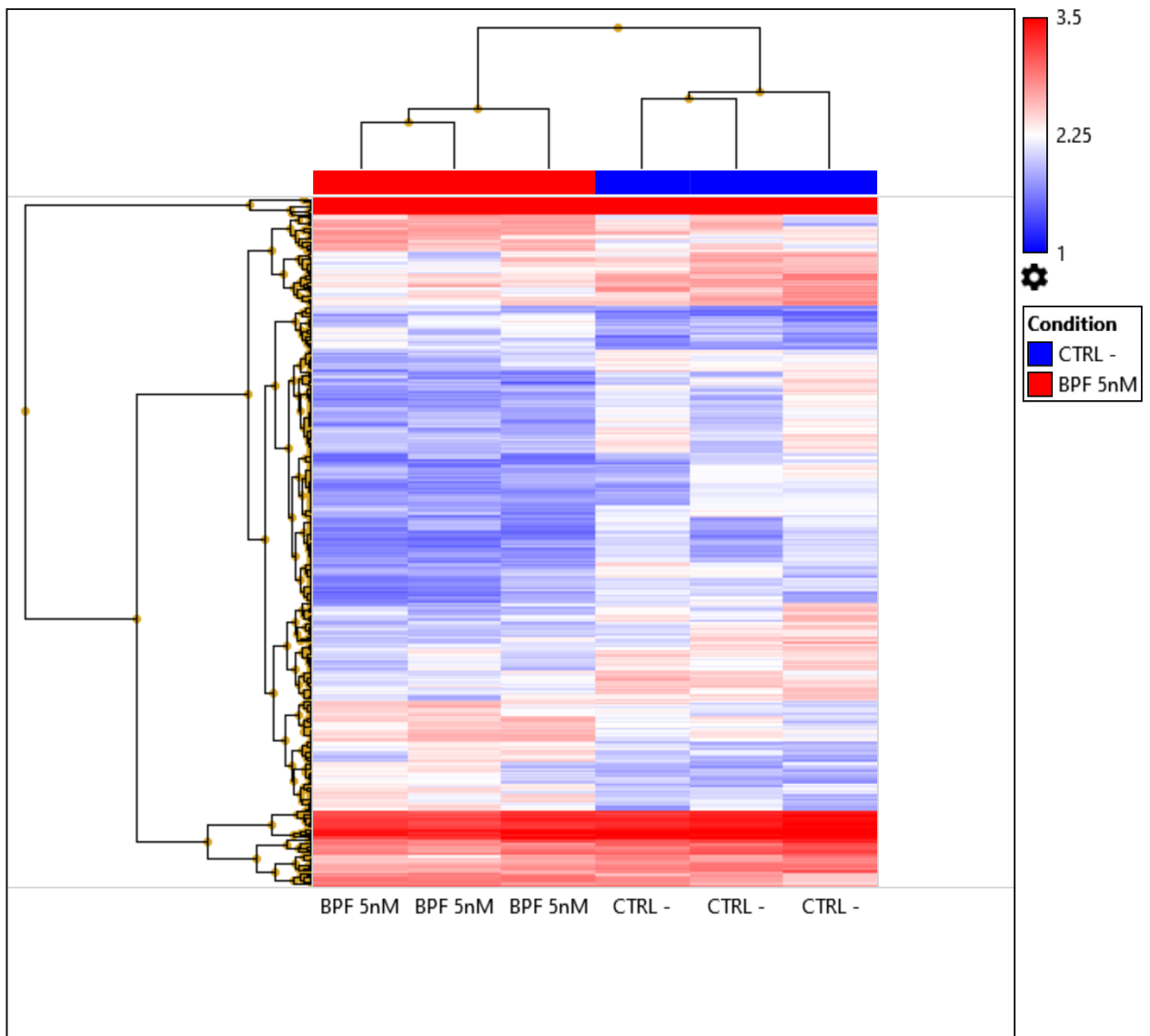


Figura 30. MAPA DE CALOR: BISFENOL F

Se muestra un mapa de calor, en el los niveles de expresión génica, nos permite diferenciar los patrones observados en las células tratadas con BPF 5 nM vs Control. De esta manera, es posible ver dos grandes clusters en los que podemos mencionar que los genes de color azul, poseen una expresión baja mientras que los genes que posee una expresión alta son de color rojo. Así se puede observar que ciertos genes en el Control poseen alta expresión y se observan de color rojo y por el contrario, esos mismos genes poseen baja expresión tras someter a las células PC3 a BPF 5 nM. Estos patrones de expresión génica son de utilidad para inferir que hay diferencia en los niveles de expresión genica en las células PC3 al ser tratadas con BPF 5 nM vs el Control (Vehículo).

De igual manera, como se realizó con el BPA 5 nM, en el caso del BPF 5 nM tras seleccionar aquellos genes que se encontraban regulados positivamente en las células PC3 (Figuras 28, 29 y 30), estos se sometieron a posterior análisis (sobrerrepresentación de vías) en el que se evidencian las posibles vías biológicas en las que están involucrados (Figura 31).

- **Bisfenol F**

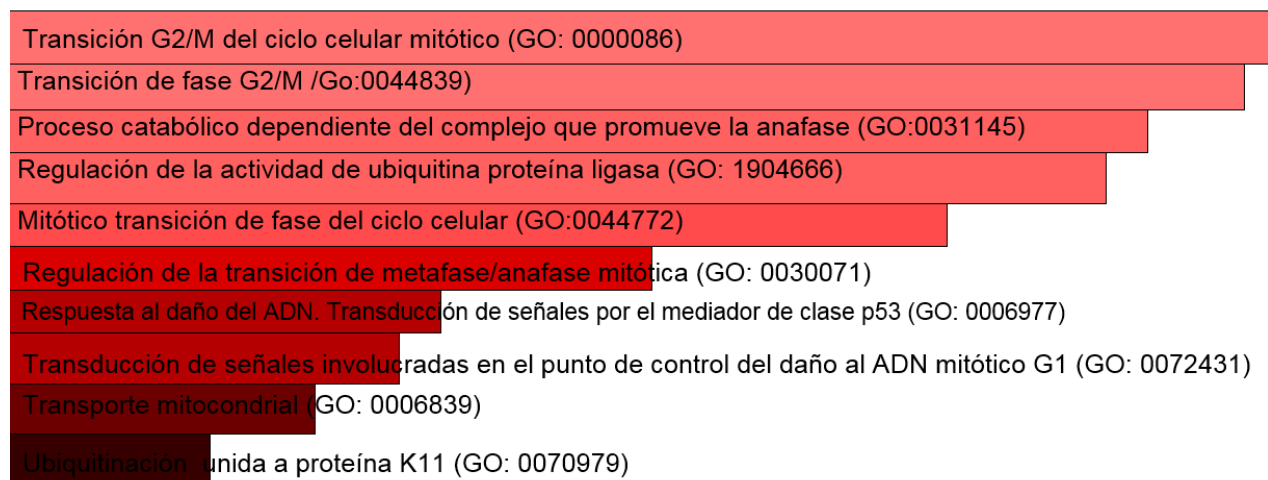


Figura 31. ANÁLISIS DE SOBRRERREPRESENTACIÓN DE VÍAS: BISFENOL F

Análisis de Enriquecimiento de vías PC3 tratadas con BPF (5 nM). Base de Datos GO Biological Process 2018. En dicha figura se destacan distintas vías biológicas sobrerrepresentadas mediante un gráfico de barras, ordenado por significancia, es decir, cuanto mayor longitud tiene la barra y cuanto más claro sea el color rojo que la colorea, el término será más significativo. De esta manera, se observa que la Transición G2/M del ciclo celular mitótico es el término más significativo, seguido del proceso metabólico dependiente del complejo que promueve la anafase y la regulación de la actividad de ubiquitina proteína ligasa. De igual manera, aunque con menos significancia, se observa una sobrerrepresentación de vías involucradas en el daño al DNA y transducción de señales por el mediador de clase p53. Lo cual, nos permite dilucidar el efecto que tiene el BPF a nivel transcripcional en la línea celular PC3.

Como se muestra en la **Figura 31** el Bisfenol F provocó una sobrerrepresentación en vías involucradas en el ciclo celular, tanto en la etapa G2/M como en la transición para la etapa mitótica, así como en vías involucradas en el daño al DNA y transducción de señales por el mediador de clase p53. En este sentido, cabe mencionar que la proteína p53 es un factor de transcripción cuya actividad está involucrada en múltiples procesos celulares, dentro de los cuales se encuentra el arresto del ciclo celular, la apoptosis y diferenciación celular, entre otros. Dicha proteína está ubicada en el centro de las vías de respuesta al estrés, activándose

(por modificaciones post-traduccionales) cuando existe daño al DNA, hipoxia o activación de oncogenes.

Dentro del Ciclo celular, esta proteína constituye un punto de control en las transiciones G2/M, así bien, al estar sobrerrepresentada, nos permite deducir que el daño al DNA se ha producido luego de la replicación del DNA y que dicho daño ha sido reparado por p53, dado que se ha reportado que esta proteína arresta a la célula en G2/M uniéndose al promotor del gen de ciclina B bloqueando su transcripción. Lo cual, explicaría que a diferencia del BPA, el BPF no es capaz de provocar una sobrerrepresentación de vías apoptóticas, pues estas se activan sólo cuando el daño al DNA es irreparable (masivo). En estos casos, p53 puede llevar a la muerte celular por apoptosis activando los genes requeridos para ambas vías de muerte: mitocondrial y receptor de muerte (Antonio & Ram, 2007).

Por otra parte, se observa una sobrerrepresentación de la regulación de la actividad de la proteína ligasa de ubiquitinación, respecto a este sistema de ubiquitinación, se sabe que son una gran familia de proteínas que participan en la regulación del recambio y la actividad de muchas proteínas diana. De las enzimas que lo conforman, se ha descrito la existencia de genes que codifican para enzimas de tipo E1, mientras que para las enzimas del tipo E2 y E3 existen un mayor número (Zamudio-arroyo et al., 2012).

Junto con la enzima activadora de ubiquitina E1 y la enzima conjugadora de ubiquitina E2, las ligasas de ubiquitina E3 catalizan la ubiquitinación de una variedad de sustratos proteicos biológicamente significativos para la degradación dirigida a través de la subunidad 26S del proteasoma, así como para la regulación no proteolítica de sus funciones o localizaciones subcelulares. Las ligasas de ubiquitina E3, por lo tanto, desempeñan un papel esencial en la regulación de muchos procesos biológicos. Lo cual, podría explicar que dicha vía se observe sobrerrepresentada tras el tratamiento del Bisfenol F, dado que, mediante la ubiquitinación y degradación oportuna de una variedad de proteínas reguladoras del ciclo celular y la apoptosis, se enmienda el daño a nivel transcripcional que es presuntamente causado por esta sustancia exógena. Adicionalmente, se ha

descubierto evidencia que sugiere fuertemente que la regulación anormal de algunas ligasas E3 está involucrada en el desarrollo del cáncer (YinSun, 2006). De igual manera, justificando la sobrerrepresentación de las vías involucradas en el ciclo celular, se sabe que existen dos ubiquitin-ligasas diferentes que juegan un papel importante en este proceso: el SCF (Skp1 / Cullin / F-box) y el complejo promotor de anafase (APC). El SCF está activo durante todo el ciclo celular; sin embargo, controla principalmente los límites G1/S y G2/M induciendo la degradación de diferentes factores en estas fases del ciclo celular. Mientras que el APC se requiere principalmente para inducir la progresión y la salida de la mitosis induciendo la proteólisis de diferentes reguladores del ciclo celular, siendo ambos complejos cruciales para la progresión del ciclo celular y la tumorigénesis, lo que nos permite inferir que al estar enriquecidos, el BPF podría ser capaz de tener inducir la producción o desarrollo de tumores, como se ha planteado (Zhang et al., 2020) (Pedi, 2014).

Bisfenol S (5 nM)

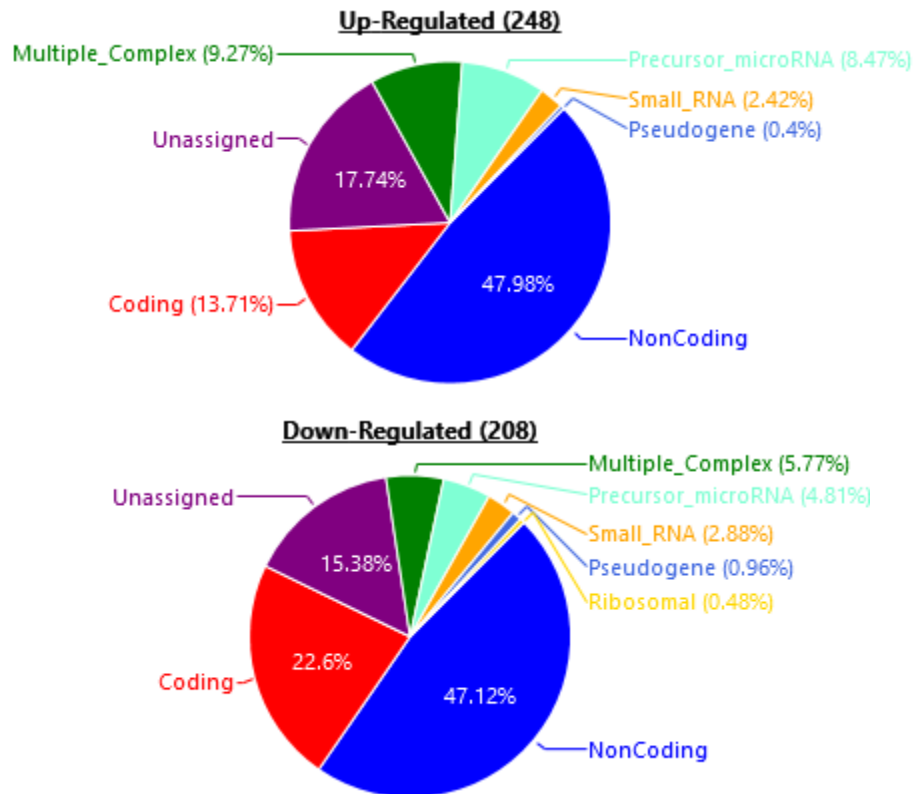


Figura 32. GENES REGULADOS AL ALZA Y A LA BAJA: BISFENOL S

Se muestra mediante Gráficos de Pastel, en cantidad los genes que están regulados al alza y a la baja al comparar el Control vs BPS 5 nM. De igual manera, se muestran cuáles de estos genes pertenecen a complejos múltiples (color verde), Precursores de microRNA (color turqués), Pseudogenes (color anaranjado), RNApequeños (color azul claro), cuales son no codificantes (color azul rey), codificantes con color rojo y no asignados con color morado. Si bien, se encontraron mayor numero de genes no codificantes regulados al alza y a la baja tras el tratamiento como se observó para el BPF y el BPA no se consideraron para el posterior analisis de sobrerepresentacion de vías por la misma razón.

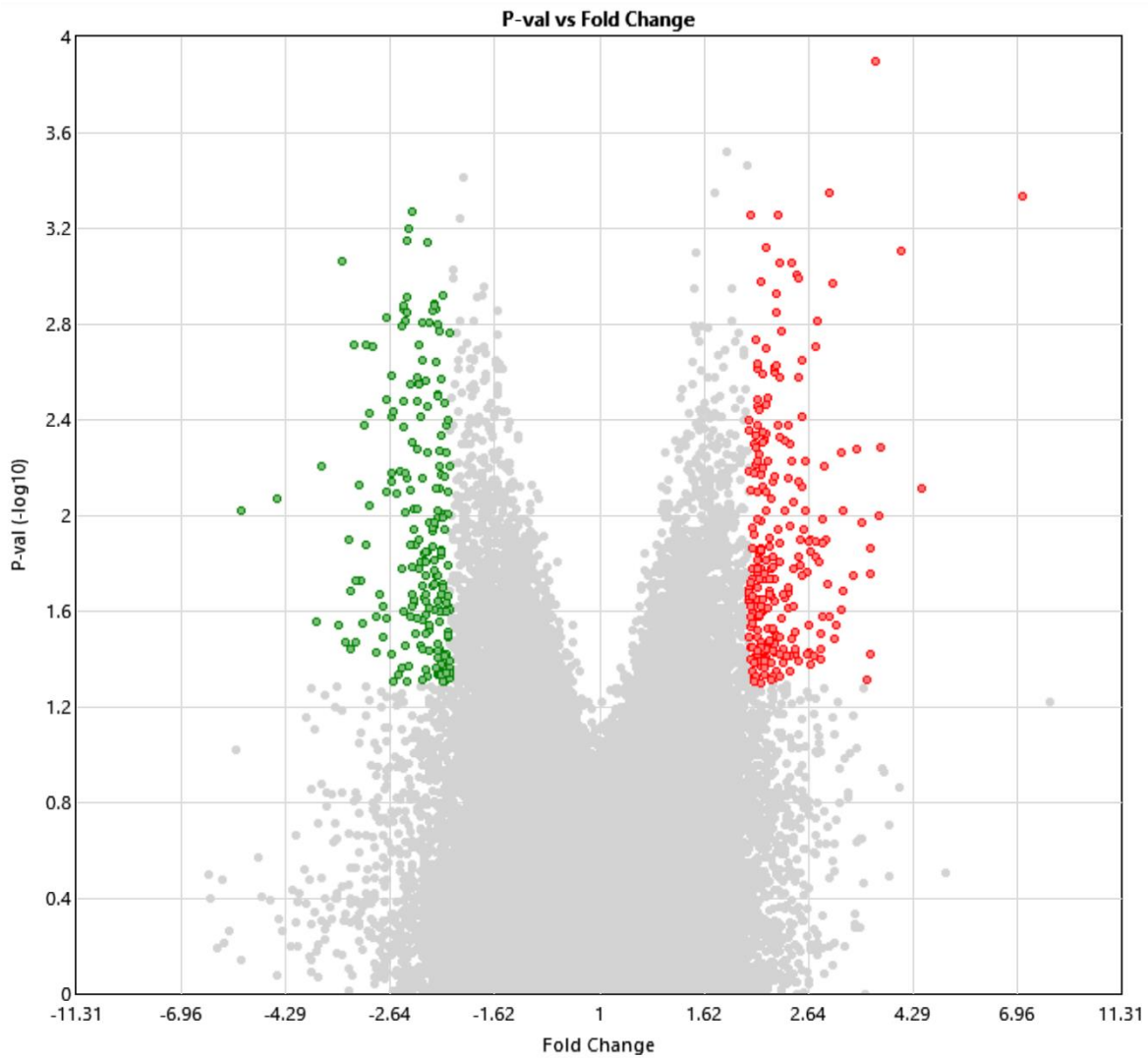


Figura 33. VOLCANO PLOT: BISFENOL S

En este gráfico Volcano Plot, destaca de colores azul y rojos aquellos que pasan los umbrales para los valores de Fold Change asignados <-2 o >2 y $-\log_{10}$ de pValue, es decir, $-\log_{10}(0.05)=1.3$. En este sentido, los genes representados por puntos rojos, son aquellos que están regulados al alza (248) mientras que los puntos que corresponden al color verde (208).

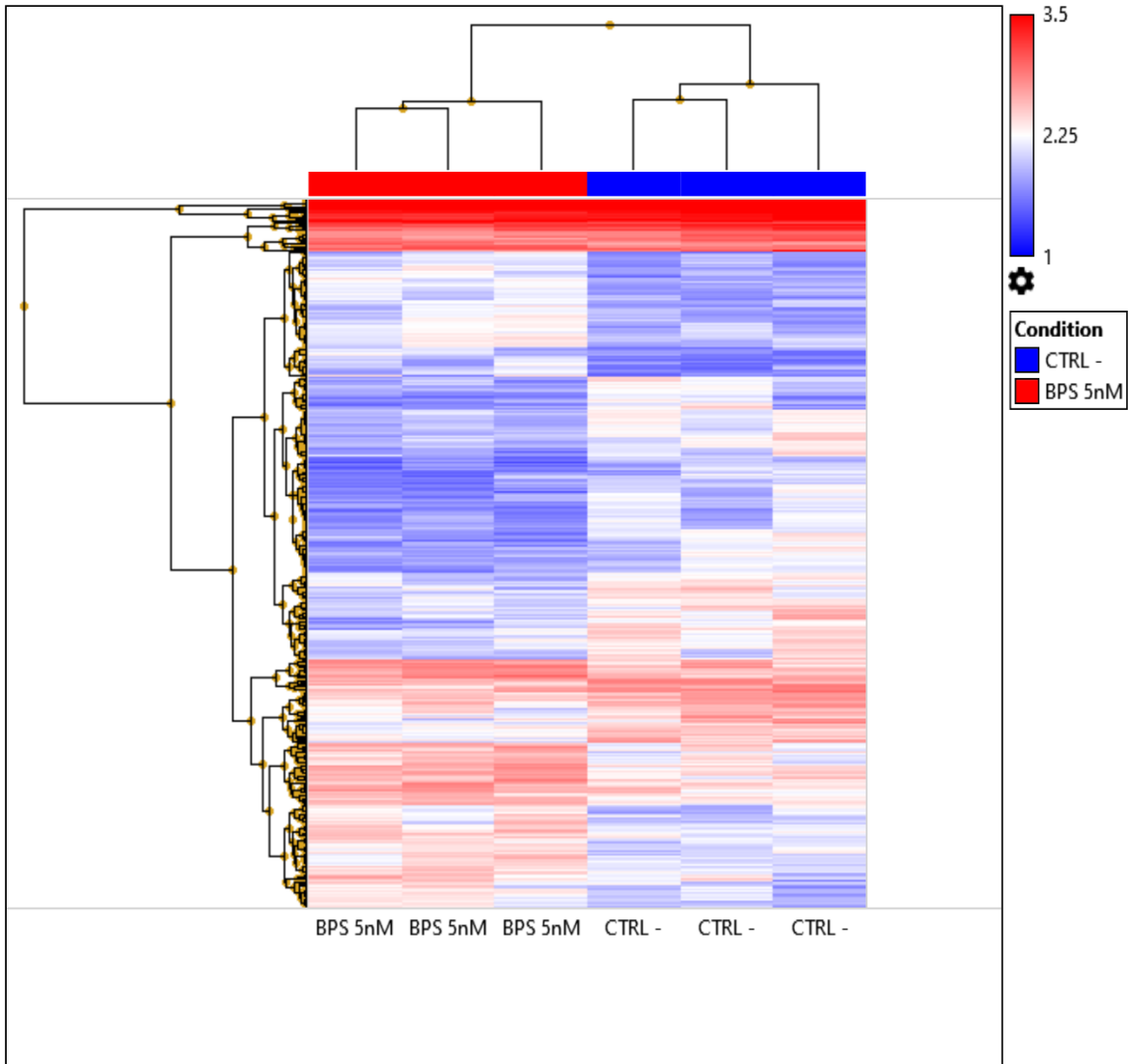


Figura 34. MAPA DE CALOR: BISFENOL S

Se muestra un mapa de calor, en el los niveles de expresión génica, nos permite diferenciar los patrones observados en las células tratadas con BPS 5 nM vs Control. De esta manera, es posible ver dos grandes clusters en los que podemos mencionar que los genes de color azul, poseen una expresión baja mientras que los genes que posee una expresión alta son de color rojo. Así se puede observar que ciertos genes en el Control poseen alta expresión y se observan de color rojo y por el contrario, esos mismos genes poseen baja expresión tras someter a las células PC3 a BPS 5 nM. Estos patrones de expresión génica son de utilidad para inferir que hay diferencia en los niveles de expresión genica en las células PC3 al ser tratadas con BPS 5 nM vs el Control (Vehículo).

Al igual que para los tratamientos con BPA 5 nM y BPF 5 nM. Al someter a las células PC3 a BPS 5 nM, gracias a los resultados mostrados en las figuras 32, 33 y 34 se seleccionaron aquellos genes que se encontraban regulados positivamente y estos se sometieron a posterior análisis (sobrerrepresentación de vías) en el que se evidencian las posibles vías biológicas en las que están involucrados (Figura 35).

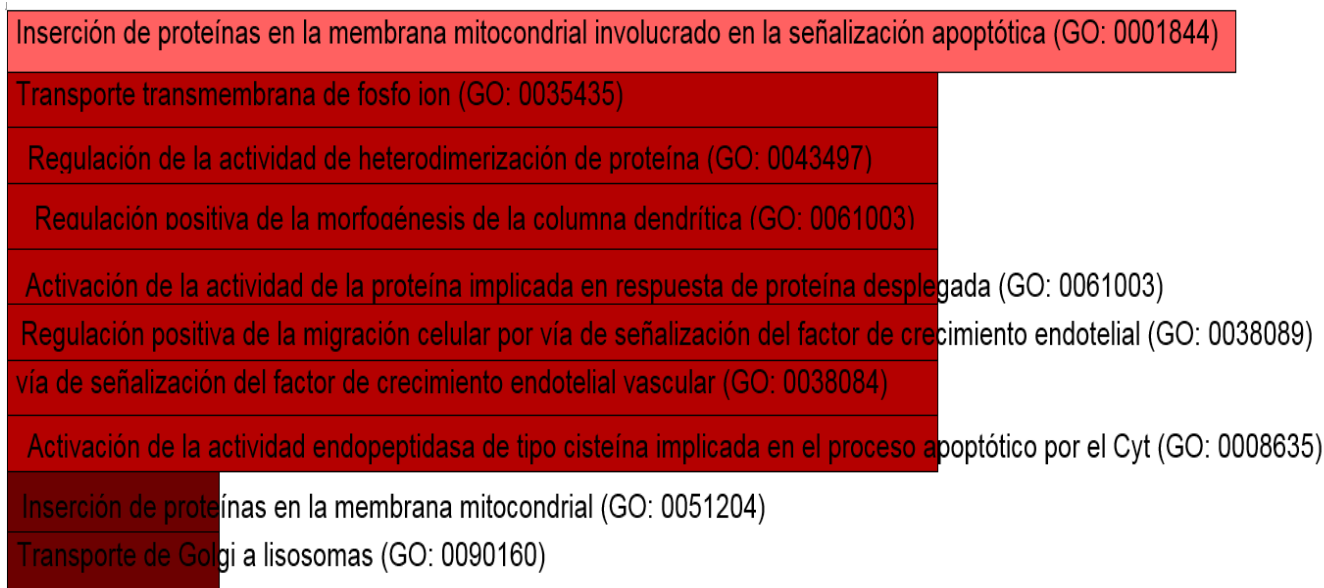


Figura 35. ANÁLISIS DE SOBRERREPRESENTACIÓN DE VÍAS: BISFENOL S

Análisis de Enriquecimiento de vías PC3 tratadas con BPF (5 nM). Base de Datos GO Biological Process 2018 En dicha figura se destacan distintas vías biológicas sobrerrepresentadas mediante un gráfico de barras, ordenado por significancia, es decir, cuanto mayor longitud tiene la barra y cuanto más claro sea el color rojo que la colorea, el término será más significativo. De esta manera, se observa que la Inserción de proteínas en la membrana mitocondrial involucrado en la señalización apoptótica es el término más significativo, seguido del transporte transmembrana de fosfoion, regulación de la actividad de heterodimerización de proteína y la regulación positiva de la migración celular por vía de señalización del factor de crecimiento endotelial. En términos generales, se observa una sobrerrepresentación de vías en la activación y regulación de proteínas. Lo cual, nos permite dilucidar el efecto que tiene el BPF a nivel transcripcional en la línea celular PC3.

Como se observa en la Figura (35) la sobrerrepresentación de vías involucradas en la activación y regulación de proteínas. Particularmente, la vía involucrada en la inserción de proteínas en la membrana mitocondrial, implicada en la vía de la señalización apoptótica. Lo cual, es consistente con estudios en los que se ha reportado que dicho Bisfenol, podrían inducir estrés oxidativo y apoptosis a través de la vía mitocondrial en las células del neuroblastoma; un tipo de cáncer que suele encontrarse en las pequeñas glándulas ubicadas sobre los riñones, además se

descubrió que los hombres son más susceptibles a los Bisfenoles que las mujeres (Wang et al., 2021).

De igual forma, como el BPA, se observó una sobrerrepresentación de vías biológicas relacionadas con el factor de crecimiento endotelial y la angiogénesis, las cuales cobran importancia en la proliferación y la diseminación metastásica de las células cancerosas, como se mencionó anteriormente.

Por otra parte, también se observó una sobrerrepresentación en la activación de la actividad endopeptidasa de tipo cisteína, implicada en el proceso apoptótico por inserción de la proteína citocromo c. Se sabe que la mitocondria además de ser productora de energía de la célula, es capaz de secuestrar proteínas proapoptóticas, siendo la más prominente el Citocromo C (Li et al., 1997). No se tiene conocimiento exacto de cómo el Citocromo C atraviesa la membrana externa, pero está claro que la familia de Bcl-2 está íntimamente implicada en la regulación de este proceso dado que al asociarse con la proteína BAX, interactúa y aumenta la apertura del canal aniónico dependiente de voltaje mitocondrial (VDAC), lo que conduce a la pérdida del potencial de membrana y la liberación del citocromo c actuando como reguladores antiapoptóticos o proapoptóticos que participan en una amplia variedad de actividades celulares. Actualmente, se propone que el Gen número 2 del linfoma de células (BCL-2) es una molécula diana importante en la progresión del cáncer de próstata independiente de andrógenos (AIPC) después de la ablación o castración de andrógenos, por lo que se sugiere que como se ha planteado en la hipótesis, el BPS podría tener un papel fundamental en la progresión del CaP (Kim et al., 2017).

Agregado a esto, también se ha reportado que la potencia de BPS en un ensayo de señalización no genómica fue similar a la de BPA. En concentraciones femtomolares a picomolares, BPS indujo vías y acciones mediadas por ER α de membrana: señalización de MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos), proliferación celular y activación de la caspasa 8. Las cuales son importantes para la función celular óptima, ya que median la proliferación y la apoptosis (así como otras acciones como la función y comportamiento cerebral mediado por estrógenos).

Además, en otros experimentos in vitro la exposición al BPS indujo la producción de caspasa 8, lo que indica que el BPS puede alterar la señalización celular apoptótica y de supervivencia como se observó en los resultados obtenidos (Rochester & Bolden, 2015).

Así bien, tras observar que los bisfenoles, a nivel transcripcional inducen cambios, se sugiere que podrían inducir la progresión del cáncer de próstata y su potencial desarrollo, esto podría ser atribuible a los efectos proliferativos que surgen de sus actividades de disrupción endocrina, a saber, los efectos estrogénicos, ya que la mayoría de los tejidos diana afectados son órganos reproductores, para interactuar con los de estrógeno alfa y beta, lo que lleva a cambios en la proliferación celular, la apoptosis o la migración (Flores Sandí, 2019).

Por otra parte, mientras que el BPA y el BPF ocasionaron una sobrerrepresentación de vías involucradas en ciclo celular, reparación a daño del DNA y vías de señalización apoptótica, el BPS ocasionó sobrerrepresentación de vías involucradas en la activación y regulación de proteínas, esto probablemente por las diferencias estructurales de estos compuestos. En este sentido, existe una métrica de química medicinal de uso común (área de superficie polar "PSA") que mediante la suma de la superficie de todos los átomos o moléculas polares, principalmente oxígeno y nitrógeno, incluidos también los átomos de hidrógeno unidos, asignan un valor para indicar la capacidad que tienen ciertos compuestos de atravesar las membranas celulares. Y, mientras que los valores para BPA y BPF son 40.5 Å, valor óptimo para penetrar las membranas celulares, el BPS posee un valor de 83 Å, siendo un valor menos óptimo para penetrar las membranas celulares. Por lo que se observaron estas diferencias y/o similitudes.

También es importante mencionar que tras evaluar el efecto citotóxico de los bisfenoles, se observó un comportamiento Dosis Respuesta No Monotónico, lo cual es consistente con lo reportado en la literatura, considerando que dicho comportamiento corresponde a compuestos que forman parte de los disruptores endócrinos.

X. CONCLUSIONES

Este estudio nos permitió concluir que los bisfenoles son capaces de inducir cambios a nivel transcripcional. Asimismo, tras realizar los ensayos *in vitro* se logró caracterizar el efecto en el transcriptoma sobre las vías asociadas a la progresión del CaP, por lo que estos compuestos podrían tener un papel fundamental en la progresión del CaP.

De igual manera, se logró demostrar que los bisfenoles provocan cambios en la viabilidad celular, dado que son disruptores endócrinos e interactúan con los receptores de estrógeno tanto alfa como beta, induciendo efectos opuestos a distintas concentraciones.

Adicionalmente, se espera validar los efectos moleculares de la disrupción transcripcional ocasionada por los Bisfenoles en la línea celular ya antes mencionada, mediante PCR y con el fin de corroborar que este efecto es observable a nivel de proteína, realizar Western Blot, para en un futuro poder utilizarlos como una herramienta potencialmente útil para monitorear el desarrollo y la progresión del cáncer de próstata.

XI. REFERENCIAS

Balaguer, P., Delfosse, V., Grimaldi, M., & Bourguet, W. (2017). Structural and functional evidences for the interactions between nuclear hormone receptors and endocrine disruptors at low doses, Sitio web: <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2017.08.002>

Beltrones, S. (2017). Proposiciones de Ciudadanos Legisladores: BPA, Sitio web: https://www.senado.gob.mx/64/gaceta_del_senado/documento/71742

Bolaños Morera, P., & Chacón Araya., C. (2017). Escala patológica de Gleason para el cáncer de próstata y sus modificaciones, Sitio web: <https://www.scielo.sa.cr/pdf/mlcr/v34n1/2215-5287-mlcr-34-01-237.pdf>

Bray, F., Ferlay, J., Laversanne, M., Brewster, D. H., Gombe Mbalawa, C., Kohler, B., Piñeros, M., Steliarova-Foucher, E., Swaminathan, R., Antoni, S., Soerjomataram, I., & Forman, D. (2015). Cancer Incidence in Five Continents: Inclusion criteria, highlights from Volume X and the global status of cancer registration, Sitio web: <https://doi.org/10.1002/ijc.29670>

Calafat, A., Ye, X., Wong, L. (2008). Exposure of the U.S. Population to Bisphenol A and 4-tertiary-Octylphenol: 2003–2004, Sitio web: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/pdf/10.1289/ehp.10753>

Carballo Quintá, M. (2012). Concepto de HBP, Anatomía y fisiología de la próstata. Hospital Xeral-Cíes, Sitio web: http://www.gallegadeurologia.es/descargas/XII_Sesion_URO-MIR_2012/DrManuel_Carballo.pdf

Catherine Joyce , Anup Kasi . (2020). Cáncer, genes supresores de tumores, Sitio web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30335276/>

Cristina, C. (2013). Cáncer: herencia y ambiente, Sitio web: <http://bvirtual.uce.edu.ec:2057/visorepub/43260>

Da Silva, E. A. (2002). Variations in morbidity after radical prostatectomy. En International Braz J Urol (162–163).

Derouiche, S., Warnier, M., Mariot, P., Gosset, P., Mauroy, B., Bonnal, J. L., Slomianny, C., Delcourt, P., Prevarskaya, N., & Roudbaraki, M. (2013). Bisphenol A stimulates human prostate cancer cell migration via remodelling of calcium signaling, Sitio web: <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-54>

Di Donato, M., Cernera, G., Giovannelli, P., Galasso, G., Bilancio, A., Migliaccio, A., & Castoria, G. (2017). Recent advances on bisphenol-A and endocrine disruptor

effects on human prostate cancer, Sitio web:
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.02.045>

Dobbs, R. W., Malhotra, N. R., Greenwald, D. T., Wang, A. Y., Prins, G. S., & Abern, M. R. (2019). Estrogens and prostate cancer, Sitio web:
<https://doi.org/10.1038/s41391-018-0081-6>

Drudge-Coates, L. (2005). Prostate cancer and the principles of hormone therapy treatment, Sitio web: <https://doi.org/10.12968/bjon.2005.14.7.17940>

England, A., Torella, F., Fisher, R. K., & McWilliams, R. G. (2016). Migration of the Nellix endoprosthesis, Sitio web: <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2016.02.053>

Flores Sandí, G. (2019). Mecanismo carcinogénico asociado a la exposición al bisfenol, Sitio web:
https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-14292019000100096

García A., Gallego C., Font G. (2015). Toxicidad del Bisfenol A: Revisión, Sitio web:
<http://rev.aetox.es/wp/wp-content/uploads/hemeroteca/vol32-2/vol%2032-2-144-160.pdf>

García-Figueroa, I., Candia, M. N., Pereda-Meira, C. M., & Laborí-Carda, C. M. (2015). Papel de los estrógenos y sus receptores en las enfermedades benignas y malignas prostáticas, Sitio web:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2007408515000968>

Gehrig, J., Kaulfuß, S., Jarry, H., Bremmer, F., & Stettner, M. (2017). Perspectivas de la activación del receptor de estrógenos β en el tratamiento del cáncer de próstata resistente a la castración, Sitio web:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5471027/>

González, J. (2010). ANÁLISIS DE DATOS DE MICROARRAYS. -, de - Sitio web:
<https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/8578/Memoria%20PFC%20Jose%20Gonzalez.pdf>

Grozescu T, Popa F, C. D. (2017). Prostate cancer between prognosis and adequate/proper therapy, Sitio web:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5304372/>

Hååg, P., Bektic, J., Bartsch, G., Klocker, H., & Eder, I. E. (2005). Androgen receptor down regulation by small interference RNA induces cell growth inhibition in androgen sensitive as well as in androgen independent prostate cancer cells, Sitio web:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15982869/>

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation, Sitio web: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Heinlein, C. A., & Chang, C. (2004). Androgen receptor in prostate cancer, Sitio web: <https://doi.org/10.1210/er.2002-0032>

Herranz Amo, F., Verdú Tartajo, F., & Martínez Salamanca, J. I. (2006). Cáncer de próstata, ecografía transrectal, Sitio web: <https://doi.org/10.4321/s0004-06142006000400006>

Hess-Wilson, J. K., & Knudsen, K. E. (2006). Endocrine disrupting compounds and prostate cancer, Sitio web: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.10.006>

Holmberg, L., & Van Hemelrijck, M. (2014). The biology and natural history of prostate cancer: A short introduction, Sitio web: https://doi.org/10.1007/978-3-642-45195-9_1

Huang, D., Wu, J., Su, X. I. N., Yan, H. A. N., & Sun, Z. (2017). *Effects of low dose of bisphenol A on the proliferation and mechanism of primary cultured prostate epithelial cells in rodents*, Sitio web: <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6469>

Institute, N. N. C. (2020). Cancer Facts & Figures 2020, Sitio web: <https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2020/cancer-facts-and-figures-2020.pdf>

Juan-García A *, & Gallego C. (2015). Efectos de plásticos en la salud. Toxicidad del Bisfenol A, Sitio web: <http://www.redalyc.org/pdf/919/91942717014.pdf>

Kim, J., Lee, H., Shin, E. A., Kim, D. H., & Choi, J. B. (2017). *Cancer progression*, Sitio web: <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1369044>

Lagarde, F., Beausoleil, C., Belcher, S. M., Belzunces, L. P., Emond, C., Guerbet, M., & Rousselle, C. (2015). *Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment*, Sitio web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25971433/>

Lagunas, A. (2018). Daño y reparación del DNA, Sitio web: <https://www.amc.edu.mx/revistaciencia/online/DanoADN.pdf>

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., & Wang, X. (1997). *Cytochrome c and dATP-Dependent Formation of Apaf-1 / Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade*, Sitio web: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9390557/>

McDaniel, J. T., Nuhu, K., Ruiz, J., & Alorbi, G. (2019). Social determinants of cancer incidence and mortality around the world: an ecological study, Sitio web: <https://doi.org/10.1177/1757975916686913>

Merrill, M. A. La, Vandenberg, L. N., Smith, M. T., Goodson, W., Browne, P., Patisaul, H. B., Guyton, K. Z., Kortenkamp, A., Cogliano, V. J., Woodruff, T. J., Gore, A. C., & Korach, K. S. (2020). Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification, Sitio web: <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0273-8>

Moiran, L. S. (2019). *Cáncer de próstata: actualización*, Sitio web: <http://orcid.org/0000-0001-8864-3139>

Moses, C., Garcia-Bloj, B., Harvey, A. R., & Blancafort, P. (2018). Hallmarks of cancer: The CRISPR generation, Sitio web: <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2018.01.002>

Narod, S. A., Neuhausen, S., Vichodez, G., Armel, S., Lynch, H. T., Ghadirian, P., Cummings, S., Olopade, O., Stoppa-Lyonnet, D., Couch, F., Wagner, T., Warner, E., Foulkes, W. D., Saal, H., Weitzel, J., Tulman, A., Poll, A., Nam, R., Sun, P., ... Bellati, C. (2008). Rapid progression of prostate cancer in men with a BRCA2 mutation, Sitio web: <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604453>

Nelson, A. W., Tilley, W. D., Neal, D. E., & Carroll, J. S. (2020). *Estrogen receptor beta in prostate cancer*, Sitio web: <https://doi.org/10.1530/ERC-13-0508>

NIH. (2019). *Hoja informativa sobre la estadificación del cáncer - National Cancer Institute*, Sitio web: <https://salud.nih.gov/>

Pedi. (2014). La mitosis y su regulación, Sitio web: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0186-23912014000100009&lng=es&nrm=iso

Pilleron, S., Sarfati, D., Janssen-Heijnen, M., Vignat, J., Ferlay, J., Bray, F., & Soerjomataram, I. (2019). Global cancer incidence in older adults, 2012 and 2035: A population-based study, Sitio web: <https://doi.org/10.1002/ijc.31664>

Prins, G. S. (2008). Endocrine disruptors and prostate cancer risk, Sitio web: <https://doi.org/10.1677/ERC-08-0043>

Quagliariello, V., Rossetti, S., Cavaliere, C., Di Palo, R., Lamantia, E., Castaldo, L., Nocerino, F., Ametrano, G., Cappuccio, F., Malzone, G., Montanari, M., Vanacore, D., Romano, F. J., Piscitelli, R., Iovane, G., Pepe, M. F., Berretta, M., D'Aniello, C., Perdonà, S., ... Facchini, G. (2017). Metabolic syndrome, endocrine disruptors and prostate cancer association: Biochemical and pathophysiological evidences, Sitio web: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16725>

RBenjamin, S. (2008). NIH Public Access. *Sitio web:* <https://doi.org/10.1038/jid.2014.371>

Redalyc. (2011). Cáncer de próstata y apoptosis, *Sitio web:* <https://doi.org/0535-5133>

Rementeria, S. (2016). Efectos del Bisfenol A en la reproducción, *Sitio web:* <https://digibuo.uniovi.es/dspace/bitstream/handle/10651/37568/Shuyana%20Deba.pdf;jsessionid=606AF278AFDACE2E92A9F562700629BA?sequence=6>

Renaud, L., Huff, M., da Silveira, W. A., Angert, M., Haas, M., & Hardiman, G. (2019). Genome-Wide Analysis of Low Dose Bisphenol-A (BPA) Exposure in Human Prostate Cells, *Sitio web:* <https://doi.org/10.2174/1389202920666190603123040>

Rubin, M. A., & De Marzo, A. M. (2004). Molecular genetics of human prostate cancer. *Sitio web:* <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800051>

Ruiz López, A. I., Pérez Mesa, J. C., Cruz Batista, Y., & González Lorenzo, L. E. (2017). Actualización sobre cáncer de próstata, *Sitio web:* <http://revcocmed.sld.cu/index.php/cocmed/article/view/2637>

Salamanca, U. (2020). PROGRAMA DE CONTROL DE CALIDAD DE MUESTRAS DE ADN Y ARN, *Sitio web:* <http://www.bancoadn.org/docs/programa-control-calidad-muestras.pdf>

Sánchez-Barriga, J. (2018). Tendencias de mortalidad y años potenciales de vida perdidos por cáncer de ovario en México, 2000-2014, *Sitio web:* <https://doi.org/10.24875/GMM.18003606>

Sánchez-de-badajoz, E., María, J., & Pilar, L. (2017). *DISRUPTORES ENDOCRINOS Y CÁNCER DE PRÓSTATA*, *Sitio web:* <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5924963>

Scaglia, H., Chichizola, C., Franconi, M. C., Ludueña, B., Mastandrea, C., & Scaglia, J. (2009). Disruptores endocrinos. Composición química, mecanismo de acción y efecto sobre el eje reproductivo, *Sitio web:* http://www.samer.org.ar/revista/numeros/2009/vol24_n2/6_disruptores_endocrinos.pdf

Schroeder, A. et.al. (2006). The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements, *Sitio web:* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1413964/>

Stucchi, G., Battevi, N., Cairoli, S., & Consonni, D. (2016). The prevalence of musculoskeletal disorders in the retail sector: an Italian cross sectional study on 3380 workers, Sitio web: <https://moh-it.pure.elsevier.com/en/publications/the-prevalence-of-musculoskeletal-disorders-in-the-retail-sector->

Taitt, H. E. (2018). Global Trends and Prostate Cancer: A Review of Incidence, Detection, and Mortality as Influenced by Race, Ethnicity, and Geographic Location, Sitio web: <https://doi.org/10.1177/1557988318798279>

Torres-Sánchez, L. E., Espinoza-Giacinto, R., Rojas-Martínez, R., Escamilla-Núñez, C., Vázquez-Salas, R. A., Campuzano, J. C., & Lazcano-Ponce, E. (2016). Prostate cancer mortality according to marginalization status in Mexican states from 1980 to 2013, Sitio web: <https://doi.org/10.21149/spm.v58i2.7787>

Torres-Sánchez, L. E., Rojas-Martínez, R., Escamilla-Núñez, C., de la Vara-Salazar, E., & Lazcano-Ponce, E. (2014). Tendencias en la mortalidad por cáncer en México de 1980 a 2011, Sitio web: <https://doi.org/10.21149/spm.v56i5.7373>

Trilla, E. (2006). Cáncer de próstata: Nuevas técnicas diagnósticas. Estado actual de la Biopsia de Próstata, Sitio web: <http://scielo.isciii.es/pdf/urol/v59n10/original1.pdf>

Urriola-Muñoz, P., Lagos-Cabré, R., Patiño-García, D., Reyes, J. G., & Moreno, R. D. (2018). Bisphenol-A and nonylphenol induce apoptosis in reproductive tract cancer cell lines by the activation of ADAM17, Sitio web: <https://doi.org/10.3390/ijms19082238>

Varnero, et.al. (2001). Morfología y fracción del área del lumen glandular de la zona de transición en la próstata humana, Sitio web: <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-98682002000300004>

Wang, C., He, J., Xu, T., Han, H., Zhu, Z., Meng, L., Pang, Q., & Fan, R. (2021). Ecotoxicology and Environmental Safety Bisphenol A (BPA), BPS and BPB-induced oxidative stress and apoptosis mediated by mitochondria in human neuroblastoma cell lines, Sitio web: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111299>

Wedel Herrera, K. (2019). Disruptores endocrinos: un riesgo para la salud reproductiva, Sitio web: <https://doi.org/10.31434/rms.v4i6.242>

Wisniewski, P., Romano, R. M., Kizys, M. M. L., Oliveira, K. C., Kasamatsu, T., Giannocco, G., Chiamolera, M. I., Dias-da-Silva, M. R., & Romano, M. A.

(2015). Adult exposure to bisphenol A (BPA) in Wistar rats reduces sperm quality with disruption of the hypothalamic-pituitary-testicular axis, Sitio web: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.01.002>

World Health Organization (WHO). (2018). Cancer burden rises to 18.1 million new cases and 9.6 million cancer deaths in 2018, Sitio web: https://iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/09/pr263_E.pdf

Zhang, S., Shen, Y., Li, H., Bi, C., Sun, Y., Xiong, X., Wei, W., & Sun, Y. (2020). Article The Negative Cross-Talk between SAG / RBX2 / ROC2 and APC / C E3 Ligases in Regulation of Cell Cycle Progression and Drug Resistance II II The Negative Cross-Talk between SAG / RBX2 / ROC2 and APC / C E3 Ligases in Regulation of Cell Cycle Progression and Drug Resistance, Sitio web: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108102>

Zhou, C. K., Check, D. P., Lortet-Tieulent, J., Laversanne, M., Jemal, A., Ferlay, J., Bray, F., Cook, M. B., & Devesa, S. S. (2016). Prostate cancer incidence in 43 populations worldwide: An analysis of time trends overall and by age group. Sitio web: <https://doi.org/10.1002/ijc.29894>