



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA /INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

EFEECTO TRANSCRIPCIONAL DE LA EXPOSICIÓN A CONCENTRACIONES
BAJAS DE BISFENOLES A, F y S EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE
PRÓSTATA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

SERGIO ALBERTO CORTÉS RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. MAURICIO RODRÍGUEZ DORANTES

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

COMITÉ TUTOR

DRA. ANA MARÍA SALAZAR

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS,

UNAM.

DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

MÉXICO, CDMX, MAYO DE 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Índice

Resumen	3
Marco Teórico.....	4
La Próstata.....	4
El Cáncer.....	11
El Cáncer de Próstata	20
El Plasticeno y su impacto en la salud humana	26
Compuestos Disruptores Endocrinos	27
Compuestos Disruptores Endocrinos en Cáncer	30
BPA	33
BPA en Cáncer de Próstata	34
Planteamiento del Problema	38
Hipótesis	39
Objetivo General.....	39
Objetivos Particulares	39
Métodos.....	40
Resultados	45
Efecto de la exposición a los bisfenoles sobre la viabilidad y proliferación celular.....	45
Efecto transcripcional de los Bisfenoles en las células de CaP	48
Análisis de sobrerrepresentación de vías	51
Análisis de redes	62
Daño al DNA	69
Análisis de Ciclo Celular	71
Discusión	72
Conclusiones.....	77
Referencias	78

RESUMEN

El cáncer de próstata (CaP) es la segunda neoplasia maligna más frecuente en hombres a nivel mundial y la principal causa de cáncer en varones en naciones occidentales (Global cancer observatory, 2020). La incidencia de cáncer de próstata ha incrementado en la mayoría de los países a nivel mundial, principalmente en países desarrollados (Teoh et al., 2019). Esta alta incidencia, indica que existe una posible correlación entre esta patología y el estilo de vida. Uno de los principales factores relacionados con estilo de vida es la exposición a contaminantes ambientales, de los cuales algunos son clasificados como compuestos disruptores endocrinos (EDCs). Dichos compuestos son capaces de mimetizar, interferir o potenciar la acción hormonal, lo que cobra particular relevancia en la fisiología de órganos y tejidos, como el tejido adiposo, la glándula mamaria, el ovario y la próstata. Uno de los EDCs más comunes es el bisfenol A (BPA), molécula ubicua usada como monómero de policarbonatos, la cual ha sido asociada con distintas patologías reguladas por hormonas. Por ello, su producción global ha sido regulada por las principales agencias de regulación sanitaria mundial, por lo cual nuevas moléculas análogas estructurales han surgido como posible reemplazo de dicha molécula. Sin embargo, la evidencia para relacionar la exposición humana a BPA, así como a sus análogos estructurales ha sido inconsistente y se requieren estudios más detallados que permitan comprender el impacto de diferentes dosis y tipos de bisfenol en la regulación génica del cáncer prostático. Este trabajo propone evaluar el efecto de la exposición de bajas concentraciones de bisfenoles en el transcriptoma de líneas celulares de cáncer prostática sensibles y resistentes a andrógenos, con el propósito de evidenciar mecanismos moleculares que pudieran explicar la correlación entre exposición y progresión de la enfermedad. Se encontró que dichos compuestos alteran vías relacionadas a control de proliferación, ciclo celular y daño a DNA.

MARCO TEÓRICO

La próstata

Anatomía

La próstata es una glándula exocrina, tubo-alveolar, que tiene una conformación cónica, su tamaño usualmente es de 3.4 cm de largo por 4.4 cm de ancho y 2.6 cm de profundidad, además tiene un peso de entre 15 y 20 gramos, aunque el tamaño de dicha glándula puede incrementar con la edad (Amis, 1994).

Está localizada en el compartimiento subperitoneal entre el diafragma pélvico y la cavidad peritoneal. Se encuentra de anterior al recto e inferior a la vejiga. Anatómicamente tiene sitios característicos como la base, el ápice, la zona anterior, posterior y las superficies laterales inferiores. La base se encuentra adherida al cuello de la vejiga, el ápice descansa sobre la superficie superior del diafragma urogenital, la superficie posterior al ser plana descansa en la pared anterior del recto, y la superficie inferior lateral se une a la superficie anterior y se sitúa sobre el diafragma urogenital (C. H. Lee et al., 2011) (Fig 1).

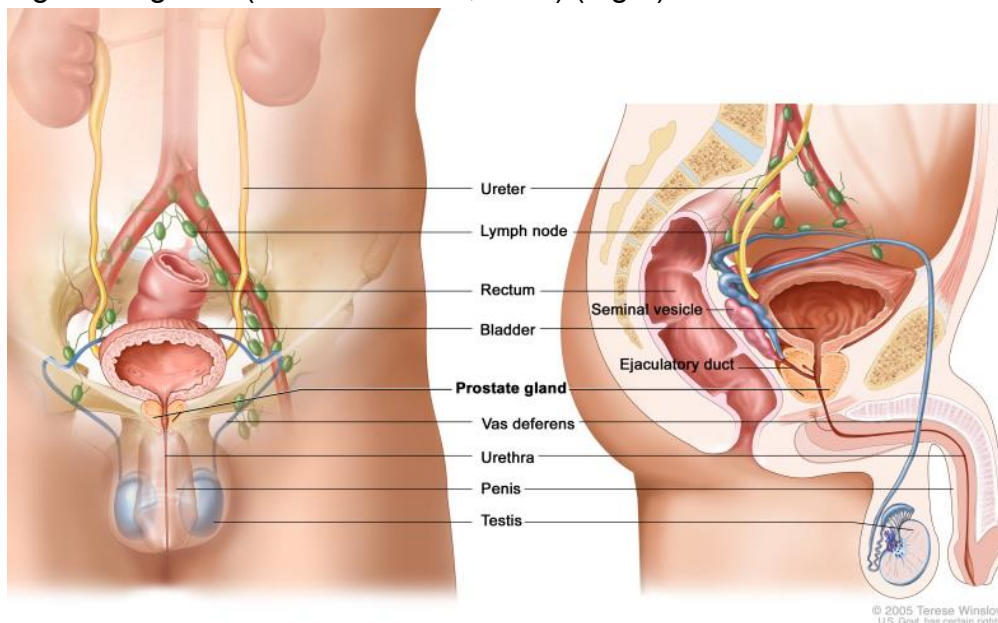


Figura 1. Localización anatómica de la próstata. La próstata se encuentra localizada en la parte inferior de la vejiga, y frente a la pared rectal, rodeando una fracción de la uretra. Imagen modificada de (National Cancer Institute, 2022).

La próstata humana, a diferencia de la próstata de otros mamíferos, no presenta lóbulos prostáticos. Sin embargo, un análisis anatómico y morfológico comprehensivo en 500 próstatas de pacientes, utilizando modelos tridimensionales, demostró la relación entre distintos sitios anatómicos, permitiendo establecer cuatro regiones anatómicas discretas, construyendo un modelo tridimensional de la glándula (McNeal, 1981) (Fig 2). Las zonas serán descritas a partir de ahora tomando a la uretra como un punto central, a partir del cual las regiones prostáticas se localizan.

Zona periférica: En varones jóvenes constituye cerca del 75% del volumen glandular. Forma un disco de tejido cuyos ductos radian alrededor de la uretra (Harvey et al., 2012). Aproximadamente 70% de los tumores prostáticos se desarrollan en la zona periférica, debido a que contiene la mayor parte del tejido glandular (Loch, 2007). Los tumores que se desarrollan en la zona periférica tienden a ser más agresivos y a invadir los demás tejidos periprostáticos, además presentan una recurrencia bioquímica más elevada. Se dice que esta alta recurrencia en tumores que provienen de esta zona se debe a que esta glándula tiene un origen embrionario en el seno urogenital, mientras que las zonas de baja frecuencia de desarrollo tumoral como la zona central derivan del ducto Wolffiano (Adler et al., 2012).

Zona central: Esta constituye el 25% del tejido glandular de la próstata, se desenvuelve cerca de los ductos eyaculatorios y sigue los mismos de forma proximal. Su similitud histológica con las vesículas seminales y los ductos eyaculatorios sugieren que comparte origen embriológico con esas estructuras derivan del tubo Wolffiano. El desarrollo de cáncer en la zona central es escaso (5-10%) de los casos (James, 2014).

Zona de transición: Esta zona rodea a la uretra proximal. La zona de transición está compuesta por dos porciones de tejido glandular que rodean a la uretra entre la vejiga y el utrículo prostático.

A pesar de que esta es la zona más pequeña de la próstata, ocupando solamente el 5% del volumen glandular, es el sitio de principal desarrollo de hiperplasia

prostática benigna (BPH); el crecimiento nodular de esta zona resulta en la obstrucción de la uretra y la compresión parcial de la salida de la vejiga. En esta zona se desarrollan del 20-25% de los tumores prostáticos; comportándose de forma diferente a los tumores prostáticos; siendo por lo general más grandes y produciendo una mayor concentración de PSA(J. J. Lee et al., 2015).

Estroma Anterior fibromuscular: Esta zona está compuesta por tejido delgado no glandular, y constituye la cara anterior de la próstata, dicho tejido tiene un papel anatómico trascendental, que es proteger por completo la cara anterior de las regiones anteriormente mencionadas.

La clasificación de la próstata en zonas se encuentra ilustrada en la figura 2. (Fig 2). Gracias a dicho sistema podemos determinar fisiopatológicamente cada una de las zonas prostáticas, con diversas afecciones características de cada una de estas regiones, como podemos observar en la figura 3 la zona periférica es la principal zona de desarrollo de cáncer y atrofia, mientras que la zona de transición está caracterizada por ser la zona de principal desarrollo de hiperplasia prostática benigna (Fig 3).

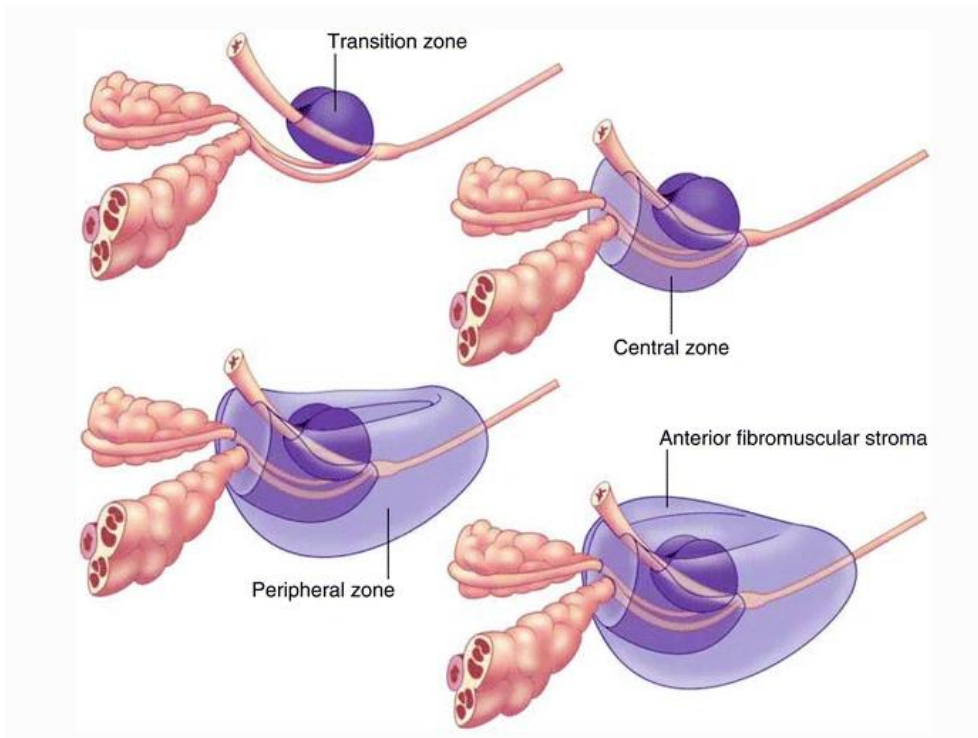


Figura 2. Modelo anatómico zonal de la próstata descrito por McNeal. La zona de transición integra entre el 5-10% del tejido glandular en varones jóvenes; en ella tienen lugar aproximadamente el 20% de los tumores prostáticos. La zona central forma parte de la base de la próstata. La zona periférica integra cerca del 70% del tejido glandular y en ella se desarrollan hasta el 75% de los casos de cáncer. El estroma fibromuscular se localiza en la región anterior, recubriendo la última cara de la próstata. Imagen modificada de (Taylor & Albertsen, 2011).

Con base en el trabajo de McNeal, se ha podido construir una correlación entre las distintas regiones anatómicas de la próstata y distintas patologías de este órgano; lo que ha permitido a los médicos y patólogos profundizar en el estudio de las zonas y su susceptibilidad a desarrollar alteraciones o enfermedades como se muestra en la figura 9. La mayoría de las lesiones cancerosas ocurren en la zona periférica de la glándula prostática, mientras que algunas menos tienen su génesis en la zona de transición y, un menor número surgen de la zona central. Por otra parte, gran parte de los casos de hiperplasia prostática benigna (BPH) se dan en las zonas de transición. También tenemos lesiones como la atrofia focal, la cual se desarrolla principalmente en la zona periférica de la próstata (De Marzo et al., 2007).

	Prostate zone		
	Peripheral	Transition	Central
Focal atrophy	High prevalence	Medium-high prevalence	Low prevalence
Acute inflammation	Low prevalence	Low prevalence	None
Chronic inflammation	Medium-high prevalence	Medium-high prevalence	Low prevalence
Benign prostatic hyperplasia	None	High prevalence	Low prevalence
High-grade PIN	Medium-high prevalence	Low prevalence	Low prevalence
Carcinoma	Medium-high prevalence	Low prevalence	None

 High prevalence	 Low prevalence
 Medium-high prevalence	 None

Figura 3. Predisposición de patologías prostáticas de acuerdo con la zona anatómica. El código de colores indica la incidencia de cada patología prostática. Imagen modificada de (De Marzo et al., 2007).

Fisiología

La glándula prostática tiene como principal función la producción del fluido seminal, el cual en conjunto con las células espermáticas constituye al semen. La principal función del fluido prostático es proveer de proteínas e iones al semen. El líquido prostático provee al semen de licuefacción, y coagulación. Además, las secreciones prostáticas participan en el recubrimiento de los espermatozoides (Hayward & Cunha, 2000). Las principales proteínas secretadas por la próstata son la fosfatasa ácida prostática (PAP), el antígeno prostático específico (PSA) y la β -microseminoproteína (β -MSP)(Lilja & Abrahamsson, 1988). Aunque las secreciones prostáticas no son requeridas para la fertilidad, la ausencia de próstata disminuye significativamente esta última.

Histología

El epitelio glandular prostático está compuesto de ductos y acinos constituidos por tres tipos de células: luminales, basales y neuroendócrinas. Los acinos tienen una apariencia ondular-papilar en la mayoría de los casos. La configuración papilar es notoriamente más pronunciada en la zona central. Las células luminales son columnares, con citoplasma eosinofílico, y núcleos redondos. Las células luminales

se especializan en secretar distintos productos al lumen, que constituyen el fluido seminal. Las células basales son adyacentes a la membrana basal, y el número de estas células puede ser variable entre individuos. Las células neuroendócrinas no pueden ser identificadas por tinciones clásicas, pero pueden ser observadas a través de técnicas inmunohistoquímicas, resaltando marcadores neuroendocrinos como la cromogranina y la sinaptofisina.

Por otra parte, el estroma prostático es fibromuscular, con abundantes células de músculo liso mezcladas con fibroblastos, vasos sanguíneos y nervios (Ittmann, 2018) (Fig 4).

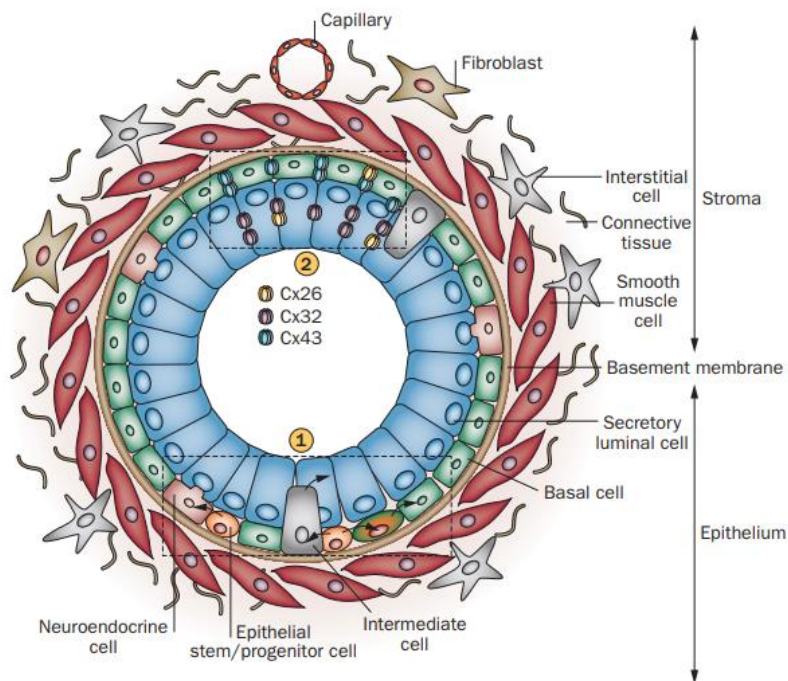


Figura 4. Tipos celulares que conforman el estroma y epitelio prostático. Imagen modificada de (Czyz et al., 2012).

Desarrollo y crecimiento, (el papel de las hormonas esteroideas)

La glándula prostática se desarrolla a través del seno urogenital embrionario (UGS). El UGs comprende el epitelio del seno urogenital, rodeado de las células mesodermales del seno urogenital (UGM). En varones, las células de Leydig de los testículos embrionarios, secretan andrógenos, cuyas señales estimulan al caudal

del UGS para iniciar la señalización proliferativa de la próstata (Buskin et al., 2021). La testosterona es la hormona esteroidea androgénica en varones, convertida en su metabolito más activo la dihidrotestosterona (DHT) por la enzima 5 α -reductasa. La hormona DHT tiene afinidad por el receptor de andrógenos, al darse la unión hormona receptor promueve la proliferación y desarrollo de las células prostáticas. Distintos modelos han demostrado el papel clave del receptor de andrógenos en el desarrollo prostático, ya que en modelos donde se inducen mutaciones de pérdida de función del gen que codifica para el AR, la glándula padece de malformaciones (Brown et al., 1988; Charest et al., 1991). El mecanismo de acción de la DHT y el AR, sobre la organogénesis puede entenderse debido al papel del AR como un factor de transcripción encargado de regular la expresión de genes del desarrollo embrionario y organogénesis, actuando principalmente a través de dos ejes moleculares:

- Genes Homeobox: Familia génica altamente relacionada con la organogénesis y estructura de distintos órganos. Durante el desarrollo embrionario, ciertos genes de esta familia son diferencialmente expresados, permitiendo la organización y diferenciación de zonas prostáticas. La mesénquima prostática que expresa los genes *Hoxa13* y *Hoxd13*, mientras que el epitelio prostático expresa *Hoxb13*. Otros factores de transcripción relacionados con la regulación de los genes Homeobox, importantes en la organogénesis de la próstata son (*NKX3*, *Fox A1*, *Fox A2* y *Notch*) (Meeks & Schaeffer, 2011).
- Ligandos de señalización secretados. Los andrógenos regulan la expresión y secreción de ligandos de acción autocrina y paracrina asociados al desarrollo prostático como el factor de crecimiento de fibroblastos 10 (Fgf-10), ligandos de la vía Wnt y proteínas Sonic Hedgehog (SHH) (Prins & Putz, 2008).

Tan relevante es el papel de los andrógenos sobre la próstata que su participación no está restringida en la organogénesis prostática, también regulan el desarrollo y especialización de las células que conforman el tejido glandular (Toivanen & Shen,

2017). Los mecanismos dependientes de andrógenos no sólo están presentes durante los primeros estadios del desarrollo prostático, también cobran un papel fundamental durante la adolescencia y edad adulta regulando funciones de crecimiento y secreción. De esta forma, la próstata adulta permanece ampliamente sensible a la acción de los andrógenos circulantes, por lo cual sufre de alteraciones como atrofia del tejido, cuando los niveles de testosterona caen por el envejecimiento.

El principio de sensibilidad a los andrógenos fue usado a nivel terapéutico por primera vez como un método para tratar a pacientes de cáncer de próstata metastásicos por Huggins y Hodge en 1941. Sus observaciones demostraron que dichos tumores son dependientes de andrógenos, observando una respuesta clínica significativa ante la terapia de deprivación androgénica (Huggins & Hodges, 2002). Sin embargo, para comprender mejor el papel de los andrógenos en el desarrollo y progresión del cáncer de próstata, comenzaremos a definir el cáncer.

El cáncer

Definición

En términos generales, el cáncer es un grupo de más de cien enfermedades que se pueden desarrollar en cualquier tejido, e inclusive en cualquier forma de vida pluricelular, que involucran la división celular descontrolada, la cual en algunos tejidos tiene como última consecuencia el desarrollo de un tumor, o masa celular, en el tejido donde se dio la división incontrolada y el cual es capaz de invadir otros órganos, metástasis. Estas enfermedades pueden desarrollarse virtualmente en cualquier tejido del cuerpo, no obstante, cada tipo de cáncer tiene características y desarrollo únicos (National Institutes of Health (US), 2007).

A pesar de que el cáncer es un grupo de enfermedades diversas, comparten patrones de comportamiento, así como características estructurales y moleculares. En cuestiones de comportamiento, existen distintos modelos que pretenden explicar el origen y desarrollo de la enfermedad, conocidos como modelos carcinogénicos. Existen cinco modelos carcinogénicos que han sido propuestos:

1) **El modelo mutacional**, principalmente enfocado en el cómo la acumulación de mutaciones inducidas por carcinógenos químicos presentes en el ambiente como contaminantes, radiación y ciertos virus((IARC), 1977; ARMITAGE & DOLL, 1954; McCann & Ames, 1976; Slaga, 1984).

2) **Modelo de inestabilidad genómica**, propone que las mutaciones asociadas con el desarrollo tumoral dependen de la herencia genética. Esta teoría indica que el desarrollo tumoral requiere de mutaciones tanto en genes supresores de tumores, genes cuyas mutaciones conducen a una pérdida de función, desencadenando el fenotipo proliferativo, y los oncogenes, genes que al mutar tienen una ganancia de función incrementando el fenotipo proliferativo. Además, el modelo de inestabilidad genómica incrementó el alcance del modelo mutacional ya que este último estaba basado en mutaciones puntuales y carcinógenos químicos, mientras que el modelo de inestabilidad genómica se basa en la premisa de que se acumulan mutaciones en los genes encargados de la estabilidad cromosómica y la reparación del daño a DNA, lo cual incrementa sustancialmente la frecuencia de eventos mutacionales tanto en oncogenes como en genes supresores de tumores, creando un modelo relativamente estratificado (Fearon & Vogelstein, 1990).

3) **El modelo no genotóxico**, fue concebido recientemente, y se caracteriza por su énfasis en los efectos no genotóxicos de compuestos carcinógenos ambientales u ocupacionales como la dieta, obesidad, hormonas y contaminantes ambientales. Estos factores no actúan directamente sobre la estructura del DNA para inducir los cambios proliferativos necesarios para la inducción del cáncer, pero influyen en otros mecanismos capaces de desencadenar cambios funcionales que inducen el fenotipo canceroso, tales como modulación endocrina dependiente e independiente de receptores, inducción de proliferación, inmunosupresión, regulación de la respuesta inflamatoria, regulación del metabolismo energético, control de la comunicación intracelular (Hernández et al., 2009).

4) **El modelo Darwiniano de carcinogénesis**, dicta que la expansión clonal de células mutadas se da por la selección del microambiente tumoral de aquellas células con mutaciones que les dan una ventaja adquirida. En otras palabras, se

explica que la mayor proliferación de algunas clonas celulares, está asociada a la selección del microambiente (Gillies et al., 2012).

5) **El modelo de organización tisular**, este modelo está basado en el hecho de que el cáncer, más allá de una enfermedad celular, es un padecimiento del tejido. Por ello en este modelo la atención se centra en el efecto del microambiente tumoral que rodea a las células precancerosas. Donde la aparición de lesiones neoplásicas no es un fenómeno autónomo aislado del microambiente, por el contrario ciertos parámetros físicos, químicos y celulares dentro del microambiente tumoral pueden inducir el desarrollo tumoral a partir de lesiones pre oncogénicas (Bissell et al., 1999) (Vineis et al., 2010).

Características del cáncer

Distintas líneas de investigación sugieren que la tumorigénesis es un proceso con múltiples pasos que son reflejo de alteraciones genéticas que desencadenan la transformación de células normales en derivados con malignidad. Esto, aunado a los métodos de secuenciación actuales, han permitido identificar características clave para el desarrollo y progresión tumoral. Dentro del vasto catálogo de genotipos asociados a cáncer existen un conjunto de alteraciones fisiológicas dentro de las células que promueven el crecimiento maligno, a las cuales Hanahan y Weinberg llamaron “Hallmarks” del cáncer. Estos autores identificaron catorce características compartidas entre los distintos tipos de neoplasias, las cuales son:

- 1) **Señales de proliferación sostenida:** La característica más fundamental de las células cancerosas es su habilidad de mantener activas vías de proliferación crónica. En tejidos normales la producción y liberación de señales promotoras del crecimiento está cuidadosamente controlada por sistemas de autoregulación. En las células tumorales, estos sistemas se ven desregulados, haciendo que estas señales sean liberadas constantemente. Las células pueden adquirir la capacidad de sostener la proliferación de distintas maneras como la activación constitutiva de vías que promueven la proliferación (Wnt, Notch, IGF, PI3K/Akt, NF- κ B, Hh), transición epitelio mesénquima que promueve el crecimiento de células troncales, estados de

hipoxia que promueve la proliferación de células troncales asociadas a cáncer (CSC), cambios en la expresión de proteínas de control de ciclo celular, alteración del metabolismo, disrupción hormonal y el desarrollo de un microambiente tumoral reactivo que estimula la proliferación celular (Feitelson et al., 2015).

- 2) ***Evasión de los supresores de crecimiento:*** Además de incrementar la actividad de vías de crecimiento celular, las células cancerígenas pueden regular negativamente los mecanismos de control de proliferación; muchos de estos programas son controlados por los genes supresores de tumores. Los genes supresores de tumores limitan el crecimiento celular y proliferación, muchos de estos genes han sido asociados con el desarrollo tumoral y mutaciones de pérdida de función hacen que las proteínas producto no puedan llevar a cabo su papel regular en cáncer, consecuentemente inducirá el desarrollo de la enfermedad. Dos de los principales supresores de tumores son la proteína RB (asociada a retinoblastoma) y TP53; dichas proteínas actúan como nodos de control central en dos circuitos regulatorios que gobiernan el ciclo celular, la senescencia y apoptosis(N. P. Wang et al., 1993).
- 3) ***Evasión de la destrucción inmune:*** Una de las teorías de sobrevivencia a la respuesta inmune indica que los tumores sólidos de alguna manera evitan ser detectados por el sistema inmunológico, lo que limita su erradicación. Existen ciertos factores que los tumores pueden utilizar para evadir dichas respuestas como la supresión de la actividad de células reguladoras en el microambiente tumoral, alteraciones en la presentación de antígenos, alteración del balance de células Th1 a células Th2 (desviación inmune), regulación de apoptosis en células inmunes(Vinay et al., 2015) .
- 4) ***Inmortalidad replicativa:*** Ha sido ampliamente aceptado que las células de cáncer requieren de potencial replicativo ilimitado para generar tumores macroscópicos. Distintas líneas de evidencia indican que los telómeros son cruciales para la protección de la sección final de los cromosomas, y dicha función está involucrada en la capacidad de proliferación. Con cada ronda de

reproducción celular estas secuencias de hexanucleótidos en tándem se recortan progresivamente, perdiendo su función, generando fusiones de DNA, dichas fusiones generan cariotipos incompatibles con la viabilidad celular. Las células con pocas rondas de replicación cuentan con una enzima, llamada telomerasa que se especializa en añadir segmentos repetidos al final de los telómeros. Dicha enzima está ausente en la mayoría de las células, sin embargo, se expresa a niveles funcionales en el 90% de las células inmortalizadas de cáncer (Yaswen et al., 2015).

- 5) **Señales inflamatorias promotoras tumorales:** En las neoplasias, la evidencia sugiere que las células inmunes inflamatorias pueden promover activamente el crecimiento tumoral dada su capacidad de inducir angiogénesis, proliferación de las células cancerígenas, e incrementar la invasión. Además, las células necróticas pueden liberar factores activos como IL-1 α , que tiene el potencial de estimular el microambiente tumoral induciendo la proliferación de células tumorales (Grivennikov et al., 2010).
- 6) **Activación de la invasión y metástasis:** La alteración mejor caracterizada en neoplasias relacionada con la activación y metástasis, es la pérdida de E-cadherina, una proteína que ayuda a la formación de uniones estrechas y adhesión celular. La regulación negativa e inactivación mutacional de la E-cadherina ha brindado pruebas de su relación con el incremento en migración e invasión, además esta proteína está relacionada con el control de la transición epitelio mesénquima (EMT) (Na et al., 2020).
- 7) **Inducción y acceso a vascularización:** Los tumores al crecer requieren de nutrientes y oxígeno así como de la capacidad de excretar desechos metabólicos y dióxido de carbono. Por ello los tumores sólidos necesitan iniciar procesos de neovascularización, angiogénesis. La evidencia dicta que muchos tipos de tumores sólidos expresan algunas proteínas inductoras de el factor de crecimiento vascular endotelial como VEGF-A. La vía de señalización de VEGF puede verse inducida por el estado hipóxico del tumor y por la señalización oncogénica en algunos tipos de tumores sólidos (Sa-Nguanraksa & O-Charoenrat, 2012).

- 8) ***Inestabilidad genómica y mutación:*** La adquisición de muchos de las características previamente mencionadas está ampliamente relacionada con alteraciones en los genomas de las células neoplásicas. Ciertos genotipos mutantes les confieren una ventaja selectiva a las células o a ciertas subclonas celulares, activando el crecimiento tumoral por su dominancia dentro del microambiente tumoral. De acuerdo con la teoría multipasos de la progresión tumoral, la expansión clonal trae como consecuencia la herencia de estos cambios genómicos y por tanto, transmisión de fenotipos altamente agresivos, la inactivación de supresores de tumores y cambios en la expresión de genes reguladores. La extraordinaria capacidad del genoma de reparar daños a través de la maquinaria de mantenimiento de daño al DNA, usualmente puede desencadenar mutaciones nuevas, lo que consecuentemente en mutantes de número de copia, de línea germinal, o mutaciones puntuales en oncogenes y en genes supresores de tumores, por lo tanto está claro que la inestabilidad genómica, induce mutaciones, lo que consecuentemente en la adquisición de otras características claves en el desarrollo tumoral (Yao & Dai, 2014).
- 9) ***Resistencia de la muerte celular:*** La habilidad de las poblaciones celulares tumorales de expandir sus números está determinada no sólo por un incremento en las tasas de proliferación celular, sino también por una disminución en las tasas de muerte. La muerte celular programada, apoptosis, representa la mayor fuente de reducción celular. Sin embargo, la resistencia a apoptosis es una de las principales características del cáncer. La resistencia a la apoptosis puede ser adquirida a través de varias estrategias, probablemente la más común es aquella relacionada con mutaciones en el gen supresor de tumores *p53*. La inactivación de su proteína producto esta asociada con más del 50% de los tumores humanos (Harris, 1996). Además existen otras vías de señalización alteradas asociadas con la resistencia a la muerte celular, tales como la vía de PI3K-AKT/PKB, la vía de señalización de MYC y alteraciones en la señalización de Ras (Mohammad et al., 2015).

- 10) **Reprogramación del metabolismo celular:** Las necesidades metabólicas cambian a lo largo de la progresión tumoral. En estadios tempranos el tumor requiere de una constante captura de nutrientes y biosíntesis. Los tumores después adquieren dependencia en nuevas vías durante estados más avanzados de la progresión, particularmente en metástasis y resistencia a terapia. Las células que migran o están siendo tratadas desarrollan un metabolismo más basado en fosforilaciones oxidativas y están más expuestas a estrés oxidante. Esto ha llevado a desarrollar distintas estrategias que logren tener como blanco terapéutico los cambios metabólicos que se producen durante el cáncer. Un ejemplo de esto es el efecto Warburg, el cual está descrito como la preferencia por vías de glicólisis y la secreción del lactato aún en presencia de oxígeno. Cambios metabólicos como estos, son característicos de todos los tumores, y pueden verse influenciados por la interacción de distintas mutaciones en genes reguladores del metabolismo (Faubert et al., 2020).
- 11) **Reprogramación epigenética:** La reprogramación epigenética es un proceso esencial para el desarrollo normal de los órganos, así como mantener los fenotipos celulares. Sin embargo, este proceso es reversible y modificable por condiciones ambientales. La reprogramación epigenética aberrante está asociada a distintas enfermedades multifactoriales como síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares y desórdenes neurológicos. En el caso del cáncer la disrupción epigenética en los patrones de metilación del DNA (pérdida general de metilación del DNA) , modificaciones de histonas, y cambios en la expresión del ncRNA están asociados con el desarrollo y progresión del tumor (Costa et al., 2023).
- 12) **Microbiomas polimórficos:** Los ecosistemas microbianos integran complejas redes de interacciones, entre ellos y con los tejidos. La evidencia prueba que las interacciones con el microbioma juegan un papel fundamental en los procesos de tumorigénesis, diferenciación, y progresión maligna. Además, el microbioma interactúa directamente para el establecimiento de ciertas características como la inflamación protumoral, evasión de la

destrucción inmune e inestabilidad genómica. Además evidencia reciente, indica que existen microbiomas intratumorales (Lythgoe et al., 2022).

13) **Senescencia celular:** La senescencia celular es un estado estable de arresto de ciclo celular, asociado con distintos cambios macromoleculares como un fenotipo hiper-secretorio y proinflamatorio. La entrada de las células en estados de senescencia puede ser una barrera anti-tumorigénica, paradójicamente estudios han demostrado que en ciertas condiciones las células malignas y no malignas del tumor pueden entrar en un estado senescente persistente llevándolas a adquirir propiedades tumorales, de resistencia a terapia, además de un estado de promoción troncal asociado a la senescencia (Schmitt et al., 2022).

14) **Desbloqueo de plasticidad fenotípica:** Los cambios fenotípicos en células adultas conducen a fenómenos de dediferenciación y transdiferenciación, cruciales en la reparación de heridas. Sin embargo, el proceso de dediferenciación son centrales en la promoción troncal para el inicio del cáncer. Además, el proceso de transdiferenciación es necesaria para promover procesos migratorios e invasivos. Otro de los fenómenos asociados a la plasticidad fenotípica son la resistencia a terapias, incremento de la troncalidad, y resistencia al estrés (Gupta et al., 2019).

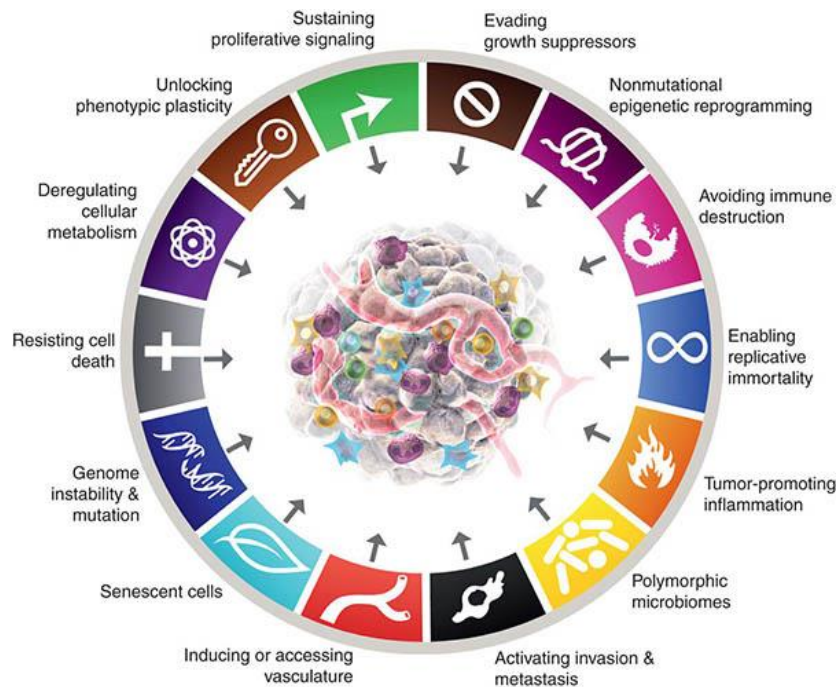


Figura 5.- Las características clave del cáncer, necesarias para el proceso carcinogénico y de progresión tumoral, compartidas entre distintos tipos tumorales, Imagen modificada de (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2011).

Estas características son cruciales para el inicio y desarrollo de la mayoría de los tumores conocidos, el conocerlas nos permite identificar qué procesos moleculares están involucrados en la carcinogénesis y progresión de tumoral (Fig. 5 Características clave del cáncer) (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2011).

Estadísticas Globales del Cáncer

En el año 2020, la Agencia para la Investigación del Cáncer estimó un aproximado de 19.3 millones de nuevos casos de cáncer a nivel mundial y 9.9 millones de muertes asociadas a cáncer, excluyendo casos de cáncer de piel, no melanoma. Dentro de los tipos de cáncer más comúnmente diagnosticados están el cáncer de mama con 2.3 millones de nuevos casos (11.7%), seguido de cáncer de pulmón (11.4%), colorectal (10%) y de próstata (7.3%) entre otros (Sung et al., 2021). Debido a su alta tasa de incidencias, el cáncer de próstata permanece como uno de los paradigmas en la investigación del cáncer, además de ser uno de los tipos de cáncer

más frecuentes, es uno de los tipos de cáncer que han sido altamente asociados con el estilo de vida, dada su prevalencia en países occidentales.

El cáncer de próstata

El cáncer de próstata (CaP) es la segunda neoplasia maligna más frecuente en hombres a nivel mundial y la principal causa de cáncer en varones en naciones occidentales. Además de eso es la quinta causa de muerte asociada a cáncer en varones a nivel mundial, con un estimado de 1,414,000 nuevos casos de cáncer y 375,304 muertes para el año 2020 (Global cancer observatory, 2020). La incidencia de cáncer de próstata ha incrementado en la mayoría de los países a nivel mundial, principalmente en países desarrollados occidentales, en regiones como el Norte y este de Europa, el Caribe, Australia, Nueva Zelanda, y Norte América (Fig 4) (Teoh et al., 2019). El hecho de que la incidencia de cáncer de próstata sea mayor en países occidentales desarrollados, indica que existe una posible relación entre esta patología y el estilo de vida. Factores el sedentarismo y la composición de la dieta son determinantes para el desarrollo de patologías prostáticas, debido a la influencia de dichos factores sobre distintos mecanismos inmunológicos y hormonales (García-Perdomo et al., 2022).

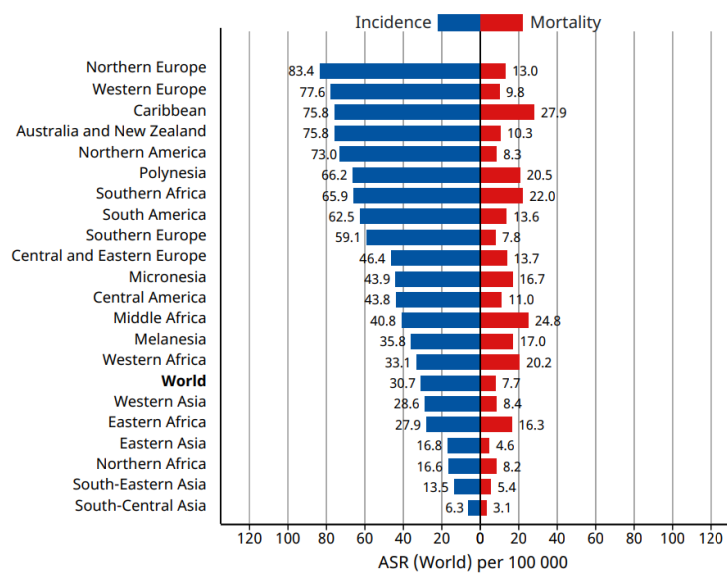


Figura 6.- Incidencia y mortalidad global del cáncer de próstata. En el gráfico podemos observar la tasa de riesgo estandarizada por edad entre cada 100,000 habitantes. Imagen modificada de (Global cancer observatory, 2020).

Cáncer de Próstata en México

En el caso de México, en 2020 se registraron 26,742 nuevos casos de cáncer de próstata, siendo la principal causa de neoplasias malignas para varones de todas las edades. Además de ser la segunda causa más frecuente de muerte asociada a neoplasias con 7, 457 defunciones registradas ese año. En ambos casos sólo detrás del cáncer de mama (Fig 7)(IARC, 2020).

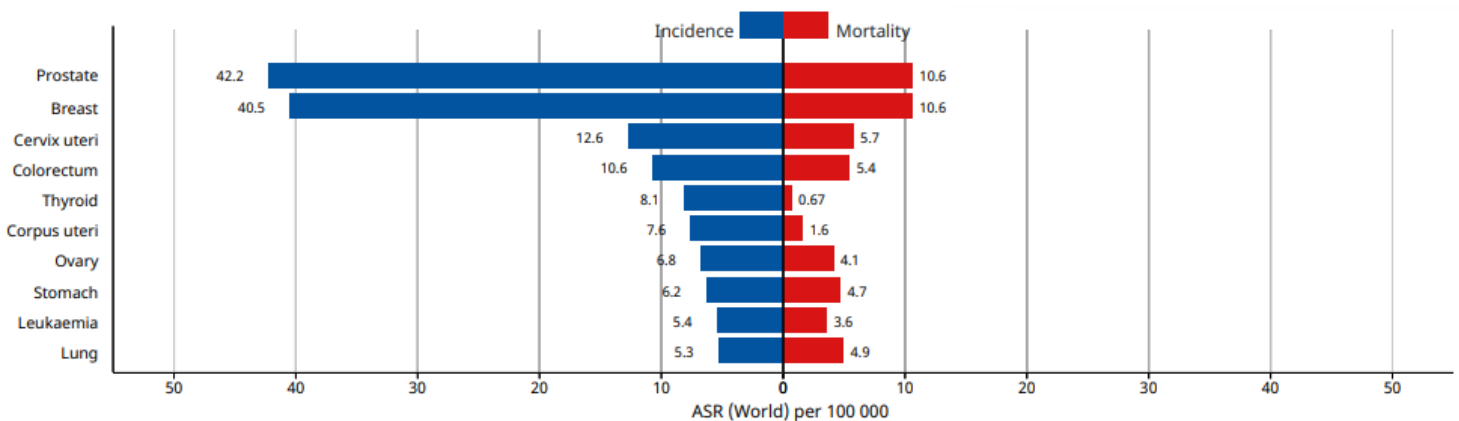


Figura 7.- Incidencia y mortalidad de los distintos tipos de cáncer en México. Como observamos en la gráfica, al normalizar por edad el cáncer de próstata presenta una incidencia elevada en el país, respecto de los otros tipos de cáncer. Imagen modificada de (IARC, 2020).

Historia Natural de la enfermedad

Como se mencionó anteriormente en la edad adulta la hormona dihidrotestosterona (DHT) actúa como un regulador de la homeostasis prostática, manteniendo el adecuado recambio del epitelio prostático, a través del control de la proliferación y la muerte celular (Tindall & Rittmaster, 2008). Contrario a los valores de la testosterona, los niveles séricos de DHT no sufren una caída de concentración asociada a la edad, lo cual indica que en condiciones normales las reacciones de conversión de testosterona a DHT se encuentran saturadas, a pesar de los bajos niveles de testosterona. Esto indica que la dihidrotestosterona es el andrógeno prostático primario (Morgentaler & Traish, 2009). Al no existir una correlación clara

entre la concentración de testosterona o dihidrotestosterona con el desarrollo de la enfermedad, se ha establecido el uso de otros marcadores moleculares y tisulares para describir el curso natural de la enfermedad. Uno de los marcadores moleculares más utilizados para el diagnóstico y seguimiento de distintas patologías prostáticas es la prueba de Antígeno Prostático Específico (PSA). La expresión del gen que codifica para PSA es inducible por la acción de los andrógenos, por lo tanto sus niveles pueden ser tomados como indicadores de actividad androgénica, y nos permite tener un panorama de la historia y progresión del tumor, sin depender directamente de las concentraciones hormonales (Kim & Coetzee, 2004). El PSA es una enzima glicoproteica secretada por el epitelio secretorio prostático y es la proteína más abundante en el plasma seminal. La función del PSA es la disolución del coágulo seminal a partir de su actividad como proteasa de serina, lo que permite disminuir la viscosidad seminal, incrementando la motilidad de los espermatozoides (David & Leslie, 2023). En condiciones normales, una fracción de PSA se filtra hacia el torrente sanguíneo, mientras que en estados de traumatismo, enfermedades prostáticas o cualquier condición que altere la delicada microarquitectura prostática, ocasionará que una mayor cantidad de PSA se difunda al espacio extracelular, incrementando la concentración plasmática de PSA; existen muchas condiciones patológicas que incrementan los niveles plasmáticos de PSA como hiperplasia prostática benigna, prostatitis, traumatismo perineal, e infecciones prostáticas (Stamey et al., 1987). A pesar de su falta de especificidad, el PSA es ampliamente utilizado en el diagnóstico y pronóstico del CaP. El valor normal del PSA debe ser menor o igual a 4ng/mL. Sin embargo, los niveles de PSA también incrementan de forma relativamente natural con la edad (Ito et al., 2003). En la figura 7 podemos observar un gráfico que muestra dos de los estados clínicos más importantes en la progresión del CaP, seguidos a través de cambios en la concentración en el PSA. En el gráfico podemos observar las fluctuaciones en los niveles plasmáticos de PSA (eje ordenadas), dependiendo de la administración y tipo de tratamiento a lo largo del tiempo (eje abscisas). Tras la terapia local de primera línea, los pacientes suelen presentar recurrencia en la que los niveles de PSA incrementan, superando su estadio inicial. Si tras el bloqueo androgénico máximo, se desarrolla recurrencia, las

células desarrollan el fenotipo conocido como Cáncer de Próstata resistente a la Castración (CPRC). En este punto, virtualmente ninguna terapia es efectiva contra las células malignas(W.D. Figg , C.H. Chau, 2010) (Fig 8).

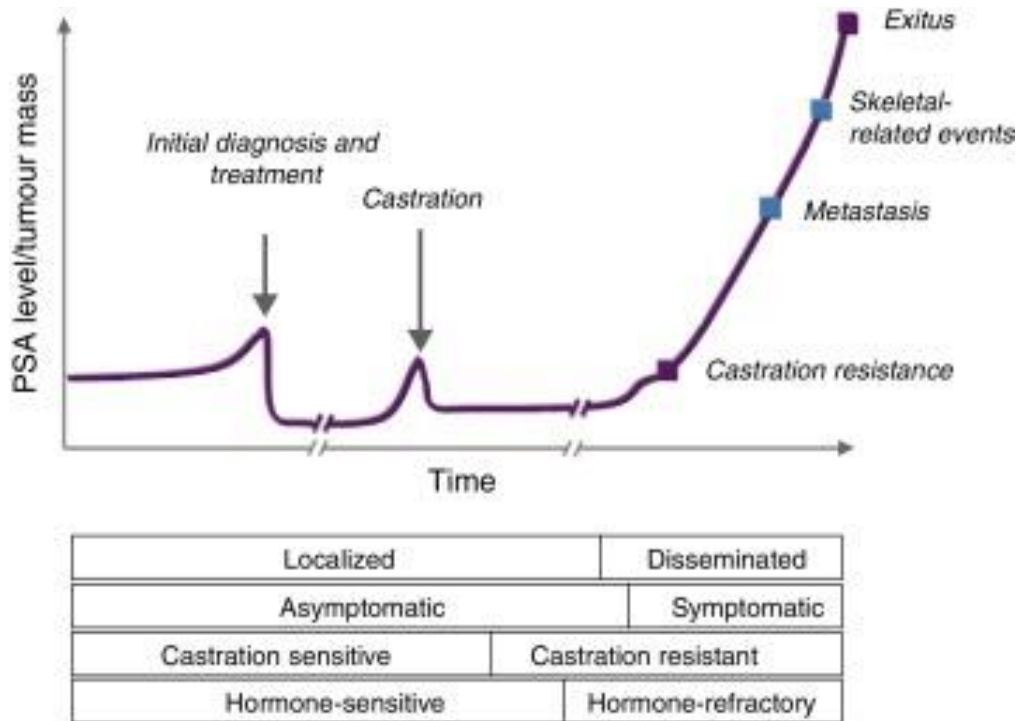


Figura 8.- Curso natural de la enfermedad representado como el cambio en las concentraciones de PSA a lo largo del tiempo. En el gráfico se muestra la progresión del CaP a lo largo del tiempo (Eje X), representada por el incremento en la concentración de antígeno prostático específico (Eje y). Imagen modificada de (Morote et al., 2016)

Clasificación y diagnóstico

Al ser una neoplasia maligna tan compleja, a la fecha el CaP no puede ser diagnosticado a través de una sola prueba, por lo que requiere de una batería de determinaciones como el tacto rectal digital (DRE), la prueba de antígeno prostático-específico (PSA), seguida de biopsia confirmatoria guiada por ultrasonido transrectal (TRUS). En países con alto número de prescripciones de PSA más del 60% de casos de CaP son diagnosticados en pacientes asintomáticos. Durante la última década se intenta ahondar en el estudio de nuevos biomarcadores con el propósito de incrementar la especificidad y sensibilidad de las pruebas existentes (Descotes, 2019).

A pesar de que el cáncer de próstata, al igual que otros tipos de tumores sigue la clasificación de la American Joint Committee on Cancer (AJCC), también conocida como escala TNM (Tumor-Nódulo-Metástasis), la forma estándar de clasificación del cáncer de próstata es el sistema Gleason, descrito por primera vez en 1974 por Gleason y Mellinger. En esta escala se puntúa el patrón de diferenciación de la glándula prostática desde un grado 1 (menos agresivo) hasta el grado 5 (más agresivo). El Grado Gleason asigna un valor numérico a las células cancerosas en una escala del 1 al 5, basado en su grado de diferenciación. Un gran número de tumores presentan dos o más patrones de diferenciación por lo que la escala Gleason fue correlaciona el grado de estos patrones de crecimiento con el comportamiento biológico del carcinoma. La relación está dada mediante la suma del patrón primario y el secundario; acto seguido, se suman dos valores para obtener el puntaje final del grado Gleason, que puede oscilar entre 2 y 10. En este sistema, un puntaje bajo (como 2 o 3) indica células cancerosas se encuentran diferenciadas, mientras que un puntaje alto (como 8, 9 o 10) indica células cancerosas más des diferenciadas y agresivas. En el caso de los patrones podemos encontrar que un Grado 1 corresponde a un crecimiento uniforme y empaçado, pero definido por acinos ovalados. En el caso del segundo patrón tenemos acinos bien definidos rodeados con masas de escasa definición El Gleason 3 es el más común de los patrones de crecimiento de cáncer de próstata; distinguido por una extensión irregular, con ácidos presentes de extensión irregular. El cuarto grado es un estadio en el cual se pueden observar acinos glandulares grandes fusionados, creando masas, cadenas y agregados. Finalmente, el quinto estadio Gleason se refiere a agregados anaplásicos, o masas sólidas de necrosis central (Borley & Feneley, 2009). En la figura 9 podemos observar los distintos patrones de crecimiento esquematizados para mejorar su comprensión (Fig 9).

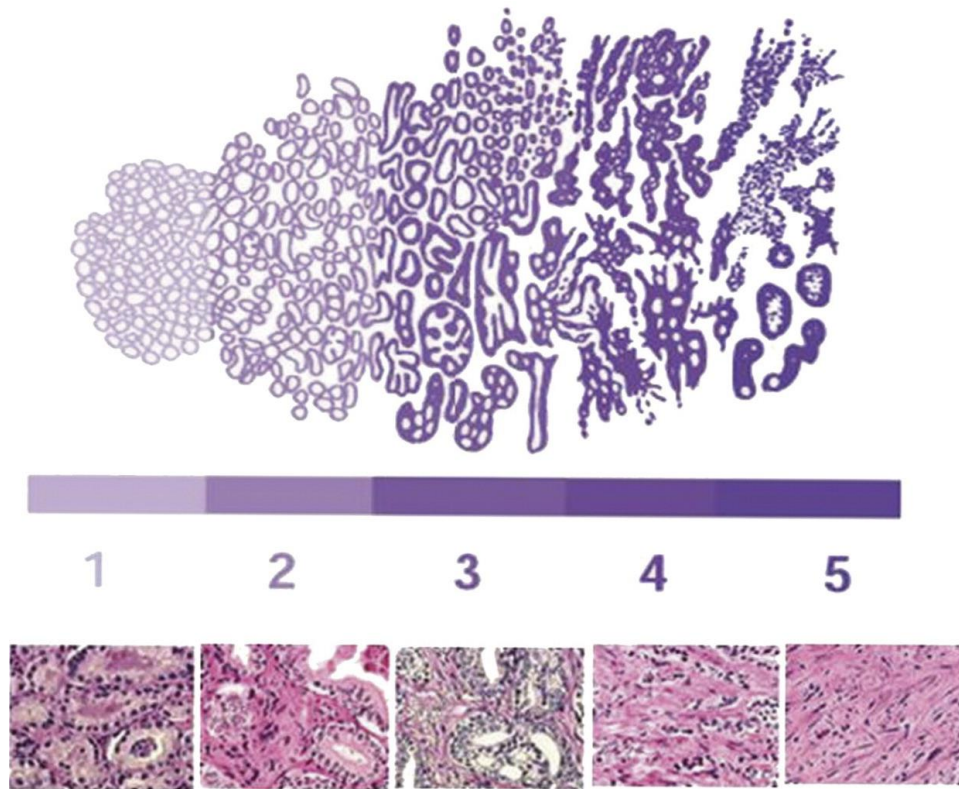


Figura 9.- Esquema representativo e imágenes de los diferentes patrones de crecimiento del grado Gleason, siendo el primer grado el de mayor diferenciación celular, con crecimiento celular uniforme y empaquetado, hasta el grado 5 con un evidente grado de dediferenciación celular. Imagen tomada de (HRNAden et al., 2007).

El cáncer de próstata y estilo de vida

Dada la alta prevalencia de cáncer de próstata en las naciones occidentales, la prevención primaria de la enfermedad ha sido considerada como una estrategia fundamental no sólo para reducir los costos significativos de los tratamientos, sino además para reducir el estrés físico y emocional de los pacientes. Se ha establecido una correlación clara entre la incidencia de cáncer de próstata y la exposición a diferentes factores ambientales que actúan a nivel molecular, como posibles carcinógenos como el tabaco, infecciones prostáticas, exposición a pesticidas, a hidrocarburos aromáticos policíclicos, y un gran número de compuestos. Sin embargo, dada su alta sensibilidad a factores hormonales, es muy probable que compuestos disruptores endocrinos (EDCs) jueguen un papel fundamental en el inicio y progresión del cáncer de próstata. Una de las fuentes principales de dichos

EDCs son las exposiciones ambientales/ ocupacionales a plásticos y contaminación por plásticos. Por ello en el siguiente apartado discutiremos el papel de dichos plásticos en la salud humana.

El plasticeno y su impacto en la salud humana

Desde la década de 1960 hasta el año 2015, la producción mundial de plásticos incrementó veinte veces, alcanzando 322 millones de toneladas en dicho año. Y se espera que estos números se dupliquen en los siguientes veinte años. Los plásticos están presentes en la actividad humana y se han indicadores económicos y de desarrollo de los países (European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions., 2018).

Este incremento masivo en la cantidad de plásticos ha hecho que dichos materiales sean considerados ubicuos en el planeta. Estos polímeros sintéticos actúan como contaminantes o como vectores químicos de una amplia gama de compuestos. La cantidad de contaminantes plásticos es tal que se han encontrado restos de plásticos y microplásticos en agua y microorganismos del mar (Alfaro-Núñez et al., 2021), en suelos (Yang et al., 2021), comida y bebidas para consumo humano (Sewwandi et al., 2023). La distribución global de los plásticos ha sido propuesta como un indicador geológico del antropoceno considerados como tecnofósiles, evidencia de la existencia y actividad humana, hasta el punto que podríamos ser capaces de llamar a la era como plasticeno (Reed, 2015). En la figura 10 (Fig 10) se ilustra cómo fragmentos de microplástico se han sedimentado a lo largo de un cañón, combinándose con su material de sedimentación original, lo cual es evidencia de la importancia geológica de dichos materiales, desde la década de 1960. La amplia disposición de plásticos a lo largo del planeta a diferentes niveles, ha desencadenado que los seres humanos estemos altamente expuestos a dichos materiales, lo que ha incrementado su presencia en tejidos humanos como en la placenta (Ragusa et al., 2021) e inclusive biofluidos humanos tales como leche materna (Ragusa et al., 2022), orina (Pironti et al., 2023) y sangre (Leslie et al., 2022). La evidencia sugiere que existen compuestos provenientes de los plásticos capaces de interferir con distintos procesos biológicos, desencadenando distintas

enfermedades entre los que destacan metales pesados, retardantes de flama, micro y nano plásticos, así como compuestos disruptores endócrinos. Todos ellos vinculados a enfermedades cardiovasculares, renales, metabólicas, neurológicas, trastornos reproductivos y distintos tipos de cáncer(Campanale et al., 2020). En el presente trabajo, nos enfocaremos en discutir el papel que tienen ciertos compuestos disruptores endocrinos en la salud humana.



Figura 10.- Depósitos y estratificación de materiales plásticos provenientes de un cañón al sur de España. Imagen tomada de (Campanale et al., 2020).

Compuestos disruptores endocrinos

De acuerdo con la Agencia para la Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), los EDCs son moléculas exógenas capaces de interferir con la síntesis, transporte, unión a receptores, metabolismo y excreción de las hormonas responsables de la homeostasis, reproducción, desarrollo y comportamiento, causando efectos adversos en un organismo o población(EPA, 1998). En otras palabras son compuestos o mezclas de compuestos que interfieren con la acción

hormonal normal. Los EDCs pueden clasificarse a grandes rasgos en dos categorías:

- a) Aquellos que tienen un origen natural como los fitoestrógenos por ejemplo la genisteína (Zheng et al., 2013), y el cumestrol (Ferreira-Dias et al., 2013).
- b) Compuestos sintéticos usados en la industria como solventes, lubricantes, plásticos, plastificantes, pesticidas, fungicidas, y algunos agentes farmacéuticos y sus bioproductos (Kabir et al., 2015).

Aunque existe una clasificación por origen, las características estructurales de los EDCs son muy diversas lo que dificulta establecer una correlación química entre ellos. Debido a esta misma naturaleza, los disruptores endocrinos presentan distintos mecanismos de acción molecular. Además, en ocasiones los metabolitos de los EDCs también son biológicamente activos, capaces de generar disrupción endocrina (Kabir et al., 2015). Esto ha dificultado a las agencias regulatorias caracterizar y legislar el riesgo de exposición a EDCs (OECD, 2018). Con el propósito de facilitar esta tarea, se integró un consenso de expertos, inspirados en aquellos para clasificación de carcinógenos, para clasificar y describir a los EDCs de acuerdo a una serie de mecanismos moleculares comunes llamados características clave, validando esta metodología de análisis para identificar y clasificar EDCs. Tras el consenso de expertos de 2019, se establecieron 10 mecanismos moleculares (características clave) para describir a los EDCs (La Merrill et al., 2020). Estos mecanismos son los siguientes:

- a) Agonismo de receptores: Un ejemplo de esto es que el dicloro difenil tricloroetano (DDT) que es capaz de estimular la señal transcripcional dependiente de receptores de estrógenos α y β (ER α y ER β) (Legler et al., 2002).
- b) Antagonismo de receptores: Existen casos de EDCs sintéticos como el diclorodifenildicloroetileno que es capaz de inhibir al receptor de andrógenos (AR) (Schrader & Cooke, 2000).
- c) Regulación de expresión de receptores: Ciertos EDCs pueden modular la expresión de los receptores hormonales a través de mecanismos de

internalización y degradación. Tal como el di(2-etilhexil)ftalato que disminuye la expresión del receptor de mineralocorticoides (aldosterona)(Martinez-Arguelles et al., 2009).

- d) Transducción de señales: Los EDCs son capaces de desencadenar reacciones intracelulares dependientes de la unión receptor. Por ejemplo algunos receptores membranales GPCRs pueden verse afectados por la unión a bisfenol A(Bouskine et al., 2009).
- e) Alteraciones epigenéticas: Se ha demostrado que los EDCs pueden regular mecanismos epigenéticos como metilación de citosinas, modificaciones post-traduccionales de histonas, y expresión de microRNAs, asociados a enfermedades como la Obesidad (Nettore et al., 2021).
- f) Síntesis de hormonas: La evidencia ha demostrado que algunos EDCs son capaces de disminuir la concentración y biodisponibilidad de hormonas, tal es el caso de algunos ftalatos que son capaces de disminuir la producción de hormonas en varones(Woodward et al., 2020).
- g) Transporte de hormonas: Ciertos disruptores endocrinos son capaces de inducir cambios en la unión hormona-acarreador, alterando el transporte de las mismas. Este es el caso del DDT que disminuye las concentraciones de proteína de unión a retinol (RBP)(Delpont et al., 2011) .
- h) Regulación de los niveles circulantes de hormonas: Se ha demostrado que algunos EDCs son capaces de alterar los niveles circulantes de hormonas, como ciertos ftalatos que pueden alterar los niveles circulantes de testosterona (Chang et al., 2015).
- i) Aclaramiento y excreción: Los distintos grupos de hormonas (peptídicas, proteicas, esteroideas y tiroideas) son inactivadas y excretadas de diferentes formas. Los EDCs pueden inducir la activación de glucoronidasas, que incrementan el aclaramiento de hormonas tiroideas en la sangre(Brucker-Davis, 1998).
- j) Regulación del destino celular (proliferación, migración, diferenciación y muerte): Algunos EDCs, como los ftalatos son capaces de inducir proliferación en células de cáncer de mama(F.-P. Chen & Chien, 2014);

inducir migración, invasión y angiogénesis en células de hepatocarcinoma(Tsai et al., 2014).

La determinación de estas características clave en la disrupción endocrina, ha permitido identificar, organizar y evaluar a los EDCs basados en datos de mecanismos moleculares, abriendo la puerta a un mejor entendimiento de los disruptores endocrinos. Ver figura 11 (La Merrill et al., 2020).

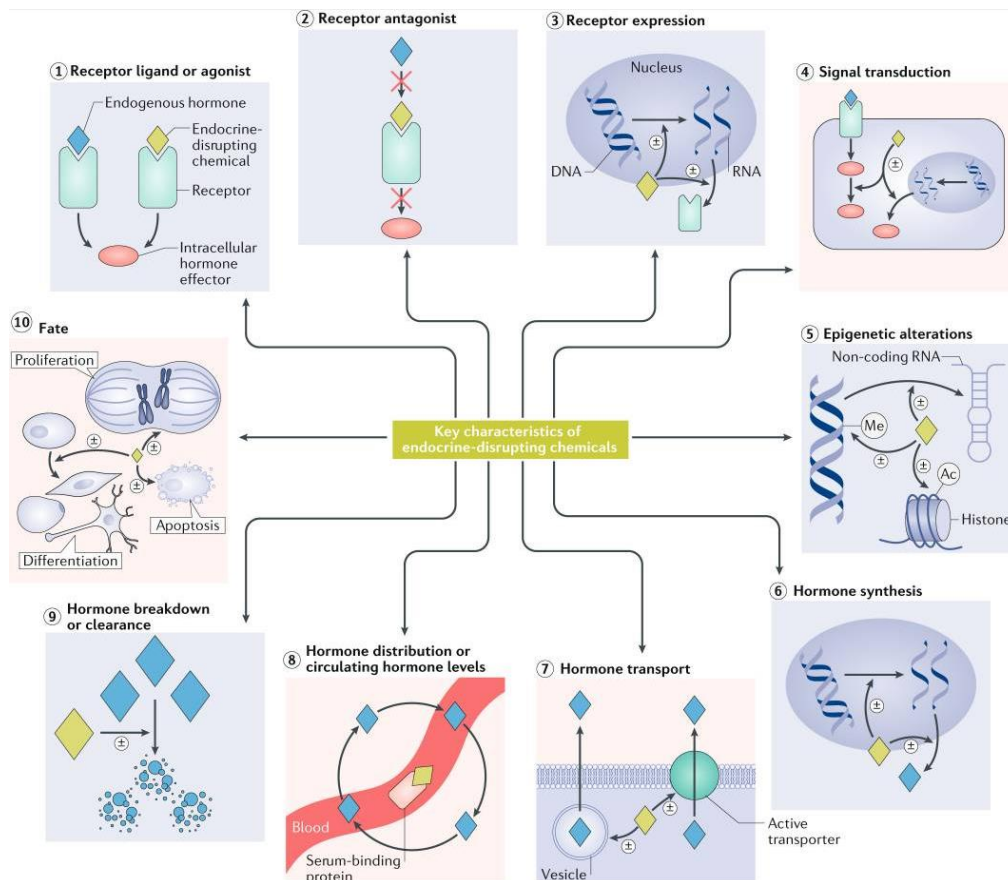


Figura 11.- Las diez características clave de los compuestos disruptores endocrinos. En la imagen las flechas señalan las diez características de los EDCs. El símbolo \pm indica que un EDC puede incrementar o disminuir el efecto. Imagen tomada de (La Merrill et al., 2020).

Compuestos disruptores endocrinos en el cáncer

La incidencia de distintos tipos de cáncer regulados por hormonas ha aumentado desde la década de los 1970's hasta la primera década del nuevo milenio. El cáncer

de mama incrementó un 26%, el cáncer testicular 56% y el cáncer de próstata 94%(Seachrist et al., 2016). Este incremento se ha visto relacionado con la exposición a distintos factores ambientales, algunos de ellos capaces de activar diferentes mecanismos biológicos emulando las funciones endógenas, conocidos como xenobióticos. Dentro de los principales xenobióticos se encuentran un grupo de compuestos capaz de mimetizar la acción de los estrógenos conocidos como xenoestrógenos. Existe evidencia de que algunos EDCs pueden ser considerados como carcinógenos en dichos tipos de cáncer(Modica et al., 2023). En el presente apartado discutiremos la evidencia que existe de la influencia de los EDCs en distintos tipos de cáncer regulado por hormonas.

EDCs en cáncer de mama

Existe evidencia que indica que la exposición a determinados EDCs está relacionada con el desarrollo de cáncer de mama. Un ejemplo de esto es el caso de alta exposición a ftalatos ($\geq 10,000$ mg acumulativos) la cual se ha asociado con incrementos de hasta dos veces en las tasas de cáncer de mama positivo a receptor de estrógenos(Ahern et al., 2019). Se ha demostrado que el DDT es capaz de promover el crecimiento de células tumorales responsivas a estrógenos en tumores mamarios (Robison et al., 1985), además puede incrementar el riesgo de desarrollar de cáncer de mama (Kleanthi & Andreas, 2009). Otro de los compuestos disruptores de endocrinos es el BPA, que se ha asociado al incremento de cáncer de mama, asociado a la acción del receptor de estrógenos- α (ER α)(Sengupta et al., 2013). Esta evidencia sugiere que tres de los disruptores endocrinos más comunes han sido asociados con el desarrollo y progresión del cáncer de mama en modelos poblacionales, *in vivo* e *in vitro*.

EDCs en cáncer de ovario

El cáncer de ovario está altamente regulado por hormonas, ciertos plastificantes, como el di(2-etilhexil)ftalato (DEHP) y el mono(2- etilhexil)ftalato están asociados al desarrollo de cáncer de ovario a través de señalización dependiendo de PPAR α dependiente de la vía PI3K/Akt/NF- κ B(Leng et al., 2021). Se han encontrado metabolitos de DDT en tejido ovárico, lo cual probablemente altere genes asociados

en remodelar el citoesqueleto (Shah et al., 2018), ejerciendo un efecto probablemente carcinógeno. Otro EDCS característico es el BPA el cual puede inducir proliferación celular y metástasis en células de cáncer de ovario a través de mecanismos de regulación del (ER α) (Sang et al., 2021).

EDCs en cáncer de testículo

En cáncer testicular existen distintos meta análisis revela que los EDCs incrementan el radio de riesgo de padecer cáncer testicular en la descendencia de población expuesta(Bräuner et al., 2021).Estudios poblacionales revelan que existe una tenue correlación entre la concentración plasmática de DDT en las madres y la incidencia de cáncer testicular en la descendencia (Cohn et al., 2010). Un estudio *in vivo* ha demostrado que la exposición de madres a BPA está correlacionada con el crecimiento del tumor testicular en ratones(Nava-Castro et al., 2019).

EDCs en cáncer de tiroides

La exposición temprana y prenatal a EDCs ha sido asociada a carcinoma tiroideo, debido a que inducen estrés oxidativo y cambios epigenéticos en la glándula tiroidea. La exposición a pesticidas, retardantes de flama, policlorados, ftalatos y parabenos es capaz de inducir cambios epigenéticos, metabólicos, y moleculares asociados a cáncer tiroideo(Kyriacou et al., 2023).

EDCs en cáncer de próstata

Evidencia epidemiológica y de modelos animales que indica que ciertos EDCs son capaces de inducir el desarrollo y progresión del (PCa), compuestos pesticidas, estrógenos ambientales y compuestos antiandrógenos han sido asociados con el desarrollo y progresión de cáncer de próstata (Prins, 2008). Actualmente la mayoría de las evidencias de disrupción endocrina asociada a cáncer de próstata está basada principalmente en cuatro familias prominentes de EDCs: bisfenoles, ftalatos, fitoestrógenos y micoestrógenos. Los EDCs pueden afectar distintas vías asociadas al desarrollo y progresión del PCa. Las hormonas esteroideas como los andrógenos, estrógenos y glucocorticoides tienen repercusiones en la salud de la próstata (Lacouture et al., 2022). Estudios epidemiológicos han relacionado el incremento

en las tasas de riesgo de cáncer de próstata con DDT (Band et al., 2011), así como se ha asociado la exposición a ftalatos con tumorigénesis prostática en población estadounidense (Guo et al., 2023). En cáncer de próstata la mayoría de la evidencia relaciona la acción de los EDCs como agentes antiandrógenos, además de interferir con la producción, sobreexpresión y amplificación de receptor de andrógenos (AR), mutantes de AR, variantes de splicing AR activas, sin embargo, los EDCs son capaces de interactuar con otros receptores hormonales como ER, además de actuar por mecanismos hormonales no genómicos (Song et al., 2002).

BPA

El bisfenol A es un compuesto orgánico sintético que es ampliamente utilizado como monómero en la síntesis de policarbonatos y resinas epóxicas, y ha estado comercialmente disponible desde 1957. Los productos que requieren de esta molécula para su elaboración son muy diversos desde plásticos rígidos, botellas plásticas, resinas epóxicas, dispositivos médicos, dentales, juguetes, materiales de cocina, recibos de papel térmico, y recubrimientos internos de latas y contenedores (Hoque et al., 2019). La producción mundial de BPA incrementó de 5 a 8 millones de toneladas métricas en el periodo de 2012 a 2016, y se espera que haya alcanzado los 10.6 millones el último bimestre de 2022 (Research and Markets, 2016). Debido a su gran cantidad de usos esta molécula ha sido encontrada en suelos (tanto industriales como agrícolas) (Sánchez-Brunete et al., 2009), aire (Kouidhi et al., 2017; Xue et al., 2016), agua, drenaje, sedimentos (Fromme et al., 2002) y comida (Schechter et al., 2010). Por ello se dice que el BPA es una molécula ubicua a la cual los humanos están constantemente expuestos mediante la dieta, vía dérmica, polvo, ingestión e inhalación (Lehmler et al., 2018). Distintas agencias de salud han reportado la presencia de BPA en más del 90% de muestras de orina en poblaciones de referencia (Estadounidense) (Calafat et al., 2005). Esto es particularmente relevante, pues se ha asociado al BPA con distintas patologías, por lo que se considera podría ser perjudicial para la salud humana. Por ello no es de sorprender que la exposición a BPA ha sido relacionada con muchas enfermedades humanas como obesidad (Lehmler et al., 2018; Rancière et al., 2015),

enfermedades cardiovasculares (Moon et al., 2021), diabetes mellitus tipo 2 (Hwang et al., 2018), síndrome de ovario poliquístico (Hu et al., 2018), asma (Abellan et al., 2022), así como la progresión de distintos tipos de cáncer regulado por hormonas como mama (Keshavarz-Maleki et al., 2021), testicular (Nava-Castro et al., 2019), tiroides (P.-P. Chen et al., 2022; Zhang et al., 2022) ovario (Sang et al., 2021; Zahra et al., 2021), y próstata (Di Donato et al., 2017; Tse et al., 2017), siendo este último uno de los principales tipos de tumores asociados a la exposición a EDCs. Por estas razones, agencias regulatorias internacionales como la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) y la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, han restringido el uso de BPA en productos para bebés, así como productos de almacenamiento de alimentos y bebidas de consumo humano (Peterson et al., 2009) (Baluka & Rumbeiha, 2016). Las regulaciones gubernamentales, así como la preocupación pública sobre el uso del BPA, llevaron a la producción y utilización de análogos estructurales, como el Bisfenol F (BPF; 4,4'-metilendifenol) y el bisfenol S (BPS; 4-hidroxifenil sulfona), que han demostrado una actividad citotóxica y disruptora endocrina similar (Rosenmai et al., 2014; Ullah et al., 2019).

Por lo tanto, es pertinente caracterizar completamente el papel molecular de la exposición a BPA y sus análogos estructurales BPS y BPF en cánceres regulados por hormonas, como el cáncer de próstata.

BPA en cáncer de próstata

Como se mencionó en párrafos anteriores, el cáncer de próstata es una enfermedad compleja, altamente regulada por hormonas por lo cual la exposición a disruptores endocrinos puede tener un papel crucial en la etiología de las patologías prostáticas. Revisiones sistemáticas de cerca de 29 estudios epidemiológicos y 27 modelos animales, evaluaron el potencial carcinogénico del BPA. Aunque en muchos de estos estudios la evidencia es inadecuada para establecer una correlación causal entre la exposición a BPA y carcinogénesis humana, por lo que a la fecha no se puede establecer una relación causal entre la exposición a bisfenoles y el cáncer (Prueitt et al., 2023). Sin embargo, en el cáncer de próstata resultados de un estudio epidemiológico llevado a cabo en Hong Kong, provee de la primera

evidencia epidemiológica relevante sobre la correlación entre la exposición a bisfenol A y carcinogénesis prostática. El estudio encontró que, en 431 casos, comparados con 402 controles, pareados por edad, existía una correlación positiva entre la exposición a bisfenoles, medida con el índice acumulativo de exposición a BPA CBPAI, y la incidencia de cáncer de próstata. Encontrando que los sujetos con un mayor CBPAI tenían un porcentaje de riesgo mayor y más significativo (Tse et al., 2017). Aunque la evidencia epidemiológica no ha sido significativa, los posibles mecanismos a través de los cuales los bisfenoles actúan sobre el cáncer de próstata han sido ampliamente estudiados en modelos *in silico*, *in vitro* e *in vivo*.

Al ser un EDC, el BPA puede presentar efectos genómicos y no genómicos sobre las células de cáncer de próstata; esto debido a que dicho compuesto tiene afinidad por receptores de estrógenos alfa ($ER\alpha$), codificado en el gen ESR1 y beta ($ER\beta$), codificado en el gen ESR2 (Li et al., 2012; Matthews et al., 2001); así como receptor de andrógenos (AR) (Teng et al., 2013), y receptores acoplados a proteína G (GPER) (Bouskine et al., 2009). En el caso de los mecanismos asociados a receptores hormonales, en todos los casos el BPA puede tener mecanismos de acción no genómicos rápidos (transducción de señales) y mecanismos genómicos (traslocación de receptor y regulación transcripcional), dichas señalizaciones pueden estimular la proliferación y vías antiapoptóticas. Dentro de las acciones no genómicas del BPA los principales mecanismo pueden depender de la activación de vías como la de protein cinasas activadas por mitógeno (MAPK), el eje fosfatidilinositol-3-cinasa/Akt, y protein cinasa C (Migliaccio et al., 2007). A través de sus efectos genómicos el BPA altera la transcripción de genes asociados a crecimiento celular, muerte celular, y progresión de ciclo celular (Di Donato et al., 2017). En la figura 12 se ilustran los mecanismos genómicos y no genómicos de acción del bisfenol A sobre el cáncer de próstata.

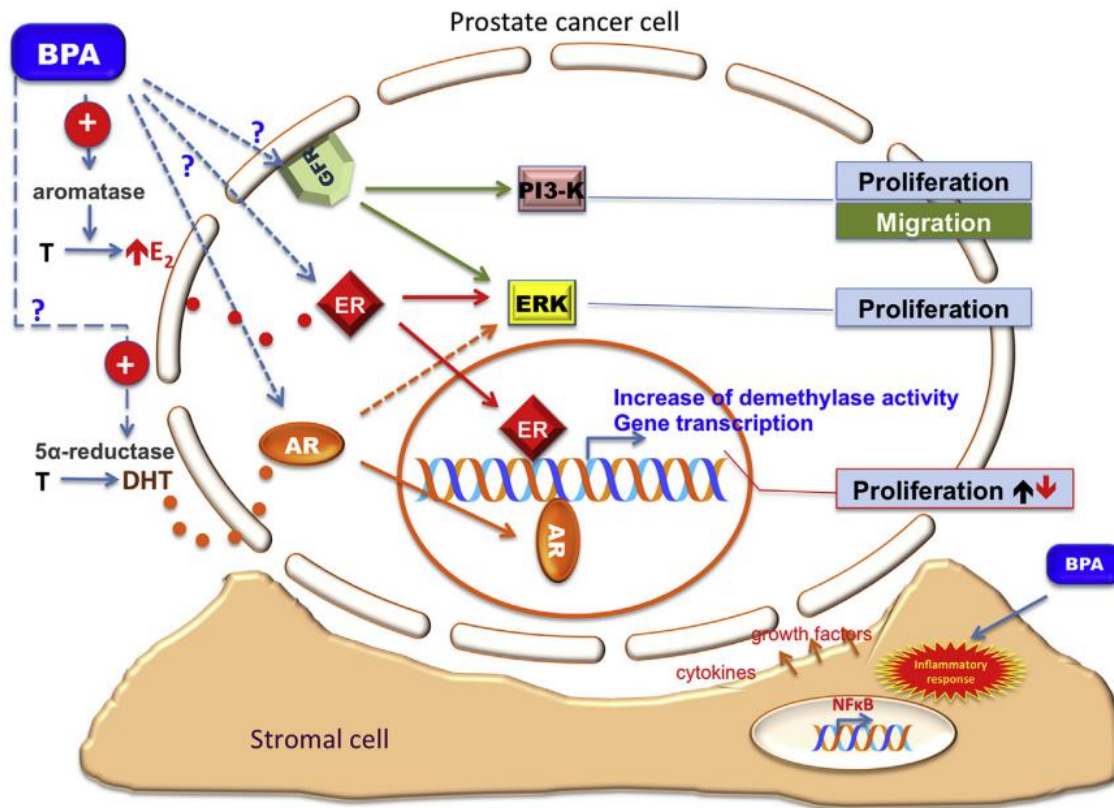


Figura 12.- Efectos genómicos y no genómicos del BPA en el microambiente prostático. Como podemos observar en la imagen, el bisfenol A puede actuar a través de distintos receptores para desencadenar la activación de cascadas de señalización que incrementan proliferación y migración, además de promover la transcripción de genes. Imagen modificada de (Di Donato et al., 2017).

Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que a través de su actividad estrogénica el BPA puede afectar la proliferación de las células de cáncer de próstata. Reportes previos describen que la exposición a BPA incrementa la susceptibilidad a lesiones precancerígenas (Ho et al., 2006). Además, a través de sus vías estrogénicas el BPA es capaz de inducir autorenovación troncal y eventos de transdiferenciación lo que induce la susceptibilidad al desarrollo tumoral (Prins et al., 2015). Aunque los efectos estrogénicos de la exposición a bisfenol A han sido ampliamente descritos, también hay evidencia de la afinidad del BPA por el AR, en células de cáncer de próstata sensibles a los andrógenos. Evidencia molecular ha demostrado que el BPA regula la proliferación de las células del cáncer de próstata e induce el arresto del ciclo celular en líneas celulares de cáncer de próstata dependientes de

andrógenos (LNCaP, LAPC4) (Bilancio et al., 2017). El AR y sus mutaciones en AR como la mutante de la proteína AR-T877A (presente en células LNCaP), parecen desempeñar un papel clave en la actividad del BPA, porque a concentraciones relevantes en el entorno (1nM), este agente es capaz de activar la expresión del antígeno específico de la próstata PSA, e inducir un crecimiento tumoral acelerado in vivo, facilitando la recurrencia bioquímica en tumores después de la terapia (Wetherill et al., 2002, 2005, 2006). Con el propósito de elucidar y ponderar cuales de los mecanismos de disrupción del BPA impactan de mayor forma sobre el transcriptoma de las células de cáncer de próstata, Hess-Wilson, et al., determinaron el perfil transcriptómico de las células LNCaP expuestas a 1nM de BPA. Este grupo descubrió que el BPA activaba los mecanismos de proliferación celular mediante la regulación negativa de ER β ; alterando la expresión de genes asociados a regulación de ciclo celular, proliferación, diferenciación, organogénesis y metabolismo (Hess-Wilson et al., 2007). Además de esto, se ha demostrado que las células de cáncer de próstata expuestas a BPA, presentan eventos de daño a DNA inducido por especies reactivas de oxígeno(Xin et al., 2014), así como alteraciones en la amplificación del centrómero, ocasionando inestabilidad cromosómica(Tarapore et al., 2014).

Sin embargo, la evidencia actual describe solamente los efectos del bisfenol A durante las etapas tempranas del CaP, donde las células son altamente sensibles a la acción de los andrógenos, pero a la fecha no se ha descrito lo que sucede cuando las células del cáncer de próstata resistentes a los andrógenos son expuestas al BPA. La línea celular PC-3 podría ser el modelo ideal para comparar la acción del BPA en condiciones de resistencia a andrógenos. Comparar las líneas celulares LNCaP y PC-3 es un enfoque común debido a sus diferencias fenotípicas, ya que las células LNCaP comparten características con el cáncer de próstata en etapa temprana (adenocarcinoma); tales como la expresión de AR, PSA , formación de cuerpos glandulares en xenotransplante y su sensibilidad a los andrógenos. Por otro lado la línea celular PC-3 presenta características comunes con el carcinoma neuroendocrino de células pequeñas (SCNC), tales como la falta de expresión de AR y PSA a nivel de proteína, proliferación independiente de la presencia de

andrógenos, no forman cuerpos glandulares en xenotransplante y, además expresan marcadores neuroendocrinos como la Enolasa Neuro-Específica (NSE) y cromogranina A (Tai et al., 2011) .

Además de esto, los modelos actuales presentan otras carencias como la falta de esclarecimiento de efectos a dosis bajas, definidos por la la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), y el Programa Nacional de Toxicología (NTP) como a aquellos cambios biológicos que:

- 1) el rango de exposiciones humanas típicas
- 2) dosis en rangos más bajos que las utilizadas en los protocolos estándar (por debajo de la evaluación toxicológica tradicional)
- 3) cualquier dosis por debajo del nivel de efecto adverso observado más bajo (LOAEL).

Por ello, es importante evaluar la exposición bajas concentraciones de EDCs debido a su relevancia biológica. Además, otra razón para caracterizar el impacto biológico de la baja concentración de EDCs es que, debido a su amplio espectro de mecanismos de acción, estos compuestos presentan efectos no lineales en la respuesta a la dosis, comúnmente conocidos como efectos no monótonos (NME, por sus siglas en inglés) (Vandenberg et al., 2012).

Con el fin de ahondar en la comprensión del impacto molecular de la exposición a bisfenoles en el desarrollo del CaP, este trabajo pretende caracterizar el efecto de estas exposiciones en líneas celulares de cáncer de próstata, LNCaP y PC-3, que representan a diferentes estados de la enfermedad, sensibilidad e independencia androgénica.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La evidencia para relacionar la exposición humana a bisfenoles es inconsistente. En este trabajo se propone analizar el efecto de la exposición a concentraciones fisiológicamente relevantes (nM) , de BPA, BPS y BPS, en líneas células de cáncer de próstata LNCaP y PC-3, como modelo de estudio, a fin de elucidar los

mecanismos moleculares que pudieran ser responsables de la correlación entre exposición y la promoción de características del cáncer (proliferación, evasión de muerte celular, migración e invasión, etc).

HIPÓTESIS

Los bisfenoles (A, F y S) modificarán el transcriptoma de las células de cáncer de próstata, en las etapas de sensibilidad (LNCaP) y de resistencia a andrógenos (PC-3). Esto promoverá la expresión diferencial de genes que activarán vías de proliferación, control de ciclo celular, migración y mecanismos de daño a DNA, según lo demostrado por evidencia previa en otros modelos.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto transcripcional de la exposición a bajas concentraciones de bisfenoles A, F y S sobre la progresión del cáncer de próstata, en un modelo *in vitro*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Esclarecer el papel transcripcional de la exposición a concentraciones bajas de bisfenoles A, F y S sobre líneas celulares LNCaP y PC-3.
- 2) Validar el efecto de los cambios transcripcionales mediante ensayos *in silico* e *in vitro*.

MÉTODOS

Las líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP y PC-3 fueron expuestas a concentraciones fisiológicamente relevantes de BPA, BPS y BPF (1, 5 y 10 nM) (Edginton & Ritter, 2009) con el fin de esclarecer el efecto de dicha exposición sobre la citotoxicidad, la proliferación, el transcriptoma, el daño al DNA y el ciclo celular.

Reactivos

El Bisfenol A (4,4'-Isopropilidenedifenol; Cas. 239658-50G; Lote # MKBX9458V), el Bisfenol S (4,4'-Sulfonildifenol; Cas. 103039-100G; Lote # MKCF0795) y el Bisfenol F (4,4'-Metilendifenol; Cas. B47006-1G; Lote # 00125KJ) fueron adquiridos de la compañía Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, 2022a, 2022c, 2022b). Para tratar las células, los bisfenoles se diluyeron en etanol absoluto, como vehículo.

Cultivo Celular

Las líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP (CRL-1740) y PC-3 (CRL-1435) fueron adquiridas de la Colección de Tipos de Cultivo Americana (ATCC, Inc.) (American Type Culture Collection, 2022; Collection, 2022). Todas las células fueron cultivadas con medio RPMI 1640 (pH= 7.4) (Merck KGaA, 2022) con un 10% de suero fetal bovino (FBS) en condiciones estándar (5% de CO₂, 37°C).

Ensayo de viabilidad celular

Aproximadamente 1×10^4 y 5×10^3 células LNCaP y PC-3 fueron sembradas en placas de 96 pocillos. Veinticuatro horas después de la siembra (confluencia aproximada del 50%), las células fueron desprovistas de hormonas utilizando medio RPMI-1640 sin rojo fenol y FBS filtrado por carbón, además de que se (1%). La baja concentración de FBS es crucial para realizar este ensayo ya que este método conocido como privación de suero promueve la sincronización del ciclo celular. Luego de 48 horas después de la privación hormonal y la sincronización, las células fueron tratadas con bisfenoles a una concentración final de 1nM, 5nM y 10nM (la concentración final del vehículo fue 1% v/v).

Cuarenta y ocho horas después del tratamiento, se retiró el medio de cultivo celular y se lavaron las células con solución salina tamponada con fosfato (PBS) 1X. Luego, se añadió un nuevo medio de cultivo preparado con el reactivo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) (Abcam, 2020). Se añadió el equivalente a 15 μ L de reactivo MTT por pocillo, diluido en 35 μ L de medio de cultivo fresco, en cada pocillo. Después de esto, las células se incubaron durante dos horas en condiciones estándar (5% de CO₂, 37°C) hasta que se observaron cristales de formazán (color púrpura). Luego, se añadieron 100 μ L de solvente reactivo MTT a cada pocillo de la placa. Las células se incubaron a temperatura ambiente hasta que se lisaron y los cristales púrpuras se disolvieron. La absorbancia se midió a 570 nm utilizando un lector de microplacas. La viabilidad celular se comparando células sin ningún tratamiento. Todos los resultados fueron normalizados respecto al control del vehículo (células sin etanol añadido).

Extracción de RNA y evaluación de la calidad

La purificación del RNA se realizó utilizando el reactivo TRI (Sigma-Aldrich, 2022d), atendiendo el protocolo del fabricante para células cultivadas en monocapa. Una vez extraído, la concentración y la pureza del RNA se midieron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop (Scientific™, n.d.), determinando la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 260 nm, y para la evaluación de la pureza se midió la relación de absorbancia a 260/A280 nm y 260/A230 nm. Consideramos que una muestra era relativamente pura cuando la relación 260/A280 nm era aproximadamente 2.0 y la relación 260/230 estaba entre 2.0 y 2.2. Luego, la calidad del RNA se determinó mediante electroforesis automatizada utilizando el Instrumento Agilent, Inc. 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, n.d.), siguiendo las indicaciones del fabricante. Las muestras con un número de integridad del RNA (RIN) ≥ 9.0 se consideraron adecuadas para las pruebas siguientes.

Ensayo de microarreglos

Para determinar el efecto de la exposición de los bisfenoles A, F y S en el transcriptoma de las líneas celulares de cáncer de próstata, utilizamos el Ensayo de microarreglos Clariom™ D humano, que contiene sondas para reconocer >542,500

transcritos humanos, lo que proporciona una amplia vista del perfil de expresión del transcriptoma humano (Thermo Fisher Scientific Inc, 2016). Seguimos el protocolo del fabricante para el preprocesamiento de las muestras, el etiquetado, la hibridación y revelado de los microarreglos (Thermo Fisher Scientific Inc, 2020).

Análisis de Datos

Análisis de Expresión Diferencial

Los datos se analizaron utilizando la Consola de Análisis del Transcriptoma (TAC 4.0.2) de Thermo-Fisher Scientific. Los datos brutos se procesaron para la normalización y el análisis a nivel de genes utilizando el método de media robusta de para varios arreglos (RMA) incluido en el software TAC. Cada condición experimental tenía tres réplicas independientes de microarreglos. La expresión diferencial (DE) fue calculada utilizando las medias de las señales de expresión génica para obtener las veces de cambio (FC) de los valores de expresión. El análisis estadístico se realizó utilizando el método ebyes limma incluido en el software TAC. Se consideraron significativos los valores de $FC \geq 2$, ≤ -2 y con un valor de p-valor a nivel de gen ≤ 0.05 . Los gráficos de volcán y los clustergramas (mapas de calor) se obtuvieron a partir del software TAC (Affymetrix, 2019).

Análisis de Enriquecimiento (Sobre-representación) de Vías

Los genes diferencialmente expresados (DEGs) de cada exposición se filtraron en dos conjuntos de datos nuevos, uno que contenía los DEGs sobreexpresados y otro que contenía los DEGs subexpresados. Cada nuevo conjunto de datos se utilizó como entrada para el paquete EnrichR en R (Kuleshov et al., 2016) para realizar el análisis de sobre-representación de vías. Se consideró la biblioteca GO_biological_Process_2018 para realizar el análisis de sobre-representación. Las vías se consideraron estadísticamente enriquecidas si tenían un valor de $p < 0.05$ y se ordenaron considerando su razón de probabilidad (Odd ratio). La visualización de dotplot se construyó utilizando el paquete R ggplot2(Wickham, 2016).

Análisis de redes

Para comprender mejor cómo interactúan los genes diferencialmente expresados entre sí, construimos una red de interacción proteína-proteína considerando solo los RNAm codificantes, utilizando Cytoscape (Shannon et al., 2003) y el complemento STRING (Szkarczyk et al., 2015). Una vez construida cada red, cargamos los datos de expresión para cada nodo y creamos una visualización donde cada nodo rojo estaba sobreexpresado y cada nodo azul estaba subexpresado. Después de esto, realizamos un análisis de centralidad, el grado de los datos se representó mediante el tamaño de cada nodo, siendo los nodos con un grado más alto los más grandes. Luego, utilizamos el algoritmo MCODE (Bader & Hogue, 2003) para identificar regiones densas de interacciones proteína-proteína, lo que permite construir grupos de interacciones con estas regiones, muchas de las cuales corresponden a complejos proteicos o proteínas involucradas en la misma vía.

Ensayo de Micronúcleos y Bloqueo de Citocinesis (CBMN)

El ensayo de CBMN es un método validado en todo el mundo, utilizado para analizar efectos genotóxicos. El ensayo se llevó a cabo de acuerdo con las condiciones descritas por (Fenech et al., 2003) pero adaptado para células cultivadas en monocapa. Se sembraron 0.5×10^6 células en un portaobjetos en platos de 60 mm. Las células se expusieron a bisfenoles A, F y S (1nM, 5nM y 10nM), a etanol como control negativo y a Mitomicina C (5 μ M) como control positivo durante 48 horas. Después del tiempo de tratamiento, se añadió citocalasina B (concentración final de 3 mg/ml) durante 24 horas. Las células en los portaobjetos se fijaron en metanol/ácido acético (3:1). Los portaobjetos se tiñeron con colorante Wright y se montaron en portaobjetos para su evaluación microscópica. La cinética de proliferación celular se analizó determinando la frecuencia de células mononucleadas (Mono), binucleadas (Bi) y polinucleadas (Poly). La actividad citostática se determinó calculando el índice de proliferación nuclear (NPI) con la fórmula $NDI = [M + 2(BN) + 3(P)]/N$, siendo N el número total de células contadas. La frecuencia de MN se determinó en 500 células binucleadas por grupo de

tratamiento, y esta medida está asociada con el daño al DNA. Este ensayo se llevó a cabo con tres réplicas biológicas, por triplicado cada una (n= 9).

Ensayo del Cometa alcalino

Para realizar el ensayo del cometa alcalino, seguimos las indicaciones descritas por (Lu et al., 2017), adaptadas a las líneas celulares LNCaP y PC-3 cultivadas en monocapa. Las células se expusieron a bisfenol A, S y F (1, 5 y 10 nM), tanto el control positivo (Mitomicina C 5 μ M) durante 48 horas. Después de la exposición, el cultivo fue desprendido de la monocapa y se resuspendió en 1 mL de RPMI 1640. Luego, se incubaron durante una hora con 10 μ L de N-hidroxiurea 10 nM. Después de la incubación, se agregaron 150 μ L de agarosa de punto de fusión bajo (LMP) a cada muestra. Se añadieron 75 μ L de la solución a láminas de vidrio previamente preparadas con agarosa de punto de fusión bajo. Las láminas de vidrio se cubrieron con un cubreobjetos y se incubaron a 4°C durante 5 minutos. Después de la incubación, se añadieron los otros 75 μ L a las láminas de vidrio y se incubaron durante otros 5 minutos. Las láminas de vidrio se sumergieron en 50 mL de solución de lisis (2.5M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 100 mM Tris, pH > 10) con 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) y 0.5 mL de solución de Triton X-100. Las láminas de vidrio se incubaron en esta solución durante una hora. Tras esto, las células fueron incubadas 20 minutos en una solución búfer alcalina (10 M NaOH, 200 mM EDTA-Na₂, pH > 13), la cual ayudará con la detección del daño a DNA incluyendo rupturas de cadena sencilla (SSB), sitios lábiles a álcalis (ALS), y entre cruzamientos DNA-DNA/ DNA-proteína. Tras el desdoblamiento alcalino las laminillas fueron sometidas a una electroforesis durante 40 minutos a 25 V. Después de la electroforesis, las láminas de vidrio se lavaron con 2 mL de Tris pH 7.4 y se fijaron con etanol. Las láminas se secaron en condiciones ambientales. Para leer las muestras, las laminillas se tiñeron con 10 μ L de bromuro de etidio (20 μ g/ml). Finalmente determinamos la presencia del cometa y su momento (relación entre longitud e intensidad) con el sistema de análisis de imágenes del ensayo del Cometa IV de (Perceptive instruments, 2016). Para este ensayo se utilizaron tres réplicas

biológicas por triplicado (n =9). En cada lectura se evaluaron un total de 60 células por muestra, dando un total de 540 eventos capturados para cada grupo.

Análisis del Ciclo Celular por citometría de flujo

El análisis del ciclo celular se realizó mediante el método de yoduro de propidio acoplado a la citometría de flujo. Las células se expusieron a bisfenol A, S y F (1, 5 y 10 nM) y al vehículo (Etanol) durante 24 y 48 horas. Además, se utilizaron linfocitos humanos como estándar de la prueba (Fase G0 del ciclo celular). Las células se digirieron con 1 mL de tripsina y se centrifugaron a 1200 rpm durante 8 minutos a 4°C. El pellet celular se resuspendió en 40 µL de PBS frío y luego se agregaron 460 µL de etanol frío. La suspensión se almacenó a -20°C durante al menos 24 horas. Después del tiempo de almacenamiento, las células se centrifugaron a 2000 rpm durante 6 minutos a 4°C. Los pellets celulares se resuspendieron en una solución de tinción (yoduro de propidio 2 mg/mL) e incubaron en condiciones oscuras durante 30 minutos. Cada muestra se cargó en el citómetro y los resultados se analizaron con el software Verity's ModFit LT versión 3.3 (Verity Software House, 2013). Se realizaron 3 réplicas biológicas por triplicado para cada exposición (n=9), en cada una de las cuales se determinaron 10,000 eventos.

RESULTADOS

Efecto de la exposición a los bisfenoles sobre la viabilidad celular

Líneas celulares de cáncer de próstata sensibles y resistentes a los andrógenos (LNCaP y PC-3) fueron expuestas a concentraciones bajas de BPA, BPS y BPF (1, 5 y 10 nM) y al vehículo (Etanol) durante 48 horas (3 réplicas biológicas por triplicado cada una). Posteriormente, se determinó la viabilidad celular utilizando el ensayo del metiltetrazolio MTT para viabilidad celular.

Las líneas celulares LNCaP no mostraron cambios de viabilidad estadísticamente significativos a ninguna concentración (Fig. 13A), pero la línea celular PC-3 presentó una disminución en su viabilidad celular a una concentración de 10 nM después de la exposición a cada bisfenol (Fig. 13B). Se observaron diferencias sustanciales en

el patrón de respuesta a la dosis de ambas líneas celulares después de la exposición a los bisfenoles, donde las líneas celulares PC-3 presentan una tendencia hacia una respuesta a la dosis no monotónica. Un patrón similar de respuesta a la dosis no monotónica fue reportado en células epiteliales prostáticas de ratas expuestas a concentraciones de nM de BPA(Huang et al., 2017).

Para determinar la proliferación celular, las líneas celulares de cáncer de próstata fueron expuestas a los bisfenoles A, S y F en las mismas concentraciones que se describieron anteriormente; durante 24, 48, 72 y 96 horas. Después de la exposición, las células fueron teñidas con cristal violeta y el tinte fue cuantificado por espectrofotometría. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la proliferación celular en las células LNCaP (Fig. 13C), pero encontramos diferencias en las líneas celulares PC-3 a las 24 horas (BPA 5 nM y BPF 10 nM) (Fig. 13D). Además, hay una tendencia creciente en la línea celular PC-3 a las 72 horas, sin embargo, no es significativa. Esta evidencia sugiere que el efecto de los bisfenoles sobre la proliferación celular en las células de cáncer de próstata puede ser diferente según la etapa de la enfermedad y la sensibilidad a los andrógenos.

Los ensayos de viabilidad y el curso temporal de viabilidad (medida indirecta de proliferación) celular nos ayudaron a determinar la concentración de trabajo y el tiempo de exposición para realizar el análisis del transcriptoma. Dado que el ensayo de viabilidad celular indica posible citotoxicidad a una concentración de 10 nM para la línea celular PC-3, se eligió la concentración de 5nM para determinar el efecto transcripcional, ya que esta concentración fue la máxima concentración sin efectos adversos observados (NOAEL) determinada para nuestro modelo.

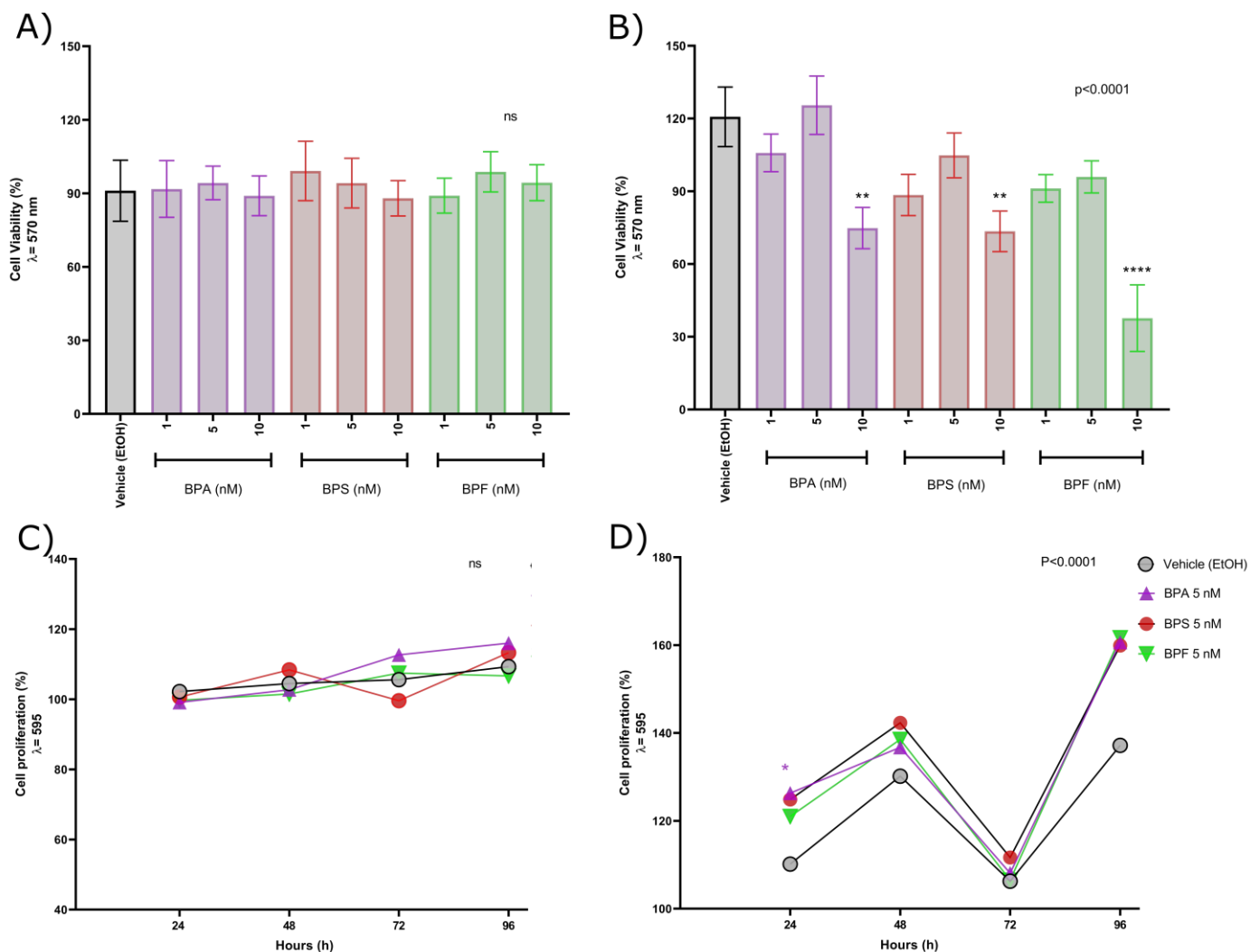


Figura 13.- Viabilidad celular en líneas de cáncer de próstata: (a) Viabilidad celular en la línea celular sensible a los andrógenos LNCaP; (b) Viabilidad celular en la línea celular independiente de los andrógenos PC-3. En ambos casos, las células fueron expuestas durante 48 horas a cada bisfenol (A, S y F) a concentraciones de 1, 5 y 10 nM. Los resultados se expresan como % de cambio respecto al control negativo (células sin vehículo) (c) Curso temporal de viabilidad en la línea sensible a los andrógenos LNCaP; (d) Curso temporal de viabilidad celular en la línea independiente de los andrógenos PC-3. En ambos casos, las células fueron expuestas durante 24, 48, 72 y 96 horas a cada bisfenol (A, S y F) a concentraciones de 1, 5 y 10 nM. La viabilidad celular se midió mediante el método MTT y se midió la absorbancia a $\lambda = 570$ nm. Los valores se normalizaron con las medidas de absorbancia de las células no tratadas. Cada grupo se comparó con las células expuestas al vehículo (EtOH) utilizando una prueba ANOVA unidireccional ordinaria,

considerando una significancia estadística a $p < 0.05$; luego se realizó una prueba de comparación múltiple de Dunnett para determinar las diferencias de cada grupo en comparación con el grupo de control, considerando un $\alpha = 0.05$ y un $p < 0.05$. La determinación temporal de viabilidad celular se midió utilizando violeta de cristal. Después de cada tiempo de exposición, las células se tiñeron con violeta de cristal y se eluyó el tinte en ácido acético. Se midió la absorbancia a $\lambda = 595$. Los valores se normalizaron con las medidas de absorbancia de las células no tratadas. Cada grupo se comparó con las células expuestas solo al vehículo (EtOH) utilizando una prueba ANOVA bidireccional ordinaria, considerando una significancia estadística a $p < 0.05$; luego se realizó una prueba de comparación múltiple de Dunnett para determinar las diferencias de cada grupo en comparación con el grupo de control, considerando un $\alpha = 0.05$ y un $p < 0.05$.

Efecto transcripcional de los Bisfenoles en las células de CaP

Se utilizó RNA total de células de cáncer de próstata sensibles a los andrógenos, LNCaP y resistentes a los andrógenos, PC-3. Cada línea celular fue expuesta a una concentración 5 nM de bisfenoles (BPA, BPS y BPF) durante 48 horas, para caracterizar los perfiles transcripcionales mediante la técnica de microarreglos. Después de evaluar la calidad y normalizar los datos de microarreglos, se realizó un análisis de expresión diferencial utilizando estadísticas de bayes empírico para la expresión diferencial (ebayes).

La exposición a BPA en las células LNCaP resultó en un total de 2750 genes diferencialmente expresados (DEGs), de los cuales 1533 estaban sobreexpresados y 1217 estaban subexpresados (Figura 14A). De manera similar, la exposición a BPS indujo la expresión diferencial de 2416 genes, de los cuales 1922 estaban sobreexpresados y 494 estaban subexpresados (Figura 14B); y la exposición a BPF presentó 3931 DEGs, de los cuales 2847 estaban sobreexpresados y 1084 estaban subexpresados (Figura 14C). El perfil de expresión para cada exposición se representó en un diagrama de agrupamiento, revelando que cada compuesto indujo un efecto transcripcional único en la línea celular LNCaP (Figura 14D).

La línea celular de cáncer de próstata resistente a los andrógenos, PC-3, fue menos sensible a la exposición a los bisfenoles, ya que se observaron menos DEGs. La exposición a BPA resultó en 738 DEGs, de los cuales 318 estaban sobreexpresados

y 420 estaban subexpresados (Figura 14E). La exposición a BPS indujo la expresión diferencial de 456 DEGs, de los cuales 208 estaban sobreexpresados y 248 estaban subexpresados (Figura 14F). Finalmente, en la exposición a BPF hubo 359 DEGs, de los cuales 106 estaban sobreexpresados y 253 estaban subexpresados (Figura 14G). Los diagramas de agrupamiento que ilustran los perfiles de expresión de cada exposición a los bisfenoles revelaron un perfil transcripcional único para cada exposición (Figura 14H). Se construyó un gráfico de "upset" para comparar los efectos transcripcionales de las diferentes exposiciones a los bisfenoles en las líneas celulares de cáncer de próstata. La exposición de las células LNCaP a BPS y BPF compartió 1004 genes DE, mientras que la exposición a los tres bisfenoles compartió solo 161 genes DE. Para las líneas celulares PC-3, las exposiciones a BPA y BPS compartieron 60 genes DE, y las exposiciones a BPF y BPS compartieron 52 genes DE. Solo se compartieron 27 genes DE en las tres exposiciones para la línea celular PC-3. En conclusión, cada exposición a los bisfenoles tiene un efecto diferencial en el transcriptoma de las líneas celulares de cáncer de próstata (LNCaP y PC-3), y es necesario explorar las posibles implicaciones de estos efectos, por lo que realizamos la caracterización funcional del efecto transcripcional de estas exposiciones a los bisfenoles (Figura 14I).

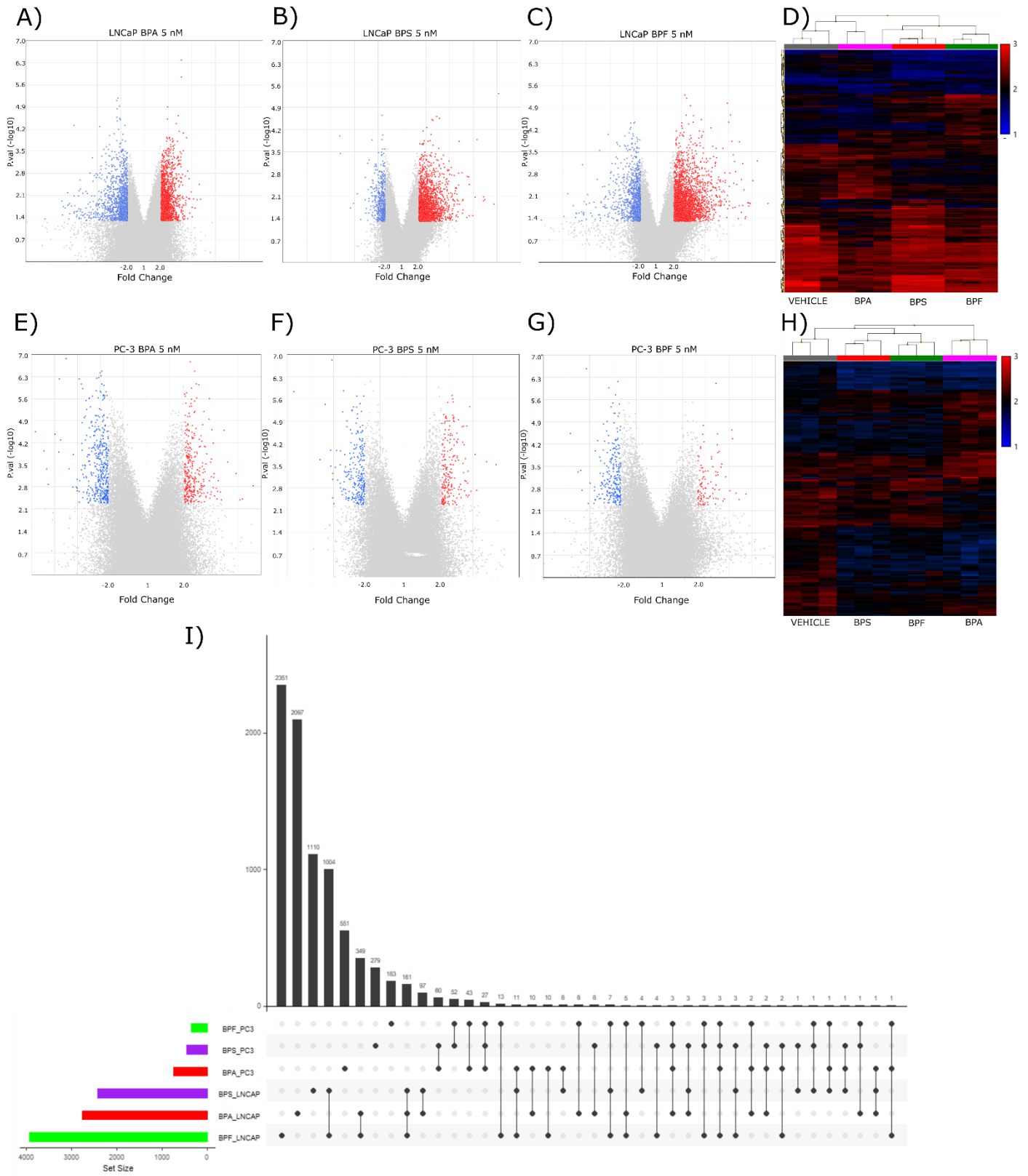


Figura 14. Análisis de expresión diferencial de las líneas celulares de cáncer de próstata (LNCaP y PC-3) expuestas a los bisfenoles A, S y F. Los gráficos de volcán presentan los

genes diferencialmente expresados tras la exposición a los bisfenoles, los puntos azules representan genes subexpresados y los puntos rojos representan genes sobreexpresados. Los mapas de calor reproducen los perfiles de expresión de genes diferencialmente expresados al comparar el control (vehículo) con cada exposición a los bisfenoles.

Gráficos de volcán para células LNCaP expuestas a: A) BPA 5 nM B) BPS 5 nM C) BPF 5 nM D) Perfiles de expresión para células LNCaP expuestas a los bisfenoles A, S y F. Gráficos de volcán para células PC-3 expuestas a: E) BPA 5 nM F) BPS 5 nM G) BPF 5 nM H) Perfiles de expresión para células PC-3 expuestas a los bisfenoles A, S y F. Gráfico de "upset" que muestra los genes DE compartidos entre todas las exposiciones a los bisfenoles. Los puntos indican los niveles de interacciones y las barras indican el número de genes DE (I).

Análisis de sobrerepresentación de vías

Con el fin de comprender mejor el posible papel de estos cambios transcripcionales en las líneas celulares de cáncer de próstata, se realizó un análisis de sobre-representación de vías utilizando el paquete EnrichR(Kuleshov et al., 2016). El análisis de sobre-representación determinó si los genes de conjuntos predefinidos, como los términos de la Gene Ontology (GO), se encontraban estadísticamente más presentes de lo esperado en nuestros datos. Para realizar este análisis, los genes DE de codificación de proteínas para cada exposición a los bisfenoles se dividieron en dos conjuntos de genes, uno que contenía los genes DE sobreexpresados ($FC > 2$) y otro que contenía los genes DE subexpresados ($FC < -2$). Una vez que los conjuntos de datos se dividieron, se realizó el análisis de sobre-representación de vías considerando que los términos de la GO estaban sobre-representados si tenían un valor de $p < 0.05$ y se ordenaron según su puntuación combinada.

Vías sobreexpresadas

En las células LNCaP expuestas a BPA, la única vía estadísticamente sobreexpresada fue la señalización del receptor de activina (Figura 15A), que previamente se asoció con la regulación de la adhesión y la viabilidad de las células prostáticas(Simon et al., 2009). El BPS alteró trece vías relacionadas con el metabolismo de biomoléculas, el procesamiento de proteínas, la diferenciación y el

control de la mitosis (Figura 15B y 15G). La exposición a BPF alteró sesenta y seis vías de metabolismo de biomoléculas, transporte de vesículas, control del ciclo celular, función de vacuolas y respuesta celular a estímulos (Figura 15C y 15G). Solo hubo seis términos de la GO compartidos entre la exposición a BPF y BPS (principalmente relacionados con el metabolismo celular, la función de vacuolas y el procesamiento de RNA), lo que indica que el efecto de estos compuestos sobre los genes DE sobreexpresados fue más similar en comparación con las otras exposiciones (Figura 15G). En las líneas celulares PC-3, las principales vías sobre-representadas fueron la adhesión célula-célula epitelial en la exposición a BPA (Figura 15D), la circulación sanguínea en el caso de la exposición a BPF y diecisiete términos de la GO enriquecidos (Figura 15F) para la exposición a BPS, relacionados con el metabolismo de biomoléculas (como nucleótidos), quimiotaxis de células inmunitarias y procesamiento de proteínas (Figura 15E y 15G).

Vías subexpresadas

Para todas las exposiciones a los bisfenoles, hubo más vías enriquecidas cuando utilizamos los genes DE subexpresados como entrada para el análisis de EnrichR. En las células LNCaP expuestas a BPA, las vías enriquecidas estadísticamente fueron aquellas relacionadas con la elongación, el metabolismo y la reparación del DNA, así como la respuesta al daño del DNA, el control del ciclo celular, la transición de fase del ciclo celular mitótico y la función mitocondrial (Figura 16A). Para la exposición a BPS en las células LNCaP, las principales vías sobre-representadas fueron aquellas relacionadas con la importación y el metabolismo de esteroides y colesterol, y también se alteró la biosíntesis de diferentes biomoléculas.

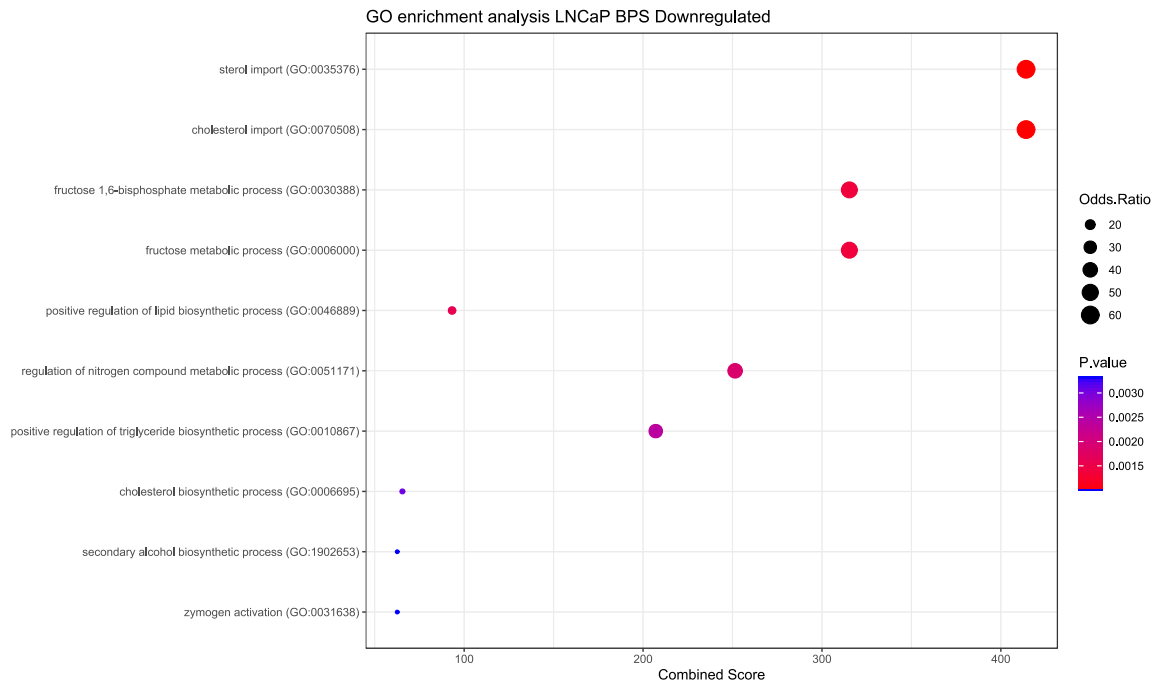
La exposición a BPF alteró vías relacionadas con la reparación del DNA, la replicación, el metabolismo, el control del ciclo celular y la organización de la cromatina en las células LNCaP (Figura 16C). En las líneas celulares PC-3, el bisfenol A alteró vías relacionadas con la división celular, la proliferación, el control del ciclo celular, la respuesta al daño del DNA y la regulación de la apoptosis (Figura 16D). La exposición al bisfenol S afectó vías relacionadas con la señalización apoptótica en las mitocondrias, el transporte de iones fosfato, la inserción de

proteínas en las mitocondrias y el factor de crecimiento endotelial vascular (Figura 16E). En el caso de la exposición a BPF, se observó una regulación negativa de genes relacionados con el control del ciclo celular, la transición de fase mitótica, el transporte mitocondrial y la respuesta al daño del DNA (Figura 16F). A partir del gráfico Upset, se determinó que había algunas vías enriquecidas comunes entre las diferentes exposiciones a los bisfenoles (Figura 16G). Hubo una vía enriquecida compartida entre las exposiciones de LNCaP a BPA, BPF y la exposición de PC-3 a BPS y BPF, que era el término GO:0006839 asociado al transporte mitocondrial. Otro término GO compartido entre cuatro exposiciones fue GO:0030330 (respuesta al daño del DNA, transducción de señales por mediadores de la clase p53), que se compartía entre la exposición de PC-3 a BPA y BPF, y también entre las exposiciones de LNCaP a BPA y BPF. Hubo veintitrés términos GO compartidos entre tres exposiciones a los bisfenoles (Figura 16G), la mayoría de ellos relacionados con el control del ciclo celular, la respuesta al daño del DNA y el metabolismo de biomoléculas, como por ejemplo GO:0010564 (regulación del proceso del ciclo celular), GO:0000086 (transición G2/M del ciclo celular mitótico), GO:0006977 (respuesta al daño del DNA, transducción de señales por mediadores de la clase p53 que resulta en la detención del ciclo celular), GO:0007077 (desmontaje de la membrana nuclear mitótica), GO:0007346 (regulación del ciclo celular mitótico). Dado que la mayoría de los términos GO enriquecidos compartidos entre tres o más exposiciones a los bisfenoles estaban relacionados con el daño del DNA, el control del ciclo celular y el metabolismo de biomoléculas, se realizaron más ensayos para dilucidar si la interrupción del transcriptoma era capaz de inducir un efecto fenotípico.

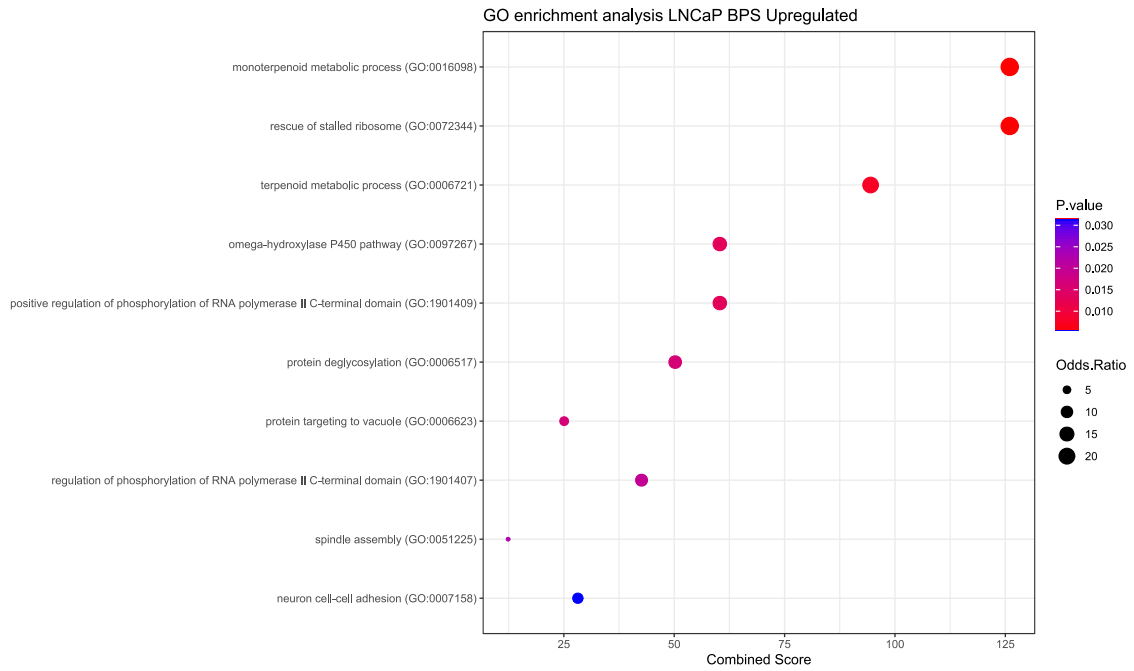
La exposición a BPF alteró vías relacionadas con la reparación del DNA, la replicación, el metabolismo, el control del ciclo celular y la organización de la cromatina en las células LNCaP (Figura 16C). En las líneas celulares PC-3, el bisfenol A alteró vías relacionadas con la división celular, la proliferación, el control del ciclo celular, la respuesta al daño del DNA y la regulación de la apoptosis (Figura 16D). La exposición al bisfenol S afectó vías relacionadas con la señalización apoptótica en las mitocondrias, el transporte de iones fosfato, la inserción de

proteínas en las mitocondrias y el factor de crecimiento endotelial vascular (Figura 16E). En el caso de la exposición a BPF, se observó una regulación negativa de genes relacionados con el control del ciclo celular, la transición de fase mitótica, el transporte mitocondrial y la respuesta al daño del DNA (Figura 16F). A partir del gráfico Upset, se determinó que había algunas vías enriquecidas comunes entre las diferentes exposiciones a los bisfenoles (Figura 16G). Hubo una vía enriquecida compartida entre las exposiciones de LNCaP a BPA, BPF y la exposición de PC-3 a BPS y BPF, que era el término GO:0006839 asociado al transporte mitocondrial. Otro término GO compartido entre cuatro exposiciones fue GO:0030330 (respuesta al daño del DNA, transducción de señales por mediadores de la clase p53), que se compartía entre la exposición de PC-3 a BPA y BPF, y también entre las exposiciones de LNCaP a BPA y BPF. Hubo veintitrés términos GO compartidos entre tres exposiciones a los bisfenoles (Figura 16G), la mayoría de ellos relacionados con el control del ciclo celular, la respuesta al daño del DNA y el metabolismo de biomoléculas, como por ejemplo GO:0010564 (regulación del proceso del ciclo celular), GO:0000086 (transición G2/M del ciclo celular mitótico), GO:0006977 (respuesta al daño del DNA, transducción de señales por mediadores de la clase p53 que resulta en la detención del ciclo celular), GO:0007077 (desmontaje de la membrana nuclear mitótica), GO:0007346 (regulación del ciclo celular mitótico), por mencionar algunos ejemplos (Suplemento 1). Dado que la mayoría de los términos GO enriquecidos compartidos entre tres o más exposiciones a los bisfenoles estaban relacionados con el daño del DNA, el control del ciclo celular y el metabolismo de biomoléculas, se realizaron más ensayos para dilucidar si la interrupción del transcriptoma era capaz de inducir un efecto fenotípico.

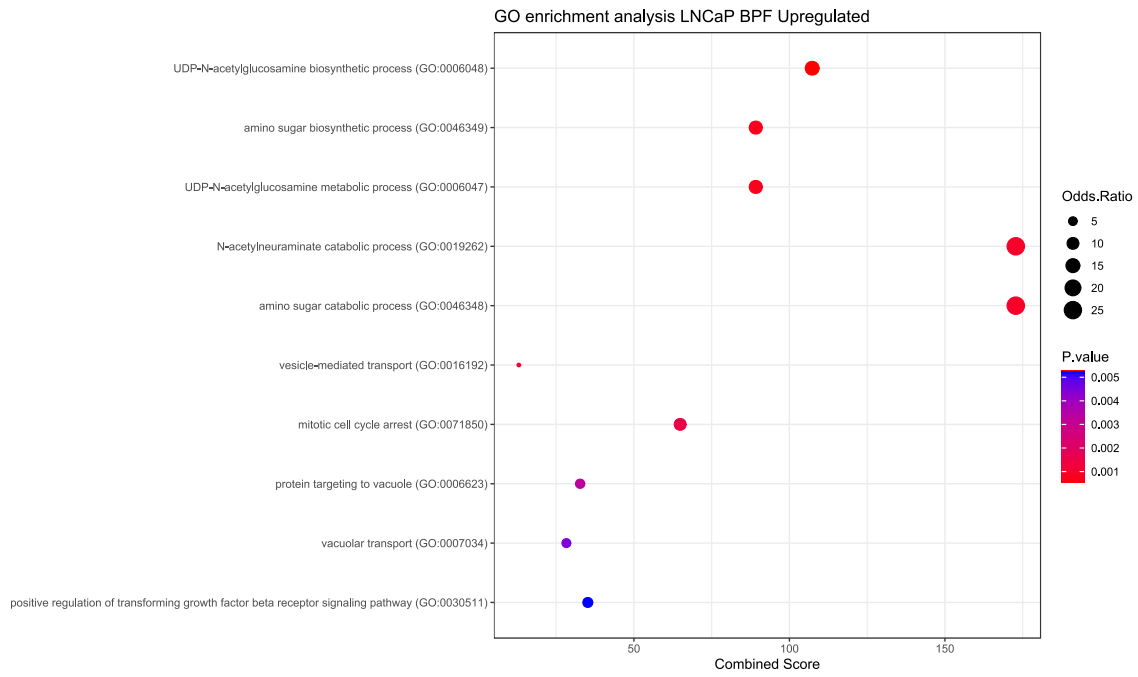
A)



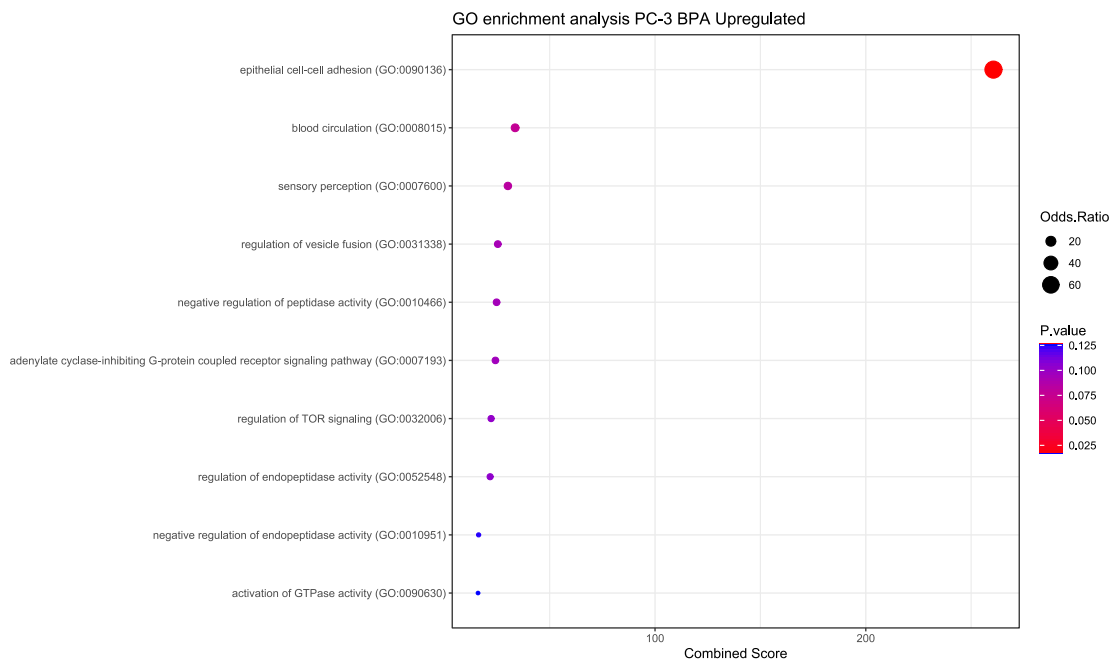
B)



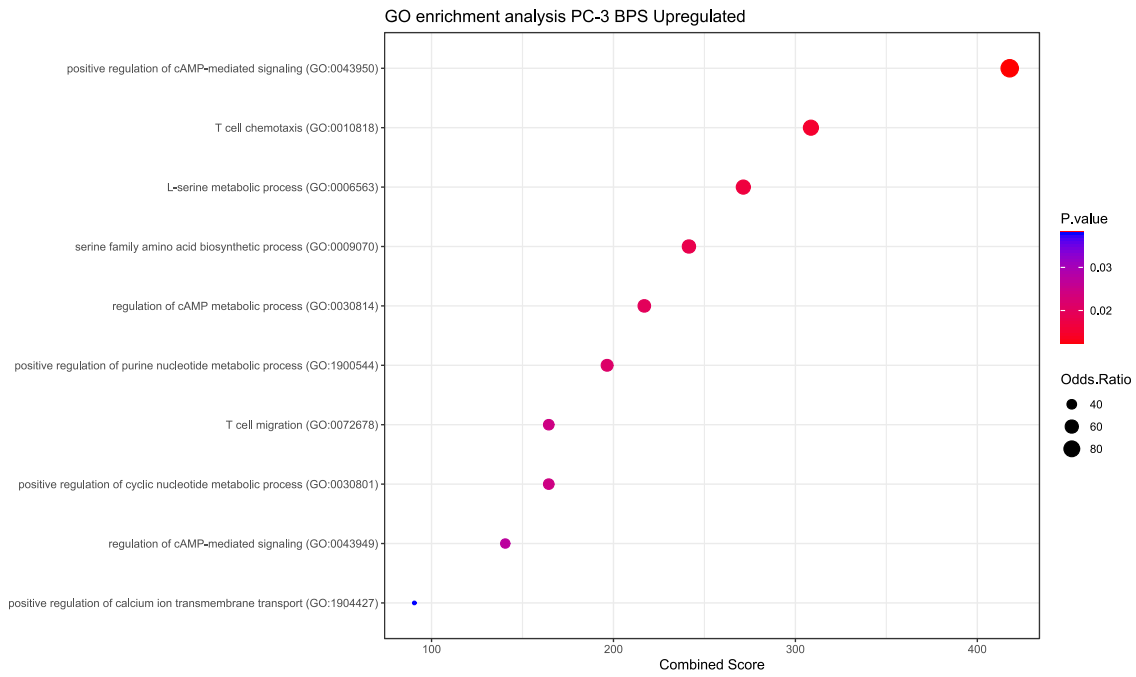
C)



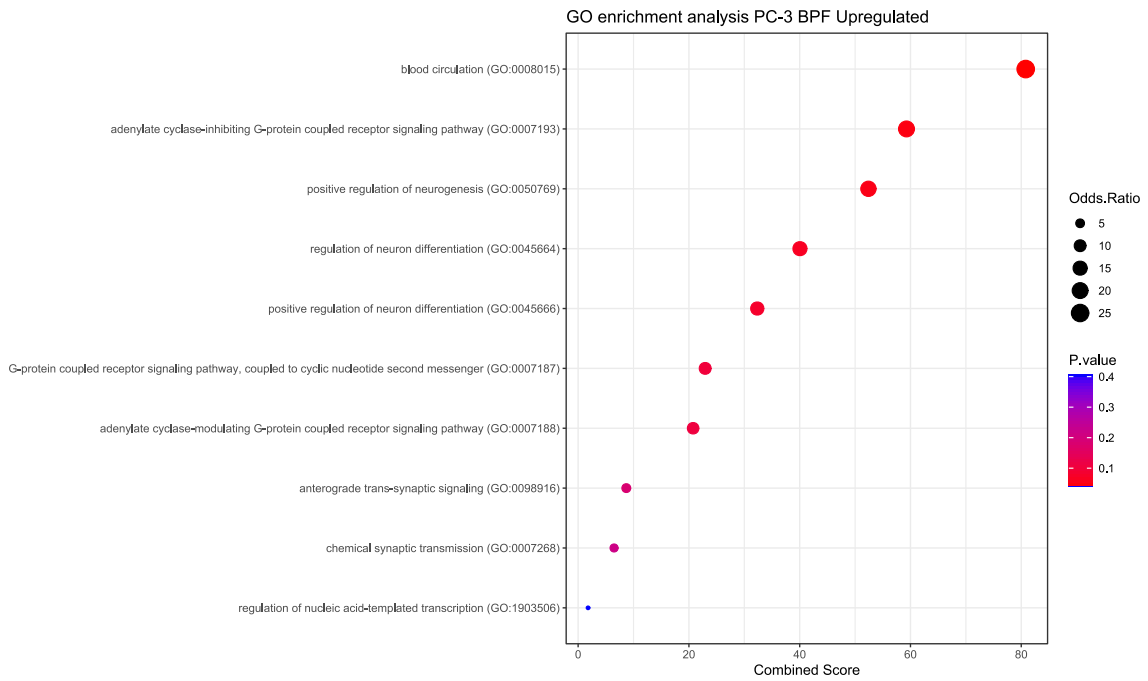
D)



E)



F)



G)

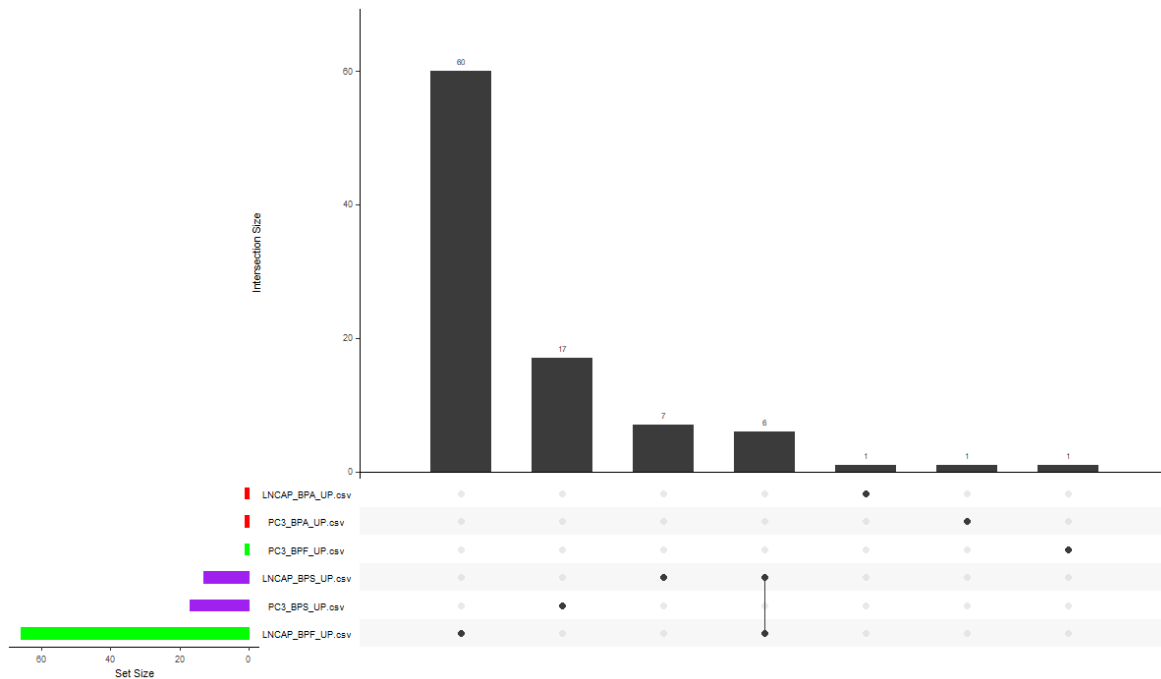
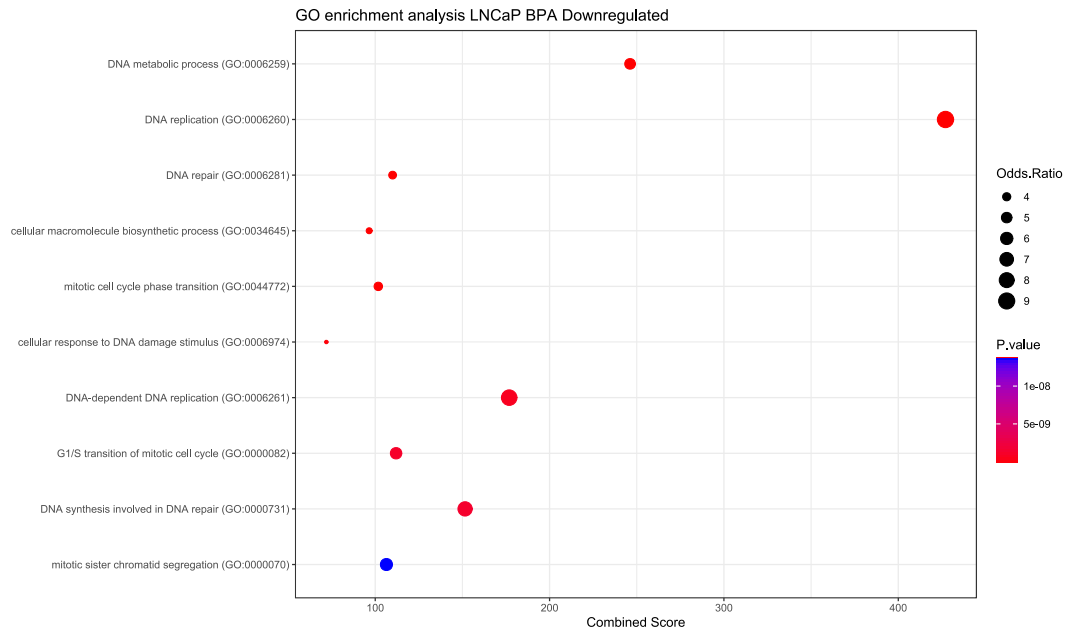
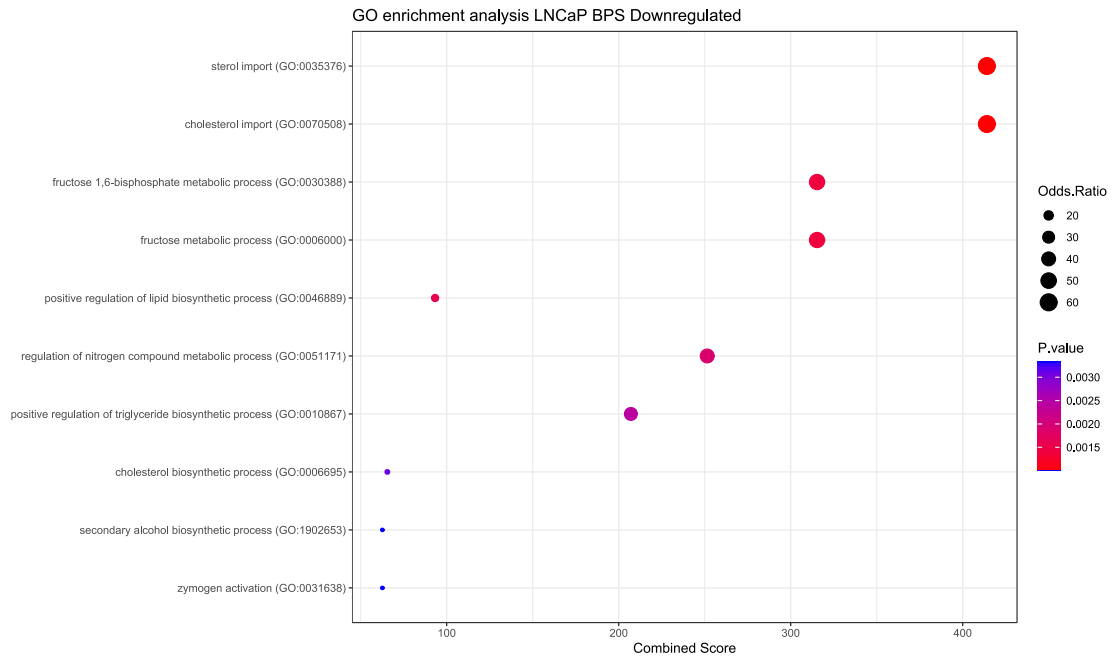


Figura 15. Análisis de sobre-representación de vías a partir de genes DE sobreexpresados. Los gráficos de puntos representan las vías enriquecidas, el tamaño de cada punto indica la razón de probabilidad y el color representa el valor de p para cada vía. Los gráficos de puntos para las células LNCaP expuestas a BPA (A), BPS (B) y BPF (C), representan las veinte vías enriquecidas principales para cada exposición. Para las líneas celulares PC-3, las principales vías sobre-representadas se representaron mediante los gráficos de puntos (D) para la exposición a BPA, (E) para la exposición a BPS y (F) para la exposición a BPF. El gráfico Upset con las principales vías sobre-representadas para cada exposición a los bisfenoles se representan en la figura (G).

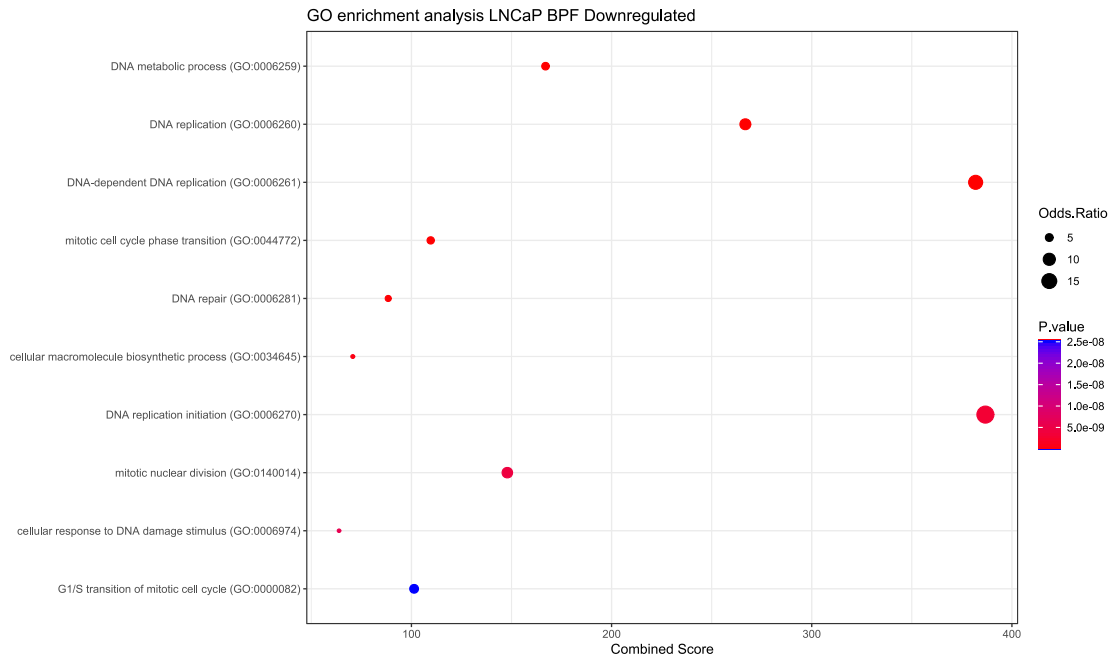
A)



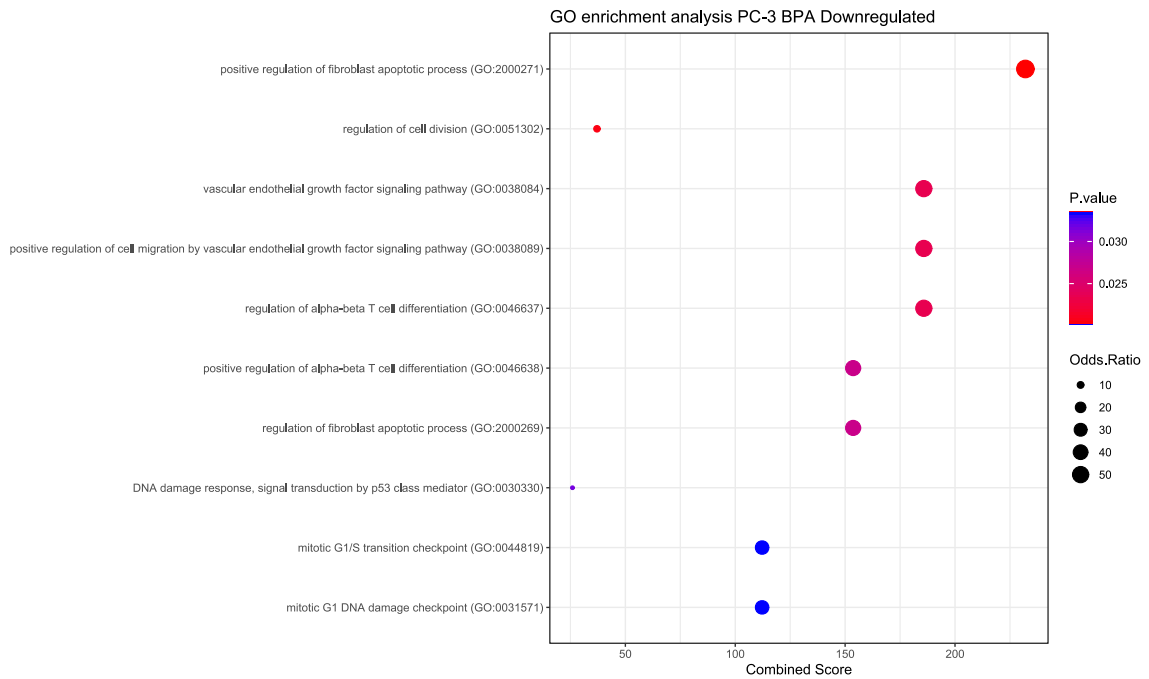
B)



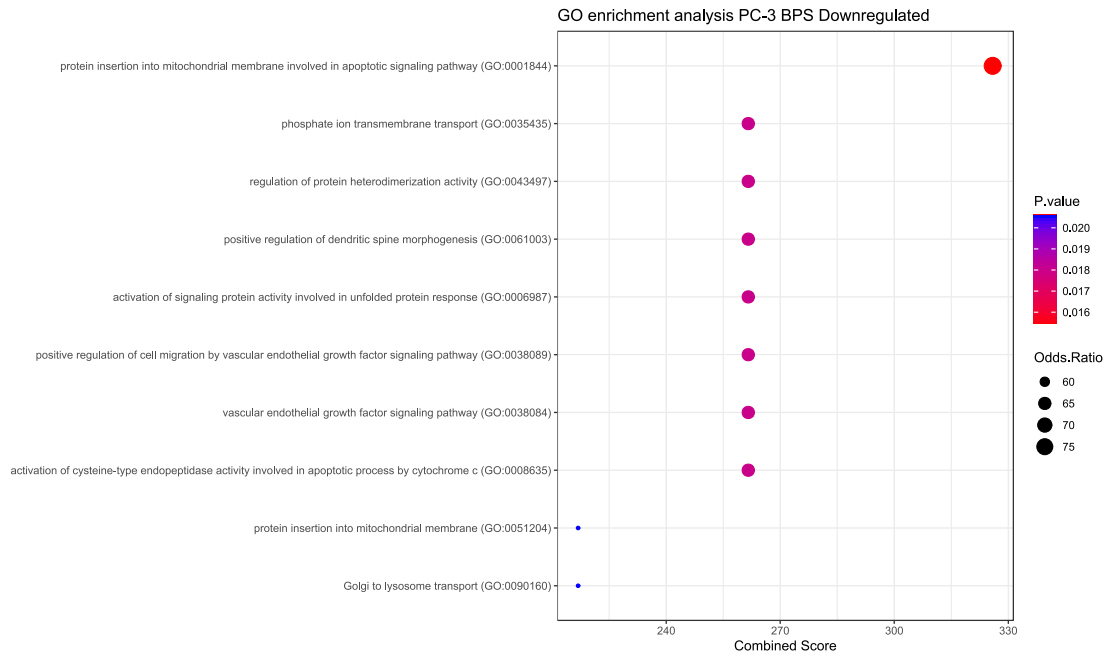
C)



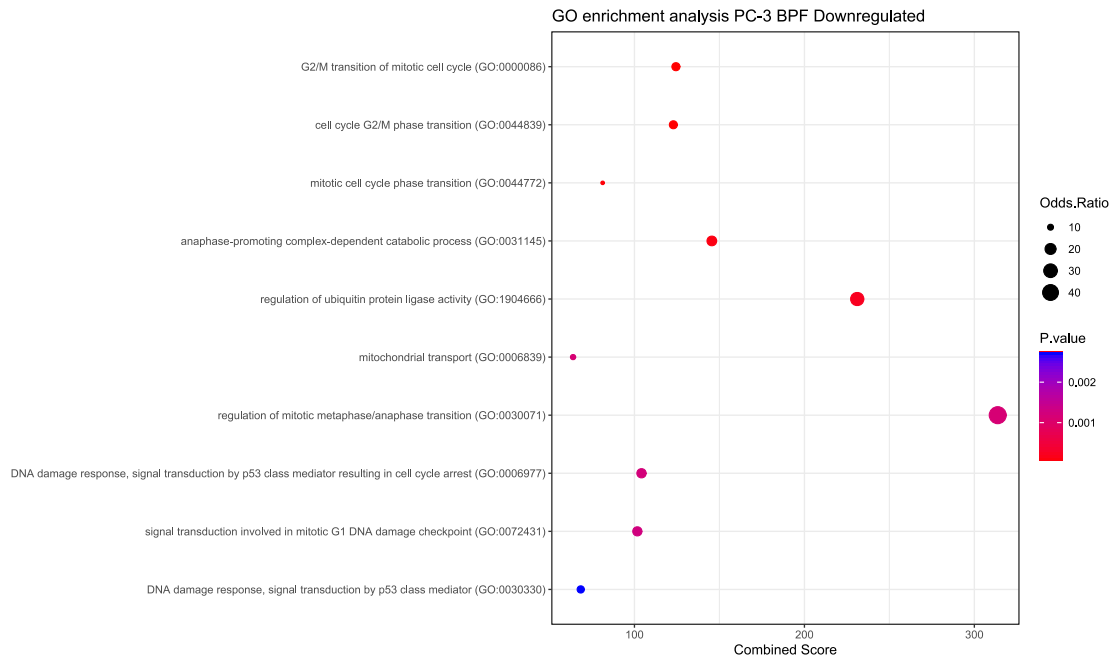
D)



E)



F)



G)

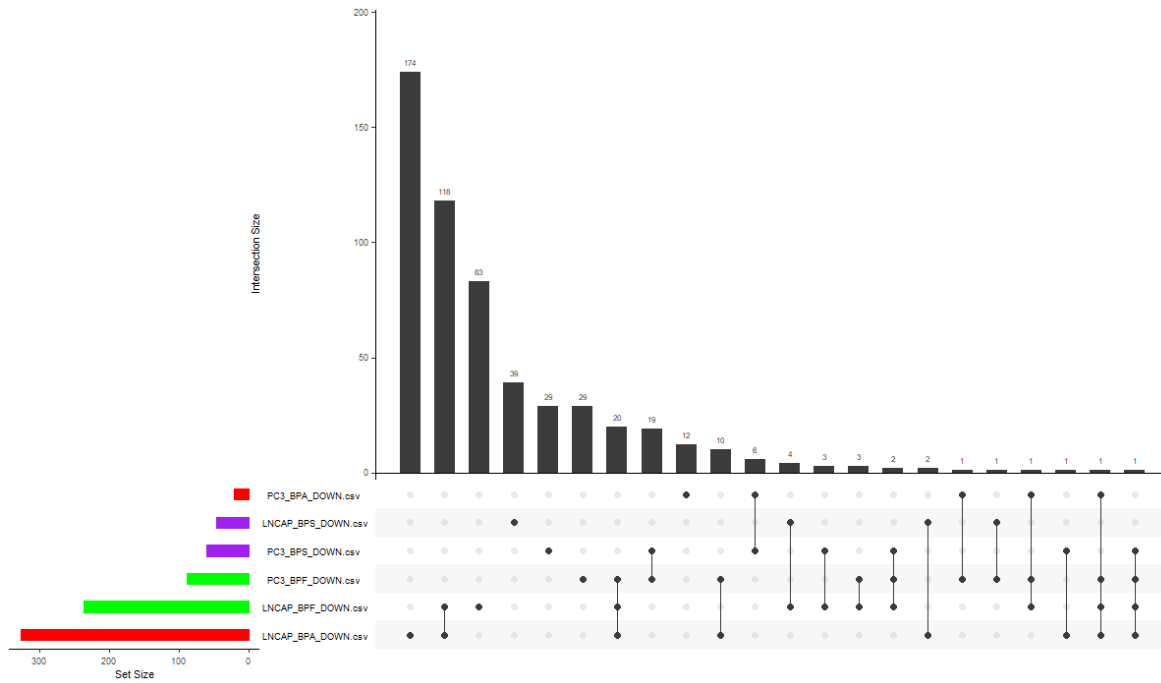


Figura 16. Análisis de sobre-representación de vías a partir de genes DE regulados negativamente. Los gráficos de puntos para las células LNCaP expuestas a BPA (A), BPS (B) y BPF (C) representan las veinte vías enriquecidas principales para cada exposición. Para las líneas celulares PC-3, las principales vías sobre-representadas se representaron mediante los gráficos de puntos (A) para la exposición a BPA, (E) para la exposición a BPS y (F) para la exposición a BPF. El gráfico Upset con las principales vías sobre-representadas para cada exposición a los bisfenoles se representa en la figura (G).

Análisis de redes

Línea celular LNCaP

Exposición a BPA

En este caso, con los transcritos codificantes para proteína, pudimos construir una red con 872 nodos y 7054 interacciones entre nodos (Figura 17A). Un detalle interesante de esta red es que la mayoría de los transcritos de codificación de proteínas están regulados a la baja. Los principales términos de GO sobre-

representados están relacionados con el control del ciclo celular y la replicación, el metabolismo, la organización y la reparación del DNA.

Para determinar cuáles eran los nodos más centrales e interconectados, utilizamos el algoritmo MCODE y se extrajo el clúster principal para construir otra red. Para la exposición al BPA en células LNCaP, el clúster principal tenía 59 nodos y 1473 aristas, y los cinco nodos más centrales fueron EXO1, ASPM, MCM2, CHEK1 y KIF11. EXO1 codifica la proteína exoendonucleasa 1 humana, que es importante para la progresión del punto de control y contribuye en varias vías de reparación del DNA (Keijzers et al., 2018); el gen ASPM fue inicialmente reportado como una proteína del centrosoma que regula la neurogénesis, pero evidencia reciente ha asociado este gen con la capacidad de autorrenovación y la progresión del cáncer de próstata (Pai et al., 2019); MCM2 es una subunidad central de la helicasa eucariota que participa en la replicación del DNA y tiene un papel bien descrito en la progresión de diferentes tipos de cáncer (Y. Sun et al., 2022).CHEK1 media la detención del ciclo celular en respuesta al daño del DNA y ha sido asociado con tumores sólidos (Fadaka et al., 2020); y KIF11 es una proteína motora esencial en la mitosis cuyos niveles de expresión se han asociado con la supervivencia libre de metástasis óseas del cáncer de próstata, el puntaje de Gleason y un estadio T más alto (H. Wang et al., 2022) (Figura 17B).

Exposición a BPS

Para la exposición a BPS, construimos una red de interacción proteína-proteína con 252 nodos y 165 aristas (Figura 17C). La falta de interacciones hizo imposible que el algoritmo STRING identificara procesos biológicos enriquecidos de GO en la red. El análisis de centralidad con el algoritmo MCODE reveló un clúster con 5 nodos y 9 interacciones (Figura 17D). Del clúster obtuvimos dos genes de la familia de las calicreínas (KLK3 y KLK2), cuyos productos se han relacionado con el cáncer de próstata. En el caso de KLK2, su expresión reducida se ha asociado con un mal pronóstico en ciertos tipos de cáncer de próstata (Bonk et al., 2020), y el producto proteico KLK3 (Antígeno Específico de Próstata, PSA) es uno de los principales

biomarcadores en el diagnóstico y pronóstico del cáncer de próstata (Fuhrman-Luck et al., 2014).

Exposición a BPF

Para los transcritos de codificación de proteínas en la exposición a BPF en células LNCaP, la red de interacción de proteínas resultante tuvo 1000 nodos y 6687 aristas (Figura 17E). Esta red contiene más transcritos diferencialmente expresados regulados al alza en comparación con la exposición a BPA. Sin embargo, los genes más centrales están todos regulados a la baja. Los principales términos de GO sobrerrepresentados están relacionados nuevamente con el control del ciclo celular y la organización, empaquetamiento y conformación del DNA.

Se obtuvo el clúster más central, que tenía 61 transcritos diferencialmente expresados con 1450 interacciones (Figura 17F), y los cinco transcritos más centrales fueron INCENP, E2F8, CHEK2, POLQ y FAM64A. El gen INCENP codifica la proteína del centrómero interno, las variantes en este gen se han relacionado con cáncer de mama, ovario y próstata, además de que se ha demostrado que su inhibición bloquea el crecimiento tumoral de neuroblastoma in vivo (M. Sun et al., 2019). Los factores de transcripción E2F son reguladores importantes del ciclo celular y se ha demostrado que E2F8 es un represor transcripcional durante las fases S y G2 (H.-Z. Chen et al., 2009; Johnson & Degregori, 2006). CHEK2 codifica una quinasa de punto de control G2 con funciones críticas en la reparación del DNA (van Jaarsveld et al., 2020), y POLQ es el gen que codifica la polimerasa del DNA theta (pol θ) en muchos eucariotas (Wood & Doublié, 2016). Se ha reportado que FAM64A tiene actividad dependiente del receptor de andrógenos lo que promueve el desarrollo del cáncer de próstata (Zhou et al., 2021).

En conclusión, la exposición de células LNCaP a los tres bisfenoles desreguló las vías relacionadas con el control del ciclo celular y los mecanismos de reparación de daño al DNA.

Línea celular PC-3

Para las células PC-3 expuestas a los bisfenoles, obtuvimos una cantidad menor de transcritos diferencialmente expresados en comparación con la línea celular LNCaP. Esto tuvo un impacto en la conformación del análisis de redes, ya que la mayoría de los transcritos diferencialmente expresados en las células PC-3 eran RNA no codificantes. Aunque se construyeron redes con los mismos parámetros, en el caso de las redes de PC-3, se agregaron de 10 a 15 PPI (interacciones proteína-proteína) a cada red para mejorar el análisis y la visualización de la red. Los parámetros y el estilo de visualización se mantienen igual que en las redes de LNCaP descritas anteriormente.

Exposición a BPA

Para la exposición a BPA, el algoritmo STRING detectó 40 nodos con 36 interacciones (Figura 18A) y el análisis de MCODE reveló los genes más centrales para la red, obteniendo un clúster con 7 nodos y 20 interacciones (Figura 18B). De este clúster, los únicos genes que eran transcritos diferencialmente expresados son CDC25 y KIF15. La proteína CDC25 participa en la regulación de la progresión G2/M y en la reparación del daño del DNA (Liu et al. 2020). Se ha informado que el miembro 15 de la familia de las cinasas promueve la progresión del cáncer de próstata resistente a la castración (Gao et al., 2021), sin embargo, se necesita más investigación para determinar las implicaciones de la regulación a la baja del transcrita KIF15 en el cáncer de próstata.

Exposición a BPS

La red para la exposición a BPS consta de 47 nodos con 50 interacciones (Figura 18C) y el clúster principal contiene 9 nodos con 35 aristas (Figura 18D). En este caso, los transcritos de consulta para el clúster principal son MYO1C y ERCC2. MYO1C es un conocido supresor de tumores y se ha relacionado su baja expresión con la estimulación de la proliferación celular en diferentes líneas celulares cancerígenas (Visuttijai et al., 2016). ERCC2 es una helicasa de DNA importante en la vía de reparación por escisión de nucleótidos, aunque se han asociado

polimorfismos en este gen con el riesgo de cáncer, el papel de su regulación a la baja en el cáncer aún no está claro (Benhamou & Sarasin, 2002).

Exposición a BPF

En el caso de la exposición a BPF, la red tiene 48 nodos y 39 aristas (Figura 18E), y el clúster principal contiene 4 nodos conectados por 6 aristas (Figura 18F). Los nodos de consulta más centrales son CCNB2 y CDC25C. La ciclina B2 es miembro de la familia de las ciclinas y desempeña un papel clave en la transición G2/M, y los estudios han relacionado CCNB2 con el cáncer de próstata (Liu et al., 2022).

En conclusión, la mayoría de los nodos centrales para la exposición a bisfenoles en las células LNCaP y PC-3 están relacionados con la regulación del ciclo celular y el daño del DNA. Por lo tanto, este estudio se complementó con ensayos funcionales donde se determinó el impacto de la exposición a bisfenoles en el ciclo celular y el daño del DNA en células de cáncer de próstata (Wu et al., 2020), mediante ensayos de micronúcleos, cometa para evaluación del daño genotóxico y citometría de flujo con yoduro de propidio para la determinación del efecto sobre el ciclo celular.

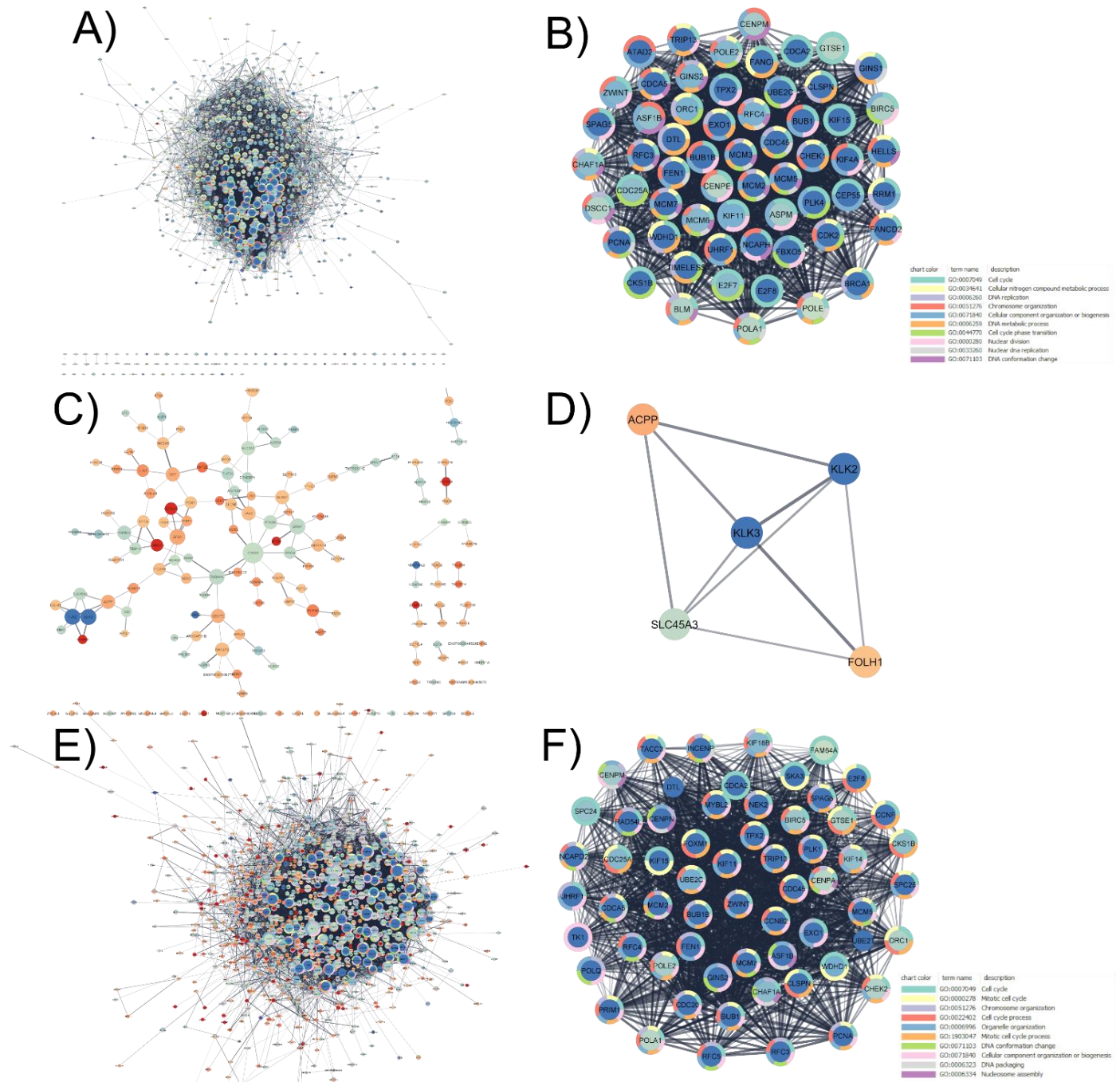


Figura 17. Análisis de redes de células LNCaP expuestas a los bisfenoles A, S y F. El tamaño de los nodos revela el grado de cada nodo, el color interno indica el valor de FC (fold change) de cada transcrito y los colores de borde describen los términos GO enriquecidos en los que participan esos transcritos. A) Red de exposición a BPA: tiene 872 nodos y 7054 aristas. B) Clúster principal de la red A: contiene 59 nodos y 1473 PPI (interacciones proteína-proteína). C) Red de exposición a BPS: contiene 252 nodos con 165

aristas. D) Clúster principal de la red C: tiene 5 nodos y 9 aristas. E) Red de exposición a BPF: consta de 1000 nodos y 6687 aristas. F) Clúster principal de la red E: incluye 61 nodos y 1450 aristas.

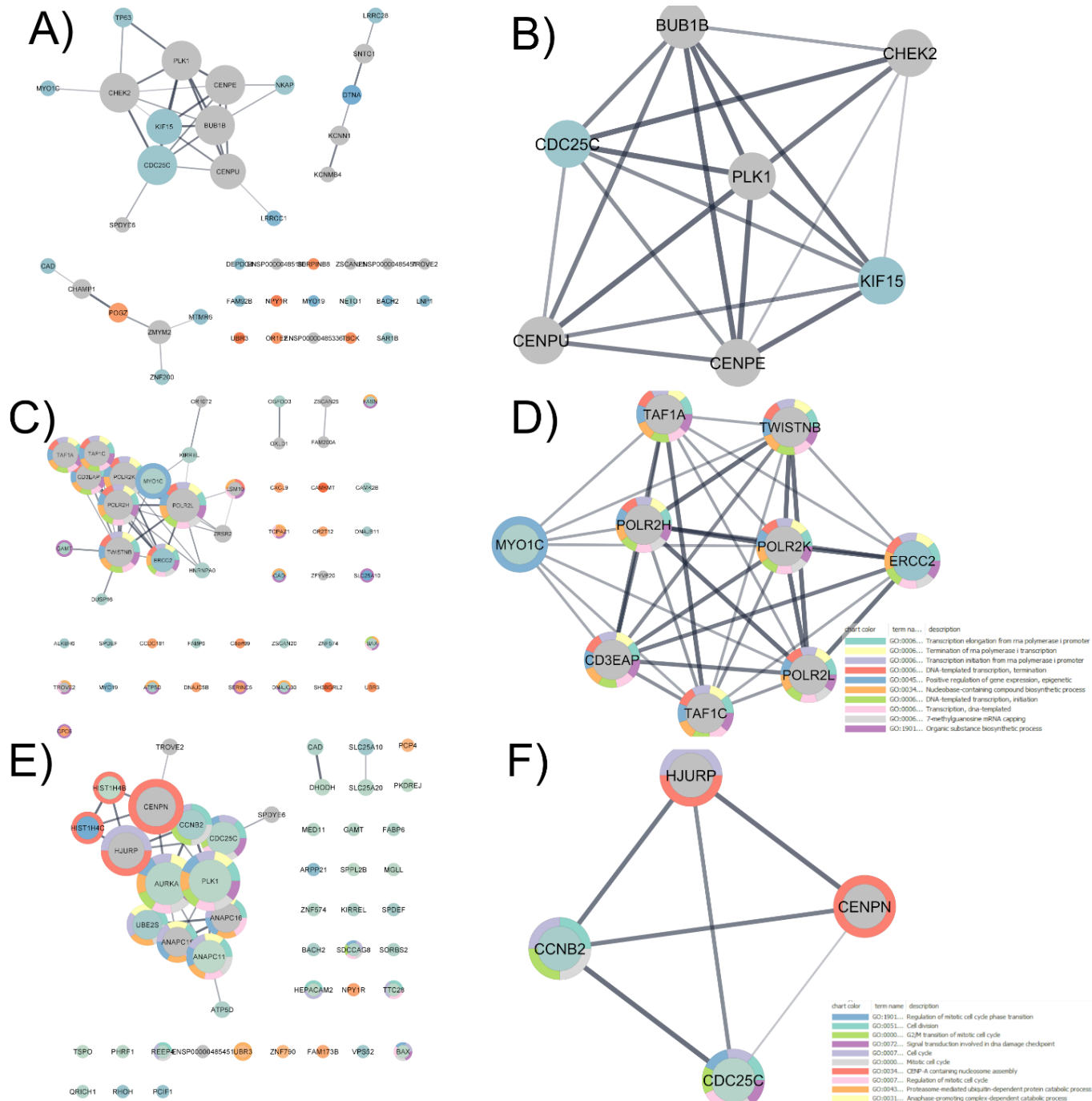


Figura 18. Análisis de redes de células PC-3 expuestas a los bisfenoles A, S y F. El tamaño de los nodos revela el grado de cada nodo, el color interno indica el valor de FC (fold

change) de cada transcrito y los colores de borde describen los términos GO enriquecidos en los que participan esos transcritos. A) Red de exposición a BPA. B) Clúster principal de la red A. C) Red de exposición a BPS. D) Clúster principal de la red C. E) Red de exposición a BPF. F) Clúster principal de la red E.

Daño al DNA

Ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinesis y ensayo cometa

El análisis bioinformático confirmó que la exposición a las concentraciones nanomolares de los bisfenoles A, S y F fue capaz de interrumpir vías relacionadas con la reparación del daño al DNA, la elongación, el metabolismo y el control del ciclo celular a través del daño al DNA. Fue relevante caracterizar si el daño al DNA era detectable en las células expuestas a estos compuestos. Para responder a esta pregunta, se utilizaron dos metodologías diferentes: el ensayo de micronúcleos con bloqueo de citosinesis (CBMN) y el ensayo del cometa.

El primero permite la detección de eventos clastogénicos y aneugénicos, tales como rupturas cromosómicas o escisiones completas de cromosomas en el material nuclear, así como la formación de buds y puentes de cromatina. La exposición a ninguno de los bisfenoles en las células LNCaP y PC-3 afectó el número de micronúcleos (Fig. 19A y 19B). De manera similar, no se observaron diferencias estadísticas en el número de buds nucleares, puentes de cromatina o eventos apoptóticos (Datos no mostrados).

Dado que no se observó daño al DNA permanente después de exponer las células de cáncer de próstata a bajas concentraciones de bisfenoles en el ensayo de CMBN, realizamos el ensayo del cometa alcalino para detectar daños primarios en el DNA, como rupturas de doble cadena, rupturas de cadena simple, sitios de reparación de escisión incompleta, etc (Pu et al., 2015). En este ensayo, todos los bisfenoles A, S y F a una concentración de 5 nM fueron capaces de inducir daño al DNA en ambas líneas celulares LNCaP (Fig. 19C) y PC-3 (Fig. 19D), representado por un aumento en el momento de las colas de los cometas (relación entre la longitud de cada cometa y la intensidad de la señal). Todas las exposiciones se

compararon con el vehículo (etanol) e incluimos un control positivo de daño al DNA, Mitomicina C (MMC), a una concentración de 5 μ M.

El resultado de la prueba de CBMN indica que la exposición a los bisfenoles A, S y F no son capaces de inducir daño al DNA a nivel clastogénico ni aneugénico.

Por otro lado estas exposiciones fueron capaces de aumentar la cantidad de daño en las hebras de DNA en las líneas celulares de cáncer de próstata, lo que confirma los resultados bioinformáticos del análisis del transcriptoma.

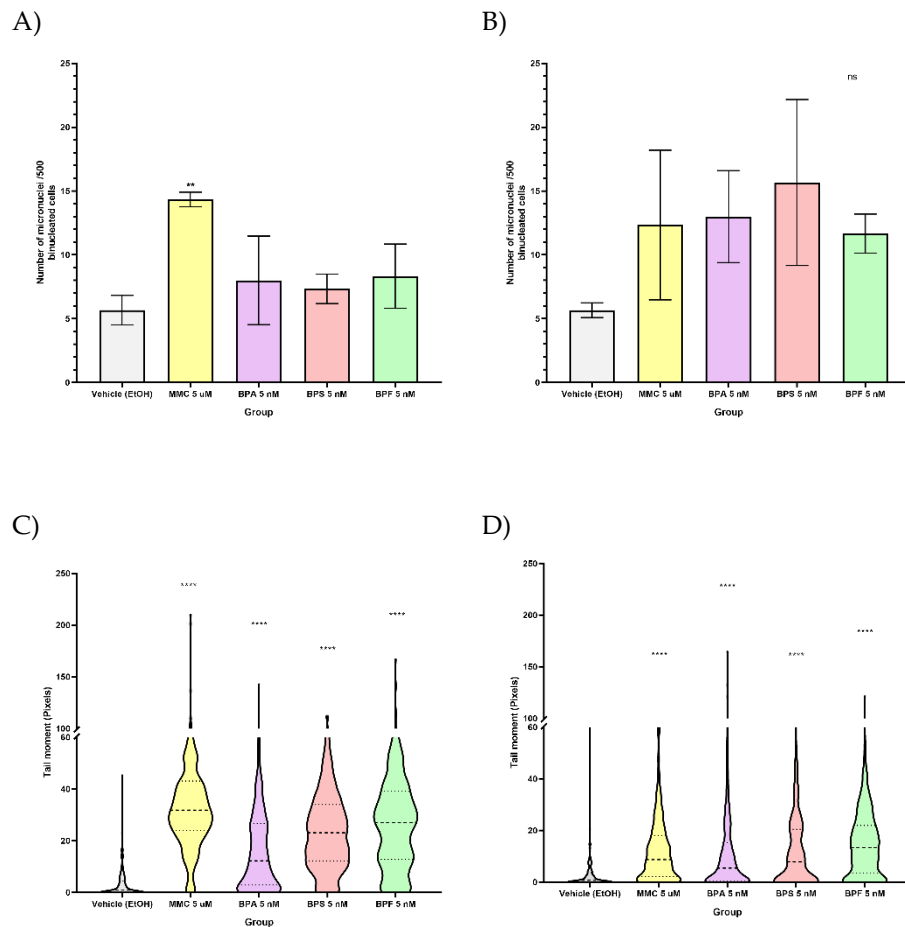


Figura 19. Análisis de daño al DNA en líneas celulares de cáncer de próstata. Número de micronúcleos por quinientas células binucleadas tanto para las líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP (A) como para PC-3 (B). Momento de las colas de los cometas para el análisis del ensayo del Cometa en las células LNCaP (C) y PC-3 (D). (MMC 5 μ M =

Mitomicina 5 micro molar). * Estadísticamente significativo en comparación con el control de vehículo (n = 9) .

Análisis de Ciclo Celular

Como los resultados del análisis de sobre-representación de vías mostraron que la mayoría de los genes diferencialmente expresados estaban involucrados en el control del ciclo celular y los mecanismos de puntos de control, evaluamos el ciclo celular en células de cáncer de próstata expuestas a bisfenoles. Para comparar los efectos que la exposición a bisfenoles podría tener en la regulación del ciclo celular, se utilizaron linfocitos humanos en la fase G0/G1 como control positivo, y se trató a las líneas celulares de cáncer de próstata con el agente antineoplásico nocodazol, que inhibe la síntesis de microtúbulos y detiene las células en la fase G2/M. Todos los grupos se compararon con un control negativo (líneas celulares de cáncer de próstata tratadas con etanol) (Figura 20A). La exposición de las células LNCaP sensibles a los andrógenos a BPA, BPS o BPF no afectó ninguna fase del ciclo celular. En contraste, las células PC-3 expuestas a 5 nM de BPA indujeron una detención del ciclo celular en la fase G0/G1 (Figura 20B). La inhibición del ciclo celular se informó previamente en células de cáncer de próstata humanas, y el posible mecanismo fue la regulación negativa de la expresión de la ciclina D1 y la sobreexpresión de inhibidores del ciclo celular como p21 y p27, a una concentración de 50 μ M (24-72h) (Bilancio et al., 2017). Sin embargo, se necesita investigación adicional para explicar este mecanismo en ambas etapas; sensibilidad a los andrógenos e independencia de los andrógenos, con más análogos de BPA.

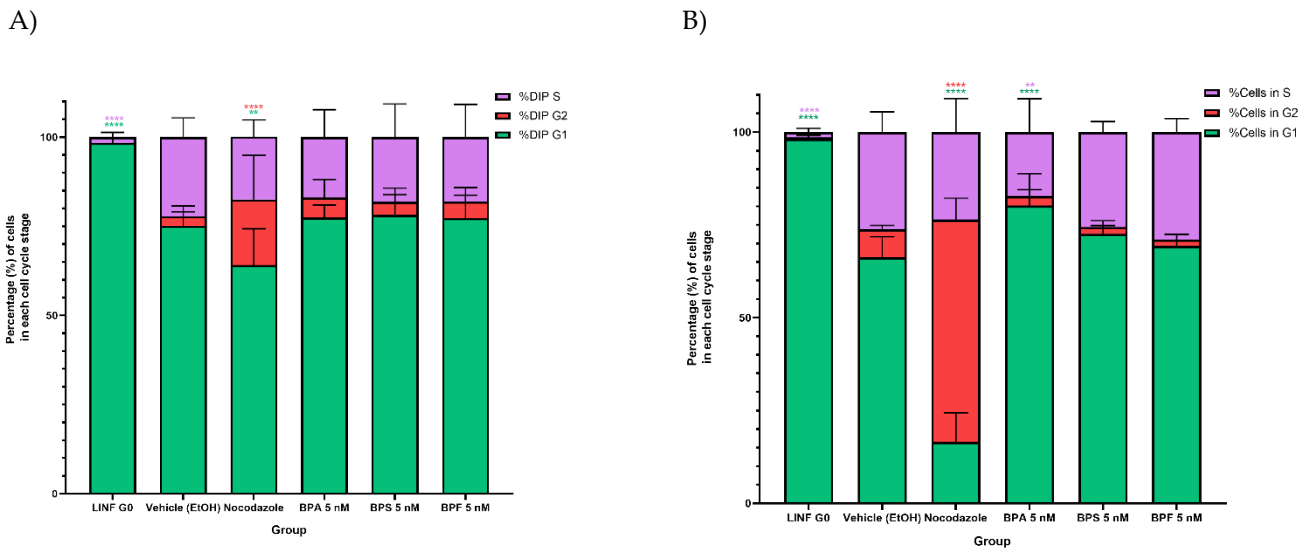


Figura 20. Análisis del ciclo celular para las líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP (A) y PC-3 (B) expuestas a los bisfenoles A, S y F a 5 nM. El bisfenol A fue capaz de inducir la detención del ciclo celular en las células PC-3. * Estadísticamente significativo en comparación con el control de vehículo.

DISCUSIÓN

En este trabajo demostramos que la exposición a las concentraciones nanomolares de bisfenol A, S y F tuvo un efecto diferencial sobre la citotoxicidad de las líneas celulares de cáncer de próstata. Las células PC-3 fueron más sensibles al efecto citotóxico, presentando una reducción estadísticamente significativa en la viabilidad a una concentración de 10 nM en todos los casos, mientras que las células LNCaP no mostraron citotoxicidad después de la exposición a los bisfenoles. Esto puede estar asociado a la afinidad diferencial de los bisfenoles por los diferentes receptores estrogénicos, los cuales presentan actividades distintas dependiendo de la concentración de bisfenoles a la que estén expuestas. Se observó un patrón similar en el ensayo de proliferación celular; las células LNCaP no presentaron cambios en la proliferación celular, mientras que las células PC-3 exhibieron un aumento en la proliferación celular a las 24 horas después de la exposición a BPA (5nM) y BPF (10nM). Las diferencias entre ambas líneas celulares podrían

explicarse por sus fenotipos. Las células LNCaP comparten características con el cáncer de próstata en etapa temprana (adenocarcinoma), mientras que PC-3 tiene características comunes con el carcinoma neuroendocrino de células pequeñas (SCNC), algunas de estas características son que las células LNCaP expresan el receptor de andrógenos (AR) y el antígeno prostático específico (PSA), mientras que las células PC-3 no expresan ninguna de esas proteínas (Tai et al., 2011). Otra diferencia sustancial entre estas líneas celulares es la presencia de receptores hormonales además del AR, como el receptor de estrógeno ($ER\alpha$, ESR1) y el receptor de estrógeno ($ER\beta$, ESR2). Los modelos in vitro demostraron que las células LNCaP expresan $ER\beta$ pero no $ER\alpha$, mientras que las células PC-3 expresan $ER\beta$ a nivel de RNAm (Lau et al., 2000). A nivel de proteínas, las células LNCaP no expresan ninguno de los receptores de estrógeno, pero sí expresan AR, y las células PC-3 expresan $ER\alpha$; sin embargo, esta línea celular no expresa AR (Lafront et al., 2020). Se ha informado previamente que $ER\alpha$ tiende a promover la tumorigenicidad del cáncer de próstata (Furic et al., 2015). Curiosamente, en otros modelos celulares (HeLa) se ha demostrado que el bisfenol A tiene efectos duales como agonista y antagonista de $ER\alpha$, activando la actividad del receptor a bajas concentraciones (HIROI et al., 1999). Esta evidencia respalda el hecho de que PC-3 fue más sensible tanto a los efectos citotóxicos como proliferativos que las células LNCaP. La exposición a bisfenoles a 5 nM no mostró efectos citotóxicos, por lo que los análisis restantes se realizaron exponiendo las células de PCa a bisfenoles a esta concentración. Caracterizamos el efecto de la exposición a bisfenoles en ambas líneas celulares de cáncer de próstata, LNCaP y PC-3. Evidencia previa caracterizó el efecto de la exposición al BPA en células humanas de cáncer de próstata (LNCaP), y encontraron que el perfil transcripcional estaba involucrado en la regulación del ciclo celular y la proliferación (Hess-Wilson et al., 2007), pero reportaron un aumento en la proliferación celular, mientras que nosotros no observamos diferencias estadísticamente significativas en la proliferación celular para las células LNCaP. Esta diferencia puede explicarse debido a la diferencia de tiempo entre nuestros estudios, ya que expusieron las células LNCaP a bisfenoles durante 24 horas, y realizamos la mayoría de los ensayos después de 48 horas de

exposición, considerando el tiempo para completar un ciclo de replicación celular y reparación del DNA.

El análisis de microarreglos demostró que cada exposición a bisfenoles tenía un perfil transcripcional único, y las células LNCaP fueron más sensibles al efecto transcriptómico que la línea celular PC-3, lo cual podría explicarse por las características inherentes de ambas líneas celulares y su expresión de receptores hormonales. Se ha informado en otros modelos que diferentes xenoestrógenos (como el BPA) tienen actividad estrogénica pero también actúan como compuestos antiandrógenos (Sohoni & Sumpter, 1998). Además, se demostró que el BPA, BPS y BPF inducen ER- α / ER β , antagonizando las actividades de AR (Pelch et al., 2019). Dado que las células LNCaP presentan funciones estrogénicas y androgénicas, hay más genes diferencialmente expresados cuando estas células se exponen a bisfenoles, en contraste con las células PC-3 que solo expresan ER- α , por lo que hay menos genes diferencialmente expresados después de la exposición a bisfenoles.

Para determinar el papel funcional de los genes diferencialmente expresados (DEGs), se realizó un análisis de sobre-representación de vías. Este análisis mostró que hubo menos términos GO enriquecidos estadísticamente cuando se utilizaron los DEGs sobreexpresados como términos de consulta, en comparación con los subexpresados. Las células LNCaP expuestas a BPF presentaron más términos GO sobreexpresados que todas las demás exposiciones, y la mayoría de las vías enriquecidas estadísticamente fueron relacionadas con el metabolismo de biomoléculas. No hubo patrones claros compartidos de enriquecimiento de vías entre las exposiciones a bisfenoles para los DEGs sobreexpresados. En contraste, los DEGs subexpresados indujeron la desregulación de más términos GO. En el caso de las vías subexpresadas, hubo más funciones biológicas compartidas entre todas las exposiciones, y la mayoría de ellas estaban relacionadas con la regulación del ciclo celular, mecanismos de reparación de daños al DNA, elongación del DNA y metabolismo de biomoléculas. Previo a esto, se ha informado que los bisfenoles son capaces de inducir daño al DNA en diferentes modelos celulares, a través de

estrés oxidativo y la interrupción de las vías de señalización cMYC y CTNNB1, induciendo arresto del ciclo celular (Y.-K. Chen et al., 2021; Di Pietro et al., 2020; Gassman et al., 2015; Pfeifer et al., 2015). En células epiteliales normales, se ha demostrado que el BPA induce daño al DNA (RWPE-1) (Kose et al., 2020), y arresto del ciclo celular en células epiteliales de próstata humanas no transformadas (EPN) y células de cáncer de próstata (LNCaP) (Bilancio et al., 2017). Sin embargo, hay falta de evidencia sobre el efecto de estos tres análogos estructurales (BPA, BPS y BPF) en células de cáncer de próstata tanto sensibles como independientes de los andrógenos, como LNCaP y PC-3.

Para obtener una visión más detallada del efecto de las proteínas codificadas por RNAm en cada término biológico GO sobreexpresado, construimos redes de interacción proteína-proteína y descubrimos que tanto en las líneas celulares LNCaP como en PC-3, los nodos más centrales (mRNAs con más interacciones en las redes) eran aquellos cuyos valores de expresión estaban subregulados. Como se discutió en la sección de resultados, los roles clave de la mayoría de los mRNAs más centrales en células LNCaP y PC-3 expuestas a bisfenoles están relacionados con la progresión de los puntos de control del ciclo celular, la respuesta al daño del DNA y la replicación del DNA. Estos análisis de redes nos permiten identificar los posibles efectores clave de proteínas en la desregulación de las vías para cada exposición a bisfenoles. Determinar objetivos específicos en cada una de las exposiciones que podrían dar lugar a efectos similares pero a través de mecanismos diferentes.

De acuerdo a los resultados anteriores, evaluamos el efecto de las exposiciones a bisfenoles sobre el daño al DNA y el control del ciclo celular. Aunque no encontramos escisiones o daño cromosómico permanentes estadísticamente significativos en el ensayo de micronúcleos, hubo una tendencia creciente en la cantidad de micronúcleos para ambas líneas celulares. En el caso de las rupturas del DNA, encontramos un aumento estadísticamente significativo en el momento de las colas de los cometas para todas las exposiciones. Estos resultados indican que los bisfenoles podrían inducir rupturas del DNA (simples) o inducir sitios de

reparación por escisión incompleta. Los efectos en el daño al DNA son consistentes con los resultados del análisis transcriptómico donde encontramos una disminución en los genes de reparación del daño al DNA. Resultados similares fueron reportados en células epiteliales prostáticas normales RWPE-1 expuestas a BPA, BPS y BPF. En este modelo, las proteínas de reparación del DNA (OGG1, Ape-1, MyH y p53) involucradas en la vía de reparación por escisión de bases fueron reguladas a la baja en todas las exposiciones a bisfenoles(Kose et al., 2020), y Chen Yin-Kai et al. también reportaron una regulación a la baja en TP53 y CDKN1A que promueve el daño al DNA(Y.-K. Chen et al., 2021). Aunque estos mecanismos necesitan ser validados por ensayos funcionales y moleculares, ya que la subexpresión no necesariamente tiene como consecuencia la pérdida de función de las proteínas.

Las células LNCaP fueron más sensibles al daño al DNA, ya que los momentos de los cometas fueron mayores que en las células PC-3. En términos de potencia toxicológica, los tres bisfenoles no mostraron una diferencia estadísticamente significativa en el momento de la cola del cometa, sin embargo, hay una tendencia en la cual la exposición al bisfenol F indujo ligeramente colas de cometa más largas en ambas líneas celulares de cáncer de próstata. En el caso de las células PC-3, el análisis del ciclo celular reveló una inducción de arresto del ciclo celular en la fase G0/G1. Para los otros tratamientos, no hubo diferencias estadísticamente significativas. Integrando el análisis de sobre-representación de vías y los resultados del ciclo celular en las células PC-3 expuestas a BPA, identificamos la regulación a la baja de genes importantes para el control del ciclo celular, como TP63, MYO19 y CDC25, después de la exposición. De hecho, se ha relacionado la ablación de TP63 con el arresto del ciclo celular en la fase G1(Bergholz & Xiao, 2012).

Con estos ensayos, confirmamos que hubo inducción de daño en el DNA de cadena sencilla tanto en las células LNCaP como en las PC-3, y que el ciclo celular solo se vio afectado por el BPA en la línea celular de cáncer de próstata independiente de andrógenos, PC-3. La citotoxicidad, la proliferación celular, los perfiles transcriptómicos, el análisis de vías bioinformáticas, los ensayos de daño al DNA y

el ciclo celular indican que la exposición a bajas concentraciones de bisfenoles podría tener un efecto diferencial en las células de cáncer de próstata, según el estadio de la enfermedad. Esto se puede explicar por la influencia de los bisfenoles en las actividades androgénicas, antiandrógenas y estrogénicas de la próstata, así como en otros mecanismos de disrupción endocrina, como los cambios epigenéticos que podrían influir en la actividad de la exposición a bisfenoles (Ahn & Jeung, 2023; Corti et al., 2022).

Serán necesarias investigaciones adicionales, como modelos in vivo y pruebas moleculares mecanísticas, para comprender completamente las diferencias mecanísticas de estas exposiciones. Sin embargo, este trabajo proporciona una primera visión de este amplio panorama. La toxicología ambiental, las ciencias ómicas y la medicina traslacional deben integrarse para proporcionar evidencia más consistente relacionada con los EDCs.

CONCLUSIONES

Los bisfenoles A, S y F, a una concentración de 10 nM disminuyen la viabilidad de las células independientes a andrógenos PC-3.

La línea celular sensible a los andrógenos LNCaP, fue más sensible transcripcionalmente al efecto de los bisfenoles, que su contraparte PC-3. Esto tomando en cuenta solamente el número total de transcritos diferencialmente expresados.

Para ambas líneas celulares, los transcritos diferencialmente expresados están involucrados en procesos como control de ciclo celular, y mecanismos de reparación de daño a DNA.

Ambas líneas celulares exhibieron rupturas de DNA, tras la exposición a bisfenoles A, F y S a una concentración de 5 nM.

La exposición a bisfenol A, a una concentración 5 nM fue capaz de inducir arresto del ciclo celular, comparable al vehículo.

PERSPECTIVAS

Los análogos estructurales del bisfenol A se utilizan ampliamente en todo el mundo, por lo tanto, es imperativo para la comunidad científica comprender completamente los mecanismos moleculares que podrían relacionar la exposición a los bisfenoles con la salud humana. Esta investigación proporciona una visión de los efectos de la exposición a bajos niveles de los análogos estructurales del bisfenol A en dos etapas diferentes de la enfermedad del cáncer de próstata, utilizando un modelo *in vitro*. Lo cual remarca la importancia de analizar los efectos de disrupción endocrina a lo largo del proceso de la enfermedad y no sólo en sus etapas iniciales. Como se mencionó anteriormente, se necesitará una investigación molecular adicional, sin embargo, este trabajo es un punto de partida para determinar si los análogos estructurales del BPA podrían tener un efecto diferencial en las células de cáncer de próstata, dependiendo de la etapa de la enfermedad.

REFERENCIAS

(IARC), I. A. for R. on C. (1977). IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man: some miscellaneous pharmaceutical substances. *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man*, 13, 1–255.

Abcam. (2020). *MTT Assay Kit (Cell Proliferation)*. Cambridge, MA, USA.
<https://www.abcam.com/mtt-assay-kit-cell-proliferation-ab211091.html>

Abellan, A., Mensink-Bout, S. M., Garcia-Esteban, R., Beneito, A., Chatzi, L., Duarte-Salles, T., Fernandez, M. F., Garcia-Aymerich, J., Granum, B., Iñiguez, C., Jaddoe, V. W. V, Kannan, K., Lertxundi, A., Lopez-Espinosa, M.-J., Philippat, C., Sakhi, A. K., Santos, S., Siroux, V., Sunyer, J., ... Casas, M. (2022). In utero exposure to bisphenols and asthma, wheeze, and lung function in school-age children: a prospective meta-analysis of 8 European birth cohorts. *Environment International*, 162, 107178.
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107178>

Adler, D., Lindstrot, A., Ellinger, J., Rogenhofer, S., Buettner, R., Perner, S., &

- Wernert, N. (2012). The peripheral zone of the prostate is more prone to tumor development than the transitional zone: Is the ETS family the key? *Molecular Medicine Reports*, 5(2), 313–316. <https://doi.org/10.3892/mmr.2011.647>
- Affymetrix, I. (2019). Transcriptome Analysis Console (TAC) 4.0.2 User Guide. *ThermoFisher Scientific*, 8(703150), 219.
- Agilent Technologies, I. (n.d.). *2100 Bioanalyzer Instrument*.
<https://www.agilent.com/en/product/automated-electrophoresis/bioanalyzer-systems/bioanalyzer-instrument/2100-bioanalyzer-instrument-228250>
- Ahern, T. P., Broe, A., Lash, T. L., Cronin-Fenton, D. P., Ulrichsen, S. P., Christiansen, P. M., Cole, B. F., Tamimi, R. M., Sørensen, H. T., & Damkier, P. (2019). Phthalate Exposure and Breast Cancer Incidence: A Danish Nationwide Cohort Study. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 37(21), 1800–1809.
<https://doi.org/10.1200/JCO.18.02202>
- Ahn, C., & Jeung, E.-B. (2023). Endocrine-Disrupting Chemicals and Disease Endpoints. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Issue 6).
<https://doi.org/10.3390/ijms24065342>
- Alfaro-Núñez, A., Astorga, D., Cáceres-Farías, L., Bastidas, L., Soto Villegas, C., Macay, K., & Christensen, J. H. (2021). Microplastic pollution in seawater and marine organisms across the Tropical Eastern Pacific and Galápagos. *Scientific Reports*, 11(1), 6424. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85939-3>
- American Type Culture Collection. (2022). *LNCaP clone FGC CRL-1740*. 1–3.
<https://www.atcc.org/products/crl-1740>
- Amis, E. S. (1994). Anatomy and Physiology of the Prostate. In E. K. Lang (Ed.), *Radiology of the Lower Urinary Tract* (pp. 167–169). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-84431-7_8
- ARMITAGE, P., & DOLL, R. (1954). The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. *British Journal of Cancer*, 8(1), 1–12.

<https://doi.org/10.1038/bjc.1954.1>

- Bader, G. D., & Hogue, C. W. V. (2003). An automated method for finding molecular complexes in large protein interaction networks. *BMC Bioinformatics*, 4(1), 2. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-4-2>
- Baluka, S. A., & Rumbeiha, W. K. (2016). Bisphenol A and food safety: Lessons from developed to developing countries. *Food and Chemical Toxicology*, 92, 58–63.
- Band, P. R., Abanto, Z., Bert, J., Lang, B., Fang, R., Gallagher, R. P., & Le, N. D. (2011). Prostate cancer risk and exposure to pesticides in British Columbia farmers. *The Prostate*, 71(2), 168–183. <https://doi.org/10.1002/pros.21232>
- Benhamou, S., & Sarasin, A. (2002). ERCC2/XPD gene polymorphisms and cancer risk. *Mutagenesis*, 17(6), 463–469. <https://doi.org/10.1093/mutage/17.6.463>
- Bergholz, J., & Xiao, Z.-X. (2012). Role of p63 in Development, Tumorigenesis and Cancer Progression. *Cancer Microenvironment : Official Journal of the International Cancer Microenvironment Society*, 5(3), 311–322. <https://doi.org/10.1007/s12307-012-0116-9>
- Bilancio, A., Bontempo, P., Di Donato, M., Conte, M., Giovannelli, P., Altucci, L., Migliaccio, A., & Castoria, G. (2017). Bisphenol A induces cell cycle arrest in primary and prostate cancer cells through EGFR/ERK/p53 signaling pathway activation. *Oncotarget*, 8(70), 115620–115631. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.23360>
- Bissell, M. J., Weaver, V. M., Lelièvre, S. A., Wang, F., Petersen, O. W., & Schmeichel, K. L. (1999). Tissue structure, nuclear organization, and gene expression in normal and malignant breast. *Cancer Research*, 59(7 Suppl), 1757-1763s; discussion 1763s-1764s.
- Bonk, S., Kluth, M., Jansen, K., Hube-Magg, C., Makrypidi-Fraune, G., Höflmayer, D., Weidemann, S., Möller, K., Uhlig, R., Büscheck, F., Luebke, A. M.,

- Burandt, E., Clauditz, T. S., Steurer, S., Schlomm, T., Huland, H., Heinzer, H., Sauter, G., Simon, R., & Dum, D. (2020). Reduced KLK2 expression is a strong and independent predictor of poor prognosis in ERG-negative prostate cancer. *The Prostate*, *80*(13), 1097–1107. <https://doi.org/10.1002/pros.24038>
- Borley, N., & Feneley, M. R. (2009). Prostate cancer: diagnosis and staging. *Asian Journal of Andrology*, *11*(1), 74–80. <https://doi.org/10.1038/aja.2008.19>
- Bouskine, A., Nebout, M., Brücker-Davis, F., Benahmed, M., & Fenichel, P. (2009). Low doses of bisphenol A promote human seminoma cell proliferation by activating PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor. *Environmental Health Perspectives*, *117*(7), 1053–1058. <https://doi.org/10.1289/ehp.0800367>
- Bräuner, E. V, Lim, Y.-H., Koch, T., Uldbjerg, C. S., Gregersen, L. S., Pedersen, M. K., Frederiksen, H., Petersen, J. H., Coull, B. A., Andersson, A.-M., Hickey, M., Skakkebaek, N. E., Hauser, R., & Juul, A. (2021). Endocrine Disrupting Chemicals and Risk of Testicular Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *106*(12), e4834–e4860. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgab523>
- Brown, T. R., Lubahn, D. B., Wilson, E. M., Joseph, D. R., French, F. S., & Migeon, C. J. (1988). Deletion of the steroid-binding domain of the human androgen receptor gene in one family with complete androgen insensitivity syndrome: evidence for further genetic heterogeneity in this syndrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *85*(21), 8151–8155. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.21.8151>
- Brucker-Davis, F. (1998). Effects of environmental synthetic chemicals on thyroid function. *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association*, *8*(9), 827–856. <https://doi.org/10.1089/thy.1998.8.827>
- Buskin, A., Singh, P., Lorenz, O., Robson, C., Strand, D. W., & Heer, R. (2021). A Review of Prostate Organogenesis and a Role for iPSC-Derived Prostate Organoids to Study Prostate Development and Disease. In *International*

Journal of Molecular Sciences (Vol. 22, Issue 23).

<https://doi.org/10.3390/ijms222313097>

- Calafat, A. M., Kuklennyik, Z., Reidy, J. A., Caudill, S. P., Ekong, J., & Needham, L. L. (2005). Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environmental Health Perspectives*, 113(4), 391–395. <https://doi.org/10.1289/ehp.7534>
- Campanale, C., Massarelli, C., Savino, I., Locaputo, V., & Uricchio, V. F. (2020). A Detailed Review Study on Potential Effects of Microplastics and Additives of Concern on Human Health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(4). <https://doi.org/10.3390/ijerph17041212>
- Chang, W.-H., Li, S.-S., Wu, M.-H., Pan, H.-A., & Lee, C.-C. (2015). Phthalates might interfere with testicular function by reducing testosterone and insulin-like factor 3 levels. *Human Reproduction*, 30(11), 2658–2670. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev225>
- Charest, N. J., Zhou, Z. X., Lubahn, D. B., Olsen, K. L., Wilson, E. M., & French, F. S. (1991). A frameshift mutation destabilizes androgen receptor messenger RNA in the Tfm mouse. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 5(4), 573–581. <https://doi.org/10.1210/mend-5-4-573>
- Chen, F.-P., & Chien, M.-H. (2014). Lower concentrations of phthalates induce proliferation in human breast cancer cells. *Climacteric : The Journal of the International Menopause Society*, 17(4), 377–384. <https://doi.org/10.3109/13697137.2013.865720>
- Chen, H.-Z., Tsai, S.-Y., & Leone, G. (2009). Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nature Reviews. Cancer*, 9(11), 785–797. <https://doi.org/10.1038/nrc2696>
- Chen, P.-P., Yang, P., Liu, C., Deng, Y.-L., Luo, Q., Miao, Y., Zhang, M., Cui, F.-P., Zeng, J.-Y., Shi, T., Lu, T.-T., Chen, D., Wang, L.-Q., Liu, C.-P., Jiang, M., & Zeng, Q. (2022). Urinary concentrations of phenols, oxidative stress biomarkers and thyroid cancer: Exploring associations and mediation effects.

Journal of Environmental Sciences (China), 120, 30–40.

<https://doi.org/10.1016/j.jes.2022.01.009>

Chen, Y.-K., Tan, Y.-Y., Yao, M., Lin, H.-C., Tsai, M.-H., Li, Y.-Y., Hsu, Y.-J., Huang, T.-T., Chang, C.-W., Cheng, C.-M., & Chuang, C.-Y. (2021). Bisphenol A-induced DNA damages promote to lymphoma progression in human lymphoblastoid cells through aberrant CTNNB1 signaling pathway. *IScience*, 24(8), 102888. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102888>

Cohn, B. A., Cirillo, P. M., & Christianson, R. E. (2010). Prenatal DDT exposure and testicular cancer: a nested case-control study. *Archives of Environmental & Occupational Health*, 65(3), 127–134.

<https://doi.org/10.1080/19338241003730887>

Collection, A. T. C. (2022). *PC-3 CRL-1435*. 1–7. <https://www.atcc.org/products/crl-1435>

Corti, M., Lorenzetti, S., Ubaldi, A., Zilli, R., & Marcoccia, D. (2022). Endocrine Disruptors and Prostate Cancer. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 3). <https://doi.org/10.3390/ijms23031216>

Costa, P. M. da S., Sales, S. L. A., Pinheiro, D. P., Pontes, L. Q., Maranhão, S. S., Pessoa, C. do Ó., Furtado, G. P., & Furtado, C. L. M. (2023). Epigenetic reprogramming in cancer: From diagnosis to treatment . In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 11).

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2023.1116805>

Czyz, J., Szpak, K., & Madeja, Z. (2012). The role of connexins in prostate cancer promotion and progression. *Nature Reviews Urology*, 9(5), 274–282.

<https://doi.org/10.1038/nrurol.2012.14>

David, M. K., & Leslie, S. W. (2023). *Prostate Specific Antigen*.

De Marzo, A. M., Platz, E. A., Sutcliffe, S., Xu, J., Grönberg, H., Drake, C. G., Nakai, Y., Isaacs, W. B., & Nelson, W. G. (2007). Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nature Reviews. Cancer*, 7(4), 256–269.

<https://doi.org/10.1038/nrc2090>

Delport, R., Bornman, R., MacIntyre, U. E., Oosthuizen, N. M., Becker, P. J., Aneck-Hahn, N. H., & de Jager, C. (2011). Changes in retinol-binding protein concentrations and thyroid homeostasis with nonoccupational exposure to DDT. *Environmental Health Perspectives*, *119*(5), 647–651.

<https://doi.org/10.1289/ehp.1002616>

Descotes, J.-L. (2019). Diagnosis of prostate cancer. *Asian Journal of Urology*, *6*(2), 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.ajur.2018.11.007>

Di Donato, M., Cerneria, 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. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *457*, 35–42.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.02.045>

Di Pietro, P., D'Auria, R., Viggiano, A., Ciaglia, E., Meccariello, R., Russo, R. Dello, Puca, A. A., Vecchione, C., Nori, S. L., & Santoro, A. (2020). Bisphenol A induces DNA damage in cells exerting immune surveillance functions at peripheral and central level. *Chemosphere*, *254*, 126819.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126819>

Edginton, A. N., & Ritter, L. (2009). Predicting plasma concentrations of bisphenol A in children younger than 2 years of age after typical feeding schedules, using a physiologically based toxicokinetic model. *Environmental Health Perspectives*, *117*(4), 645–652. <https://doi.org/10.1289/ehp.0800073>

EPA. (1998). *Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee Final Report*. EDSTAC Final Rep.

European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions. (2018). *Strategy for Plastics in a Circular Economy*. Seikei-Kakou.

<https://doi.org/10.4325/seikeikakou.30.577>

Fadaka, A. O., Bakare, O. O., Sibuyi, N. R. S., & Klein, A. (2020). Gene Expression

- Alterations and Molecular Analysis of CHEK1 in Solid Tumors. *Cancers*, 12(3).
<https://doi.org/10.3390/cancers12030662>
- Faubert, B., Solmonson, A., & DeBerardinis, R. J. (2020). Metabolic reprogramming and cancer progression. *Science (New York, N.Y.)*, 368(6487).
<https://doi.org/10.1126/science.aaw5473>
- Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759–767. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-i](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-i)
- Feitelson, M. A., Arzumanyan, A., Kulathinal, R. J., Blain, S. W., Holcombe, R. F., Mahajna, J., Marino, M., Martinez-Chantar, M. L., Nawroth, R., Sanchez-Garcia, I., Sharma, D., Saxena, N. K., Singh, N., Vlachostergios, P. J., Guo, S., Honoki, K., Fujii, H., Georgakilas, A. G., Bilsland, A., ... Nowsheen, S. (2015). Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Seminars in Cancer Biology*, 35 Suppl(Suppl), S25–S54.
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.02.006>
- Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., & Zeiger, E. (2003). HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, 534(1–2), 65–75. [https://doi.org/10.1016/s1383-5718\(02\)00249-8](https://doi.org/10.1016/s1383-5718(02)00249-8)
- Ferreira-Dias, G., Botelho, M., Zagrajczuk, A., Rebordão, M. R., Galvão, A. M., Bravo, P. P., Piotrowska-Tomala, K., Szóstek, A. Z., Wiczowski, W., Piskula, M., Fradinho, M. J., & Skarzynski, D. J. (2013). Coumestrol and its metabolite in mares' plasma after ingestion of phytoestrogen-rich plants: potent endocrine disruptors inducing infertility. *Theriogenology*, 80(6), 684–692.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.06.002>
- Fromme, H., Kuchler, T., Otto, T., Pilz, K., Müller, J., & Wenzel, A. (2002). Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Research*, 36(6), 1429–1438. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0043->

1354(01)00367-0

- Fuhrman-Luck, R. A., Loessner, D., & Clements, J. A. (2014). Kallikrein-Related Peptidases in Prostate Cancer: From Molecular Function to Clinical Application. *EJIFCC*, *25*(3), 269–281.
- Furic, L., Lawrence, M. G., & Risbridger, G. P. (2015). Pro-tumorigenic role of ER α in prostate cancer cells. *Aging (Albany NY)*, *7*(6), 356.
- Gao, L., Zhao, R., Liu, J., Zhang, W., Sun, F., Yin, Q., Wang, X., Wang, M., Feng, T., Qin, Y., Cai, W., Li, Q., Dong, H., Chen, X., Xiong, X., Liu, H., Hu, J., Chen, W., & Han, B. (2021). KIF15 Promotes Progression of Castration Resistant Prostate Cancer by Activating EGFR Signaling Pathway. *Frontiers in Oncology*, *11*, 679173. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.679173>
- García-Perdomo, H. A., Gómez-Ospina, J. C., Chaves-Medina, M. J., Sierra, J. M., Gómez, A. M. A., & Rivas, J. G. (2022). Impact of lifestyle in prostate cancer patients. What should we do? *International Braz j Urol : Official Journal of the Brazilian Society of Urology*, *48*(2), 244–262. <https://doi.org/10.1590/S1677-5538.IBJU.2021.0297>
- Gassman, N. R., Coskun, E., Stefanick, D. F., Horton, J. K., Jaruga, P., Dizdaroglu, M., & Wilson, S. H. (2015). Bisphenol A Promotes Cell Survival Following Oxidative DNA Damage in Mouse Fibroblasts. *PLOS ONE*, *10*(2), e0118819. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118819>
- Gillies, R. J., Verduzco, D., & Gatenby, R. A. (2012). Evolutionary dynamics of carcinogenesis and why targeted therapy does not work. In *Nature reviews. Cancer* (Vol. 12, Issue 7, pp. 487–493). <https://doi.org/10.1038/nrc3298>
- Global cancer observatory. (2020). Prostate Cancer fact sheet Globocan 2020. *Cancer Today*, *419*, 119–120. <https://gco.iarc.fr/today%0Ahttps://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/27-Prostate-fact-sheet.pdf>
- Grivennikov, S. I., Greten, F. R., & Karin, M. (2010). Immunity, inflammation, and

- cancer. *Cell*, 140(6), 883–899. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>
- Guo, T., Meng, X., Liu, X., Wang, J., Yan, S., Zhang, X., Wang, M., Ren, S., & Huang, Y. (2023). Associations of phthalates with prostate cancer among the US population. *Reproductive Toxicology*, 116, 108337. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2023.108337>
- Gupta, P. B., Pastushenko, I., Skibinski, A., Blanpain, C., & Kuperwasser, C. (2019). Phenotypic Plasticity: Driver of Cancer Initiation, Progression, and Therapy Resistance. *Cell Stem Cell*, 24(1), 65–78. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.11.011>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harnden, P., Shelley, M. D., Coles, B., Staffurth, J., & Mason, M. D. (2007). Should the Gleason grading system for prostate cancer be modified to account for high-grade tertiary components? A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Oncology*, 8(5), 411–419. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(07\)70136-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(07)70136-5)
- Harris, C. C. (1996). p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic--an abridged historical perspective. *Carcinogenesis*, 17(6), 1187–1198. <https://doi.org/10.1093/carcin/17.6.1187>
- Harvey, C. J., Pilcher, J., Richenberg, J., Patel, U., & Frauscher, F. (2012). Applications of transrectal ultrasound in prostate cancer. *The British Journal of Radiology*, 85 Spec No(Spec Iss 1), S3-17. <https://doi.org/10.1259/bjr/56357549>
- Hayward, S. W., & Cunha, G. R. (2000). THE PROSTATE: DEVELOPMENT AND PHYSIOLOGY. *Radiologic Clinics of North America*, 38(1), 1–14. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0033-8389\(05\)70146-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0033-8389(05)70146-9)

- Hernández, L. G., van Steeg, H., Luijten, M., & van Benthem, J. (2009). Mechanisms of non-genotoxic carcinogens and importance of a weight of evidence approach. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 682(2), 94–109. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.07.002>
- Hess-Wilson, J. K., Webb, S. L., Daly, H. K., Leung, Y.-K., Boldison, J., Comstock, C. E. S., Sartor, M. A., Ho, S.-M., & Knudsen, K. E. (2007). Unique bisphenol A transcriptome in prostate cancer: novel effects on ER β expression that correspond to androgen receptor mutation status. *Environmental Health Perspectives*, 115(11), 1646–1653. <https://doi.org/10.1289/ehp.10283>
- HIROI, H., TSUTSUMI, O., MOMOEDA, M., TAKAI, Y., OSUGA, Y., & TAKETANI, Y. (1999). Differential Interactions of Bisphenol A and 17 β -estradiol with Estrogen Receptor α (ER α) and ER β ; *Endocrine Journal*, 46(6), 773–778. <https://doi.org/10.1507/endocrj.46.773>
- Ho, S.-M., Tang, W.-Y., Belmonte de Frausto, J., & Prins, G. S. (2006). Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Research*, 66(11), 5624–5632.
- Hoque, E., Sujjan, K. M., Haque, M. I., Mustary, A., Miah, M. A., Hossain, M. M., & Islam, M. K. (2019). Evaluation of bisphenol a induced effects on blood biochemical constituents and histo-structure of liver in Swiss albino mice and its 'one health' perspectives. *J Vet Med One Heal Res*, 1, 75–83.
- Hu, Y., Wen, S., Yuan, D., Peng, L., Zeng, R., Yang, Z., Liu, Q., Xu, L., & Kang, D. (2018). The association between the environmental endocrine disruptor bisphenol A and polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 34(5), 370–377. <https://doi.org/10.1080/09513590.2017.1405931>
- Huang, D., Wu, J., Su, X., Yan, H., & Sun, Z. (2017). Effects of low dose of bisphenol A on the proliferation and mechanism of primary cultured prostate

epithelial cells in rodents. *Oncology Letters*, 14(3), 2635–2642.

<https://doi.org/10.3892/ol.2017.6469>

Huggins, C., & Hodges, C. V. (2002). Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941. *The Journal of Urology*, 168(1), 9–12. [https://doi.org/10.1016/s0022-5347\(05\)64820-3](https://doi.org/10.1016/s0022-5347(05)64820-3)

Hwang, S., Lim, J.-E., Choi, Y., & Jee, S. H. (2018). Bisphenol A exposure and type 2 diabetes mellitus risk: a meta-analysis. *BMC Endocrine Disorders*, 18(1), 81. <https://doi.org/10.1186/s12902-018-0310-y>

IARC. (2020). Mexico Source: Globocan 2020. *International Agency for Research on Cancer WHO*, 929, 1–2.

<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/484-mexico-factsheets.pdf>

Ito, K., Yamamoto, T., Ohi, M., Takechi, H., Kurokawa, K., Suzuki, K., & Yamanaka, H. (2003). Natural history of PSA increase with and without prostate cancer. *Urology*, 62(1), 64–69. [https://doi.org/10.1016/s0090-4295\(03\)00135-3](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(03)00135-3)

Ittmann, M. (2018). Anatomy and Histology of the Human and Murine Prostate. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(5).

<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030346>

James, N. (2014). Primer on prostate cancer. *Primer on Prostate Cancer*, 1–50.

<https://doi.org/10.1007/978-1-907673-82-5>

Johnson, D. G., & Degregori, J. (2006). Putting the Oncogenic and Tumor Suppressive Activities of E2F into Context. *Current Molecular Medicine*, 6(7), 731–738. <https://doi.org/10.2174/1566524010606070731>

Kabir, E. R., Rahman, M. S., & Rahman, I. (2015). A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 40(1), 241–258.

<https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.06.009>

Keijzers, G., Bakula, D., Petr, M. A., Madsen, N. G. K., Teklu, A., Mkrtchyan, G., Osborne, B., & Scheibye-Knudsen, M. (2018). Human Exonuclease 1 (EXO1) Regulatory Functions in DNA Replication with Putative Roles in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(1).

<https://doi.org/10.3390/ijms20010074>

Keshavarz-Maleki, R., Kaviani, A., Omranipour, R., Gholami, M., Khoshayand, M. R., Ostad, S. N., & Sabzevari, O. (2021). Bisphenol-A in biological samples of breast cancer mastectomy and mammoplasty patients and correlation with levels measured in urine and tissue. *Scientific Reports*, *11*(1), 18411.

<https://doi.org/10.1038/s41598-021-97864-6>

Kim, J., & Coetzee, G. A. (2004). Prostate specific antigen gene regulation by androgen receptor. *Journal of Cellular Biochemistry*, *93*(2), 233–241.

<https://doi.org/10.1002/jcb.20228>

Kleanthi, G., & Andreas, L. (2009). BURDEN OF ORGANOCHLORINE SUBSTANCES AS A RISK FACTOR OF BREAST CANCER. *Health Science Journal*, *3*(1).

Kose, O., Rachidi, W., Beal, D., Erkekoglu, P., Fayyad-Kazan, H., & Kocer Gumusel, B. (2020). The effects of different bisphenol derivatives on oxidative stress, DNA damage and DNA repair in RWPE-1 cells: A comparative study. *Journal of Applied Toxicology : JAT*, *40*(5), 643–654.

<https://doi.org/10.1002/jat.3934>

Kouidhi, W., Thannimalay, L., Soon, C. S., & Mohd, M. A. (2017). Occupational exposure to bisphenol A (BPA) in a plastic injection molding factory in Malaysia. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*, *30*(5), 743.

Kuleshov, M. V, Jones, M. R., Rouillard, A. D., Fernandez, N. F., Duan, Q., Wang, Z., Koplev, S., Jenkins, S. L., Jagodnik, K. M., Lachmann, A., McDermott, M. G., Monteiro, C. D., Gundersen, G. W., & Ma'ayan, A. (2016). Enrichr: a

comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update.

Nucleic Acids Research, 44(W1), W90-7. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw377>

Kyriacou, A., Tziaferi, V., & Toumba, M. (2023). Stress, Thyroid Dysregulation, and Thyroid Cancer in Children and Adolescents: Proposed Impending Mechanisms. *Hormone Research in Paediatrics*, 96(1), 44–53. <https://doi.org/10.1159/000524477>

La Merrill, M. A., Vandenberg, L. N., Smith, M. T., Goodson, W., Browne, P., Patisaul, H. B., Guyton, K. Z., Kortenkamp, A., Cogliano, V. J., Woodruff, T. J., Rieswijk, L., Sone, H., Korach, K. S., Gore, A. C., Zeise, L., & Zoeller, R. T. (2020). Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nature Reviews Endocrinology*, 16(1), 45–57. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0273-8>

Lacouture, A., Lafront, C., Peillex, C., Pelletier, M., & Audet-Walsh, É. (2022). Impacts of endocrine-disrupting chemicals on prostate function and cancer. *Environmental Research*, 204, 112085. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112085>

Lafront, C., Germain, L., Weidmann, C., & Audet-Walsh, É. (2020). A Systematic Study of the Impact of Estrogens and Selective Estrogen Receptor Modulators on Prostate Cancer Cell Proliferation. *Scientific Reports*, 10(1), 4024. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60844-3>

Lau, K.-M., LaSpina, M., Long, J., & Ho, S.-M. (2000). Expression of Estrogen Receptor (ER)- α and ER- β in Normal and Malignant Prostatic Epithelial Cells: Regulation by Methylation and Involvement in Growth Regulation¹. *Cancer Research*, 60(12), 3175–3182.

Lee, C. H., Akin-Olugbade, O., & Kirschenbaum, A. (2011). Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America*, 40(3), 565–575. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecl.2011.05.012>

Lee, J. J., Thomas, I.-C., Nolley, R., Ferrari, M., Brooks, J. D., & Leppert, J. T.

- (2015). Biologic differences between peripheral and transition zone prostate cancer. *The Prostate*, 75(2), 183–190. <https://doi.org/10.1002/pros.22903>
- Legler, J., Zeinstra, L. M., Schuitemaker, F., Lanser, P. H., Bogerd, J., Brouwer, A., Vethaak, A. D., De Voogt, P., Murk, A. J., & Van der Burg, B. (2002). Comparison of in vivo and in vitro reporter gene assays for short-term screening of estrogenic activity. *Environmental Science & Technology*, 36(20), 4410–4415. <https://doi.org/10.1021/es010323a>
- Lehmler, H.-J., Liu, B., Gadogbe, M., & Bao, W. (2018). Exposure to Bisphenol A, Bisphenol F, and Bisphenol S in U.S. Adults and Children: The National Health and Nutrition Examination Survey 2013–2014. *ACS Omega*, 3(6), 6523–6532. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b00824>
- Leng, J., Li, H., Niu, Y., Chen, K., Yuan, X., Chen, H., Fu, Z., Zhang, L., Wang, F., Chen, C., Héroux, P., Yang, J., Zhu, X., Lu, W., Xia, D., & Wu, Y. (2021). Low-dose mono(2-ethylhexyl) phthalate promotes ovarian cancer development through PPAR α -dependent PI3K/Akt/NF- κ B pathway. *The Science of the Total Environment*, 790, 147990. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147990>
- Leslie, H. A., van Velzen, M. J. M., Brandsma, S. H., Vethaak, A. D., Garcia-Vallejo, J. J., & Lamoree, M. H. (2022). Discovery and quantification of plastic particle pollution in human blood. *Environment International*, 163, 107199. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107199>
- Li, Y., Burns, K. A., Arao, Y., Luh, C. J., & Korach, K. S. (2012). Differential estrogenic actions of endocrine-disrupting chemicals bisphenol A, bisphenol AF, and zearalenone through estrogen receptor α and β in vitro. *Environmental Health Perspectives*, 120(7), 1029–1035. <https://doi.org/10.1289/ehp.1104689>
- Lilja, H., & Abrahamsson, P.-A. (1988). Three predominant proteins secreted by the human prostate gland. *The Prostate*, 12(1), 29–38. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pros.2990120105>

- Liu, K., Chen, Y., Feng, P., Wang, Y., Sun, M., Song, T., Tan, J., Li, C., Liu, S., Kong, Q., & Zhang, J. (2022). Identification of Pathologic and Prognostic Genes in Prostate Cancer Based on Database Mining. *Frontiers in Genetics*, 13, 854531. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.854531>
- Loch, T. (2007). Urologic imaging for localized prostate cancer in 2007. *World Journal of Urology*, 25(2), 121–129. <https://doi.org/10.1007/s00345-007-0155-x>
- Lu, Y., Liu, Y., & Yang, C. (2017). Evaluating In Vitro DNA Damage Using Comet Assay. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 128. <https://doi.org/10.3791/56450>
- Lythgoe, M. P., Mullish, B. H., Frampton, A. E., & Krell, J. (2022). Polymorphic microbes: a new emerging hallmark of cancer. *Trends in Microbiology*, 30(12), 1131–1134. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2022.08.004>
- Martinez-Arguelles, D. B., Culty, M., Zirkin, B. R., & Papadopoulos, V. (2009). In utero exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate decreases mineralocorticoid receptor expression in the adult testis. *Endocrinology*, 150(12), 5575–5585. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0847>
- Matthews, J. B., Twomey, K., & Zacharewski, T. R. (2001). In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chemical Research in Toxicology*, 14(2), 149–157. <https://doi.org/10.1021/tx0001833>
- McCann, J., & Ames, B. N. (1976). Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals: discussion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(3), 950–954. <https://doi.org/10.1073/pnas.73.3.950>
- McNeal, J. E. (1981). The zonal anatomy of the prostate. *The Prostate*, 2(1), 35–49. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pros.2990020105>
- Meeks, J. J., & Schaeffer, E. M. (2011). Genetic Regulation of Prostate

- Development. *Journal of Andrology*, 32(3), 210–217.
<https://doi.org/https://doi.org/10.2164/jandrol.110.011577>
- Merck KGaA. (2022). *RPMI-1640 Medium Sigma-Aldrich*.
<https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/sigma/r8758>
- Migliaccio, A., Castoria, G., & Auricchio, F. (2007). Src-dependent signalling pathway regulation by sex-steroid hormones: therapeutic implications. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(7–8), 1343–1348.
- Modica, R., Benevento, E., & Colao, A. (2023). Endocrine-disrupting chemicals (EDCs) and cancer: new perspectives on an old relationship. *Journal of Endocrinological Investigation*, 46(4), 667–677.
<https://doi.org/10.1007/s40618-022-01983-4>
- Mohammad, R. M., Muqbil, I., Lowe, L., Yedjou, C., Hsu, H.-Y., Lin, L.-T., Siegelin, M. D., Fimognari, C., Kumar, N. B., Dou, Q. P., Yang, H., Samadi, A. K., Russo, G. L., Spagnuolo, C., Ray, S. K., Chakrabarti, M., Morre, J. D., Coley, H. M., Honoki, K., ... Azmi, A. S. (2015). Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 35 Suppl(0), S78–S103.
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.001>
- Moon, S., Yu, S. H., Lee, C. B., Park, Y. J., Yoo, H. J., & Kim, D. S. (2021). Effects of bisphenol A on cardiovascular disease: An epidemiological study using National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2016 and meta-analysis. *The Science of the Total Environment*, 763, 142941.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142941>
- Morgentaler, A., & Traish, A. M. (2009). Shifting the paradigm of testosterone and prostate cancer: the saturation model and the limits of androgen-dependent growth. *European Urology*, 55(2), 310–320.
<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2008.09.024>
- Morote, J., Maldonado, X., & Morales-Bárrera, R. (2016). Prostate cancer. *Medicina Clínica (English Edition)*, 146(3), 121–127.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.medcle.2014.12.004>

- Na, T.-Y., Schecterson, L., Mendonsa, A. M., & Gumbiner, B. M. (2020). The functional activity of E-cadherin controls tumor cell metastasis at multiple steps. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *117*(11), 5931–5937. <https://doi.org/10.1073/pnas.1918167117>
- National Cancer Institute. (2022). *PDQ Screening and Prevention Editorial Board. Prostate Cancer Screening (PDQ®): Patient Version*. PDQ Cancer Information Summaries [Internet]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65867/figure/CDR0000258032__77/
- National Institutes of Health (US). (2007). Understanding Cancer. In *NIH Curriculum Supplement Series [Internet]*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20362/>
- Nava-Castro, K. E., Ramírez-Nieto, R., Méndez-García, L. A., Girón-Pérez, M. I., Segovia-Mendoza, M., Navidad-Murrieta, M. S., & Morales Montor, J. (2019). Environmental Pollution as a Risk Factor in Testicular Tumour Development: Focus on the Interaction between Bisphenol A and the Associated Immune Response. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *16*(21). <https://doi.org/10.3390/ijerph16214113>
- Nettore, I. C., Franchini, F., Palatucci, G., Macchia, P. E., & Ungaro, P. (2021). Epigenetic Mechanisms of Endocrine-Disrupting Chemicals in Obesity. *Biomedicines*, *9*(11). <https://doi.org/10.3390/biomedicines9111716>
- OECD. (2018). *Revised Guidance Document 150 on Standardised Test Guidelines for Evaluating Chemicals for Endocrine Disruption*. <https://doi.org/https://doi.org/https://doi.org/10.1787/9789264304741-en>
- Pai, V. C., Hsu, C.-C., Chan, T.-S., Liao, W.-Y., Chuu, C.-P., Chen, W.-Y., Li, C.-R., Lin, C.-Y., Huang, S.-P., Chen, L.-T., & Tsai, K. K. (2019). ASPM promotes prostate cancer stemness and progression by augmenting Wnt–Dvl-3– β -catenin signaling. *Oncogene*, *38*(8), 1340–1353. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0497-4>
- Pelch, K. E., Li, Y., Perera, L., Thayer, K. A., & Korach, K. S. (2019).

Characterization of Estrogenic and Androgenic Activities for Bisphenol A-like Chemicals (BPs): In Vitro Estrogen and Androgen Receptors Transcriptional Activation, Gene Regulation, and Binding Profiles. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, 172(1), 23–37.

<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz173>

Perceptive instruments. (2016). *Comet Assay IV*.

<http://www.perceptive.co.uk/products/comet-assay-iv/>

Peterson, M. J., S., vom S. F., T., A. B., Koji, A., Scott, B., Theo, C., Ibrahim, C., Andrew, C. D., Francesca, F., J., G. L., Terry, H., Shuk-mei, H., A., H. P., Taisen, I., Susan, J., Jun, K., Hans, L., Michele, M., A., M. J., ... Thomas, Z. R. (2009). Why Public Health Agencies Cannot Depend on Good Laboratory Practices as a Criterion for Selecting Data: The Case of Bisphenol A.

Environmental Health Perspectives, 117(3), 309–315.

<https://doi.org/10.1289/ehp.0800173>

Pfeifer, D., Chung, Y. M., & Hu, M. C.-T. (2015). Effects of Low-Dose Bisphenol A on DNA Damage and Proliferation of Breast Cells: The Role of c-Myc.

Environmental Health Perspectives, 123(12), 1271–1279.

<https://doi.org/10.1289/ehp.1409199>

Pironti, C., Notarstefano, V., Ricciardi, M., Motta, O., Giorgini, E., & Montano, L. (2023). First Evidence of Microplastics in Human Urine, a Preliminary Study of Intake in the Human Body. In *Toxics* (Vol. 11, Issue 1).

<https://doi.org/10.3390/toxics11010040>

Prins, G. S. (2008). Endocrine disruptors and prostate cancer risk. *Endocrine-Related Cancer*, 15(3), 649–656. <https://doi.org/10.1677/ERC-08-0043>

Prins, G. S., Calderon-Gierszal, E. L., & Hu, W.-Y. (2015). Stem cells as hormone targets that lead to increased cancer susceptibility. *Endocrinology*, 156(10), 3451–3457.

Prins, G. S., & Putz, O. (2008). Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 76(6),

641–659. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2008.00277.x>

Prueitt, R. L., Hixon, M. L., Fan, T., Olgun, N. S., Piatos, P., Zhou, J., & Goodman, J. E. (2023). Systematic review of the potential carcinogenicity of bisphenol A in humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *142*, 105414.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2023.105414>

Pu, X., Wang, Z., & Klaunig, J. E. (2015). Alkaline comet assay for assessing DNA damage in individual cells. *Current Protocols in Toxicology*, *2015*(August), 3.12.1-3.12.11. <https://doi.org/10.1002/0471140856.tx0312s65>

Ragusa, A., Notarstefano, V., Svelato, A., Belloni, A., Gioacchini, G., Blondeel, C., Zucchelli, E., De Luca, C., D'Avino, S., Gulotta, A., Carnevali, O., & Giorgini, E. (2022). Raman Microspectroscopy Detection and Characterisation of Microplastics in Human Breastmilk. *Polymers*, *14*(13).

<https://doi.org/10.3390/polym14132700>

Ragusa, A., Svelato, A., Santacroce, C., Catalano, P., Notarstefano, V., Carnevali, O., Papa, F., Rongioletti, M. C. A., Baiocco, F., Draghi, S., D'Amore, E., Rinaldo, D., Matta, M., & Giorgini, E. (2021). Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. *Environment International*, *146*, 106274.

<https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106274>

Rancière, F., Lyons, J. G., Loh, V. H. Y., Botton, J., Galloway, T., Wang, T., Shaw, J. E., & Magliano, D. J. (2015). Bisphenol A and the risk of cardiometabolic disorders: a systematic review with meta-analysis of the epidemiological evidence. *Environmental Health : A Global Access Science Source*, *14*, 46.

<https://doi.org/10.1186/s12940-015-0036-5>

Reed, C. (2015). Dawn of the Plasticene age. *New Scientist*, *225*(3006), 28–32.

Research and Markets. (2016). *Bisphenol-A – a global market overview*.

<https://www.prnewswire.com/news-releases/global-bisphenol-a-market-overview-2016-2022---market-is-projected-to-reach-us225-billion-by-2022-up-from-156-billion-in-2016---research-and-markets-300303934.html>

- Robison, A. K., Sirbasku, D. A., & Stancel, G. M. (1985). DDT supports the growth of an estrogen-responsive tumor: Mammary tumor growth; pesticides. *Toxicology Letters*, 27(1), 109–113.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-4274\(85\)90127-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-4274(85)90127-4)
- Rosenmai, A. K., Dybdahl, M., Pedersen, M., Alice van Vugt-Lussenburg, B. M., Wedebye, E. B., Taxvig, C., & Vinggaard, A. M. (2014). Are structural analogues to bisphenol a safe alternatives? *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, 139(1), 35–47.
<https://doi.org/10.1093/toxsci/kfu030>
- Sa-Nguanraksa, D., & O-Charoenrat, P. (2012). The role of vascular endothelial growth factor a polymorphisms in breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(11), 14845–14864.
<https://doi.org/10.3390/ijms131114845>
- Sánchez-Brunete, C., Miguel, E., & Tadeo, J. L. (2009). Determination of tetrabromobisphenol-A, tetrachlorobisphenol-A and bisphenol-A in soil by ultrasonic assisted extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(29), 5497–5503.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.05.065>
- Sang, C., Song, Y., Jin, T.-W., Zhang, S., Fu, L., Zhao, Y., Zou, X., Wang, Z., Gao, H., & Liu, S. (2021). Bisphenol A induces ovarian cancer cell proliferation and metastasis through estrogen receptor- α pathways. *Environmental Science and Pollution Research International*, 28(27), 36060–36068.
<https://doi.org/10.1007/s11356-021-13267-0>
- Schechter, A., Malik, N., Haffner, D., Smith, S., Harris, T. R., Paepke, O., & Birnbaum, L. (2010). Bisphenol A (BPA) in U.S. Food. *Environmental Science & Technology*, 44(24), 9425–9430. <https://doi.org/10.1021/es102785d>
- Schmitt, C. A., Wang, B., & Demaria, M. (2022). Senescence and cancer — role and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 19(10), 619–636. <https://doi.org/10.1038/s41571-022-00668-4>

- Schrader, T. J., & Cooke, G. M. (2000). Examination of selected food additives and organochlorine food contaminants for androgenic activity in vitro. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 53(2), 278–288. <https://doi.org/10.1093/toxsci/53.2.278>
- Scientific™, T.-F. (n.d.). *NanoDrop™ One/OneC*.
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ND-ONE-W>
- Seachrist, D. D., Bonk, K. W., Ho, S.-M., Prins, G. S., Soto, A. M., & Keri, R. A. (2016). A review of the carcinogenic potential of bisphenol A. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 59, 167–182.
<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.09.006>
- Sengupta, S., Obiorah, I., Maximov, P. Y., Curpan, R., & Jordan, V. C. (2013). Molecular mechanism of action of bisphenol and bisphenol A mediated by oestrogen receptor alpha in growth and apoptosis of breast cancer cells. *British Journal of Pharmacology*, 169(1), 167–178.
<https://doi.org/10.1111/bph.12122>
- Sewwandi, M., Wijesekara, H., Rajapaksha, A. U., Soysa, S., & Vithanage, M. (2023). Microplastics and plastics-associated contaminants in food and beverages; Global trends, concentrations, and human exposure. *Environmental Pollution*, 317, 120747.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120747>
- Shah, H. K., Bhat, M. A., Sharma, T., Banerjee, B. D., & Guleria, K. (2018). Delineating Potential Transcriptomic Association with Organochlorine Pesticides in the Etiology of Epithelial Ovarian Cancer. *The Open Biochemistry Journal*, 12, 16–28.
<https://doi.org/10.2174/1874091X01812010016>
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., & Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 13(11), 2498–2504. <https://doi.org/10.1101/gr.1239303>

- Sigma-Aldrich. (2022a). *Bisphenol A 239658*.
<https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/aldrich/239658>
- Sigma-Aldrich. (2022b). *Bisphenol F B47006*.
<https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/aldrich/b47006>
- Sigma-Aldrich. (2022c). *Bisphenol S 103039*.
<https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/aldrich/103039>
- Sigma-Aldrich. (2022d). *TRI Reagent*.
<https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/product/sigma/t9424>
- Simon, D. P., Vadakkadath Meethal, S., Wilson, A. C., Gallego, M. J., Weinecke, S. L., Bruce, E., Lyons, P. F., Haasl, R. J., Bowen, R. L., & Atwood, C. S. (2009). Activin receptor signaling regulates prostatic epithelial cell adhesion and viability. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, *11*(4), 365–376.
<https://doi.org/10.1593/neo.81544>
- Slaga, T. J. (1984). Multistage skin carcinogenesis: a useful model for the study of the chemoprevention of cancer. *Acta Pharmacologica et Toxicologica*, *55 Suppl 2*, 107–124. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0773.1984.tb02485.x>
- Sohoni, P., & Sumpter, J. P. (1998). Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *Journal of Endocrinology*, *158*(3), 327–340.
- Song, K.-H., Lee, K., & Choi, H.-S. (2002). Endocrine disrupter bisphenol a induces orphan nuclear receptor Nur77 gene expression and steroidogenesis in mouse testicular Leydig cells. *Endocrinology*, *143*(6), 2208–2215.
<https://doi.org/10.1210/endo.143.6.8847>
- Stamey, T. A., Yang, N., Hay, A. R., McNeal, J. E., Freiha, F. S., & Redwine, E. (1987). Prostate-specific antigen as a serum marker for adenocarcinoma of the prostate. *The New England Journal of Medicine*, *317*(15), 909–916.
<https://doi.org/10.1056/NEJM198710083171501>
- Sun, M., Veschi, V., Bagchi, S., Xu, M., Mendoza, A., Liu, Z., & Thiele, C. J. (2019). Targeting the Chromosomal Passenger Complex Subunit INCENP

Induces Polyploidization, Apoptosis, and Senescence in Neuroblastoma. *Cancer Research*, 79(19), 4937–4950. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-0695>

Sun, Y., Cheng, Z., & Liu, S. (2022). MCM2 in human cancer: functions, mechanisms, and clinical significance. *Molecular Medicine*, 28(1), 128. <https://doi.org/10.1186/s10020-022-00555-9>

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>

Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Roth, A., Santos, A., Tsafou, K. P., Kuhn, M., Bork, P., Jensen, L. J., & von Mering, C. (2015). STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Research*, 43(Database issue), D447-52. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1003>

Tai, S., Sun, Y., Squires, J. M., Zhang, H., Oh, W. K., Liang, C.-Z., & Huang, J. (2011). PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *The Prostate*, 71(15), 1668–1679. <https://doi.org/10.1002/pros.21383>

Tarapore, P., Ying, J., Ouyang, B., Burke, B., Bracken, B., & Ho, S.-M. (2014). Exposure to bisphenol A correlates with early-onset prostate cancer and promotes centrosome amplification and anchorage-independent growth in vitro. *PloS One*, 9(3), e90332.

Taylor, J. A., & Albertsen, P. C. (2011). *Benign and Malignant Diseases of the Prostate BT - Principles and Practice of Geriatric Surgery* (R. A. Rosenthal, M. E. Zenilman, & M. R. Katlic (eds.); pp. 1069–1082). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-6999-6_81

Teng, C., Goodwin, B., Shockley, K., Xia, M., Huang, R., Norris, J., Merrick, B. A., Jetten, A. M., Austin, C. P., & Tice, R. R. (2013). Bisphenol A affects androgen

receptor function via multiple mechanisms. *Chemico-Biological Interactions*, 203(3), 556–564.

Teoh, J. Y. C., Hirai, H. W., Ho, J. M. W., Chan, F. C. H., Tsoi, K. K. F., & Ng, C. F. (2019). Global incidence of prostate cancer in developing and developed countries with changing age structures. *PloS One*, 14(10), e0221775. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221775>

Thermo Fisher Scientific Inc. (2016). *Clariom™ D solutions for human, mouse, and rat*. 122, 1–8. https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FSLG%2Fbrochures%2FEMI07313-2_DS_Clariom-D_solutions_HMR.pdf

Thermo Fisher Scientific Inc. (2020). *GeneChip™ WT PLUS Reagent Kit Manual Target Preparation for GeneChip Whole Transcript (WT)*. shorturl.at/kvCFJ

Tindall, D. J., & Rittmaster, R. S. (2008). The rationale for inhibiting 5 α -reductase isoenzymes in the prevention and treatment of prostate cancer. *The Journal of Urology*, 179(4), 1235–1242. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2007.11.033>

Toivanen, R., & Shen, M. M. (2017). Prostate organogenesis: tissue induction, hormonal regulation and cell type specification. *Development (Cambridge, England)*, 144(8), 1382–1398. <https://doi.org/10.1242/dev.148270>

Tsai, C.-F., Hsieh, T.-H., Lee, J.-N., Hsu, C.-Y., Wang, Y.-C., Lai, F.-J., Kuo, K.-K., Wu, H.-L., Tsai, E.-M., & Kuo, P.-L. (2014). Benzyl butyl phthalate induces migration, invasion, and angiogenesis of Huh7 hepatocellular carcinoma cells through nongenomic AhR/G-protein signaling. *BMC Cancer*, 14(1), 556. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-556>

Tse, L. A., Lee, P. M. Y., Ho, W. M., Lam, A. T., Lee, M. K., Ng, S. S. M., He, Y., Leung, K., Hartle, J. C., Hu, H., Kan, H., Wang, F., & Ng, C. F. (2017). Bisphenol A and other environmental risk factors for prostate cancer in Hong Kong. *Environment International*, 107, 1–7.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.06.012>

- Ullah, A., Pirzada, M., Jahan, S., Ullah, H., & Khan, M. J. (2019). Bisphenol A analogues bisphenol B, bisphenol F, and bisphenol S induce oxidative stress, disrupt daily sperm production, and damage DNA in rat spermatozoa: a comparative in vitro and in vivo study. *Toxicology and Industrial Health*, *35*(4), 294–303. <https://doi.org/10.1177/0748233719831528>
- van Jaarsveld, M. T. M., Deng, D., Ordoñez-Rueda, D., Paulsen, M., Wiemer, E. A. C., & Zi, Z. (2020). Cell-type-specific role of CHK2 in mediating DNA damage-induced G2 cell cycle arrest. *Oncogenesis*, *9*(3), 35. <https://doi.org/10.1038/s41389-020-0219-y>
- Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R. J., Lee, D.-H., Shioda, T., Soto, A. M., vom Saal, F. S., Welshons, W. V., Zoeller, R. T., & Myers, J. P. (2012). Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine Reviews*, *33*(3), 378–455. <https://doi.org/10.1210/er.2011-1050>
- Verity Software House. (2013). *ModFit LT User Guide*. <https://www.vsh.com/Documentation/ModFitLT/mf40userguide.pdf>
- Vinay, D. S., Ryan, E. P., Pawelec, G., Talib, W. H., Stagg, J., Elkord, E., Lichtor, T., Decker, W. K., Whelan, R. L., Kumara, H. M. C. S., Signori, E., Honoki, K., Georgakilas, A. G., Amin, A., Helferich, W. G., Boosani, C. S., Guha, G., Ciriolo, M. R., Chen, S., ... Kwon, B. S. (2015). Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology*, *35*, S185–S198. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.004>
- Vineis, P., Schatzkin, A., & Potter, J. D. (2010). Models of carcinogenesis: an overview. *Carcinogenesis*, *31*(10), 1703–1709. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgq087>
- Visuttijai, K., Pettersson, J., Mehrbani Azar, Y., van den Bout, I., Örndal, C., Marcickiewicz, J., Nilsson, S., Hörnquist, M., Olsson, B., Ejeskär, K., & Behboudi, A. (2016). Lowered Expression of Tumor Suppressor Candidate

MYO1C Stimulates Cell Proliferation, Suppresses Cell Adhesion and Activates AKT. *PLOS ONE*, 11(10), e0164063.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164063>

W.D. Figg, , C.H. Chau, E. J. S. (2010). Drug Management of Prostate Cancer. *Anticancer Research*, 30(12), 5264.

<https://ar.iijournals.org/content/30/12/5264.4>

Wang, H., Li, S., Liu, B., Wei, S., Wang, T., Li, T., Lin, J., & Ni, X. (2022). KIF11: A potential prognostic biomarker for predicting bone metastasis-free survival of prostate cancer. *Oncology Letters*, 24(3), 312.

<https://doi.org/10.3892/ol.2022.13432>

Wang, N. P., To, H., Lee, W. H., & Lee, E. Y. (1993). Tumor suppressor activity of RB and p53 genes in human breast carcinoma cells. *Oncogene*, 8(2), 279–288.

Wetherill, Y. B., Fisher, N. L., Staubach, A., Danielsen, M., de Vere White, R. W., & Knudsen, K. E. (2005). Xenoestrogen action in prostate cancer: pleiotropic effects dependent on androgen receptor status. *Cancer Research*, 65(1), 54–65.

Wetherill, Y. B., Hess-Wilson, J. K., Comstock, C. E. S., Shah, S. A., Buncher, C. R., Sallans, L., Limbach, P. A., Schwemberger, S., Babcock, G. F., & Knudsen, K. E. (2006). Bisphenol A facilitates bypass of androgen ablation therapy in prostate cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 5(12), 3181–3190.

<https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-06-0272>

Wetherill, Y. B., Petre, C. E., Monk, K. R., Puga, A., & Knudsen, K. E. (2002). The xenoestrogen bisphenol A induces inappropriate androgen receptor activation and mitogenesis in prostatic adenocarcinoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 1(7), 515–524.

Wickham, H. (2016). Ggplot2: Elegant graphics for data analysis. In *Use R!* (2nd ed.). Springer International Publishing.

- Wood, R. D., & Doubl  , S. (2016). DNA polymerase θ (POLQ), double-strand break repair, and cancer. *DNA Repair*, 44, 22–32.
<https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.05.003>
- Woodward, M. J., Obsekov, V., Jacobson, M. H., Kahn, L. G., & Trasande, L. (2020). Phthalates and Sex Steroid Hormones Among Men From NHANES, 2013-2016. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 105(4), e1225-34. <https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa039>
- Wu, W., Li, M., Liu, A., Wu, C., Li, D., Deng, Q., Zhang, B., Du, J., Gao, X., & Hong, Y. (2020). Bisphenol A and the Risk of Obesity a Systematic Review With Meta-Analysis of the Epidemiological Evidence. *Dose-Response : A Publication of International Hormesis Society*, 18(2), 1559325820916949. <https://doi.org/10.1177/1559325820916949>
- Xin, F., Jiang, L., Liu, X., Geng, C., Wang, W., Zhong, L., Yang, G., & Chen, M. (2014). Bisphenol A induces oxidative stress-associated DNA damage in INS-1 cells. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 769, 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.04.019>
- Xue, J., Wan, Y., & Kannan, K. (2016). Occurrence of bisphenols, bisphenol A diglycidyl ethers (BADGEs), and novolac glycidyl ethers (NOGEs) in indoor air from Albany, New York, USA, and its implications for inhalation exposure. *Chemosphere*, 151, 1–8.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.02.038>
- Yang, L., Zhang, Y., Kang, S., Wang, Z., & Wu, C. (2021). Microplastics in soil: A review on methods, occurrence, sources, and potential risk. *The Science of the Total Environment*, 780, 146546.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146546>
- Yao, Y., & Dai, W. (2014). Genomic Instability and Cancer. *Journal of Carcinogenesis & Mutagenesis*, 5. <https://doi.org/10.4172/2157-2518.1000165>
- Yaswen, P., MacKenzie, K. L., Keith, W. N., Hentosh, P., Rodier, F., Zhu, J., Firestone, G. L., Matheu, A., Carnero, A., Bilsland, A., Sundin, T., Honoki, K.,

- Fujii, H., Georgakilas, A. G., Amedei, A., Amin, A., Helferich, B., Boosani, C. S., Guha, G., ... Yang, X. (2015). Therapeutic targeting of replicative immortality. *Seminars in Cancer Biology*, 35 Suppl(Suppl), S104–S128.
<https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.03.007>
- Zahra, A., Dong, Q., Hall, M., Jeyaneethi, J., Silva, E., Karteris, E., & Sisu, C. (2021). Identification of Potential Bisphenol A (BPA) Exposure Biomarkers in Ovarian Cancer. *Journal of Clinical Medicine*, 10(9).
<https://doi.org/10.3390/jcm10091979>
- Zhang, X., Guo, N., Jin, H., Liu, R., Zhang, Z., Cheng, C., Fan, Z., Zhang, G., Xiao, M., Wu, S., Zhao, Y., & Lu, X. (2022). Bisphenol A drives di(2-ethylhexyl) phthalate promoting thyroid tumorigenesis via regulating HDAC6/PTEN and c-MYC signaling. *Journal of Hazardous Materials*, 425, 127911.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127911>
- Zheng, J., Li, H., Zhu, H., Xiao, X., & Ma, Y. (2013). Genistein inhibits estradiol- and environmental endocrine disruptor-induced growth effects on neuroblastoma cells in vitro. *Oncology Letters*, 5(5), 1583–1586.
<https://doi.org/10.3892/ol.2013.1236>
- Zhou, Y., Ou, L., Xu, J., Yuan, H., Luo, J., Shi, B., Li, X., Yang, S., & Wang, Y. (2021). FAM64A is an androgen receptor-regulated feedback tumor promoter in prostate cancer. *Cell Death & Disease*, 12(7), 668.
<https://doi.org/10.1038/s41419-021-03933-z>