



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO**

**DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA**

**“Efecto del arsenito de sodio en el proceso de promoción y progresión  
de la carcinogénesis a través de la regulación de aromatasa en células  
de cáncer de mama MDA-MB-231 y MDA-MB-453”**

Tesis que presenta:

**M. en C. Liliana Esmeralda Reyes Vázquez**

Para obtener el grado de Doctora en Ciencias  
Especialidad en Toxicología

Directora de tesis:

**Dra. Emma S. Calderón Aranda**

México, D. F, 25 de Septiembre del 2020.

COMITÉ ACADÉMICO:

Directora de tesis:

**Dra. Emma S. Calderón Aranda**

Asesores internos

**Dra. Libia Vega Loyo**

**Dra. María del Rocío Gómez Ortega**

Asesores externos

**Dra. Ana María Salazar Martínez**

**Dr. José Eduardo Pérez Salazar**

**Dr. José Manuel Hernández Hernández**

Este trabajo se realizó en el Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN bajo la tutoría y en el laboratorio de la Dra. Emma S. Calderón Aranda.

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través (Proyectos No. 152491 y 32913).

## RESUMEN

El arsénico es un disruptor endócrino que promueve el desarrollo de cáncer de mama. La síntesis de estrógenos a través de la activación de la enzima aromatasa es esencial en la promoción y progresión del cáncer de mama. Éste es un evento mediado por la activación de receptores de estrógenos, como el receptor de estrógenos acoplados a proteínas G 1 o GPER1, el cual regula las respuestas celulares rápidas no genómicas que participan en la proliferación y migración de células de cáncer de mama. En el presente estudio se evaluó si el tratamiento con arsenito de sodio, a concentraciones ambientalmente relevantes (0.01-1  $\mu\text{M}$ ), induce la proliferación, la migración y la invasión de líneas celulares de cáncer de mama a través de la inducción de la actividad de aromatasa o activando la vía de señalización de GPER1. Nuestros resultados demostraron que 0.1  $\mu\text{M}$  de arsenito de sodio induce la proliferación, migración e invasión celular de las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231, MDA-MB-453 y MCF-7, pero no de células epiteliales no transformadas de mama (MCF-12A). Esta misma exposición estimula la actividad de aromatasa en células MDA-MB-231. Utilizando Letrozol (un inhibidor de la aromatasa) y G-15 (antagonista selectivo de GPER1) demostramos que tanto la proliferación, así como la migración inducida por el arsenito de sodio, son mediadas por la inducción de aromatasa y al menos parcialmente, por la activación de la vía GPER1 en células MDA-MB-231 y MDA-MB-453. El arsenito de sodio además induce la fosforilación de Src, una proteína tirosina-cinasa que regula positivamente la actividad de aromatasa y es un mediador importante de la vía de señalización de GPER1. Nuestros resultados demostraron que Src participa en la proliferación celular y actividad de aromatasa inducida por el arsenito de sodio en células MDA-MB-231. En conclusión, nuestros datos sugieren que a concentraciones ambientalmente relevantes, el arsenito de sodio induce una regulación positiva de la proliferación, la migración y la invasión de líneas celulares de cáncer de mama a través del incremento de la actividad de aromatasa y niveles de estradiol, estimulación de GPER1 y activación Src, lo que podría contribuir a la promoción y progresión tumoral.

## **ABSTRACT**

Arsenic is an endocrine disruptor that promotes breast cancer development. Estrogen synthesis, via aromatase activation, is essential for breast cancer promotion and progression activating the G-coupled estrogen receptor 1 or GPER1 and regulating rapid non-genomic effects involved in cell proliferation and migration of breast cancer cells. This study evaluated whether sodium arsenite, at environmental concentrations (0.01-1  $\mu\text{M}$ ), induces the proliferation, migration, and invasion of BCa by inducing aromatase activity or activating GPER1 pathway in the MDA-MB-231 cell line. Our results demonstrated that the treatment with 0.1  $\mu\text{M}$  of sodium arsenite induced cell proliferation, migration, invasion, and stimulated aromatase activity of BCa cell lines MDA-MB-231, MDA-MB-453, MCF-7, but not in a nontumorigenic breast epithelial cell line (MCF-12A). Using letrozole (an aromatase inhibitor) and G-15 (a GPER1-selective antagonist), we demonstrated that sodium arsenite-induced proliferation and migration is mediated by induction of aromatase enzyme and, at least in part, by GPER1 activation in MDA-MB-231 and MDA-MB-453 cells. Sodium arsenite induced phosphorylation of Src participating in sodium arsenite-induced aromatase activity, and cell proliferation of MDA-MB-231 cell line. Overall, our data suggests that sodium arsenite induces a positive-feedback loop of the proliferation, migration, and invasion cell of breast cancer cells, through induction of aromatase activity, E2 production, GPER1 stimulation, and Src activation that could contribute to tumor promotion and progression.

## DEDICATORIA

Este trabajo lo realicé con esfuerzo y corazón con la esperanza de que dentro, en el contenido, se encuentre información que pueda ser útil e interesante para alguien más.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a todas las personas que se involucraron y apoyaron el proyecto de forma directa e indirecta:

A la Dra. Emma Calderón por su apoyo, paciencia, enseñanzas y hacer del laboratorio 13 un espacio agradable para la realización de los proyectos basándose en el respeto y promoviendo el trabajo en equipo.

A la Dra. Libia Vega por su apoyo en la revisión crítica del trabajo y el artículo, su participación fue muy importante, gracias.

Al Dr. Eduardo Pérez Salazar por su apoyo con las líneas celulares y su ayuda en la discusión y revisión crítica de la tesis y el artículo, muchas gracias doctor.

A la Dra. Rocío Gómez por su ayuda junto con el INCAN con las líneas celulares y su revisión crítica de la tesis, muchas gracias por su apoyo doctora.

Al Dr. Manuel Hernández que desde la maestría me brindado su apoyo, muchas gracias doctor.

La Dra. Ana María Salazar por siempre mostrarse interesada en el trabajo y ofrecernos reiteradamente su ayuda en el mismo.

Al Dr. Pedro Cortés y a la M. en C. Elizabeth Estrada por su apoyo y asistencia técnica.

M. en C. Javier Ramírez, M. en C. Arlet Veloz y M. en C. Martín Orozco por toda su ayuda en las distintas técnicas y experimentos que realicé.

A los chicos del laboratorio 13 Chris, Beto, Omar, Vanessa y Víctor Núñez por su ayuda y apoyo.

Y finalmente agradezco a Arlet por su compañía y apoyo incondicional que fue muy importante durante estos años para mi, a mis amigos y familia que siempre me han apoyado.

<b>ÍNDICE</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Cáncer de mama	1
1.1.1 Epidemiología	1
1.1.2 Tipos de CaM	2
1.1.3 Factores de riesgo	3
1.1.3.1 Historia familiar y personal	3
1.1.3.2 Factores reproductivos	3
1.1.3.3 Estilo de vida	5
1.1.3.4 Factores ambientales	5
1.2 Receptores de estrógenos	6
1.2.1 Receptor de estrógenos clásicos (ER $\alpha$ y ER $\beta$ )	6
1.2.2 Receptor de estrógenos acoplado a proteínas G1 (GPER1)	7
1.2.2.1 Vía de señalización de Src	8
1.2.2.2 Papel del GPER1 en la carcinogénesis inducida por los estrógenos	9
1.3 Aromatasa (CYP19A1)	11
1.3.1 Regulación Transcripcional	11
1.3.2 Regulación Postraducciona	12
1.4 Arsénico	13
1.4.1 Generalidades	13
1.4.2 Toxicocinética	14
1.4.3 Arsénico en México	15
1.4.4 Mecanismos de carcinogenicidad del As	17
1.4.5 Exposición a As y el riesgo a desarrollar CaM	19
<b>1.5 JUSTIFICACIÓN</b>	<b>21</b>
<b>1.6 HIPÓTESIS</b>	<b>22</b>
<b>1.7 OBJETIVO GENERAL</b>	<b>22</b>
<b>1.7.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>22</b>
<b>2. MÉTODOS</b>	<b>23</b>
2.1 Diseño experimental	23
2.1.1 Evaluación del efecto del arsenito de sodio sobre la proliferación, la migración y la invasión celular.	23



2.1.2 Evaluación del efecto del arsenito de sodio sobre los niveles totales y la actividad de la aromatasa y su participación en la proliferación y la migración celular estimulada por el arsenito de sodio.	24
2.1.3 Evaluación de la participación de la vía del GPER1-Src en la actividad de la aromatasa y en la proliferación y la migración estimuladas por el arsenito de sodio.	25
2.2 Líneas celulares	26
2.3 Tratamientos celulares	26
2.4 Viabilidad celular por MTT	27
2.5 Proliferación celular por incorporación de Bromodesoxiuridina	27
2.6 Migración celular por el método de "Scratch" o cierre de herida	28
2.7 Invasión celular por el método de Transwell	28
2.8 Western blot	29
2.9 Actividad de aromatasa	30
2.10 Análisis estadístico	31
<b>3. RESULTADOS</b>	<b>32</b>
3.1 Efecto de la exposición a arsenito de sodio sobre la viabilidad de células de cáncer de mama	32
3.2 Efecto del arsenito de sodio sobre la proliferación celular	33
3.3 Efecto del arsenito de sodio sobre la migración y la invasión celular	35
3.4 Expresión proteica de aromatasa, GPER1 y ER $\alpha$ en las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-453, MCF-7 y MCF12A	38
3.5 Efecto del arsenito de sodio sobre los niveles de proteína totales y actividad de la aromatasa	38
3.6 Papel de la aromatasa en la proliferación y migración inducida por arsenito de sodio en células MDA-MB-231 y MDA-MB-453	39
3.7 Asociación de GPER1 con la proliferación, la migración y la actividad de la aromatasa en células MDA-MB-231 y MDA-MB-45.	40
3.8 Participación de Src en la proliferación celular y la actividad de la aromatasa inducida por el arsenito de sodio	41
<b>4. DISCUSIÓN</b>	<b>45</b>
<b>5. CONCLUSIONES</b>	<b>54</b>
<b>6. PERSPECTIVAS</b>	<b>55</b>
<b>7. REFERENCIAS</b>	<b>56</b>
<b>8. ANEXOS</b>	<b>69</b>

## INDICE DE TABLAS

## PÁGINA

<b>Tabla 1.</b> Clasificación molecular de tumores de CaM.....	<b>2</b>
<b>Tabla 2.</b> Estudios epidemiológicos que evalúan la asociación de la exposición a As con el riesgo a desarrollar CaM .....	<b>20</b>
<b>Tabla 3.</b> El arsenito de sodio no afecta la viabilidad de las líneas células evaluadas a las 24, 48 y 72 h.....	<b>32</b>

## INDICE DE FIGURAS

## PÁGINA

<b>Figura 1.</b> Tasas de mortalidad por CaM en mujeres de 20 años y más en México.....	<b>1</b>
<b>Figura 2.</b> Vía de señalización de GPER1 .....	<b>9</b>
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de regulación de la actividad de la aromatasa por estradiol (E2) en células de CaM. ....	<b>13</b>
<b>Figura 4.</b> El arsenito de sodio incrementa la proliferación de células de CaM. ....	<b>34</b>
<b>Figura 5.</b> El arsenito de sodio incrementa la migración de células de CaM. ....	<b>36</b>
<b>Figura 6.</b> El arsenito de sodio incrementa la invasión de células MDA-MB-231 .....	<b>37</b>
<b>Figura 7.</b> Expresión de receptores a estrógenos y de aromatasa en células de CaM .....	<b>38</b>
<b>Figura 8.</b> El arsenito de sodio incrementa los niveles de proteína y la actividad enzimática de la aromatasa .....	<b>40</b>
<b>Figura 9.</b> La aromatasa participa en la proliferación y la migración inducida por el arsenito de sodio. ....	<b>42</b>
<b>Figura 10.</b> GPER1 participa en la proliferación y la migración inducidas por el arsenito de sodio .....	<b>43</b>
<b>Figura 11.</b> Src participa en la proliferación de células MDA-MB-231 y la activación de la aromatasa estimulada por el arsenito de sodio. ....	<b>44</b>
<b>Figura 12.</b> Mecanismo propuesto por el cual el arsenito de sodio favorece la promoción y la progresión de las células de CaM.....	<b>53</b>

## ABREVIATURAS

AC	Adenilil ciclasa
ANOVA	Análisis de varianza
Ara-C	Arabinósido de citosina
ATSDR	Agencia para el registro de sustancias tóxicas y enfermedades
BrdU	Bromodesoxiuridina
BSA	Albúmina de suero bovino
CaM	Cáncer de mama
CREB	Proteína de unión a elementos de respuesta a AMP cíclico
E2	17 $\beta$ -estradiol
EDC	Compuesto disruptor endócrino
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
ERE	Elemento de respuesta a estrógenos
ERs	Receptores de estrógenos
ER $\alpha$	Receptor de estrógenos alfa
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G
GPER1	Receptor de estrógenos acoplado a proteínas G
HER2	Receptor 2 del factor epidérmico humano
HRP	Peroxidasa de rábano
IARC	Agencia internacional de la investigación sobre el cáncer
MMP	Metaloproteinasa
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NaAsO <sub>2</sub>	Arsenito de sodio
PBS	Buffer fosfata salino
PKA	Proteincinasa A
PR	Receptor de progesterona
PTP1B	Proteína tirosina fosfatasa 1B
RTK	Receptor tirosina cinasa
SFB	Suero fetal bovino
T	Testosterona
TRITC	Tetrametilrodamina
WHO	Organización mundial de la salud

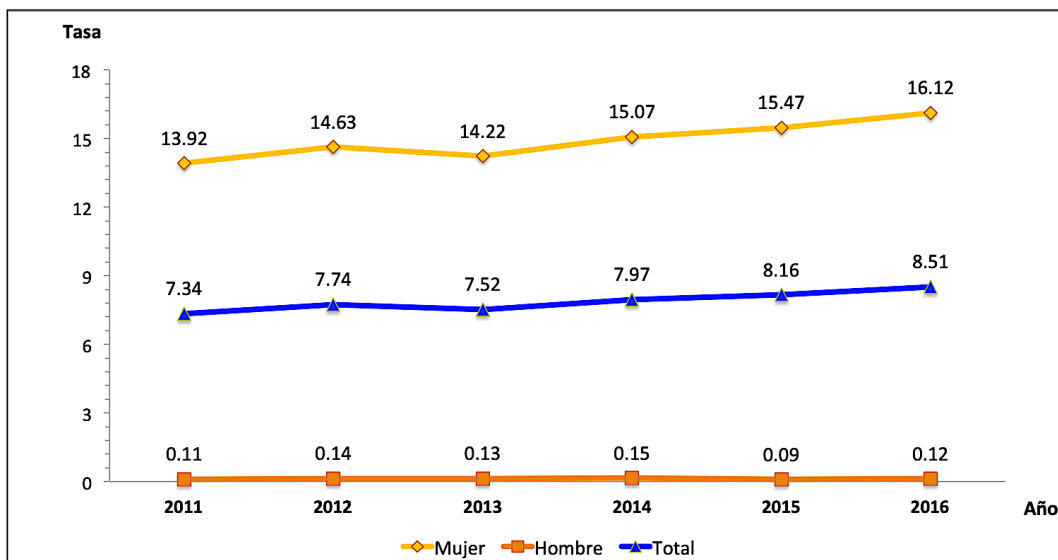
# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Cáncer de mama

### 1.1.1 Epidemiología

La agencia internacional de la investigación sobre el cáncer (IARC) estimó una incidencia de 18.1 millones nuevos casos de cáncer y 9.6 millones de muertes por cáncer en 2018. Entre estas, el cáncer de mama (CaM) es la quinta causa de muerte por cáncer alrededor del mundo y el segundo tipo de cáncer con mayor frecuencia de diagnóstico (2.1 millones de nuevos casos en 2018). Entre mujeres, es la enfermedad que se diagnostica con mayor frecuencia (24.2%) y es también la principal causa de muerte (15%) en la mayoría de los países (Bray et al., 2018).

En México, el CaM es la tercera causa de muerte por tumores malignos entre mujeres de 30 a 59 años; mientras que en hombres los datos de mortalidad se mantienen bajos. De manera general, en México las tasas de mortalidad que se reportan por tumor maligno de mama se siguen manteniendo con una tendencia al alza en el periodo 2011-2016 (INEGI, 2018) (Fig. 1).



**Figura 1.** Tasas de mortalidad por CaM en mujeres de 20 años y más en México. Serie Anual de 2011-2016 por cada 100,000 habitantes (modificada de INEGI, 2018).

### 1.1.2 Tipos de CaM

El CaM inicia como una enfermedad localizada y se reconocen carcinomas de dos tipos: invasores e *in situ*; los primeros se extienden a tejidos tanto circundantes como lejanos de la mama, mientras que los segundos se localizan únicamente en el tejido mamario. Actualmente, se describen 21 tipos de CaM histológicamente distintos y al menos cuatro subtipos moleculares (ACS, 2015). Cada subtipo se determina por técnicas moleculares para identificar la presencia de diferentes receptores hormonales (ER $\alpha$ , receptor de estrógenos alfa; PR, receptor de progesterona y HER2, receptor 2 del factor epidérmico humano) a partir de los cuales se obtienen cinco categorías principalmente: luminal A, luminal B, basal, baja en claudina y HER2 (Tabla 1) (Holliday & Speirs, 2011).

**Tabla 1.** Clasificación molecular de tumores de CaM

Clasificación	Inmunoperfil	Otras características	Ejemplos de líneas celulares
<b>Luminal A</b> 40-50% de casos	ER <sup>+</sup> , PR <sup>+/-</sup> , HER2 <sup>-</sup>	Bajo Ki67 Sensible a terapia endócrina y frecuentemente sensible a quimioterapia	MCF-7 T47D SUM185
<b>Luminal B</b> 15-20% de casos	ER <sup>+</sup> , PR <sup>+/-</sup> , HER2 <sup>+</sup>	Alto Ki67 Usualmente sensible a terapia endócrina, respuesta variable a quimioterapia. Los tumores HER2 <sup>+</sup> responden a terapia con Trastuzumab	BT474 ZR-75
<b>Basal</b> 18% de casos	ER <sup>-</sup> , PR <sup>-</sup> , HER2 <sup>-</sup>	Alto Ki67 EGFR <sup>+</sup> y/o Citoqueratina 5/6 <sup>+</sup> No sensibles a respuesta endócrina, frecuentemente responden a quimioterapia	MDA-MB-468 SUM190
<b>Baja en Claudina</b> 18% de casos	ER <sup>-</sup> , PR <sup>-</sup> , HER2 <sup>-</sup>	Bajo Ki67 Baja E-cadherina, Claudina 3,4 y 7 Respuesta intermedia a quimioterapia	BT549 MDA-MB-231 Hs578T SUM1315
<b>HER2</b> 20-25% de casos	ER <sup>-</sup> , PR <sup>-</sup> , HER2 <sup>+</sup>	Alto Ki67 Sensible a Trastuzumab y quimioterapia	SKBR3 MDA-MB-453

EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico

Ki67, marcador de proliferación codificado por el gen MKI67 (modificado de Holliday & Speirs, 2011)

### 1.1.3 Factores de riesgo

El CaM es una enfermedad multifactorial, siendo descritos algunos factores que contribuyen al riesgo, englobándose en cuatro grupos principales:

#### 1.1.3.1 Historia familiar y personal

Los individuos con antecedentes familiares de CaM, especialmente en un familiar de primer grado (madre, hermana, hija, padre, hermano o hijo) poseen un riesgo elevado de desarrollar CaM. En comparación con las mujeres sin antecedentes familiares, el riesgo de CaM es aproximadamente el doble en las mujeres con un familiar de primer grado diagnosticado, el triple en las mujeres con dos familiares, y casi cuatro veces mayor en las mujeres con tres o más familiares con CaM (ACS, 2015). Dentro de los casos hereditarios de CaM, los genes BRCA1 y BRCA2 están relacionados con la susceptibilidad a la enfermedad, representando del 15 al 20% de todos los tipos de CaM familiar. Las mutaciones en estos genes son muy poco frecuentes en la población general (menos del 1%), pero ocurren con una frecuencia ligeramente mayor en ciertos grupos étnicos o geográficamente aislados, como los Ashkenazi (Europa del Este) (aproximadamente 2%) (ACS, 2015).

Por otro lado, las mujeres que se diagnostican con CaM a edad temprana (< 40 años) tienen casi 4.5 veces mayor riesgo de volver a desarrollar CaM posteriormente. Así como algunos tipos de condiciones benignas de mama que desarrollan las mujeres a lo largo de su vida, como fibrosis, quistes, fibroadenoma e hiperplasia ductal y lobular atípica, se asocian con un mayor riesgo de desarrollar CaM. También la densidad del tejido mamario puede ser un factor de riesgo en el desarrollo de CaM, entre otros factores (ACS, 2015).

#### 1.1.3.2 Factores reproductivos

Ciclo menstrual.

El riesgo de desarrollar CaM incrementa alrededor del 5% por cada año de inicio temprano de la menstruación (menarca), y 3% por cada año tardío de inicio de la

menopausia. Este incremento en el riesgo de desarrollar CaM se debe a la exposición prolongada durante la vida de una mujer a hormonas endógenas reproductivas. En mujeres postmenopáusicas con niveles de hormonas sexuales endógenas mayores a los basales, se observa dos veces más riesgo de desarrollar CaM (Kelsey, Gammon & John, 1993; ACS, 2015). Los niveles altos de hormonas en circulación sanguínea se asocian con otros factores de riesgo de desarrollar CaM, como la obesidad e ingesta de alcohol en mujeres postmenopáusicas. Por su parte, en mujeres premenopáusicas es complicado establecer una relación con las hormonas ya que los niveles varían a través del ciclo menstrual. Sin embargo, se reporta que niveles altos de estrógenos y andrógenos en circulación sanguínea se asocian con un incremento en el riesgo de desarrollar CaM en éstas mujeres (Key et al., 2013).

#### Embarazo.

El tener el primer embarazo a término antes de los 35 años, así como tener un número mayor de hijos se asocia con un riesgo menor de padecer CaM ER<sup>+</sup>. Sin embargo, existe un incremento transitorio en el riesgo de desarrollar CaM después de un embarazo a término, particularmente en las mujeres mayores de 35 años (Kelsey, Gammon & John, 1993).

#### Amamantamiento.

La mayoría de los estudios sugieren que el amamantamiento durante un año o más reduce ligeramente el riesgo general de desarrollar CaM. Una duración mayor del periodo de amamantamiento, parece disminuir el riesgo. Una posible explicación de este efecto puede ser que el amamantamiento inhibe la menstruación, reduciendo en el tiempo de vida el número de ciclos menstruales (Faupel-Badger et al., 2013).

#### Hormonas postmenopáusicas.

Recientemente el uso prolongado de hormonas menopáusicas (también conocida como terapia hormonal o terapia de reemplazo hormonal) en combinaciones con estrógenos y progestina, incrementa el riesgo de padecer CaM. Este riesgo se relaciona con el incremento en la densidad mamaria que se genera por los estrógenos y la progestina. El riesgo también se incrementa en mujeres que inician con la terapia



cerca del inicio de la menopausia, comparadas con las que la inician de manera tardía (Chlebowski et al., 2010).

#### 1.1.3.3 Estilo de vida

Se reporta una posible asociación entre desarrollar CaM y la dieta, consumo de alcohol y tabaco, obesidad y actividad física. El riesgo de padecer CaM es aproximadamente uno punto cinco veces mayor en las mujeres con sobrepeso y aproximadamente dos veces mayor en las mujeres obesas con respecto a las mujeres delgadas. Esto se debe, en parte, a los niveles altos de estrógeno porque el tejido de grasa es la mayor fuente de estrógeno en las mujeres posmenopáusicas. Esta asociación también se podría explicar por los niveles más altos de insulina en mujeres obesas. Otros estudios reportan que la actividad física moderada se asocia con el riesgo bajo de desarrollar CaM, reduciendo el riesgo en un 30% (Key et al., 2013).

#### 1.1.3.4 Factores ambientales

Estudios epidemiológicos recientes concluyen que hasta un 75% de la incidencia de CaM se atribuye a factores ambientales. Dentro de los contaminantes ambientales que se asocian con las diferentes etapas del desarrollo de CaM se encuentra la radiación y compuestos disruptores endócrinos (CDE) como: fitoestrógenos, metaloestrógenos y xenoestrógenos que mimetizan a los estrógenos participando en la promoción y progresión del crecimiento tumoral de mama (Wallace, 2015).

Los metaloestrógenos son metales iónicos pequeños y metaloides que desencadenan efectos mediados por el ER $\alpha$  (Martin et al., 2003). Los metaloestrogenos se dividen en dos subclases: aniones metal/metaloide y metales catiónicos bivalentes. Los aniones metal/metaloide incluyen compuestos como arsenito, nitrito, selenito, y vanadato. Los cationes bivalentes incluyen metales tales como cadmio, calcio, cobalto, cobre, níquel, cromo, plomo, mercurio y estaño (Byrne et al., 2013).

Como se revisará a profundidad más adelante, el arsénico es un metaloestrógeno que se relaciona con el crecimiento y progresión del CaM. Liu y cols. (2015) reportaron en

un estudio de cohorte prospectivo en California (EUA) que, a largo plazo la exposición ambiental a dosis bajas de compuestos como cadmio y arsénico inorgánico puede ser un factor de riesgo para desarrollar CaM. Además, algunos estudios muestran que el arsénico activa al ER $\alpha$  e induce un fenotipo celular de cáncer en células epiteliales de mama normal humana en una manera independiente de ER $\alpha$  pero dependiente de la enzima aromatasa (Stoica, Katzenellenbogen & Martin, 2000; Xu, Tokar & Waalkes, 2014).

## 1.2 Receptores de estrógenos

El 17 $\beta$ -estradiol (E2) pertenece a las hormonas esteroideas sexuales femeninas, las cuales derivan del colesterol. El E2 regula el crecimiento, diferenciación y fisiología de los procesos reproductivos y juegan un papel importante en el desarrollo, proliferación, migración y supervivencia de células blanco. Sus efectos biológicos se ejercen a través de su asociación con ERs.

### 1.2.1 Receptor de estrógenos clásicos (ER $\alpha$ y ER $\beta$ )

El ER $\alpha$  se aisló por primera vez por Jensen y Jacobson en 1962, mientras que el descubrimiento del ER $\beta$  lo realizó el equipo de Gustafsson en 1996. El descubrimiento de este último permitió entender mejor los efectos pleiotrópicos de los estrógenos, incluso en tejidos y células que carecen de ER $\alpha$  (ER $\alpha$ -) (Jensen & Jacobson, 1962; Kuiper et al., 1996).

ER $\alpha$  y  $\beta$  son miembros de la superfamilia de receptores nucleares. Se codifican en varios genes y poseen características en común con otros receptores nucleares, entre ellas su estructura, la cual está compuesta de cinco a seis dominios: los dominios A/B están situados en la región amino terminal de la proteína y contienen el motivo de activación funcional 1 (AF-1), el cual es responsable de la activación transcripcional independiente de la unión del ligando. El dominio C participa en la dimerización del receptor y en la unión del complejo ligando-receptor a la secuencia de ADN (ácido desoxirribonucleico) específica. El dominio D tiene también propiedades que participan en unión al ADN a través de la señal de traducción nuclear; la región carboxilo terminal

de la proteína se une al ligando específico. Algunos ERs contienen un dominio E adicional, cuya función aún se desconoce (Anbalagan & Rowan, 2015).

La activación de estos receptores implica su translocación al núcleo en donde actúan como factores de transcripción dependientes de ligando. Esta modulación en la transcripción de genes por ERs nucleares se conoce como actividad “genómica” de los estrógenos. Este mecanismo requiere la unión del E2 al ER $\alpha$ , su translocación al núcleo seguido de la dimerización del receptor formando homo o heterodímeros y, finalmente la unión del complejo a los elementos de respuesta a estrógenos (ERE) en el promotor y regiones reguladoras de genes blanco (Anbalagan & Rowan, 2015).

Por otro lado, además de los mecanismos genómicos de los estrógenos, el E2 también ejerce acciones rápidas no genómicas que inician en la membrana celular al unirse a receptores de estrógenos membranales, los cuales comprenden subpoblaciones de ER clásicos (mER $\alpha$  y mER $\beta$ ) y un ER adicional, GPER1 (Thomas et al., 2005; Revankar et al., 2005). La señalización de los eventos rápidos no genómicos incluye la activación de proteínas, proteína-cinasas, proteínas G y la modulación de canales iónicos (Prossnitz et al., 2008).

### 1.2.2 Receptor de estrógenos acoplado a proteínas G1 (GPER1)

GPER1 es un miembro huérfano de la superfamilia de receptores de siete regiones transmembranales (7TMR). En el 2005, se identificó como un receptor acoplado a proteínas G (GPCR) membranal de unión a los estrógenos y más tarde se evidenció que su expresión era necesaria para desencadenar respuestas celulares rápidas por E2 (Filardo et al., 2000; Maggiolini et al., 2004). GPER1 se expresa de manera ubicua en todo el cuerpo, incluyendo corazón, cerebro, páncreas, músculo esquelético, riñón, vasos y órganos reproductivos (Olde & Leeb-Lundberg, 2009). Las acciones biológicas del GPER se ajustan al mecanismo molecular de la vía de señalización de los GPCRs. Así, la vía de GPER1, promueve en paralelo vías de señalización dependientes de proteínas G<sub>s</sub> y G <sub>$\beta\gamma$</sub>  en células blanco. La proteína G<sub>s</sub> activa a la adenilato ciclasa (AC), la cual estimula la síntesis de AMPc llevando a la activación de la proteína cinasa A (PKA) que activa al factor de transcripción de la proteína reguladora de unión al AMPc,

CREB y a la regulación de los complejos ciclina D/cinasa dependiente de ciclina cuatro y seis (CDK-4 y -6) así como de CDK p27<sup>Kip1</sup>. Por otro lado, la activación dependiente de G<sub>βγ</sub> lleva a la activación de la integrina α5β1 y metaloproteinasas de matriz (MMPs), que ocurre por la liberación de calcio intracelular por PI3K, lo cual lleva a la activación de Src, Shc y cinasa de adhesión focal (FAK). De esta manera, la integrina α5β1 es un intermediario transmembranal necesario en la señalización que coordina la formación de fibrillas de fibronectina y la síntesis de una matriz de fibronectina provisional, con la liberación de polipéptidos de EGF (factor de crecimiento epidérmico) que se ancla a la membrana, y la eventual transactivación del EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico). De esta manera, las MMPs coordinan la adhesión celular y la sensibilidad a EGF, eventos clave requeridos en la supervivencia celular pero también promueven la invasión celular por la localización de colagenasas en los sitios de contacto célula-matriz. La liberación autócrina de EGF mediada por GPER1 resulta en la transactivación y autofosforilación de EGFR y el reclutamiento de proteínas adaptadoras que se acoplan a cinasas efectoras río abajo en la señalización, como ERK1/2, que a su vez promueve la expresión de ciclina D. PI3K puede activar a ErbB1 acoplado a Akt, la cual regula el tránsito de la fase G1 a la fase S del ciclo celular y otros eventos como la apoptosis (Filardo, 2018; Filardo, Quinn & Sabo, 2008) (Fig. 2).

#### 1.2.2.1 Vía de señalización de Src

Src, es un miembro de la familia de proteínas con actividad tirosina-cinasas que se asocia a la membrana, pero no pertenece al grupo de receptores membranales. Los miembros de esta familia participan en vías distintas de señalización intracelular que se originan por la activación de receptores de factores de crecimiento transmembranales, citocinas y hormonas, entre los que destacan: EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico), PDGFR (receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas), IGF1R (receptor del factor de crecimiento uno), VEGFR (receptor del factor de crecimiento endotelial vascular), FGFR (receptor del factor de crecimiento fibroblástico), HER2, PRLR, ER y GPER1 (Guarino, 2010). Estos receptores participan en la regulación de vías de señalización que desencadenan proliferación celular,

supervivencia, diferenciación, adhesión, migración e invasión celular en modelos biológicos diferentes (Thomas & Brugge, 1997; Guarino, 2010).

Src tiene como función catalizar la transferencia del grupo fosfato terminal de ATP a residuos específicos de tirosina presentes en diferentes sustratos proteicos. De esta manera, transduce señales del ambiente extracelular a vías bioquímicas intracelulares que activan tanto factores nucleares (respuestas transcripcionales), como componentes citoplásmicos que resultan en la reorganización del citoesqueleto (Thomas & Brugge, 1997).

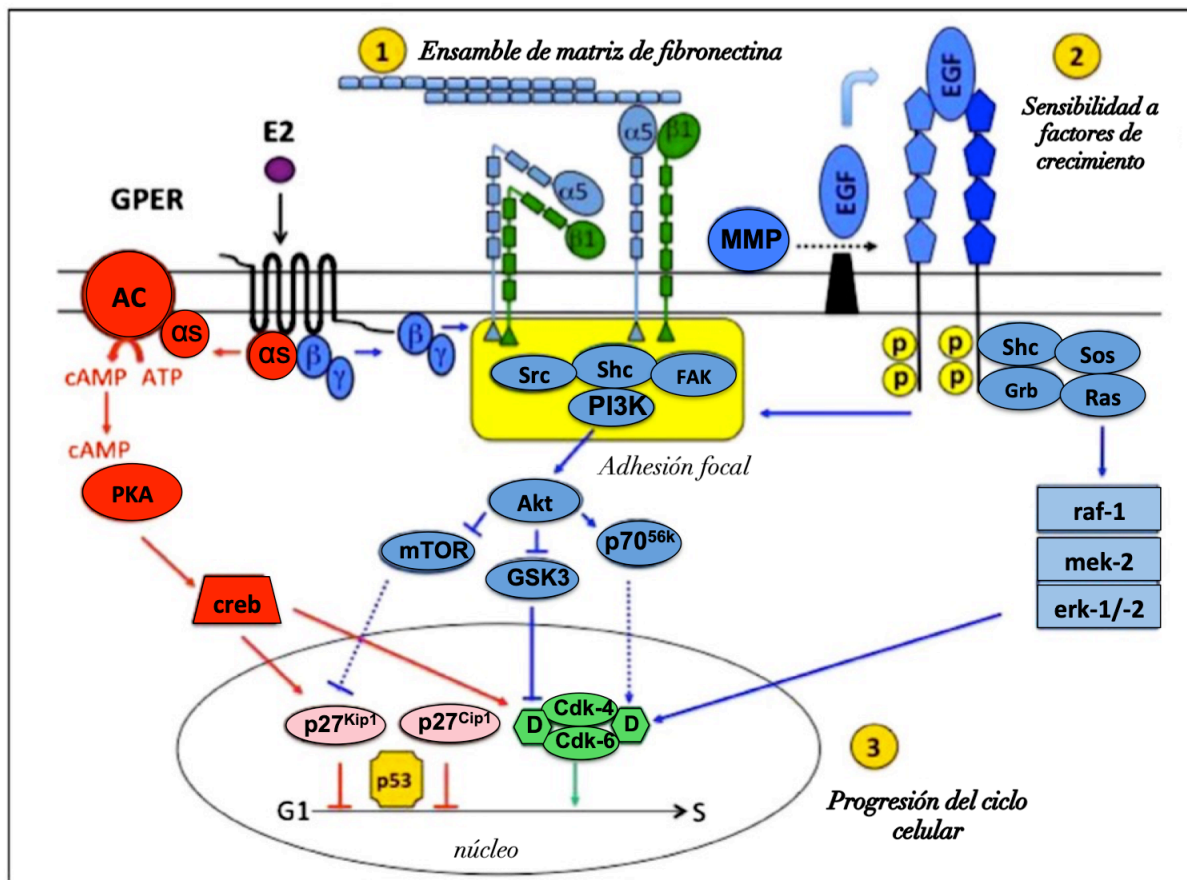


Figura 2. Vía de señalización de GPER1 (Adaptado de Filardo, 2018).

### 1.2.2.2 Papel del GPER1 en la carcinogénesis inducida por los estrógenos

El mecanismo de carcinogénesis mediado por estrógenos en distintos modelos, se centra en la capacidad de los estrógenos para promover la proliferación celular,

incrementando la probabilidad de que ocurran mutaciones somáticas, las cuales se acumulan con el incremento de la exposición a estrógenos (Clemons & Goss, 2001). Con esto, se hipotetiza que los estrógenos participan en la iniciación y promoción del CaM, un evento que se relaciona con la activación de los ER clásicos. Sin embargo, se observa que los estrógenos también participan en la progresión tumoral mamaria (Yang et al., 2013). Diversos estudios sugieren que GPER1 manifiesta actividades asociadas con la promoción y progresión tumoral (Marjo et al., 2014; Jung, 2019), lo cual permitiría ofrecer una explicación plausible de los mecanismos de la carcinogénesis inducida por los estrógenos en tumores ER $\alpha$ .

El análisis del GPER1 en biopsias de tumores primarios de mama humano, indican que el GPER1 se asocia directamente con el tamaño del tumor y una franca metástasis (Filardo et al., 2006; Aiad et al., 2014). Por su parte, Marjo y cols. (2014) al evaluar el papel del GPER1 en el crecimiento y metástasis en un modelo de ratón transgénico de tumorigénesis mamario, “*knockout*” (KO) de GPER1, observaron que los tumores de ratones KO fueron más pequeños y con una tasa menor de proliferación comparados con los que se observaron en los ratones de tipo silvestre. Interesantemente, no observaron una diferencia en el periodo de latencia de los tumores entre los grupos. Además, el grado histológico era menor en los KO, sugiriendo que el tumor era menos agresivo que en los ratones silvestres; esto lo evidenciaron al evaluar la metástasis a tejido cercano como el pulmón, observando una disminución en la capacidad invasiva en los ratones KO en comparación con los ratones silvestres. Con esto, se sustenta la hipótesis de que GPER1 no participa en el proceso de iniciación tumoral de mama, pero sí en la promoción y progresión (Marjo et al., 2014).

Por otra parte, además de la activación de la vía de señalización de GPER1, el incremento de los niveles de estrógenos puede ocurrir por el aumento de la transcripción y actividad de la enzima que se encarga de la síntesis de estrógenos, la aromatasa, después de la activación de GPER1 por algunos de sus ligandos como E2 y tamoxifen. Esto generaría un estroma tumoral reactivo e impulsaría la progresión del cáncer (Filardo, 2018).

### 1.3 Aromatasa (CYP19A1)

La aromatasa es un complejo enzimático que pertenece a la familia de los citocromos P450. Es responsable de la conversión de andrógenos a estrógenos, que limita la velocidad de la biosíntesis de estrógenos. Está compuesta de dos polipéptidos, una flavoproteína no específica ubicua, NADPH-citocromo-c-reductasa y una forma microsomal específica de citocromo P450 aromatasa, que se codifica en el gen CYP19. La aromatasa se expresa en condiciones fisiológicas normales en el retículo endoplásmico de células productoras de estrógenos como las del ovario, los testículos, el tejido adiposo, la piel, el hipotálamo y la placenta (Santen et al., 2009).

El papel de la aromatasa en el desarrollo de CaM se ha estudiado extensamente. Existen tres fuentes de estrógenos que mantienen el desarrollo y crecimiento de CaM. Primero, los estrógenos que se sintetizan en el ovario por las células de la teca alcanzan el tejido mamario para actuar de manera endócrina. Segundo, la síntesis de estrógenos por la aromatasa en sitios extraováricos, como el tejido adiposo subcutáneo y la piel, también actúan sobre la mama de manera endócrina. Y tercero, la sobreexpresión de la aromatasa en tejido tumoral y/o en el estroma circundante aumenta los niveles locales de estrógenos, los cuales actúan en el sitio de síntesis de manera parácrina y/o intrácrina (Zhao et al., 2016; Sun, Zhou & Chen, 1997). Por lo que, una de las estrategias terapéuticas para tratar el CaM se dirige a la reducción de los niveles de estrógenos a través del uso de inhibidores de la aromatasa.

#### 1.3.1 Regulación Transcripcional

El gen de la aromatasa humana CYP19, se localiza en el cromosoma quince. Tiene una extensión de aproximadamente 123 kb. La región codificante contiene nueve exones (II-X) con el sitio de inicio traduccional ATG en el exón II. La región regulatoria, de 93 kb que se encuentra río abajo, contiene promotores que son específicos del tipo de tejido que controlan la expresión del CYP19A1. Estos promotores se regulan por vías de señalización distintas que controlan la expresión de la aromatasa y la formación de estrógenos por el reclutamiento de distintos factores de transcripción a sus elementos *cis*-regulatorios. Específicamente en tejido de CaM, se observa que los

promotores PI.3 y PII se encargan de regular del 80 al 90% de los transcritos totales (Bulun et al., 1993). Catalano y cols. (2014) demostraron que el GPER1 es capaz de incrementar la actividad transcripcional del promotor PI.3/PII por un incremento en el reclutamiento del complejo c-Fos/c-Jun a los motivos AP-1 en células de CaM.

Por otro lado, se ha propuesto que uno de los mecanismos por el cual algunos CDE favorecen la promoción de CaM es a través de modular la expresión y actividad de la aromatasa (Kinoshita & Chen, 2003). En este sentido, algunos herbicidas, plaguicidas, fungicidas y componente de cremas para la piel y plastificantes son capaces de incrementar la expresión de la aromatasa, incrementar la actividad de aromatasa, y por ende los niveles de E2, lo cual se relaciona con su capacidad de estimular la proliferación de células de CaM (Williams & Darbre, 2019).

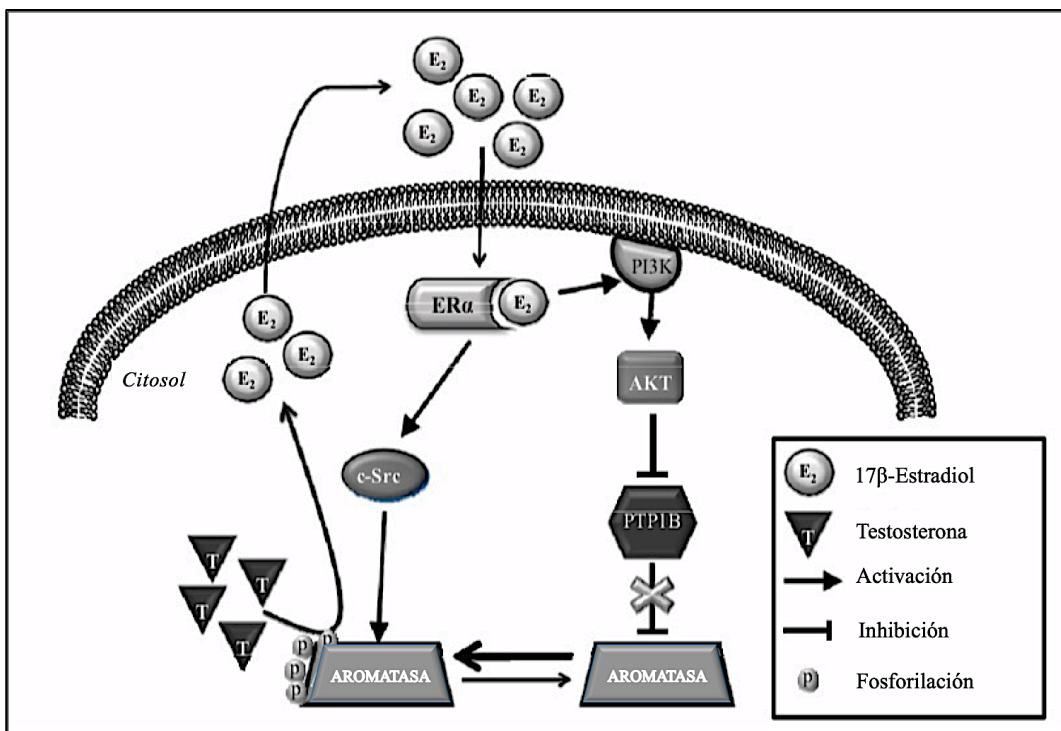
### 1.3.2 Regulación Postraduccional

A diferencia de la regulación transcripcional, la regulación postraduccional de la aromatasa aun no se caracteriza. Existe evidencia de que la actividad de la aromatasa se modula por modificaciones postraduccionales, específicamente por eventos cíclicos de fosforilación/desfosforilación. La primera evidencia de que la fosforilación y la desfosforilación de la aromatasa funcionan como un control que permite modular rápidamente su actividad enzimática y biosíntesis de estrógenos fue demostrada en cerebro de codornices (Balhazart et al., 2003). Algunos trabajos proponen que la fosforilación de la aromatasa se relaciona con una disminución en su actividad (Miller et al., 2008); mientras que otros mostraron una relación con el incremento en su actividad (Barone et al., 2012). Por ejemplo, en células de CaM MCF-7 se reportó que después de la exposición a E2 se incrementan los niveles de fosforilación en tirosina en la enzima, mientras que el estatus de fosforilación en serina se mantiene sin cambio. El residuo tirosina 361 (Tyr361) es crucial para inducir la actividad enzimática de la aromatasa por E2, siendo un sitio blanco de fosforilación de la tirosina-cinasa c-Src que interactúa de forma directa con la aromatasa (Catalano et al., 2009).

Es importante mencionar que la fosforilación de proteínas se regula por la actividad competitiva entre proteínas cinasas y fosfatasas. La proteína tirosina fosfatasa,



PTP1B, se asocia con la aromatasa en el retículo endoplásmico de células de CaM, manteniendo a la aromatasa inactiva. El E2 activa la vía de PI3K/Akt que inhibe la actividad de PTP1B, lo que permite la interacción de aromatasa con Src y su eventual fosforilación en la Tyr361. Así, la inhibición o silenciamiento de PTP1B aumentan la actividad enzimática de la aromatasa. Es decir, esta enzima actúa como regulador negativo de la actividad de la aromatasa inducida por E2, mientras que Src actúa como un regulador positivo de la vía generando una retroalimentación positiva entre E2 y aromatasa (Fig. 3) (Barone et al., 2012).



**Figura 3.** Mecanismo de regulación de la actividad de la aromatasa por estradiol (E2) en células de CaM (Adaptada de Catalano et al., 2016).

## 1.4 Arsénico

### 1.4.1 Generalidades

El arsénico (As) es un metaloide que se distribuye ubicuamente en el ambiente. La mayor parte del As en la corteza terrestre está presente en la litosfera. La meteorización de las rocas, actividades geotérmicas y volcánicas, la minería y la

fundición son fuentes de liberación de arsénico. En el ambiente puede mantenerse en el aire y viajar largas distancias hasta depositarse en suelo y agua, y se transfiere al humano a través de la cadena alimenticia y el agua de bebida (Zhu et al., 2014).

La mayor parte del As se utiliza en procesos industriales para producir conservantes antifúngicos de madera que pueden conducir a la contaminación del suelo. Según la publicación de la ATSDR, desde 2003 el uso de preservativos de madera que contienen As se disminuye paulatinamente en ciertos usos residenciales como estructuras de juegos, mesas de picnic, cubiertas, entre otros, pero todavía se utilizan en aplicaciones industriales (Chung, Yu & Hong, 2014).

El As también se usa en la industria farmacéutica y del vidrio, en la fabricación de aleaciones, desinfectantes, curtiduría de cuero, pigmentos y pinturas anti-incrustantes. Los compuestos de As también se emplean en las industrias microelectrónica y óptica (WHO, 2002). Además, el As se utiliza en insecticidas y plaguicidas debido a su poder germicida. Sin embargo, el uso de compuestos de As inorgánico en plaguicidas no está permitido en Estados Unidos. Los compuestos de As inorgánico, principalmente el arsenito de sodio, se utiliza ampliamente como herbicidas y esterilizantes no selectivos del suelo (US Department of Agriculture, 1970).

La liberación de As por las fuentes antropogénicas puede contaminar lagos, ríos o aguas subterráneas a través de sus desechos. Por ello, así como por la contaminación de As en agua a partir de las fuentes naturales y antropogénicas, es un problema serio de salud pública en todo el mundo (ATSDR, 2007). En el ambiente, el As está presente en diferentes formas químicas, este elemento tiene cuatro estados de oxidación: 5+, 3+, 0 y -3, denominados arsenato, arsenito, arsénico elemental y arsina, respectivamente. El arsenito ( $\text{As}^{3+}$ ) y el arsenato ( $\text{As}^{5+}$ ) son las formas inorgánicas más abundantes en el ambiente.

#### 1.4.2 Toxicocinética

La exposición a As a través de su inhalación y absorción dérmica son consideradas las rutas de menor exposición en la población en general, pero la principal ruta de exposición ocupacional. En la población en general, la exposición oral es la ruta

predominante a través de la ingestión de alimentos y agua de bebida contaminada. Además, la ingestión de pequeñas concentraciones de As a partir del suelo y polvo es una ruta importante de exposición en niños (ATSDR, 2007).

Una vez que se absorben, los compuestos de As se metabolizan en el hígado y se convierten en otras especies orgánicas e inorgánicas incluyendo arsenito, arsenato, dimetilarseniato (DMA) y monometilarsonato (MMA) (Chung, Yu & Hong, 2014). El As inorgánico y orgánico se absorben rápidamente en el tracto gastrointestinal y se distribuyen en el organismo a través de la circulación sanguínea. Las especies orgánicas generalmente se consideran inocuas ya que se absorben poco en las células. En contraste, las especies inorgánicas son altamente reactivas y afectan una serie de reacciones intracelulares (Drobná et al., 2010). Finalmente, los metabolitos del As en el cuerpo se excretan en la orina, la principal vía de excreción para eliminar las especies de As del cuerpo. Cada forma de As tiene diferentes propiedades fisiológicas y bioactivas, por lo que es necesario identificar y cuantificar cada forma química de As para evaluar sus efectos individuales en la salud humana. En general, se reconoce que el As inorgánico es más tóxico que el As orgánico entre el As inorgánico, el  $As^{3+}$  es más tóxico que  $As^{5+}$ . Diversos estudios sugieren que los metabolitos metilados pueden ser responsables en parte de los efectos adversos que se asocian con la exposición a As inorgánico (Styblo et al., 2000; Vega et al., 2001).

#### 1.4.3 Arsénico en México

Debido a que muchos compuestos de As pueden disolverse en el agua, el As puede contaminar lagos, ríos y aguas subterráneas al disolverse por la lluvia, nieve o a través de desechos industriales. El agua subterránea contaminada con As es una fuente importante de agua de consumo humano y por lo tanto una fuente de exposición a As importante. La exposición crónica a niveles altos de As inorgánico a través de agua de bebida se asocia con una amplia gama de efectos adversos, como lesiones cutáneas, enfermedades vasculares periféricas, toxicidad reproductiva y efectos neurológicos, entre otros. Además, varios estudios epidemiológicos relacionan la exposición a As con una variedad de tumores malignos humanos en la piel, los pulmones, la vejiga y el

hígado (ATSDR, 2007; IARC, 2012). Consecuentemente, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomendó en 1963, como límite de concentración máxima de As en el agua de bebida 50 µg/L. Después de evidencias nuevas que se relacionan con efectos de concentraciones bajas de As y riesgo de cáncer, en 1992 la OMS redujo la concentración máxima permitida en el agua de bebida a 10 µg/L. Sin embargo, se estima que más de 100 millones de personas alrededor del mundo están expuestos a niveles mayores de As que los que estableció la OMS en 1992.

En algunas áreas del mundo, las concentraciones de As inorgánico en agua de bebida se mantienen por arriba de los límites recomendados, como Argentina, Bangladesh, Chile, China, India, México y Taiwan (IARC, 2012). Es importante destacar que varios países como Estados Unidos, Canadá, Rumania, Hungría, Taiwan y Vietnam han adoptado las últimas recomendaciones de la OMS, mientras que México, Argentina, Bolivia y Perú han retrasado la adopción de esta recomendación (Fisher et al., 2017). México tiene un límite regulatorio de 25 µg As/L en agua potable [NOM 127-SSA1-1994 (2000)] y en el 2010 se propuso una nueva sección de la NOM para regular la calidad del agua que incluye un límite permisible de 10 µg de As/L de agua [NOM 000-SSA1-2010]. Sin embargo, aún no se publica una versión actualizada de esta norma (Fisher et al., 2017).

En México, se reportan desde los años 50's concentraciones altas de As en aguas subterráneas, contaminadas principalmente a partir de fuentes naturales. Aunque en el norte de México las fuentes de contaminación se mantienen en discusión, se propone que distintos procesos geoquímicos son responsables de la contaminación de As en aguas subterráneas como sistemas hidrotérmicos que liberan niveles altos de litio, boro, As y fluoruro, la disolución de los óxidos de hierro y manganeso, y la liberación de As retenido en arcillas. Este último puede movilizar el As de la matriz del acuífero al agua subterránea. Los estudios científicos sugieren que la sobreexplotación y la evaporación de los acuíferos son los mecanismos principales del enriquecimiento del agua con As en México (Armienta & Segovia, 2008).

En los estados del norte como Chihuahua, Coahuila, Durango y Sonora se reportan niveles de As en agua entre siete y 600 µg de As/L. Otros estados como Hidalgo,

Guanajuato, Baja California, San Luis Potosí, Michoacán y Puebla reportan concentraciones de As que sobrepasan los límites permisibles ( $\geq 73,600 \mu\text{g}$  de As/L de agua). Existe información muy limitada sobre los niveles de As en agua de bebida que se pueden encontrar en el resto de los estados y/o poblaciones mexicanas que posiblemente estén expuestos a niveles por encima de los  $10 \mu\text{g}$  de As/L de agua (Armienta & Segovia, 2008; Fisher et al., 2017).

#### 1.4.4 Mecanismos de carcinogenicidad del As

La IARC clasifica al As en el grupo uno como carcinógeno humano. Diversos estudios epidemiológicos establecen una asociación entre la exposición a As inorgánico en agua de bebida y un incremento en la incidencia de cáncer incluyendo cáncer de vejiga, de hígado, de pulmón, de próstata, de piel y CaM (Zhou & Xi, 2018; Khanjani, Jafarnejad & Tavakkoli, 2017). El mecanismo por el cual el As induce carcinogénesis aún no es claro. Se proponen varios mecanismos de tumorigénesis inducido por As, entre los principales se encuentran estrés oxidante, anomalías cromosómicas, daño genotóxico, modificación en la expresión de genes, mecanismos epigenéticos, citotoxicidad y proliferación regenerativa. Sin embargo, muchos de los estudios donde relacionan el estrés oxidante, genotoxicidad y anomalías cromosómicas con la incidencia de cáncer son estudios *in vitro* en los cuales se utilizan concentraciones muy altas de As que ahora se conoce que afectan la viabilidad celular (Zhou & Xi, 2018).

El desarrollo del cáncer es un fenómeno que presenta fases distintas: iniciación, promoción, progresión y metástasis. Se postula que los efectos cromosómicos y el daño al ADN son eventos críticos en la iniciación y progresión del cáncer humano. Nesnow y cols. (2002) demostraron que no ocurre una interacción directa entre el ADN y los compuestos arsenicales y no se reporta la información de aductos de ADN que contengan As. Sin embargo, el As puede producir efectos genotóxicos de manera indirecta al causar la formación de micronúcleos, intercambio de cromátidas hermanas, aberraciones cromosómicas y la inhibición de proteínas reparadoras de ADN (Xie et al., 2014; Klein et al., 2007). Por otro lado, cada vez son más las

evidencias que indican que la alteración de la transducción de señales celulares se relaciona directamente con la carcinogénesis del As. A niveles bajos, el As actúa como promotor tumoral o co-carcinógeno induciendo traducción de señales intracelulares que llevan a la activación o inhibición de factores de transcripción y proteínas regulatorias que se unen al ADN y regulan la transcripción de genes blanco que participan en el crecimiento celular, proliferación y transformación maligna (Zhou & Xi, 2018; Yang & Frenkel, 2002). El As puede interactuar con tres vías de señalización importantes: la vía de EGFR, PI3K/AKT y NRF2/KEAP1. El EGFR (también conocido como HER1 y ErbB1) pertenece a la familia de receptores tirosina-cinasa ErbB (RTKs) en el se encuentran otros tres miembros mas: HER2, HER3 y HER4. Su activación desencadena vías de señalización como la de PI3K/AKT y las vías de MAPK que regulan eventos de crecimiento celular, apoptosis, señales de estrés y transformación maligna, entre otros (Zhou et al., 2018; Hubaux et al., 2013). Por otro lado, las proteínas tirosina-cinasa relacionadas con el desarrollo de cáncer, como Src, han mostrado que cooperan con los RTK para promover el crecimiento tumoral. Src es una tirosinacinasas que participa en eventos celulares como proliferación, supervivencia, diferenciación, adhesión, morfología y migración celular. Se reporta que el As puede estimular la actividad de Src, la cual activa a EGFR por una interacción física que resulta en dos eventos de fosforilación en tirosina (Tyr845 y Tyr1101), lo que permite la autofosforilación y activación del receptor, de una manera independiente de ligando (Simeonova & Luster, 2002; Biscardi et al., 1999). El As también puede inducir la activación de componentes de la vía de EGFR como Ras, Raf, Mek y ERK a través de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Zhou & Xi, 2018; Hubaux et al., 2013). Recientemente, Huff y cols. (2016) reportaron que en células de adenocarcinoma de pulmón (H1793) expuestas a 100 nM de arsenito de sodio, se activa una vía de señalización mediada por ER, EGFR, Src y GPER1 que activa finalmente a ERK. Además, se observó que la preincubación con G-15, un antagonista selectivo de GPER1, inhibe la activación de MAPK dependiente de E2 y arsenito. También reportaron que el pretratamiento con la toxina *pertussi*, la cual impide la interacción de los GPCRs con las proteínas G heterotriméricas, inhibe esta activación dependiente de arsenito.

Existen evidencias que el As es capaz de actuar como un disruptor endócrino y se sugiere que éste es uno de los mecanismos por el que se le relaciona con el riesgo para desarrollar o promover la promoción y progresión del CaM. Stoica y cols. (2000) reportaron que el arsenito es capaz de unirse al dominio de unión a ligando del ER $\alpha$  y activarlo, aumentando la proliferación celular, mimetizando el efecto del estradiol. Por el contrario, otros estudios *in vitro* e *in vivo* proponen que el As actúa como disruptor endócrino alterando la regulación de genes a través de los receptores de glucocorticoides, mineralocorticoides, progesterona, andrógenos, y suprimiendo la regulación de genes dependiente de E2 y ER $\alpha$  (Davey et al., 2007). Recientemente, se reportó que la exposición crónica a As, en células epiteliales normales de mama humana (MCF-10A), induce un fenotipo de cáncer de epitelio de mama humana a través de una vía independiente del ER $\alpha$ , y la sobreexpresión de la aromatasa (Xu et al., 2014). *In vivo* se observa que la exposición *in útero* a As promueve la apertura vaginal temprana, aumenta el número de las células formadoras de glándulas mamarias y la ramificación y densidad de células epiteliales en la etapa prepuberal. En la etapa postpuberal se observó un incremento en la expresión de ER $\alpha$  (Parodi et al., 2015). Por otro lado, Nakareangrit y cols. (2015) reportaron que *in vitro*, el arsenito inhibe la actividad transcripcional de ER $\alpha$  inducida por E2 y activa rápidamente y de manera sostenida a ERK, es decir la vía no genómica, incrementando la fosforilación de ER $\alpha$  en el residuo Ser<sup>118</sup> y la expresión de c-fos y c-myc.

#### 1.4.5 Exposición a As y el riesgo a desarrollar CaM

En la última década, diversos estudios epidemiológicos muestran la asociación entre la exposición a As y el desarrollo de CaM, sin embargo, sus hallazgos son variables y contradictorios. En la tabla 2 se resumen los estudios que encuentran una asociación entre la exposición a As y la incidencia de CaM.

**Tabla 2.** Estudios epidemiológicos que evalúan la asociación de la exposición a As con el riesgo a desarrollar CaM

Autor/Año	Localización	Tipo de estudio	Conclusión
Marciniak y cols. (2019)	Norte de Polonia	Cohorte prospectiva n = 1,702	La exposición crónica a As incrementa el riesgo a desarrollar CaM. El análisis ajustado por niveles de As (4 cuartiles) en sangre se asoció con el riesgo de CaM. Siendo el cuartil de mayores niveles de As el que presentó mayor riesgo (HR= 13.2; IC 95% 4.02-43).
Vu y cols. (2019)	Estados Unidos	Estudio ecológico	Se demostró una asociación significativa entre la exposición a metales disruptores endócrinos en el aire ambiental y la incidencia de CaM en Estados Unidos. Los niveles en aire de As, plomo y mercurio, se asociaron con la incidencia de CaM ER-positivo.
Michel-Ramirez y cols. (2017)	Torreón, Coahuila	Estudio transversal n = 120	Una reducción en la capacidad de metabolizar al iAs puede ser un factor de riesgo potencial para desarrollar CaM.
López-Carrillo y cols. (2014)	Coahuila, Chihuahua, Durango, Nuevo León y Sonora (Norte de México)	Estudio de casos y controles n = 1,016 casos y 1,028 controles	Las variaciones interindividuales en el metabolismo del As inorgánico pueden jugar un papel importante en la carcinogénesis de CaM. Mujeres con mayor capacidad de metilar iAs a MMA y/o baja capacidad para metilar MMA a DMA tienen mayor riesgo de desarrollar CaM.
Muszyńska (2012)	Polonia	Estudio de casos y controles n = 99 casos y 198 controles	El As incrementa el riesgo de CaM especialmente en mujeres con BRCA1 activo.
Wadhwa y cols. (2015)	Pakistan	Estudio de Casos y controles n= 125 casos y 94 controles	En muestras de cuero cabelludo se mostraron concentraciones mayores de CaM de mama comparada con los niveles de As en los controles.
Joo y cols. (2009)	Korea	Estudio transversal n = 144	
Liu y cols. (2015)	California	Estudio de Cohorte prospectivo (1995-2010) n = 112, 379	Una exposición prolongada a iAs es un factor de riesgo para desarrollar CaM ER-negativo.



## 1.5 JUSTIFICACIÓN

El CaM es la principal causa de muerte en mujeres a nivel mundial. En México, las tasas de mortalidad por CaM aumentan con respecto al tiempo. Dentro de los factores de riesgo de padecer CaM se encuentran la exposición prolongada a estrógenos endógenos y exógenos, y se sugiere que los factores ambientales y la industrialización participan en el desarrollo y progresión de la enfermedad.

El As es un carcinógeno en diferentes tejidos, a niveles bajos puede actuar como un promotor tumoral y se sugiere que posee propiedades de un disruptor endócrino, lo que podría ser un factor de riesgo para desarrollar CaM.

A pesar de los hallazgos reportados acerca del mecanismo molecular del As, la importancia de la participación de la enzima aromatasa en el desarrollo y progresión del CaM y el papel que juega el GPER1 en la vía de señalización del E2 y posiblemente de el As, se desconoce si la exposición a arsenito de sodio incrementa la proliferación, migración e invasión de células epiteliales de mama transformadas y si en estos eventos participa la regulación de aromatasa y GPER1.

## **1.6 HIPÓTESIS**

El As incrementa la proliferación, migración e invasión de líneas celulares de CaM a través del incremento de los niveles y/o actividad de la aromatasa.

## **1.7 OBJETIVO GENERAL**

Estudiar si el efecto del As sobre la proliferación, migración e invasión de células de CaM implica la regulación de la aromatasa.

### **1.7.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

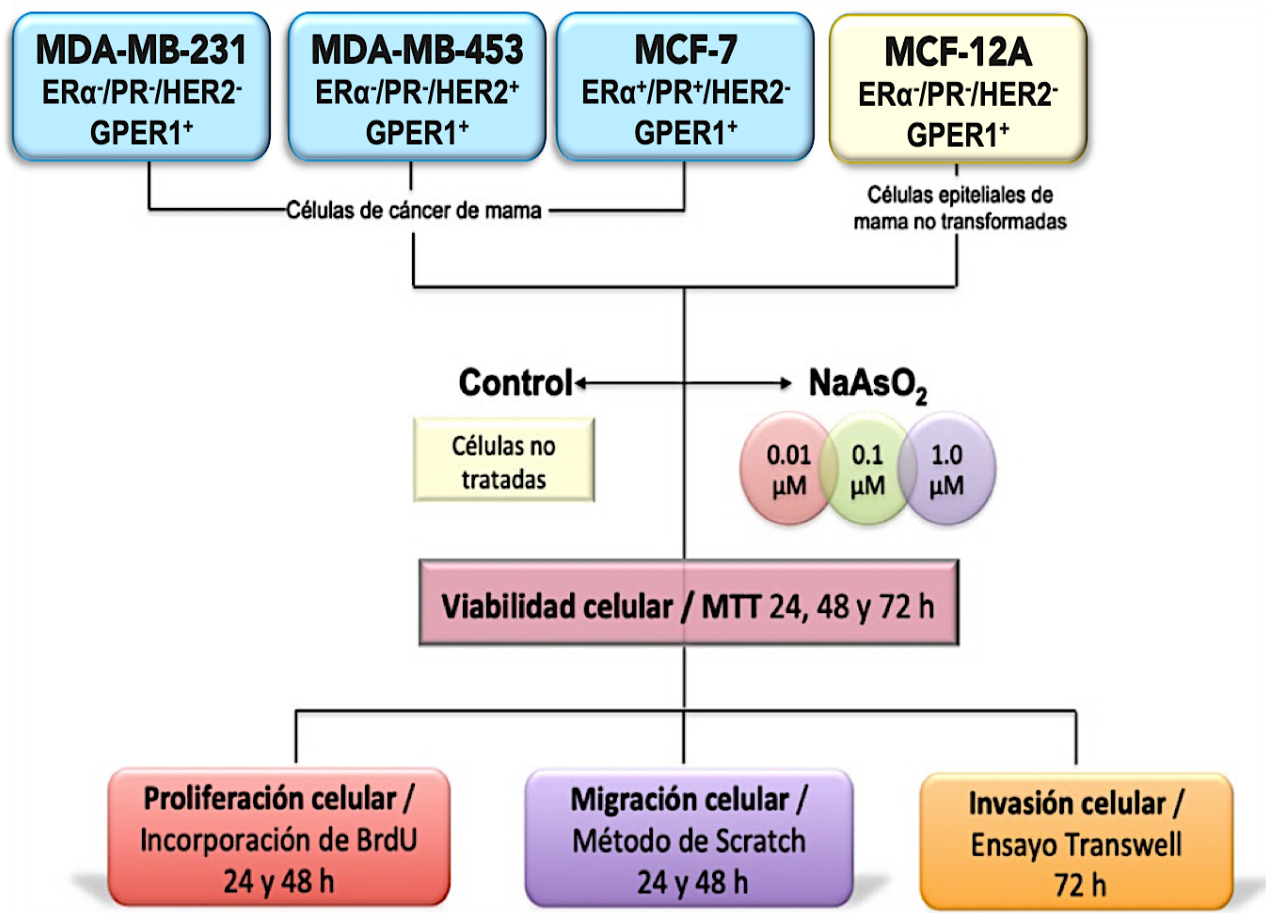
- 1) Evaluar el efecto del As sobre la proliferación, la migración y la invasión de líneas celulares de CaM.
- 2) Determinar el efecto del As sobre los niveles y actividad enzimática de la aromatasa en una línea celular de CaM (MDA-MB-231).
- 3) Evaluar la participación de la aromatasa en los procesos de proliferación y migración inducida por el arsenito de sodio en células de CaM MDA-MB-231 y MDA-MB-453
- 4) Evaluar la participación del GPER1 en la proliferación y la migración inducida por el arsenito de sodio en las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-453.
- 5) Determinar el efecto del arsenito de sodio sobre los niveles de Src fosforilada en la línea celular MDA-MB-231.
- 6) Evaluar la participación de Src en la actividad de la aromatasa y la proliferación inducidas por el arsenito de sodio en la línea celular MDA-MB-231.

## 2. MÉTODOS

### 2.1 Diseño experimental

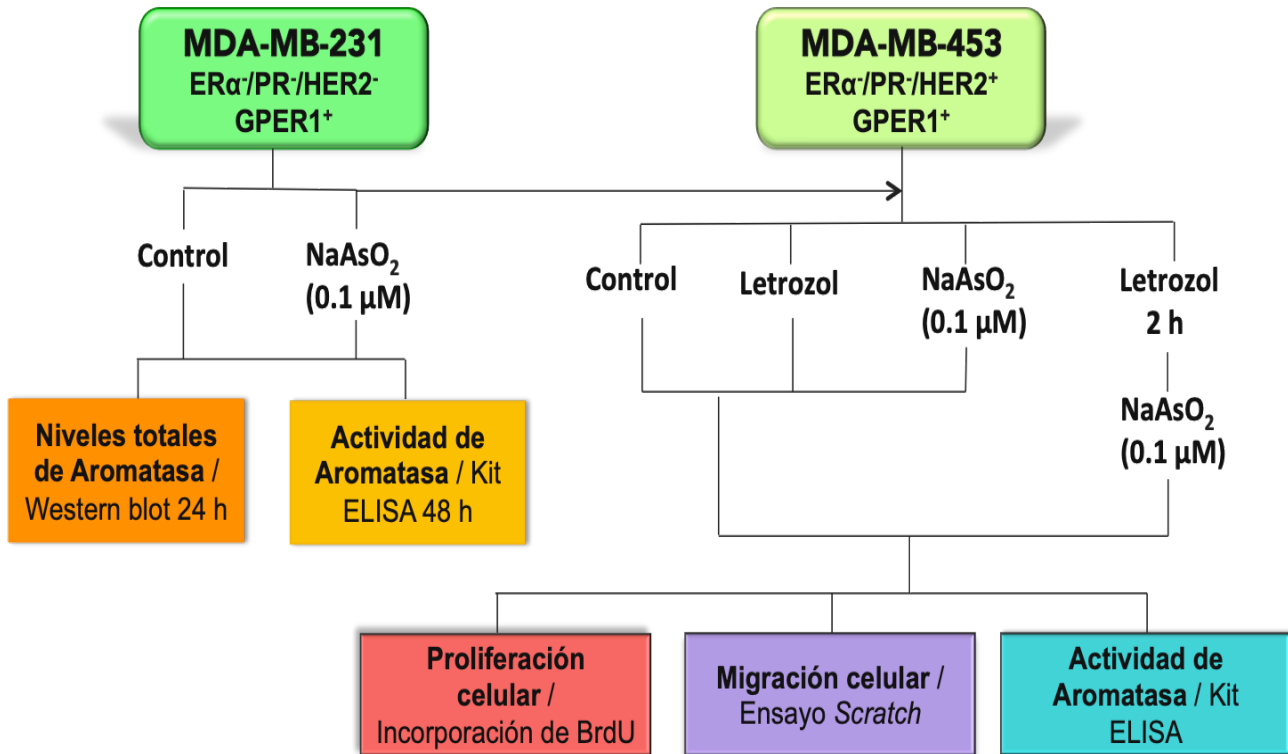
2.1.1 Evaluación del efecto del arsenito de sodio sobre la proliferación, la migración y la invasión celular.

La primera parte del estudio se diseñó para conocer si el arsenito de sodio es capaz de estimular procesos importantes en la promoción y la progresión celular, para lo que se seleccionaron tres líneas celulares de CaM y una línea mamaria no transformada.



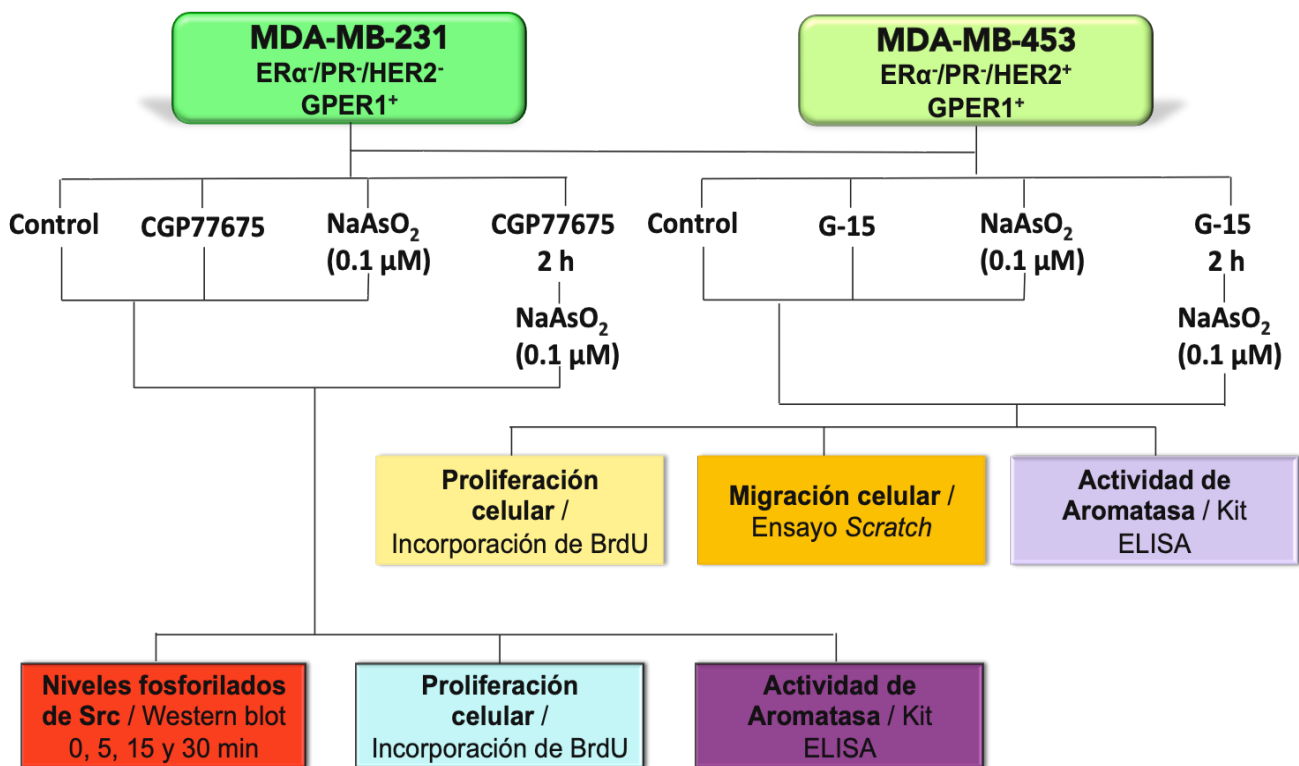
2.1.2 Evaluación del efecto del arsenito de sodio sobre los niveles totales y la actividad de la aromatasa y su participación en la proliferación y la migración celular estimulada por el arsenito de sodio.

La segunda parte evaluó la participación de la aromatasa en el aumento de la proliferación y la migración promovida por el arsenito de sodio en células de CaM.



2.1.3 Evaluación de la participación de la vía del GPER1-Src en la actividad de la aromatasa y en la proliferación y la migración estimuladas por el arsenito de sodio.

Por último, la tercera parte evaluó la participación de dos elementos importantes de la vía de señalización del E2, el GPER1 y Src, en el aumento de la proliferación, la migración y actividad de la aromatasa estimuladas por el arsenito en células de CaM.



## 2.2 Líneas celulares

Se utilizaron tres líneas celulares de CaM humano MDA-MB-231, MDA-MB-453 y MCF-7 las cuales provienen de sitios metastásicos y una línea de células epiteliales no tumorigénicas, MCF-12A. Todas se adquirieron de la ATCC (*American Type Culture Collection, USA*), o se proporcionaron amablemente por el Dr. JE. Pérez Salazar. Las líneas de CaM se cultivaron en medio DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium; GIBCO-BRL, NY, USA) alto en glucosa suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB; GIBCO-BRL, NY, USA) y 1% de penicilina 10X/estreptomicina 10X (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA). Las células MCF-12A se cultivaron en medio DMEM:Ham's F12 (1:1) suplementado con 5% de SFB (GIBCO-BRL, NY, USA), 10 µg/ml de insulina (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA), 0.5 µg/ml de hidrocortisona (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA), 20 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA) y 1% de penicilina 10X/estreptomicina 10X (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA). Los cultivos se mantuvieron en la incubadora a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

## 2.3 Tratamientos celulares

Los cultivos celulares se sembraron en diferentes placas de acuerdo con el experimento a realizar. Se dejaron estabilizar durante 24-36 h y posteriormente se trataron con diferentes concentraciones de arsenito de sodio (0.01, 0.1, 1 µM) (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA) durante 24, 48 y 72 h de acuerdo con cada experimento. Como control se utilizó medio DMEM, como se indica en cada experimento. El letrozol (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA), un inhibidor no esteroideo de la aromatasa, se utilizó a una concentración de 1 µM; El G-15 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), un antagonista selectivo del GPER1, se utilizó a una concentración de 3 µM y el CGP77675 (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA), un inhibidor de la fosforilación de SrcY419 se usó a una concentración de 2 µM. Estos se agregaron 2 h antes del tratamiento con arsenito.

## 2.4 Viabilidad celular por MTT

El ensayo MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA) se usó para evaluar la viabilidad celular que se cuantificó como actividad mitocondrial a través de la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa (Mosmann, 1983). Las líneas células se sembraron en placas de 24 pozos colocando  $5 \times 10^4$  células/pozo. Los cultivos se estabilizaron 24 h y entonces se trataron con medio solo (control) o con 0.01-1.0  $\mu\text{M}$  de arsenito de sodio durante 24, 48 y 72 h. Posteriormente se cuantificó la absorbancia con un espectrofotómetro de microplacas a 590 nm (SpectraMax 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). El porcentaje de células viables se calculó comparado con el grupo control que representó el 100% de viabilidad. Se realizaron cuatro experimentos independientes por triplicado.

## 2.5 Proliferación celular por incorporación de Bromodesoxiuridina

El ensayo de incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) se realizó usando un kit ELISA comercial (Roche Applied System, MANNHEIM, GERMANY). Esta técnica se basa en la incorporación de un análogo de pirimidina, la BrdU en lugar de timidina al ADN de células proliferantes. Después de la incorporación al ADN, la BrdU se detecta por un inmunoensayo. Las células MDA-MB-231, MDA-MB-453, MCF-7 y MCF-12A se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de  $15 \times 10^3$  células/pozo. Se dejaron estabilizar durante 24-36 h, se agregaron los tratamientos y se evaluó la proliferación a las 24 y 48 h. El tratamiento con medio DMEM solo se consideró como control. La mitomicina C (4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; TEVA, CDMX, México) y/o el arabinósido de citosina (Ara-C) (10  $\mu\text{M}$ ; Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA) se utilizaron como control negativo de la proliferación celular; un agente alquilante que inhibe la síntesis de ADN y un agente anti metabólico que impide la síntesis del ADN, respectivamente. Las células se trataron con BrdU (10  $\mu\text{M}$ ) durante 12 h a 37°C antes de finalizar el ensayo. Posteriormente las células se fijaron y se incubaron con el anticuerpo anti-BrdU acoplado a peroxidasa durante 90 min a temperatura ambiente. Finalmente se agregaron 100  $\mu\text{l}$ /pozo de la solución sustrato durante 15 min. Y se midió la

absorbancia con un espectrofotómetro de microplacas (SpectraMax 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) a 370 nm. Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado.

## 2.6 Migración celular por el método de “*Scratch*” o cierre de herida

Las células se sembraron en cajas de cultivo celular de 30 mm hasta alcanzar una confluencia del 95-100%. Posteriormente, las células MDA-MB-231, MDA-MB-453 y MCF-7 se privaron de SFB durante 24 h, mientras que las células MCF-12A se privaron de SFB por 6 h. Dos horas antes de agregar los tratamientos se agregó mitomicina C (4 µg/mL; TEVA, CDMX, México) o Ara-C (10 µM; Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA) para inhibir la proliferación celular. Enseguida se realizó la herida sobre la monocapa con una punta estéril de 200 µL y se realizaron dos lavados con medio DMEM sin suplementos. Se incubaron con los distintos tratamientos ya descritos. Se utilizó SFB (5%; GIBCO-BRL, NY, USA) como control positivo de migración. El cierre de la herida se evaluó a las 0, 24 y 48 h con imágenes que se tomaron con el microscopio invertido de contraste de fases FSX100 (Olympus America Inc., USA) y se procesaron con el *software* ImageJ (U. S. National Institutes of Health, USA). El porcentaje de recuperación de la herida se calculó considerando el cierre de la herida (área total de la herida) con respecto al tiempo cero en la misma condición experimental. Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado.

## 2.7 Invasión celular por el método de Transwell

Los ensayos de invasión se realizaron utilizando cámaras de Boyden (Costar, Corning, Inc., NY, USA) modificadas con matrigel. A cada inserto se les agregó Matrigel BD (3 mg/ml) por 2 h a 37°C, para formar una matriz semisólida. Los cultivos se estabilizaron durante 24 h y se privaron de SFB por 16-18 h. Después, las células se sembraron sobre el inserto con poros de 8 µm en placas de 24 pozos, a una densidad celular de  $1 \times 10^6$  células/pozo. Se agregaron los tratamientos en la parte inferior de la cámara a un volumen final de 600 µL durante 72 h. Se utilizó medio solo como control negativo y 5% SFB (GIBCO-BRL, NY, USA) como control positivo de invasión celular. Al finalizar



el tiempo de incubación se retiró el matrigel con un hisopo y las células que fueron capaces de degradar el matrigel y atravesaron la membrana porosa depositándose en la contraparte inferior del inserto, es decir, las células que invadieron se fijaron con paraformaldehído (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA) al 4%. Posteriormente las células se tiñeron con cristal violeta al 0.5% y se tomaron fotografías en un microscopio Nikon Eclipse Ci (Nikon instruments Inc., USA). Las células se destiñeron con ácido acético al 30% y se cuantificó la absorbancia a 595 nm con un espectrofotómetro de microplacas a 590 nm (SpectraMax 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). La absorbancia fue directamente proporcional al número de células que invadieron. Se realizaron cuatro experimentos independientes.

## 2.8 Western blot

Las diferentes líneas celulares se sembraron en cajas de 60mm a una densidad de  $1 \times 10^9$  células/pozo y se estabilizaron durante 24 h. Después, se incubaron con los diferentes tratamientos indicados en resultados, a los diferentes tiempos y las células se lisaron con el buffer RIPA (*radioimmunoprecipitation assay*, por sus siglas en inglés) 150 mM NaCl (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA), 50 mM Tris pH 7.4 (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA), 1 mM EGTA (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA), 1 mM ortovanadato de sodio (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA), 100 mM NaF (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA), 10 mM pirofosfato de sodio (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA), 10% glicerol (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA), 1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA), 1% deoxicolato de sodio (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA), 0.1% SDS (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA), 1 mM PMSF (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA), 10 µg/mL leupeptina (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA), 5 µg/mL antipaina (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA), 5 µg/mL quimostatina (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA), 5 µg/mL benzamidina (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA), and 1 µg/mL pepstatina (Sigma-Aldrich, St Louis MO, USA)). Los lisados se centrifugaron a 12000 rpm a 4°C por 12 minutos y se colectaron los sobrenadantes para su análisis por Western blot. Se cargaron 40 µg de proteína por carril en el gel y se realizó la electroforesis SDS-PAGE

(*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, por sus siglas en inglés). Posteriormente las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de PVDF (*polyvinylidene fluoride*, por sus siglas en inglés; Millipore Corporation, USA) usando una cámara semiseca de transferencia (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco CA, USA). Enseguida se bloquearon las membranas con 5% de leche en PBS Tween al 0.1% por 1 h. Las membranas se incubaron toda la noche con anticuerpos contra: Aromatasa (1:250; BIO-RAD, Hercules, CA, USA), Src (1:1500; Santa Cruz Biotechnology, USA), p-SrcY419 (1:500; R&B Systems, MINNEAPOLIS, USA), GPER1 (1:500; Santa Cruz Biotechnology, USA), ER $\alpha$  (1:500; Santa Cruz Biotechnology, USA) ó  $\beta$ -actina (donado amablemente por el Dr. Manuel Hernández, Departamento de Biología celular, Cinvestav-IPN). Al día siguiente, se lavaron las membranas con PBS Tween 0.1% y se incubaron con anticuerpos secundarios anti-ratón-HRP (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) ó anti-conejo-HRP (BIO-RAD, Hercules, CA, USA) según sea el caso durante 2 h. Se realizaron tres lavados con PBS Tween 0.1% y finalmente las bandas se visualizaron con luminata<sup>TM</sup> (Millipore, MA, USA) y películas radiográficas Kodak (Palo Alto, CA, USA). Los autoradiogramas fueron escaneados con un sistema de imágenes *Gene Genius Bio Imaging System* (Syngene, USA) para su posterior análisis con el *software* ImageJ (U. S. National Institutes of Health, USA). Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado.

## 2.9 Actividad de aromatasa

La actividad de la aromatasa en células MDA-MB-231 se evaluó por la conversión de testosterona (T) a estradiol (E2). Las células se sembraron en placas de seis pozos a una densidad de  $3 \times 10^5$  células/pozo. Después de 24-36 h de estabilización, el medio se reemplazó por medio sin SFB que contenía el sustrato de la aromatasa, T (Steraloids Inc., Newport, RI; 100 nM) y las diferentes concentraciones de arsenito. Se incubó durante 48 h. Se tomaron alícuotas del medio de cultivo para cuantificar el E2 usando un *kit* de inmunoensayo enzimático (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). La actividad de la aromatasa se expresó como picogramos de E2 sintetizado por mililitro de medio de cultivo (pg/ml).

## 2.10 Análisis estadístico

La significancia estadística de los datos se evaluó utilizando un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba *post hoc* Dunnett o Tukey según fuera apropiado. Se utilizó la prueba t de Student para comparar el grupo control vs. el grupo control positivo o negativo. El análisis se realizó usando el programa GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad software, San Diego, CA). El valor de p menor de 0.05 ( $p < 0.05$ ) se consideró estadísticamente significativo.

Los datos utilizados para el análisis estadístico de cada resultado fueron los promedios obtenidos de los experimentos independientes por duplicado o triplicado  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) que se utilizó como medida de dispersión.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Efecto de la exposición a arsenito de sodio sobre la viabilidad de células de cáncer de mama

Se determinaron las concentraciones de arsenito de sodio óptimas para evaluar los distintos efectos de interés sin afectar la viabilidad celular. Para ello, determinamos la capacidad citotóxica de 0.01, 0.1 y 1  $\mu\text{M}$  de arsenito de sodio en las distintas líneas celulares que se utilizaron en el estudio: células MDA-MB-231, MDA-MB-453, MCF-7 y MCF-12A. Se determinó la viabilidad celular como actividad mitocondrial mediante el ensayo de reducción de MTT a las 24, 48 y 72 horas. La tabla 3 muestra que el arsenito de sodio no afectó la viabilidad de ninguna de las líneas celulares de CaM, ni de las células MCF-12A a ninguna de las concentraciones ni tiempos que se evaluaron.

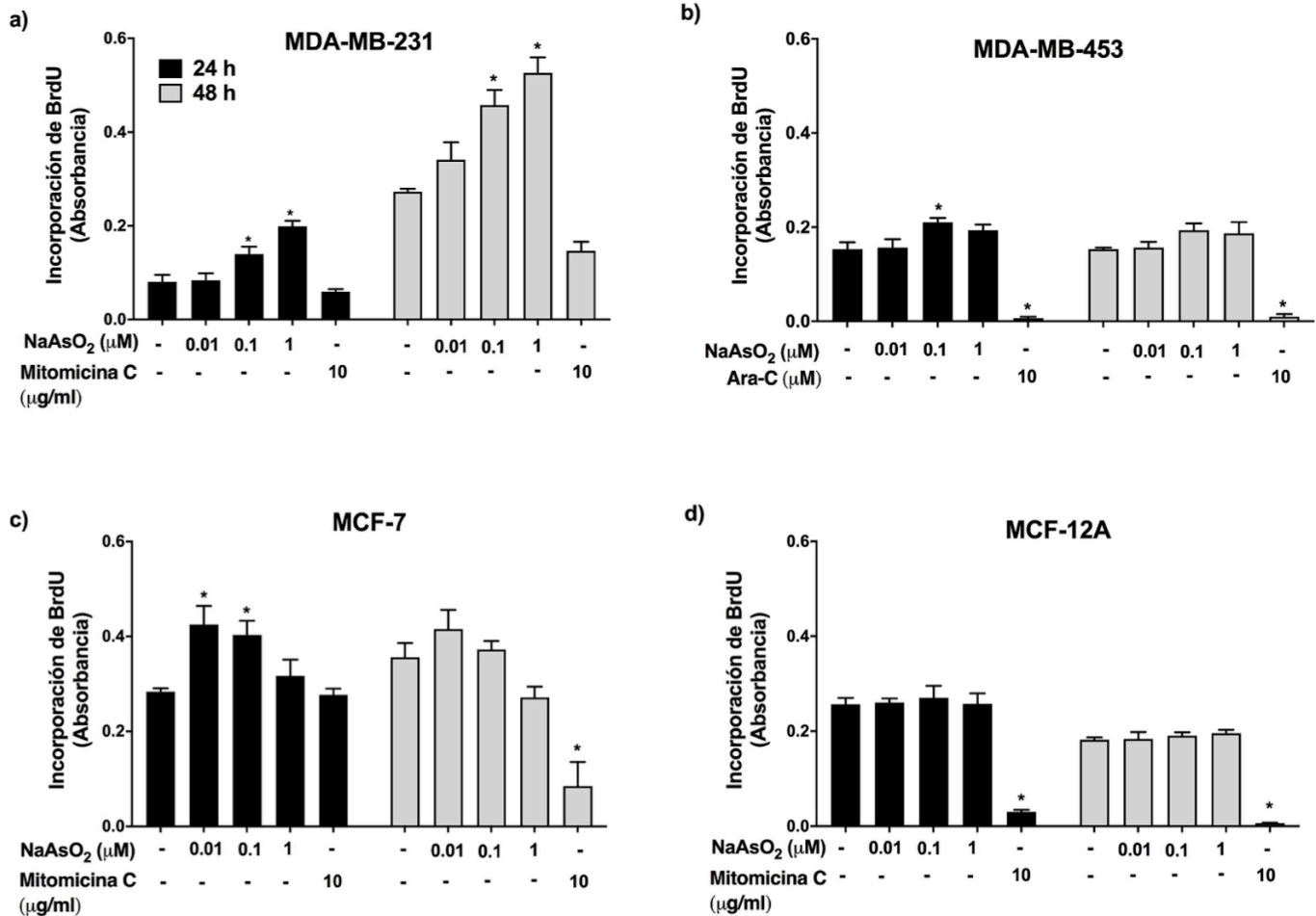
**Tabla 3.** El arsenito de sodio no afecta la viabilidad de las líneas células evaluadas a las 24, 48 y 72 h

Tratamientos / Línea celular	MDA-MB-231			MDA-MB-453		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Control	100 $\pm$ 1.8	100 $\pm$ 0.5	100 $\pm$ 0.3	100 $\pm$ 1.2	100 $\pm$ 0.6	100 $\pm$ 0.8
0.01 $\mu\text{M}$ de arsenito	97.5 $\pm$ 3.9	99.3 $\pm$ 0.6	101 $\pm$ 3.0	98.0 $\pm$ 5.7	98.8 $\pm$ 4.9	98 $\pm$ 7.6
0.1 $\mu\text{M}$ de arsenito	101.5 $\pm$ 3.0	103 $\pm$ 2.5	106 $\pm$ 3.0	93.5 $\pm$ 4.2	101 $\pm$ 3.0	94 $\pm$ 6.9
1.0 $\mu\text{M}$ de arsenito	103 $\pm$ 1.6	94.7 $\pm$ 4.0	97.7 $\pm$ 2.0	102.3 $\pm$ 4.0	101 $\pm$ 3.1	100 $\pm$ 8.8
	MCF-7			MCF-12A		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Control	100 $\pm$ 0.9	100 $\pm$ 0.8	100 $\pm$ 0.6	100 $\pm$ 1.1	100 $\pm$ 0.5	100 $\pm$ 0.9
0.01 $\mu\text{M}$ de arsenito	94.5 $\pm$ 1.0	95.3 $\pm$ 1.4	88.8 $\pm$ 3.0	100.8 $\pm$ 2.3	96.8 $\pm$ 3.4	91.5 $\pm$ 2.3
0.1 $\mu\text{M}$ de arsenito	97.5 $\pm$ 0.9	94.5 $\pm$ 2.3	93.5 $\pm$ 2.4	100.5 $\pm$ 3.7	99.2 $\pm$ 4.1	94.3 $\pm$ 1.4
1.0 $\mu\text{M}$ de arsenito	104.8 $\pm$ 0.9	106 $\pm$ 2.3	106 $\pm$ 4.1	93.2 $\pm$ 2.7	91.3 $\pm$ 3.3	93.3 $\pm$ 0.6

La citotoxicidad se evaluó por el método de reducción de MTT y se expresó como porcentaje, considerando como 100% de viabilidad al control no tratado. Los datos se analizaron utilizando ANOVA de dos vías, *post hoc* Tukey. Los datos corresponden a la media  $\pm$  EEM de cuatro experimentos independientes por triplicado.

### 3.2 Efecto del arsenito de sodio sobre la proliferación celular

En la tumorigénesis, la fase de promoción se asocia con un incremento de la proliferación de células iniciadas, por lo que primero decidimos evaluar el efecto del arsenito de sodio sobre la proliferación celular a través de ensayos de incorporación de BrdU en las tres líneas celulares de CaM antes mencionadas y en una línea de células epiteliales humanas no tumorigénica expuestas a 0.01, 0.1 y 1  $\mu\text{M}$  de arsenito de sodio por 24 y 48 horas. Los resultados mostraron que las concentraciones de 0.1 y 1  $\mu\text{M}$  de arsenito incrementaron la proliferación celular en un 42 y 59%, respectivamente a las 24 h, mientras que la proliferación se incrementó a un 40 y 48%, respectivamente a las 48 h en células MDA-MB-231 (Fig. 4a). En células MDA-MB-453, solo la concentración de 0.1  $\mu\text{M}$  incrementó 27% la proliferación a las 24 h (Fig. 4b); mientras que la exposición a 0.01 y 0.1  $\mu\text{M}$  incrementó la proliferación de células MCF-7, a las 24 h (Fig. 4c). En contraste, el arsenito de sodio no modificó la proliferación de células MCF-12A a ninguna concentración ni tiempo evaluado (Fig. 4d). La mitomicina C o Ara-C que se usaron como control negativo, inhibió la proliferación celular a las 24 y 48 h comparada con el grupo control.

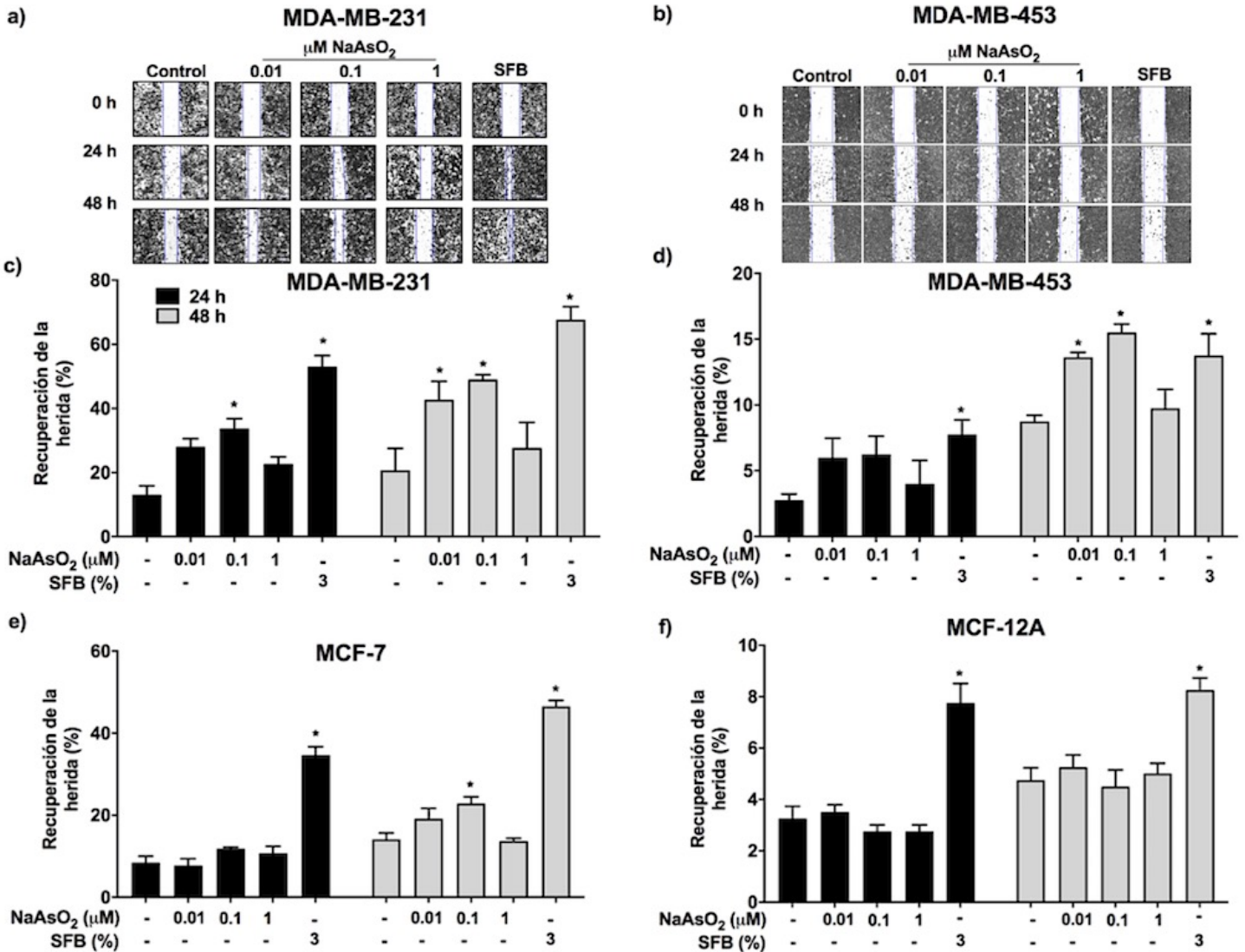


**Figura 4.** El arsenito de sodio incrementa la proliferación de células de CaM.

El efecto de la exposición a NaAsO<sub>2</sub> sobre la proliferación celular se analizó utilizando la técnica de incorporación de BrdU a las 24 y 48 h en células **a)** MDA-MB-231, **b)** MDA-MB-453, **c)** MCF-7 y **d)** MCF-12A. La mitomicina C y Ara-C se utilizaron como control negativo. Los datos corresponden a la media ± EEM de las absorbancias de tres experimentos independientes por duplicado y se analizaron utilizando ANOVA de dos vías, *post hoc* Dunnett, \*p < 0.05 vs. control.

### 3.3 Efecto del arsenito de sodio sobre la migración y la invasión celular

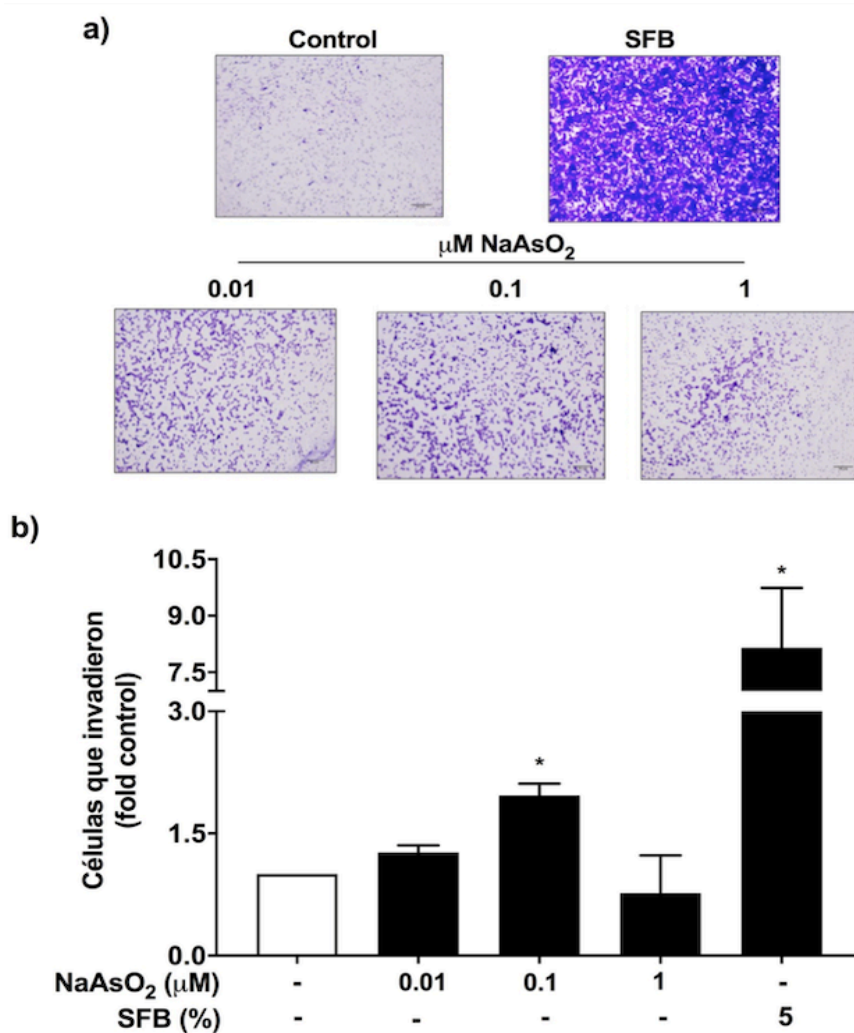
Para determinar si el arsenito de sodio también promueve eventos que participan en la progresión tumoral, se evaluó el efecto sobre la migración y la invasión celular por el método de la técnica de “*scratch*” (cierre de herida) y el método de transwell, respectivamente, obteniendo los porcentajes de recuperación de la herida y el número de células con capacidad invasiva comparando grupos tratados con arsenito y cultivos no tratados. Los resultados mostraron que el arsenito estimuló la migración de las células MDA-MB-231 expuestas a 0.1  $\mu\text{M}$  a las 24 y 48 h de tratamiento (61 y 49 %, respectivamente); mientras que a 0.01  $\mu\text{M}$  indujo la migración celular solo después de las 48 h de exposición (Fig. 5a y c). En células MDA-MB-453, 0.01 y 0.1  $\mu\text{M}$  de arsenito estimularon la migración (34 y 44 %, respectivamente) a las 48 h (Fig. 5b y 5c) y a 0.1  $\mu\text{M}$ , el arsenito de sodio indujo un porcentaje similar de migración que en la línea MDA-MB-231. En la línea MCF-7 se incrementó la migración con la concentración de 0.1  $\mu\text{M}$  de arsenito a las 48 h (Fig. 5e). En células MCF-12A el arsenito no estimuló la migración celular a ningún tiempo ni concentración (Fig. 5f). El efecto del arsenito sobre la invasión celular se evaluó en células MDA-MB-231 en cámaras de Boyden modificadas con matrigel, a las 72 h de exposición. Los resultados mostraron que 0.1  $\mu\text{M}$  de arsenito promueve la invasión celular (Fig. 6). Tanto en los ensayos de migración como de invasión, se utilizó SFB como control positivo.



**Figura 5.** El arsenito de sodio incrementa la migración de células de CaM.

Los cultivos se expusieron a NaAsO<sub>2</sub> (0.01-1 μM) y suero fetal bovino (SFB) (control positivo). La migración celular se evaluó por el método de scratch (cierre de la herida) a las 0, 24 y 48 h. Imágenes representativas de **a)** células MDA-MB-231 y **b)** MDA-MB-453. Las gráficas presentan los porcentajes de la recuperación de la herida comparado con el tiempo inicial (tiempo cero) en células **c)** MDA-MB-231, **d)** MDA-MB-453, **e)** MCF-7 y **f)** MCF-12A. Cada barra representa la media ± EEM de tres experimentos independientes. Los datos se analizaron utilizando ANOVA de dos vías, *post hoc* Dunnett. Los grupos control vs. SFB se compararon por una prueba t de Student con corrección Welch. \**p* < 0.05 vs. control.



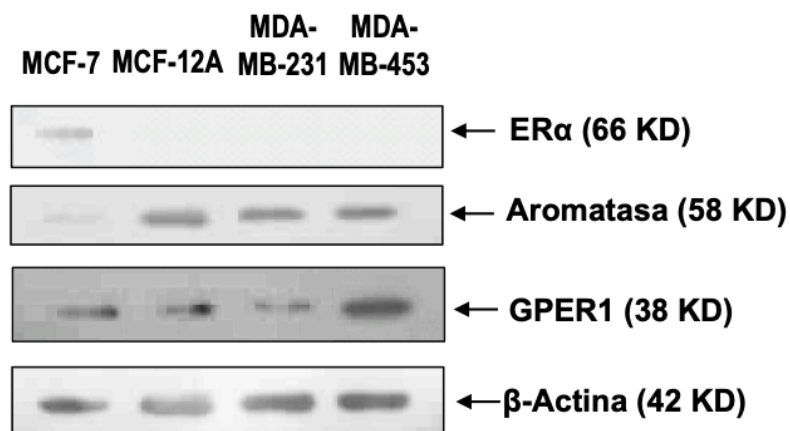


**Figura 6.** El arsenito de sodio incrementa la invasión de células MDA-MB-231.

Los cultivos celulares se expusieron a NaAsO<sub>2</sub> (0.01-1 μM) y SFB (control positivo) para determinar la invasión celular en cámaras de Boyden modificadas con matrigel a las 72 h. **a)** Imágenes representativas de cultivos teñidos con cristal violeta tratados con arsenito. **b)** La gráfica muestra la media ± EEM del número de células que invadieron ajustada al control. Se realizaron cuatro experimentos independientes y se analizaron utilizando ANOVA de una vía, *post hoc* Dunnett. Los grupos control vs SFB se compararon por *t de Student*, \**p* < 0.05 vs. control.

### 3.4 Expresión proteica de aromatasa, GPER1 y ER $\alpha$ en las líneas celulares MDA-MB-231, MDA-MB-453, MCF-7 y MCF12A

De acuerdo con la clasificación molecular del CaM las líneas celulares utilizadas en el estudio pertenecen a diferentes grupos, por tal motivo decidimos corroborar la expresión del ER $\alpha$  en todas las líneas, así como la expresión del GPER1 y aromatasa. La figura 7 muestra que la aromatasa se expresa en todas las líneas celulares que se evaluaron, siendo menor en las células MCF-7 en comparación con las otras líneas celulares. Las células MCF-7 expresaron GPER1 y ER $\alpha$ , mientras que las células MCF-12A, MDA-MB-231 y MDA-MB-453 expresaron GPER1, pero no ER $\alpha$ . Notablemente, la línea MDA-MB453 expresó niveles mayores de proteína GPER1 que las células MDA-MB-231, MCF-7 y MCF12A.



**Figura 7.** Expresión de receptores a estrógenos y de aromatasa en células de CaM. Las proteínas GPER1, ER $\alpha$  y aromatasa se evaluaron por *Western blot* con anticuerpos específicos. Se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga. Las células MCF-7 se usaron como control positivo de la expresión de ER $\alpha$ .

### 3.5 Efecto del arsenito de sodio sobre los niveles de proteína totales y actividad de la aromatasa

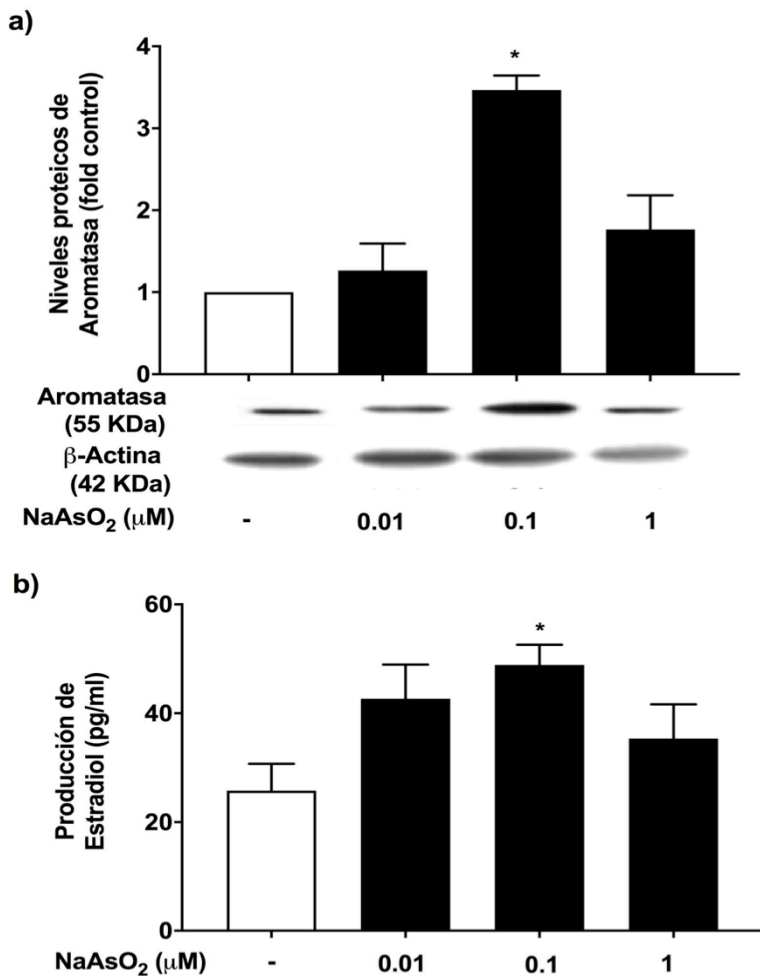
La aromatasa es la enzima encargada de la síntesis de E2, el cual participa en el desarrollo de CaM estimulando la proliferación, migración e invasión de células tumorales. Por este motivo, evaluamos el efecto del arsenito de sodio sobre los niveles

proteicos totales y la actividad enzimática de la aromatasa. Como se muestra en la figura 8, el arsenito de sodio (0.1  $\mu\text{M}$ ) incrementó significativamente los niveles totales y la actividad enzimática de la aromatasa. Debido a que en los ensayos anteriores observamos que el arsenito de sodio aumentó la proliferación, la migración, la invasión y los niveles y la actividad de la aromatasa a la concentración de 0.1  $\mu\text{M}$ , los ensayos posteriores se realizaron utilizando solo esta concentración.

### 3.6 Papel de la aromatasa en la proliferación y migración inducida por arsenito de sodio en células MDA-MB-231 y MDA-MB-453

Para determinar la participación de la aromatasa en los efectos que se observaron en la proliferación y la migración celular inducida por el arsenito de sodio, las células MDA-MB-231 y MDA-MB-453 se trataron con letrozol, un inhibidor específico de la aromatasa, 2 h previas al tratamiento con arsenito de sodio (0.1  $\mu\text{M}$ ). La presencia del letrozol, disminuyó la proliferación inducida por el arsenito de sodio en ambas líneas celulares (Fig. 9a y 9b). Además, el pretratamiento con Letrozol disminuyó la migración inducida por el arsenito en células MDA-MB-231 (Fig. 9c) y en células MDA-MB-453 (Fig. 9d).

El aumento de la actividad enzimática de la aromatasa estimulada por el arsenito de sodio se corroboró en células MDA-MB-231 en presencia de letrozol. Nuestros resultados mostraron que el pretratamiento con el inhibidor de la aromatasa disminuye la producción de E2 estimulada por el arsenito de sodio (Fig. 9e). Estos resultados nos sugieren que la proliferación y la migración inducida por el arsenito requieren de la producción de E2.



**Figura 8.** El arsenito de sodio incrementa los niveles de proteína y la actividad enzimática de la aromatasa.

En cultivos de células MDA-MB-231 tratadas con NaAsO<sub>2</sub> (0.01-1 μM) por 24 y 48 h se evaluaron. **a)** Los niveles proteicos de la aromatasa por *Western blot*. La media ± EEM de los niveles totales comparado con las células sin tratamiento (control) de tres experimentos independientes y **b)** la actividad enzimática por *kit de ELISA*. La media ± EEM de la producción de E2 (pg/ml) de tres experimentos independientes por duplicado que se analizaron utilizando ANOVA de una vía, *post hoc* Dunnett, \*p < 0.05 vs. control.

### 3.7 Asociación de GPER1 con la proliferación, la migración y la actividad de la aromatasa en células MDA-MB-231 y MDA-MB-45.

Evaluamos si la proteína GPER1 está relacionada con la proliferación, la migración y la actividad de la aromatasa inducida por el arsenito de sodio. En células MDA-MB-231 preincubadas con G-15, un antagonista selectivo de GPER1, se observó una inhibición significativa de la proliferación inducida por el arsenito (0.1 μM) (Fig. 10a), así como de la migración (Fig. 10c) en ambos tiempos evaluados. De la misma manera, en células MDA-MB-453, la exposición a G-15 previno la proliferación (Fig. 10b) y la migración (Fig. 10d) inducidas por el arsenito. Adicionalmente, evaluamos si el GPER1 tenía una relación con la actividad de la aromatasa estimulada por el arsenito en células MDA-MB-231. Los resultados mostraron que la exposición al

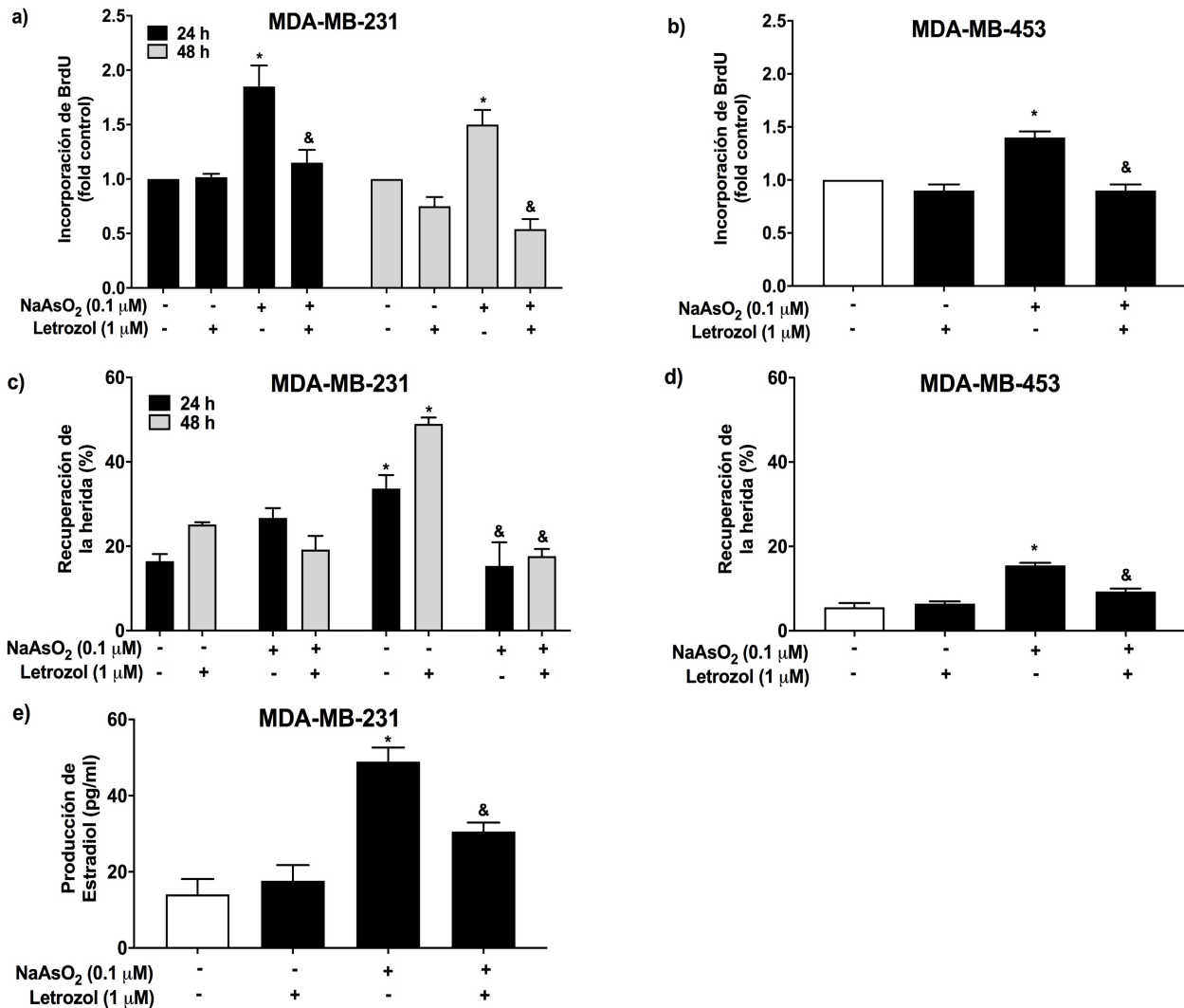
inhibidor de GPER1 no afectó la actividad de la aromatasa (Fig. 10e). Sugiriéndonos que la vía del GPER1 participa en la proliferación y la migración inducidas por el arsenito de sodio, pero no en la inducción de la actividad de la aromatasa.

### 3.8 Participación de Src en la proliferación celular y la actividad de la aromatasa inducida por el arsenito de sodio

Varios estudios muestran un papel directo de la proteína cinasa Src en la proliferación, la migración, la angiogénesis y la metástasis. Además, Src es un importante mediador de la vía de GPER1, por lo que decidimos evaluar el efecto del arsenito de sodio sobre la activación de Src a través de su fosforilación en el residuo Y419 en la línea celular MDA-MB-231. Nuestros resultados mostraron que 0.1  $\mu$ M de arsenito de sodio incrementó transitoriamente los niveles de fosforilación de Src, es decir, se observó que durante los 5 y 15 minutos de tratamiento se incrementaron significativamente los niveles de fosforilación de Src, y a los 30 min volvieron a sus niveles basales (Fig. 11a y 11b). Después, para demostrar la especificidad en la señal de fosforilación de Src utilizamos CGP77675, un inhibidor de la fosforilación de Src en el sitio Y419. Como se observa en la figura 11b, el pre- tratamiento disminuyó la activación de Src estimulada por el arsenito a los 5 y 15 min de exposición. Los ensayos en presencia del antagonista de GPER1 (G-15), mostraron que la fosforilación de Src inducida por 0.1  $\mu$ M arsenito a los 15 min es dependiente de la activación de GPER1 (Fig. 11a y 11b).

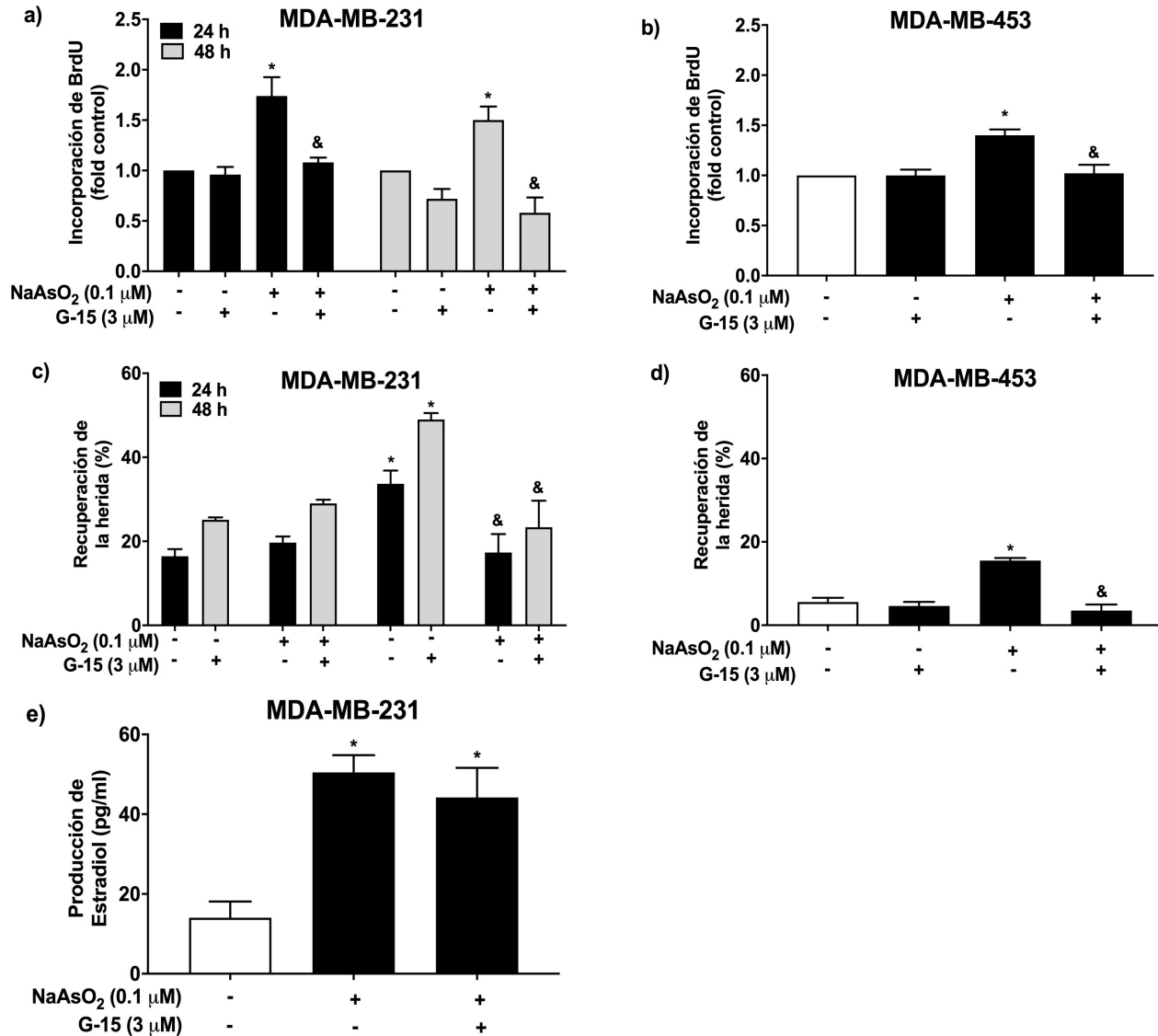
Posteriormente, evaluamos la participación de Src en la proliferación inducida por arsenito de sodio y observamos que la proliferación celular estimulada por arsenito de sodio es dependiente de la activación de Src (Fig. 11c).

Considerando que Src es un regulador positivo de la actividad enzimática de la aromatasa, se decidió evaluar si la activación de la aromatasa por el arsenito de sodio es dependiente de Src, y nuestros resultados mostraron que la exposición al inhibidor de Src inhibe la actividad de la aromatasa inducida por el arsenito de sodio (Fig. 11d). Estos resultados nos sugieren que Src es un mediador esencial de los efectos generados por el arsenito de sodio sobre la producción de E2 y la proliferación celular.



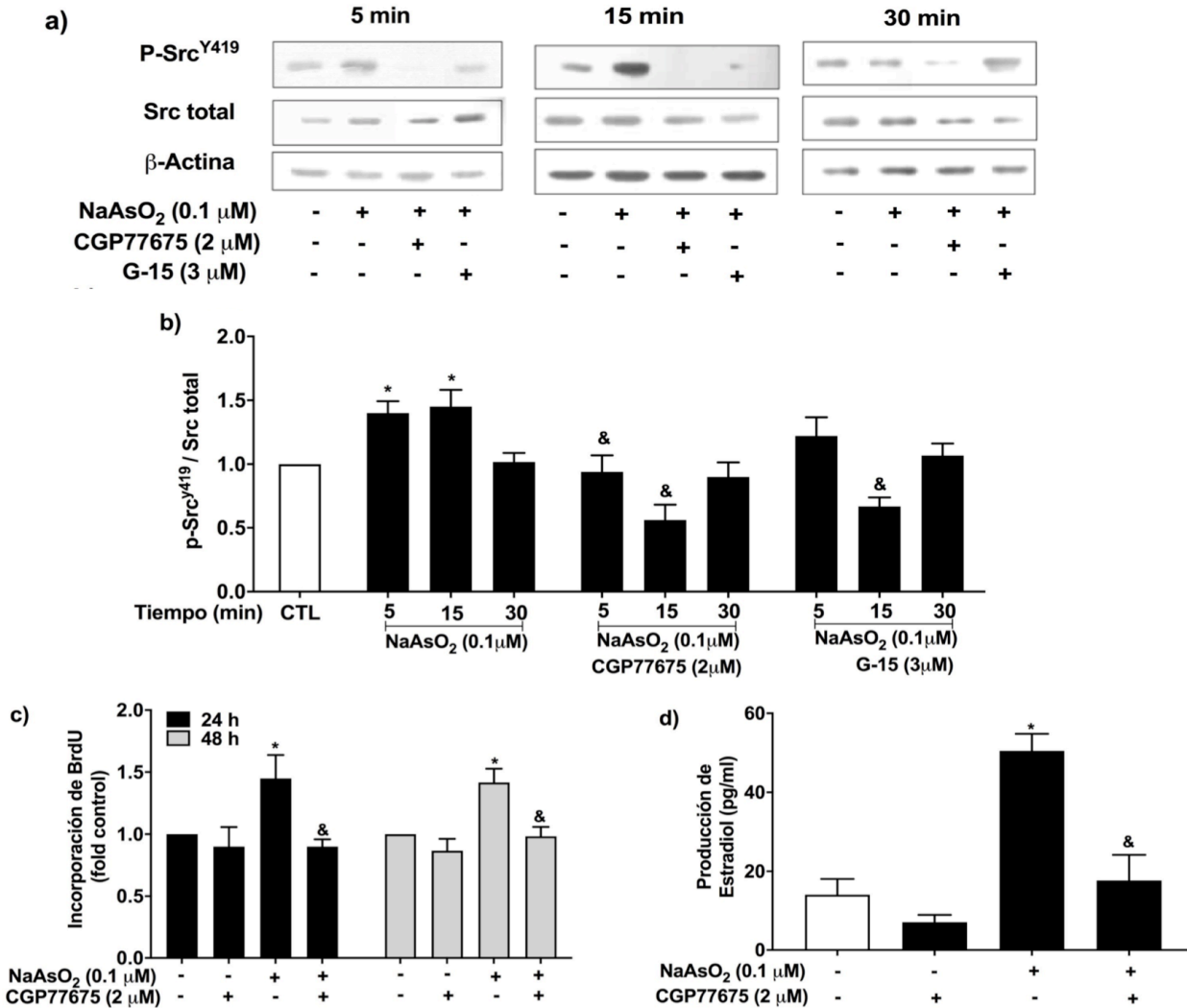
**Figura 9.** La aromatasa participa en la proliferación y la migración inducida por el arsenito de sodio.

Las células MDA-MB-231 y MDA-MB-453 fueron tratadas con letrozol (un inhibidor de aromatasa) 2 h previas al tratamiento con 0.1 μM de NaAsO<sub>2</sub>. Se determinó la proliferación celular por incorporación de BrdU de células **a)** MDA-MB-231 a 24 y 48 h y **b)** MDA-MB-453 a 24 h. La migración celular se evaluó por ensayo *scratch* en células **c)** MDA-MB-231 a 24 y 48 h y **d)** MDA-MB-453 a 48 h. **e)** La actividad de la aromatasa por producción de E2 (pg/ml) en células MDA-MB-231 a las 48 h. Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado que se analizaron utilizando ANOVA de dos vías, *post hoc* Tukey para los experimentos con células MDA-MB-231; ANOVA de una vía, *post hoc* Tukey para los experimentos con células MDA-MB-453 y el ensayo de actividad de la aromatasa. \**p* < 0.05 vs. control, &*p* < 0.05 vs. NaAsO<sub>2</sub>.



**Figura 10.** *GPER1* participa en la proliferación y la migración inducidas por el arsenito de sodio.

Células MDA-MB-231 y MDA-MB-453 se trataron con G-15 (antagonista selectivo de GPER1) durante 2 h antes del tratamiento con 0.1 μM de NaAsO<sub>2</sub>. La proliferación celular por incorporación de BrdU de células **a)** MDA-MB-231 a las 24 y 48 h y **b)** MDA-MB-453 a 24 h. La migración por el método *scratch* de células **c)** MDA-MB-231 a las 24 y 48 h y **d)** MDA-MB-453 a las 48 h. **e)** La actividad de la aromatasa evaluada por producción de E2 (pg/ml) a las 48 h. Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado que se analizaron por ANOVA de dos vías, post hoc Tukey en los experimentos con la línea MDA-MB-231 y ANOVA de una vía, post hoc Tukey en los ensayos con células MDA-MB-453 y el ensayo de actividad de la aromatasa. \*p < 0.05 vs. control; &p < 0.05 vs. NaAsO<sub>2</sub>.



**Figura 11.** Src participa en la proliferación de células MDA-MB-231 y la activación de la aromatasa estimulada por el arsenito de sodio.

Las células MDA-MB-231 se trataron con un inhibidor de p-SrcY419 (CGP77676) y/o un inhibidor de GPER1 (G-15) previo al tratamiento con 0.1 μM de NaAsO<sub>2</sub>. **a)** Imágenes representativas del *Western blot* de los niveles de Src fosforilado (p-Src) a los 5, 15 y 30 minutos de exposición. Se usó β-actina como control de carga. **b)** La media ± EEM de la razón de los niveles de p-Src/Src total evaluados por *Western blot* de tres experimentos independientes por duplicado que se analizaron utilizando ANOVA de una vía, *post hoc* Tukey. **c)** Proliferación celular por incorporación de BrdU; los datos muestran la media ± EEM de tres experimentos independientes por duplicado que se analizaron utilizando ANOVA de dos vías, *post hoc* Tukey. **d)** Actividad de aromatasa por producción de E2 (pg/ml), los datos muestran la media ± EEM de tres experimentos independientes que se analizaron utilizando ANOVA de una vía, *post hoc* Tukey. \*p < 0.05 vs. control; &p < 0.05 vs. NaAsO<sub>2</sub>.



#### 4. DISCUSIÓN

El CaM es una enfermedad multifactorial. Existen distintos factores de riesgo para desarrollar CaM: factores genéticos, edad avanzada y factores reproductivos/hormonales (por ejemplo, menarca temprana, menopausia tardía, primer embarazo a término a edad avanzada, etc.) (Madigan et al., 1995). Por otro lado, se sugiere que diferentes contaminantes ambientales y la industrialización participan en el desarrollo y la progresión de la enfermedad (White et al., 2019; Byrne et al., 2013; Viñas, Jeng & Watson, 2012). Recientemente, se ha propuesto que algunos metales (como As, cadmio, plomo y mercurio) tienen capacidad estrogénica y han sido asociados con el riesgo de padecer CaM (Burks et al., 2017; Martin et al., 2003).

La IARC clasifica al As como un carcinógeno del grupo uno (2012), debido a que existe suficiente evidencia para asociarlo con el desarrollo de cáncer en humanos. Su exposición crónica está relacionada con cáncer de piel, de pulmón, de vejiga, de riñón, de hígado y CaM; la mayoría de éstos cánceres son dependientes de hormonas (Khanjani, Jafarnejad & Tavakkoli, 2017; WHO, 2018).

La exposición a As se considera un problema de salud a nivel mundial. La mayoría de las personas están expuestas de manera crónica a niveles bajos de As. La OMS, en 1992, definió 10 µg/L (10 ppb = 0.13 µM) como límite seguro de As en agua de bebida. En el presente estudio utilizamos concentraciones no citotóxicas y ambientalmente relevantes de arsenito de sodio (0.01-1.0 µM), las cuales se encuentran en el rango de concentraciones de As reportados en suministros de agua potable contaminados en un gran número de países (IARC, 2012) e incluso, se encuentran por debajo de los niveles observados en algunos estados de la Republica Mexicana como Durango e Hidalgo donde reportan niveles de 167 y 1,001 µg/L, respectivamente, de As en pozos utilizados como fuente de agua potable (Armienta & Segovia, 2008).

A pesar de la asociación del As con diferentes tipos de cáncer, el mecanismo molecular de la carcinogénesis generado por el As aún no se define. Se sugiere a partir de trabajos *in vitro*, que el arsenito de sodio a niveles bajos (<10 µM) actúa como un promotor tumoral o co-carcinógeno induciendo transducción de señales, activando factores de transcripción y modificando la expresión de genes que participan en el

crecimiento celular, la proliferación y la transformación maligna (Yang & Frenkel, 2002). En estudios *in vivo* se reporta que la exposición a As trivalente (0.5 y 1 mg/Kg) incrementa la angiogénesis y el crecimiento de tumores sólidos (Soucy et al., 2003). Por el contrario, a concentraciones altas (40  $\mu\text{M}$  = 3.08 mg/L), el arsenito suprime el crecimiento celular y favorece eventos de muerte celular como la apoptosis (Lau et al., 2004). En nuestro trabajo, encontramos que la exposición a 0.01-1  $\mu\text{M}$  de arsenito de sodio incrementa la proliferación, la migración y la invasión de células de CaM, pero no de células epiteliales no tumorigénicas. Las fases de promoción y progresión en el desarrollo del cáncer se caracterizan por el incremento de la proliferación de células iniciadas y la adquisición de un fenotipo maligno o invasivo, respectivamente (Martínez et al., 2003). Las células normales tienen mecanismos encargados de regular vías de señalización que participan en la división y el crecimiento celular, como por ejemplo, el secuestro de factores de crecimiento en el espacio pericelular y matriz extracelular y/o a través de la sensibilización de receptores membranales, a diferencia de las células cancerosas que adquieren la capacidad de responder de manera sostenida a señales mitogénicas que estimulan la proliferación celular (Hanahan & Weinberg, 2011). De esta manera, con nuestros hallazgos soportamos la hipótesis que el arsenito de sodio a concentraciones bajas actúa como un promotor tumoral y podría participa en la progresión tumoral. Estudios previos reportan que el arsenito de sodio a concentraciones similares a las que se utilizaron en este estudio (0.1-1  $\mu\text{M}$ ), incrementan la proliferación de células de CaM a través de su capacidad como disruptor endócrino, alterando la transcripción de genes dependientes de E2 (Stoica, Katzenellenbogen & Martin, 2000; Davey et al., 2007; Nakareangrit et al., 2015). Además, se reporta que la exposición crónica (24 semanas) a 500 nM de arsenito de sodio es capaz de inducir a células epiteliales mamarias humanas MCF-10A hacia un fenotipo de cáncer, un efecto que se observó concomitante a la sobreexpresión e incremento de la actividad de la aromatasa, lo cual ocurrió de manera independiente del ER $\alpha$  (Xu, Tokar & Waalkes, 2014). Por su parte Huff y cols. (2016) demostraron que la exposición a arsenito de sodio incrementa la proliferación de células de cáncer de pulmón a través de la activación del receptor GPER1.

Por esta razón, en este trabajo decidimos utilizar cuatro líneas celulares que expresan aromatasa y GPER1. Tres de éstas líneas son de CaM: MDA-MB-231 (ER $\alpha$ <sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>/HER2<sup>-</sup>/GPER1<sup>+</sup>), MDA-MB-453 (ER $\alpha$ <sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>/HER2<sup>+</sup>/GPER1<sup>+</sup>) y MCF-7 (ER $\alpha$ <sup>+</sup>/PR<sup>+</sup>/HER2<sup>-</sup>/GPER1<sup>+</sup>), en tanto que la cuarta es una línea celular epitelial no tumorigénica la MCF-12A (ER $\alpha$ <sup>-</sup>/PR<sup>-</sup>/HER2<sup>-</sup>/GPER1<sup>+</sup>). Los resultados que se obtuvieron con todas las líneas, nos sugieren que el arsenito de sodio es capaz de inducir la proliferación, la migración y la invasión de células de CaM a pesar de tener diferente estatus de expresión de receptores, mientras que no modifica la proliferación ni la migración de células epiteliales de mama no transformadas a pesar de que la línea expresa GPER1 y aromatasa. Sin embargo, en la línea MDA-MB-231 observamos que el arsenito estimuló la proliferación y la migración desde las 24 h y el efecto se mantuvo hasta las 48 h comparado con el resto de las líneas que solo se observó el aumento a las 24 h en la proliferación y a las 48 h en la migración celular. Estos datos nos podrían sugerir que la expresión de otros receptores membranales, pueden modular negativamente los efectos del arsenito de sodio. Por ejemplo, se sugiere que el GPER1 puede actuar como regulador negativo de la proliferación de células de CaM ER $\alpha$  positivo, mientras que en células ER $\alpha$  negativo promueve el crecimiento de estas células (Ariazi et al., 2010).

Con todo lo anterior en mente, la siguiente pregunta a responder fue sí a concentraciones ambientalmente relevantes de arsenito de sodio a tiempos cortos de exposición se inducen eventos importantes para la promoción y la progresión tumoral a través del aumento en la actividad de la aromatasa y consecuentemente en la producción de E2; además del papel que juega el GPER1 en los efectos del arsenito de sodio en las células de CaM. Por este motivo utilizamos como modelo celular principal la línea celular MDA-MB-231 y realizamos los mismos experimentos a las mismas condiciones con otra línea celular de CaM, la MDA-MB-453 que de manera similar expresa aromatasa y GPER1 pero no expresa ER $\alpha$ , con el objetivo de establecer que los efectos no son exclusivos de una línea de CaM en particular.

En el paso final de la esteroidogénesis, la testosterona se metaboliza a 17 $\beta$ -estradiol (E2) por el complejo catalítico enzimático del CYP19A1. La aromatasa se localiza en el retículo endoplásmico de tejidos sensible a estrógenos, como tejido adiposo, mamario,

de próstata, células endoteliales y fibroblastos (Kirma et al., 2001). Nuestros resultados demostraron que 0.1  $\mu$ M de arsenito de sodio, incrementa significativamente los niveles protéicos totales y la actividad enzimática de la aromatasa. Este efecto es biológicamente importante ya que se ha observado que, en el desarrollo de CaM, la producción local de estrógenos a través de la actividad de la aromatasa es un mecanismo importante de estimulación autócrina y parácrina, lo que favorece la proliferación, la migración y la invasión de células tumorales a través de la unión y activación del E2 a sus receptores (De mukhopadhyay et al., 2015; Key et al., 2013). En el pasado, las líneas MDA-MB-231 y MDA-MB-453, al ser ER $\alpha$  negativas, se consideraban células de CaM no dependientes de hormonas. Sin embargo, esto ya no es totalmente aceptado. Se propone que el fenotipo ER $\alpha$ <sup>-</sup> se adquiere a través de modificaciones epigenéticas que llevan a la pérdida de la expresión del ER $\alpha$  (Gajulapalli et al., 2016). Lapidus y cols. (1998) reportaron que en tumores de CaM ER $\alpha$ <sup>-</sup> se mantiene el estatus de metilación del gen promotor *ESR1* que codifica para la expresión del ER $\alpha$  a diferencia de los tumores ER $\alpha$ <sup>+</sup>. La ADN metiltransferasa 1 (DNMT1) es la responsable de la metilación del promotor *ESR1* en la línea MDA-MB-231 en la cual generaron el silenciamiento de la DNMT1, lo que permitió la re-expresión del ER $\alpha$ , demostrando así que la metilación es un factor importante que contribuye al fenotipo de CaM ER $\alpha$ <sup>-</sup>, de tal manera que las células mantendrían la expresión de la aromatasa y su capacidad de responder a los efectos del E2 a través de otros receptores de estrógenos como el GPER1 (Pandey et al., 2009; Maggiolini et al., 2004; Filardo et al., 2000). Para demostrar la relevancia de la enzima aromatasa en el CaM se han realizado estudios utilizando inhibidores no esteroideos de tercera generación (letrozol y anastrozol) de la actividad de la aromatasa. El letrozol es un supresor de la aromatización de andrógenos y de los niveles de estrógenos, y es más potente que el anastrozol (Geisler et al., 2002). De hecho, los inhibidores de la aromatasa se utilizan ampliamente como primera línea de tratamiento de CaM metastásico y están aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos de USA para utilizarse como terapia adyuvante en mujeres postmenopáusicas (Winer et al., 2005). En estudios *in vivo* en ratones inoculados con células de CaM ER $\alpha$ <sup>-</sup>, MDA-MB-231 y 4T1, se evaluó la participación de la aromatasa en el crecimiento del tumor y

en la metástasis hacia el pulmón; los resultados demostraron que tras la exposición a letrozol, se disminuye el crecimiento tumoral y la metástasis de los tumores, incluyendo los tumores ER $\alpha$  (Wang et al., 2016; Sabnis et al., 2011).

Por otro lado, existen reportes que demostraron que los CDE pueden favorecer la expresión y actividad de la aromatasa, y que este evento es necesario para incrementar la proliferación de células de CaM (Williams & Darbre, 2019). Por ejemplo, la exposición, a tiempos cortos (24 h), a compuestos como dietilestilbestrol, coumestrol, genisteína, bisfenol A y al dicloro difenil tricloroetano (DDT) incrementan la actividad de la aromatasa en células de CaM a través de mecanismos no genómicos (Kinoshita & Chen, 2003). Aunque se propone que la vía de señalización de PI3k/Akt es una de las posibles vías que participan en el efecto inducido específicamente por el DDT en células MCF-7 y MDA-MB-231 (Han et al., 2010), el mecanismo molecular preciso por el cual estos compuestos activan a la aromatasa aún se desconoce. Sin embargo, se sabe que su expresión no es dependiente del estatus de expresión del ER $\alpha$ , PR y HER2 (Kanomata et al., 2017).

Nosotros utilizamos el inhibidor de la aromatasa letrozol por su gran especificidad y potencia sobre la aromatasa, con el objetivo de evidenciar la participación de la enzima en la proliferación y la migración estimulada por el arsenito de sodio. Nuestros resultados mostraron que la proliferación y la migración estimuladas por 0.1  $\mu$ M de arsenito requiere la activación de la aromatasa y la producción de E2 en ambas líneas celulares. Esto a la vez nos sugiere la participación de un receptor de estrógenos y, debido a que nuestras líneas no expresan el ER $\alpha$ , consideramos que el receptor que participa es el GPER1, un receptor acoplado a proteínas G. El GPER1 media los efectos rápidos no genómicos de los estrógenos a través de la modulación de segundos mensajeros y vía de las MAPKs en células de CaM, tanto ER $\alpha$  positivo como ER $\alpha$  negativo (Filardo et al., 2000; Maggiolini et al., 2004; Pandey et al., 2009). En este trabajo utilizamos G-15, un antagonista específico de GPER1 de uso amplio que interrumpe la vía de señalización de GPER1 por su similitud estructural con el agonista sintético de GPER1, G1 (Dennis et al., 2009; Arterburn et al., 2009; Mendez-Luna et al., 2015; Changyu et al., 2019). Con esta estrategia corroboramos que GPER1 efectivamente participa en la proliferación y la migración estimuladas por 0.1

$\mu\text{M}$  de arsenito de sodio en las células MDA-MB-231 y MDA-MB-453. El hecho de que la exposición a G-15 disminuye la proliferación y la migración en ambas líneas celulares nos sugiere que la activación de GPER1 ocurre por la unión de E2, el cual desencadena vías de señalización que estimulan la proliferación y la migración celular (Fig. 12). Huff y cols. (2016) mostraron que el arsenito de sodio activa rápidamente ERK1/2 a través de la vía de GPER1. Por otro lado, Stoica y cols. (2000) reportaron que el arsenito de sodio activa al ER $\alpha$  a través de una interacción con el dominio de unión al ligando del receptor. En nuestro estudio, nosotros sugerimos que la activación del GPER1 por la exposición a arsenito de sodio se debe a la unión de E2, sin embargo, desconocemos si la activación puede también ocurrir por una distintos receptores interacción directa del arsenito con GPER1, y son necesarios experimentos específicos para determinarlo.

En este trabajo corroboramos el estatus de expresión de GPER1 y ER $\alpha$  en las líneas celulares utilizadas y observamos que las células MDA-MB-453 expresan mayor cantidad de GPER1 que las células MDA-MB-231, y nuestros resultados mostraron efectos mas persistentes en la línea MDA-MB-231. Estos datos nos sugieren que el papel del GPER1 no depende de la cantidad que expresan las células sino de la cantidad de E2 que producen. Catalano y cols. (2014) demostró en células SKBR3 que la expresión de la aromatasa es regulada por el receptor GPER1 a través del reclutamiento del complejo c-fos y c-jun a los motivos AP-1 de la región promotora del gen de la aromatasa. Nosotros no evaluamos sí la inhibición de GPER1 interrumpe la expresión de la aromatasa, pero sí demostramos que la inhibición de GPER1 con G-15 no modifica la actividad de la aromatasa inducida por el arsenito de sodio. Estos datos sugieren que el arsenito activa a la aromatasa a través de un mecanismo independiente de la activación de GPER1. Sin embargo, la activación de la vía de GPER1 podría participar en la sobreexpresión de la aromatasa. En éste sentido, se sabe que la vía de GPER1 también desencadena una vía dependiente de la proteína G $\alpha$  que a su vez activa a la adenilil ciclasa, quien activa a PKA, que activa a CREB (proteína de unión a elementos de respuesta a AMP cíclico) y que se une a los elementos CRE de la región promotora en el gen de la aromatasa, induciendo así la expresión de la enzima (Girgert, Emons & Gründker, 2017). Por su parte, Catalano y

cols. (2009) y Barone y cols. (2012) reportaron que la actividad enzimática de la aromatasa se regula por modificaciones postraduccionales como un estado cíclico de fosforilación/desfosforilación en el que participan cinasas como la tirosina cinasa Src y fosfatasa. Nuestros resultados mostraron que el arsenito de sodio incrementa de manera transitoria la fosforilación de Src-<sup>Y419</sup>, a los 5 y 15 minutos de exposición y después de 30 minutos de exposición regresan a los niveles basales. La autofosforilación en este residuo es importante ya que permite que Src alcance su máxima actividad de cinasa (Guarino, 2010). Nosotros, al utilizar un inhibidor específico de la fosforilación en el residuo <sup>Y419</sup>, corroboramos que Src es un blanco del arsenito de sodio y que la actividad de la aromatasa y la proliferación celular inducida por el arsenito son dependientes de la activación de Src.

Estudios previos demuestran que Src también fosforila el residuo <sup>Y361</sup> de la aromatasa incrementando su actividad enzimática (Catalano et al., 2009), mientras que PTP1B (tirosin fosfatasa 1B) desfosforila el mismo residuo reduciendo su actividad (Barone et al., 2012). Con estos datos en mente, nuestros resultados nos podrían sugerir que el arsenito de sodio incrementa la actividad de la aromatasa a través de un evento mediado principalmente por Src. Sin embargo, otro posible mecanismo se puede relacionar con la inhibición de fosfatasa por el arsenito de sodio, lo cual permitiría mantener “encendida” la actividad de la aromatasa (Barone et al., 2012). Con respecto a esto, un mecanismo bien caracterizado, es la capacidad del arsénico de interactuar con grupos sulfhidrilos libres de varias macromoléculas, modificando su actividad o el estado de activación de manera directa o indirecta. Las proteínas tirosina fosfatasa (PTPasas) son enzimas con grupos -SH y por lo tanto sensibles a compuestos que reaccionan con grupos tiol. Cavigelli y cols. (1996) demostraron que el arsenito de sodio es capaz de activar a la cinasa c-jun N-terminal (JNK) a través de la inactivación de fosfatasa debido a que, el arsenito puede interactuar con cisteínas del sitio catalítico de las PTPasas inhibiendo su actividad.

Por otra parte, se reporta que en células MDA-MB-231 expuestas a inhibidores de Src se disminuye su proliferación, su migración y su invasión celular (Sánchez-Bailón et al., 2012). Independientemente, se observa que en células uroepiteliales humanas expuestas a arsenito de sodio, se induce la fosforilación de Src. En estas condiciones

Src fosforila y activa al receptor HER2 que induce nuevamente una fosforilación sostenida de Src, creando una retroalimentación positiva que resulta en un aumento de la proliferación, la migración y la invasión celular (Zhou et al., 2018). Estos datos están de acuerdo con nuestros resultados, dado que por un lado la exposición a arsenito de sodio favoreció la activación de Src el cual participó en la regulación de la aromatasas, además de que también es un mediador importante de la proliferación celular. Nuestros resultados también demostraron que la activación de Src se debe parcialmente a la vía de GPER1, pero se necesitan más estudios para determinar el mecanismo por el cual el arsenito de sodio induce la activación de Src, tanto en la vía dependiente como independiente de GPER1. En líneas celulares distintas se demuestra que Src se encuentra asociado a la membrana celular interna, particularmente vecino a factores de crecimiento o “clusters” de integrinas, y su activación se regula por eventos de fosforilación y desfosforilación (Bjorge, Jakymiw & Fujita, 2000). Por lo anterior, se sugieren algunos mecanismos por los que el arsénico podría estar activando a Src: 1) el arsénico puede interactuar directamente con grupos tiol libres de Src promoviendo su actividad, o indirectamente activarla por inhibición de PTPasas; 2) el arsénico podría acumularse en la matriz extracelular al unirse a moléculas con grupos sulfhidrilos libres que generan el reordenamiento de integrinas que eventualmente provocan la activación de Src, y 3) los ROS o la modulación del nivel de glutatión intracelular podrían jugar un papel en la activación de Src (Simeonova & Luster, 2002).

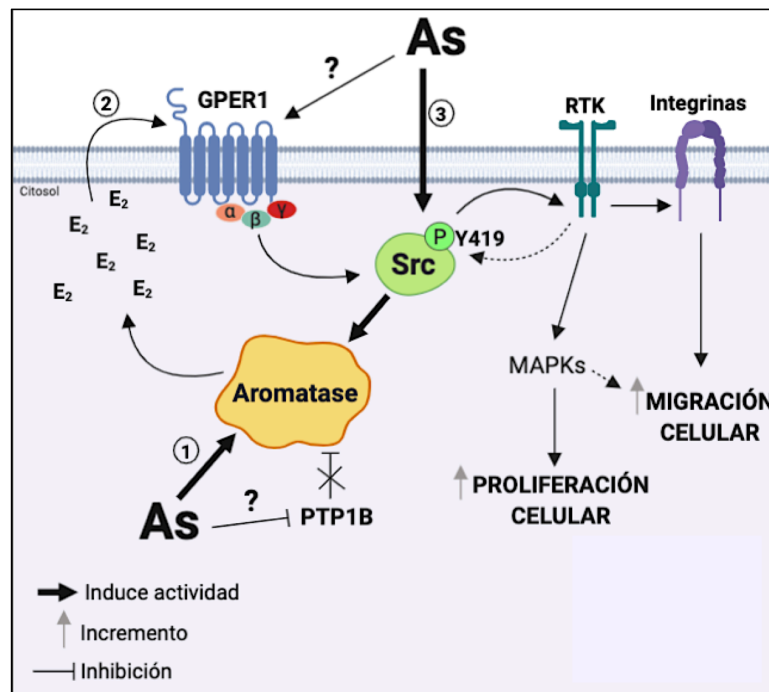
Por otro lado, existen reportes que muestran la participación de Src en la regulación de la proliferación de células de CaM, entre ellas en la línea MDA-MB-231. El E2 desencadena una señalización dependiente de EGFR/Src/Shc, donde Src ejerce un papel de “switch” de la vía de señalización que promueve el incremento en el nivel de c-myc y ciclina D1, reguladores críticos del ciclo celular, promoviendo el crecimiento de células ER $\alpha$  negativo (Zhang et al., 2011; Zhang et al., 2012). Estos antecedentes podrían sugerir cómo la participación de Src *per se*, es importante en los efectos promovidos por el arsenito, independientes de la vía de GPER1.

Integrando los hallazgos que se obtuvieron en el presente trabajo, se demostró que el arsenito de sodio, a concentraciones ambientalmente relevantes, es capaz de



estimular eventos importantes en la promoción y la progresión tumoral en células de CaM a través de incrementar la actividad de la aromatasa, y consecuentemente aumentando los niveles de E2. El incremento de E2 crearía una retroalimentación positiva de la vía de GPER1 que participa en la promoción y la progresión de células de CaM. Adicionalmente, la exposición a arsenito de sodio induce la activación de Src que contribuye tanto al aumento en los niveles de E2 como a la proliferación y la migración inducidas por el arsenito de sodio y E2.

En conclusión, nuestros datos sugieren que a concentraciones ambientalmente relevantes, el arsenito de sodio induce una regulación positiva de la proliferación, migración e invasión de líneas celulares de CaM, a través del incremento de la actividad de la aromatasa y de los niveles de estradiol (E2), la estimulación de GPER1 y la activación Src (Fig. 12).



**Figura 12.** Mecanismo propuesto por el cual el arsenito de sodio favorece la promoción y la progresión de las células de CaM.

1) El arsenito de sodio incrementa la actividad de la aromatasa que puede ocurrir por la inhibición de fosfatasas, 2) El E2 que produce la aromatasa se puede unir y activar GPER1 que transactiva a RTKs e integrinas que desencadenan las vías de señalización de la proliferación y la migración celular, y activan a Src, 3) el arsenito de sodio activa a Src, lo que contribuye a los efectos de promoción tumoral creando una retroalimentación positiva de la activación de la aromatasa, la promoción y la progresión de las células de CaM.

## 5. CONCLUSIONES

- I) El arsenito de sodio a una concentración de 0.1  $\mu\text{M}$  incrementa la proliferación, la migración y la invasión de las células de CaM, pero no de células no tumorigénicas.
- II) El arsenito de sodio a una concentración de 0.1  $\mu\text{M}$  incrementa los niveles proteicos y la actividad enzimática de la aromatasa en células de CaM.
- III) La estimulación de la proliferación y la migración por el arsenito de sodio requiere de la activación de la aromatasa y el consecuente aumento en la producción de E2.
- IV) GPER1 participa parcialmente en la proliferación y la migración estimuladas por el arsenito de sodio, pero no participa en la activación de la aromatasa.
- V) El arsenito de sodio (0.1  $\mu\text{M}$ ) promueve la activación de Src, el cual contribuye en la activación de la aromatasa y la proliferación celular inducidas por arsenito de sodio en células derivadas de CaM.

## 6. PERSPECTIVAS

- ∴ Evaluar el efecto del arsenito de sodio sobre la expresión de mRNA del gen de la aromatasa y determinar el mecanismo de inducción de la actividad de aromatasa en líneas celulares de CaM ER $\alpha$  positivo como la MCF-7.
- ∴ Estudiar el efecto del arsenito de sodio sobre la fosfatasa PTP1B con el uso de inhibidores específicos y el silenciamiento del gen para determinar si éste es el mecanismo por el cual aumenta la actividad de la aromatasa.
- ∴ Estudiar el mecanismo molecular de inducción de la actividad de Src por el arsenito de sodio a través de: 1) el silenciamiento de GPER1, 2) evaluando la activación por fosfatasa con tratamientos en presencia de fosfatasas e inhibidores de fosfatasas y 3) evaluar niveles de ROS generados por el arsenito y tratamientos con antioxidantes en células derivadas de CaM.
- ∴ Estudiar el efecto del arsenito de sodio sobre la transición epitelio mesénquima (EMT) a través de la identificación de marcadores de una células mesequimal como expresión de N-caderina, fibronectina, vimentina y metaloproteinasas.
- ∴ Estudiar el efecto del arsenito de sodio sobre el ciclo celular y reguladores importantes de éste como ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (cdks).
- ∴ Estudiar si ocurre la activación del GPER1 a través de una interacción directa con el arsenito de sodio por estudios de modelado molecular y ensayos de unión competitiva con agonistas del receptor.

## 7. REFERENCIAS

- ACS. (2015). *Breast cancer facts & figures*. Atlanta: American Cancer Society, Inc.
- Aiad, H. A., Wahed, M. M., Asaad, N. Y., El-Tahmody, M. & Elhosary, E. (2014). Immunohistochemical expression of GPR30 in breast carcinoma of Egyptian patients: an association with immunohistochemical subtypes. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 122, 976-984.
- Anbalagan, M. & Rowan, B. G. (2015). Estrogen receptor alpha phosphorylation and its functional impact in human breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 264-72.
- Ariazi, E. A., Brailoiu, E., Yerrum, S., Shupp, H. A., Slifker, M. J., Cunliffe, H. E., Black, M. A., Donato, A. L., Arterburn, J. B., Oprea, T. I., Prossnitz, E. R., Dun, N. J. & Jordan, V. C.. (2010). The G protein-coupled receptor GPR30 inhibits proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells . *Cancer Research*, 70 (3).
- Armienta, M. A. & Segovia, N. (2008). Arsenic and fluoride in the groundwater of Mexico. *Environmental Geochemistry and Health*, 30 (4), 345-353.
- Arterburn, J. B., Oprea, T. I., Prossnitz, E. R., Edwards, B. S. & Sklar , L. A. (2009). Discovery of selective probes and antagonists for G protein-coupled receptors FPR/FPRL1 and GPR30. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 9 (13), 1227-1236.
- ATSDR. (2007). *Toxicological profile for arsenic*.
- Balhazart, J., Baillien, M., Charlier, T. D. & Ball, G. F. (2003). Calcium-dependent phosphorylation processes control brain aromatase in quail. *European Journal of Neuroscience*, 17, 1591-1606.
- Barone, I., Giordano, C., Malivindi, R., Lanzino, M., Rizza, P., Casaburi, I., Bonofiglio, D., Catalano, S. & Andò, S. (2012). Estrogens and PTP1B function in a novel pathway to regulate aromatase enzymatic activity in breast cancer cells. *Endocrinology*, 153 (11), 5157-5166.
- Biscardi, J. S., Maa, M.-C., Tice, D. A., Cox, M. E., Leu, T.-H. & Parsons, S. J. (1999). c-Src-mediated phosphorylation of the epidermal growth factor receptor on Tyr845 and

Tyr1101 is associated with modulation of receptor function. *The Journal of Biological Chemistry*, 274 (12), 8335–8343.

Bjorge, J. D., Jakymiw, A. & Fujita, D. J. (2000). Selected glimpses into the activation and function of Src kinase. *Oncogene*, 19, 5620-5635.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R., Torre, L. & Jemal, A. (2018). Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *A cancer journal for clinicians*, 68 (394), 394–424.

Bulun, S. E., Price, T. M., Aitken, J., Mahendroo, M. S. & Simpson, E. R. (1993). A link between breast cancer and local estrogen biosynthesis suggested by quantification of breast adipose tissue aromatase cytochrome P450 transcripts using competitive polymerase chain reaction after reverse transcription. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 77 (6), 1622–1628.

Burks, H., Pashos, N., Martin, E., Mclachlan, J., Bunnell, B. & Burow, M. (2017). Endocrine disruptors and the tumor microenvironment: A new paradigm in breast cancer biology. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 457, 13-19.

Byrne, C., Divekar, S. D., Storchan, G. B., Parodi, D. A. & Martin, M. B. (2013). Metals and breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 18 (1), 63-73.

Catalano, S., Barone, I., Marsico, S., Bruno, R. & Andò, S. (2016). Phosphorylation processes controlling aromatase activity in breast cancer: An update. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 16, 691-698.

Catalano, S., Giordano, C., Panza, S., Chemi, F., Bonofiglio, D., Lanzino, M., Rizza, P., Romeo, F., Fuqua, S., Maggiolini, M., Andò, S. & Barone, I. (2014). Tamoxifen through GPER upregulates aromatase expression: a novel mechanism sustaining tamoxifen-resistant breast cancer cell growth. *Breast Cancer Research Treatment*, 146, 273–285.

Catalano, S., Barone, I., Giordano, C., Rizza, P., Qi, H., Gu, G., Malivindi, R., Bonofiglio, D. & Andò, S. (2009). Rapid estradiol/ERα signaling enhances aromatase enzymatic activity in breast cancer cells. *Molecular Endocrinology*, 23, 1634-1645.

Cavigelli, M., Li, W. W., Lin, A., Su, B., Yoshioka, K. & Karin, M. (1996). The tumor promoter arsenite stimulates AP-1 activity by inhibiting a JNK phosphatase. *The EMBO Journal*, 15 (22), 6269-6279.

Changyu, L., Yongde, L., Sheng, F., Xiangning, F., Jing, X., Sheng, Z., Man, Z. & Jianmiao, W. (2019). G-protein-coupled estrogen receptor antagonist G15 decreases estrogen-induced development of non-small cell lung cancer. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 27 (3), 283-292.

Chlebowski, R. T., Anderson, G. L., Gass, M., Lane, D. S., Aragaki, A. K., Kuller, L. H., Manson, J. E., Stefanick, M. L., Ockene, J., Sarto, G. E., Johnson, K. C., Wactawski-Wende, J., Ravdin, P. M., Schenken, R., Hendrix, S. L., Rajkovic, A., Rohan, T. E., Yasmeen, S. & Prentice, R. L. (2010). Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in postmenopausal women. *JAMA*, 304 (15), 1684-1692.

Chung, J.-Y., Yu, S.-D. & Hong, Y. S. (2014). Environmental source of arsenic exposure. *Journal of Preventive Medicine & Public Health*, 47, 253-257.

Clemons, M. & Goss, P. (2001). Estrogen and the risk of breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 344 (4).

Davey, J. C., Bodwell, J. E., Gosse, J. A. & Hamilton, J. W. (2007). Arsenic as an endocrine disruptor: Effects of arsenic on estrogen receptor-mediated gene expression in vivo and in cell culture. *Toxicological Sciences*, 98 (1), 75-86.

De Mukhopadhyay, K., Liu, Z., Bandyopadhyay, A., Kirma, N. B., Tekmal, R. R., Wang, S. & Sun, L.-Z. (2015). Aromatase expression increases the survival and malignancy of estrogen receptor positive breast cancer cells. *Plos One*, 10, 121-136.

Dennis, M. K., Burai, R., Ramesh, C., Petrie, W. K., Alcon, S. N., Nayak, T. K., Bologna, C. G., Leitao, A., Brailoiu, E., Deliu, E., Dun, N. J., Sklar, L. A., Hathaway, H. J., Arterburn, J. B., Oprea, T. I. & Prossnitz, E. R. (2009). In vivo effects of a GPR30 antagonist. *Nature Chemical Biology*, 5 (6), 421-427.

- Drobná, Z., Walton, F. S., Paul, D. S., Xing, W., Thomas, D. J. & Stýblo, M. (2010). Metabolism of arsenic in human liver: the role of membrane transporters. *Archives of Toxicology*, *84*, 3-16.
- Faupel-Badger, J. M., Arcaro, K. F., Balkam, J. J., Eliassen, A. H., Hassiotou, F., Lebrilla, C. B., Michels, K. B., Palmer, J. R., Schedin, P., Stuebe, A. M., Watson, C. J. & Sherman, M. E. (2013). Postpartum remodeling, lactation, and breast cancer risk: summary of a National Cancer Institute–sponsored workshop. *Journal of the National Cancer Institute*, *105* (3), 166-74.
- Filardo, E. J. (2018). A role for G-protein coupled estrogen receptor (GPER) in estrogen-induced carcinogenesis: Dysregulated glandular homeostasis, survival and metastasis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *176*, 38-48.
- Filardo, E. J., Graeber, C. T., Quinn, J. A., Resnick, M. B., Giri, D., DeLellis, R. A., Steinhoff, M. M. & Sabo, E. (2006). Distribution of GPR30, a seven membrane–spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression. *Human Cancer Biology*, *12* (21).
- Filardo, E. J., Quinn, J. A. & Sabo, E. (2008). Association of the membrane estrogen receptor, GPR30, with breast tumor metastasis and transactivation of the epidermal growth factor receptor. *Steroids*, *73*, 870-873.
- Filardo, E. J., Quinn, J. A., Bland, K. I. & Frackelton, R. (2000). Estrogen-induced activation of Erk- 1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Molecular Endocrinology*, *14* (10), 1649-1660.
- Fisher, A. T., López-Carrillo, L., Gamboa-Loira, B. & Cebrián, M. E. (2017). Standards for arsenic in drinking water: Implications for policy in Mexico. *Journal Public Health Policy*, *38* (4), 395–406.
- Gajulapalli, V. N., Malisetty, V. L., Chitta, S. K. & Manavathi, B. (2016). Oestrogen receptor negativity in breast cancer: a cause or consequence?. *Bioscience Reports*, *36*.

Geisler, J., Haynes, B., Anker, G., Dowsett, M. & Lønning, P. E. (2002). Influence of Letrozole and Anastrozole on Total Body Aromatization and Plasma Estrogen Levels in Postmenopausal Breast Cancer Patients Evaluated in a Randomized, Cross-Over Study. *Journal of Clinical Oncology*, 20 (3), 751-757.

Girgert, R., Emons, G. & Gründker, C. (2017). 17 $\beta$ -estradiol-induced growth of triple-negative breast cancer cells is prevented by the reduction of GPER expression after treatment with gefitinib . *Oncology Reports*, 37, 1212-1218.

Guarino, M. (2010). Src Signaling in Cancer Invasion. *Cellular Physiology*, 223, 14-26.

Han, E. H., Kim, H. G., Hwang, Y. P., Choi, J. H., Im, J. H., Park , B., Yang, J. H., Jeong, T. C. & Jeong, H. G. (2010). The role of cyclooxygenase-2-dependent signaling via cyclic AMP response element activation on aromatase up-regulation by o,p'-DDT in human breast cancer cells. *Toxicology Letters*, 198, 331–341.

Hanahan, D. & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144, 646-674.

Holliday, D. L. and Speirs, V. (2011). Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Research*, 13 (215).

Hubaux, R., Becker-Santos, D. D., Enfield, K. S., Rowbotham, D., Lam , S., Lam, W. L. & Martinez, V. D. (2013). Molecular features in arsenic-induced lung tumors. *Molecular Cancer*, 12 (20).

Huff, M. O., Todd, S. L., Smith, A. L., Elpers, J. T., Smith, A. P., Murphy , R. D. Bleser-Shartzter, A. S., Hoerter, J. E., Radde, B. N. & Klinge, C. M. (2016). Arsenite and cadmium activate MAPK/ERK via membrane estrogen receptors and G-protein coupled estrogen receptor signaling in human lung adenocarcinoma cells. *Toxicological Sciences*, 152 (1), 62–71.

INEGI. (2018). *Estadísticas a propósito del Día mundial contra el cáncer (4 de Febrero)*. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México: Comunicación social.

International Agency for Research on Cancer. (2012). *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. Lyon, France.



International Program on Chemical Safety. (2002). *Arsine: human health aspects*. World Health Organization. Geneva.

Jensen, E. V. & Jacobson, H. I. (1962). Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Progress in Hormone Research*, 18, 387–414.

Joo, N. S., Kim, S. M., Jung, Y. S. & Kim, K. M. (2009). Hair iron and other minerals' level in breast cancer patients. *Biological Trace Element Research*, 129, 28-35.

Jung, J. (2019). Role of G Protein-Coupled Estrogen Receptor in Cancer Progression. *Toxicological Research*, 35 (3), 209-214.

Kanomata, N., Matsuura, S., Nomura, T., Kurebayashi, J., Mori, T., Kitawaki, J. & Moriya, T. (2017). Preparation of a novel antiserum to aromatase with high affinity and specificity: Its clinicopathological significance on breast cancer tissue. *Plos One*, 12 (5).

Kelsey, J. L., Gammon, M. D. & John, E. M. (1993). Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiologic reviews*, 15 (1), 36-47.

Key, T. J., Appleby, P. N., Reeves, G. K., Travis, R. C., Alberg, A. J., Barricarte, A., Berrino, F., Krogh, V., Sieri, S., Brinton, L. A., Dorgan, J. F., Dossus, L., Dowsett, M., Eliassen, A. H., Fortner, R. T., Hankinson, S. E., Helzlsouer, K. J., Hoffman-Bolton, J., Kaaks, R., Kahle, L. L., Koenig, K., Zeleniuch-Jacquotte, A., Muti, P., Overvad, K., Peeters, P. H., Riboli, E., Rinaldi, S., Rollison, D. E., Stanczyk, F. Z., Trichopoulos, D., Tworoger, S. S. & Vineis, P. (2013). Sex hormones and risk of breast cancer in premenopausal women: a collaborative reanalysis of individual participant data from seven prospective studies. *Lancet Oncology*, 14, 1009-19.

Khanjani, N., Jafarnejad, A.-B. & Tavakkoli, L. (2017). Arsenic and breast cancer: a systematic review of epidemiologic studies. *Reviews on Environmental Health*.

Kinoshita, Y. & Chen, S. (2003). Induction of aromatase (CYP19) expression in breast cancer cells through a nongenomic action of estrogen receptor. *Cancer Research*, 63, 3546–3555.

Kirma, N., Gill, K., Mandava, U. & Tekmal, R. R. (2001). Overexpression of aromatase leads to hyperplasia and changes in the expression of genes involved in apoptosis, cell

cycle, growth, and tumor suppressor functions in the mammary glands of transgenic mice. *Cancer Research*, 61, 1910–1918.

Klein, C. B., Lesczynska, J., Hickey, C. & Rossman, T. G. (2007). Further evidence against a direct genotoxic mode of action for arsenic-induced cancer. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 22 (3), 289-297.

Kuiper, G. G., Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S. & Gustafsson, G. A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93 (12), 5925–5930.

Lapidus, R. G., Nass, S. J., Butash, K. A., Parl, F. F., Weitzman, S. A., Graff, J. G., Herman, J. G. & Davidson, N. E. (1998). Mapping of ER gene CpG island methylation by methylation-specific polymerase chain reaction. *Cancer Research*, 58 (12).

Lau, A. T., Li, M., Xie, R., He, Q.-Y. & Chiu, J.-F. (2004). Opposed arsenite-induced signaling pathways promote cell proliferation or apoptosis in cultured lung cells. *Carcinogenesis*, 25 (1), 21-28.

Liu, R., Nelson, D. O., Hurley, S., Hertz, A. & Reynolds, P. (2015). Residential exposure to estrogen disrupting hazardous air pollutants and breast cancer risk. The California teachers study. *Epidemiology*, 26, 365-373.

López-Carrillo, L., Hernández-Ramírez, R. U., Gandolfi, J. A., Ornelas-Aguirre, J. M., Torres-Sánchez, L. & Cebrian, M. E. (2014). Arsenic methylation capacity is associated with breast cancer in northern Mexico. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 280, 53–59.

Madigan, M. P., Ziegler, R. G., Benichou, J., Byrne, C. & Hoover, R. N. (1995). Proportion of Breast Cancer Cases in the United States Explained by Well-Established Risk Factors. *Journal of the National Cancer Institute*, 87 (22), 1681–1685.

Maggiolini, M., Vivacqua, A., Fasanella, G., Recchia, A. G., Sisci, D., Pezzi, V., Montanaro, D., Musti, A. M., Picard, D. & Andò, S. (2004). The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 279 (26), 27008–27016.

Marciniak, W., Derkacz, R., Muszynska, M., Baszuk, P., Gronwald, J., Huzarski, T. et al. (2019). Blood arsenic levels and the risk of familial breast cancer in Poland. *International Journal of Cancer*.

Marjo, N. A., Hu, C., Hathaway, H. J. & Prossnitz, E. R. (2014). G protein-coupled estrogen receptor regulates mammary tumorigenesis and metastasis. *Molecular Cancer Research*, 12 (11), 1644-54.

Martin, M. B., Reiter, R., Pham, T., Avellanet, Y. R., Camara, J., Lahm, M., Pentecost, E., Pratap, K., Gilmore, B. A., Divekar, S., Dagata, R. S., Bull, J. L. & Stoica, A. (2003). Estrogen-like activity of metals in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology*, 144 (6), 2425-2436.

Martinez, J. D., Parker, M. T., Fultz, K. E., Ignatenko, N. A. & Gerner, E. W. (2003). Molecular biology of cancer. En D. J. Abraham, *Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery*. Arizona.

Mendez-Luna, D., Martínez-Archundia, M., Maround, R. C., Ceballos-Reyes, G., Fragoso-Vázquez, M., González-Juárez, D. & Correa-Basurto, J. (2015). Deciphering the GPER/GPR30-agonist and antagonists interactions using molecular modeling studies, molecular dynamics, and docking simulations. *Journal Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2161-2172.

Michel-Ramirez, G., Recio-Vega, R., Ocampo-Gomez, G., Palacios-Sanchez, E., Delgado-Macias, M., Delgado-Gaona, M., Lantz, R. C., Gandolfi, J. & Gonzalez-Cortes, T. (2017). Association between YAP expression in neoplastic and non-neoplastic breast tissue with arsenic urinary levels. *Journal of Applied Toxicology*, 37 (10), 1195-1202.

Miller, T. W., Shin, I., Kagawa, N., Evans, D. B., Waterman, M. R., & Arteaga, C. L. (2008). Aromatase is phosphorylated in situ at serine-118. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 112, 95-101.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55-63.

Muszyńska, M., Jaworska-Bieniek, K., Durda, K., Sukiennicki, G., Gromowski, T., Jakubowska, A., Morawski, A. & Lubinski, J. (2012). Arsenic (As) and breast cancer risk. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, 10 (4), A8.

Nakareangrit, W., Thiantanawat, A., Visitnonthachai, D., Watcharasit, P. & Satayavivad, J. (2015). Sodium arsenite inhibited genomic estrogen signaling but induced pERα (Ser118) via MAPK pathway in breast cancer cells. *Environmental Toxicology*.

Nesnow, S., Roop, B. C., Lambert, G., Kadiiska, M., Mason, R. P., Cullen, W. R. & Mass, M. J. (2002). DNA damage induced by methylated trivalent arsenicals is mediated by reactive oxygen species. *Chemical Research Toxicology*, 14, 1627–1634.

Olde, B. & Leeb-Lundberg, L. (2009). GPR30/GPER1: searching for a role in estrogen physiology. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 20 (8), 409-416.

Pandey, D. P., Lappano, R., Albanito, L., Madeo, A., Maggiolini, M. & Picard, D. (2009). Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF. *The EMBO Journal*, 28 (5), 523–532.

Parodi, D. A., Greenfield, M., Evans, C., Chichura, A., Alpaugh, A., Williams, J. & Martin, M. B. (2015). Alteration of mammary gland development and gene expression by in utero exposure to arsenic. *Reproductive Toxicology*.

Prossnitz, E. R., Arterburn, J. B., Smith, H. O., Oprea, T. I., Sklar, L. A. & Hathaway, H. J. (2008). Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annual Review of Physiology*, 70, 165-190.

Revankar, C. M., Cimino, D. F., Sklar, L. A., Arterburn, J. B. & Prossnitz, E. R. (2005). A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*, 307, 1625-1630.

Sánchez-Bailón, M., Calcabrini, A., Gómez-Domínguez, D., Morte, B., Martín-Forero, E., Gómez-López, G., Molinari, A., Wagner, K-U. & Martín-Perez, J. (2012). Src kinases catalytic activity regulates proliferation, migration and invasiveness of MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cellular Signalling*, 24, 1276–1286.

Sabnis, G. J., Goloubeva, O., Chumsri, S., Nguyen, N., Sukumar, S. & Brodie, A. M. (2011). Functional activation of the estrogen receptor- $\alpha$  and aromatase by the HDAC inhibitor, entinostat, sensitizes ER-negative tumors to letrozole. *Cancer Research*, 71 (5), 1893–1903.

Santen, R. J., Brodie, H., Simpson, E. R., Siiteri, P. K. & Brodie, A. (2009). History of Aromatase: Saga of an important biological mediator and therapeutic target. *Endocrine Reviews*, 30 (4), 343-375.

Simeonova, P. P. & Luster, M. I. (2002). Arsenic carcinogenicity: Relevance of c-Src activation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 277–282.

Soucy, N. V., Ihnat, M. A., Kamat, C. D., Hess, L., Post, M. J., Klei, L. R., Clark, C. & Barchowsky, A. (2003). Arsenic stimulates angiogenesis and tumorigenesis In Vivo. *Toxicological Sciences*, 76, 271-279.

Stoica, A., Katzenellenbogen, B. S. & Martin, M. B. (2000). Action of estrogen receptor alpha by the heavy metal cadmium. *Molecular Endocrinology*, 14 (4), 545-553.

Styblo, M., Del Razo, L. M., Vega, L., Germolec, D. R., LeCluyse, E. L., Hamilton, G. A., Reed, W., Wang, C., Cullen, W. R. & Thomas, D. J. (2000). Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells. *Archives of Toxicology*, 74, 289-299.

Sun, X. Z., Zhou, D. & Chen, S. (1997). Autocrine and paracrine actions of breast tumor aromatase. A three-dimensional cell culture study involving aromatase transfected MCF-7 and T-47D cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 63, 29-36.

Thomas, S. M. & Brugge, J. S. (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annual review of cell and developmental biology*, 13, 513-609.

Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E. & Dong, J. (2005). Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*, 146 (2), 624-632.

US Department of Agriculture. (1970). *The pesticides review*. Washington, DC: US Department of Agriculture.

- Viñas, R., Jeng, Y.-J. & Watson, C. (2012). Non-genomic effects of xenoestrogens mixtures. *Environmental research and public health*, 9, 2694-2714.
- Vega, L., Styblo, M., Patterson, R., Cullen, W., Wang, C. & Germolec, D. (2001). Differential effects of trivalent and pentavalent arsenicals on cell proliferation and cytokine secretion in normal human epidermal keratinocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 172, 225–232.
- Vu, V., Navalkar, N. and Wei, Y. (2019). Endocrine-disrupting metals in ambient air and female breast cancer incidence in US. *Gynecological Endocrinology*, 1-4.
- Wadhwa, S. K., Kazi, T. G., Afridi, H. I., Talpur, F. N. & Naeemullah. (2015). Interaction between carcinogenic and anti-carcinogenic trace elements in the scalp hair samples of different types of Pakistani female cancer patients. *Clinica Chimica Acta*, 439, 178–184.
- Wallace, D. R. (2015). Environmental pesticides and heavy metals-role in breast cancer. En D. R. Wallace & M. Larramendy (Ed.), *Toxicity and hazard of agrochemicals* (págs. 39-70). IntechOpen.
- Wang, W., Belosay, A., Yang, X., Hartman, J. A., Song, H., Iwaniec, U. T., Turner, R. T., Churchwell, M. I., Doerge, D. R. & Helferich, W. G. (2016). Effects of letrozole on breast cancer micro-metastatic tumor growth in bone and lung in mice inoculated with murine 4T1 cells. *Clinical & Experimental Metastasis*, 33, 475–485.
- White, A. J., O'Brien, K. M., Niehoff, N. M., Carroll, R. & Sandler, D. P. (2019). Metallic air pollutants and breast cancer risk in a nationwide cohort study. *Epidemiology*, 30, 20-28.
- WHO. (2018). *World Health Organization*. Obtenido de World Health Organization: Publishing PhysicsWeb <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs372/en/>.
- Williams, G. P. & Darbre, P. D. (2019). Low-dose environmental endocrine disruptors, increase aromatase activity, T estradiol biosynthesis and cell proliferation in human breast cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 486, 55-64.
- Winer, E. P., Hudis, C., Burstein, H. J., Wolff, A. C., Pritchard, K. I., Ingle, J. N., Chlebowski, R. T., Gelber, R., Edge, S. B., Gralow, J., Cobleigh, M. A., Mamounas, E.

P., Goldstein, L. J., Whelan, T. J., Powles, T. J., Bryant, J., Perkins, C., Perotti, J., Braun, S., Langer, A. S., Browman, G. P. & Somerfield, M. R. (2005). American society of clinical oncology technology assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant therapy for postmenopausal women with hormone receptor–positive breast cancer: Status report 2004. *Journal of Clinical Oncology*, 23, 619-629.

Xie, H., Huang, S., Martin, S. & Wise, J. P. (2014). Arsenic is cytotoxic and genotoxic to primary human lung cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 760, 33-41.

Xu, Y., Tokar, E. J. & Waalkes, M. P. (2014). Arsenic-induced cancer cell phenotype in human breast epithelia is estrogen receptor-independent but involves aromatase activation. *Archives of Toxicology*, 88, 263-274.

Yang, X., Belosay, A., Du, M., Fan, T. M., Turner, R. T., Iwaniec, U. T. & Helferich, W. G. (2013). Estradiol increases ER-negative breast cancer metastasis in an experimental model. *Clinical & Experimental Metastasis*, 30 (6), 711–721.

Yang, C. & Frenkel, K. (2002). Arsenic-mediated cellular signal transduction, transcription factor activation, and aberrant gene expression: Implications in carcinogenesis. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 21 (4), 331-342.

Zhang, X., Ding, L., Kang, L. & Wang, Z.-Y. (2012). Estrogen receptor-alpha 36 mediates mitogenic antiestrogen signaling in ER-negative breast cancer cells. *Plos One*, 7 (1).

Zhang, X., Kang, L., Ding, L., Vranic, S., Gatalica, Z. & Wang, Z.-Y. (2011). A Positive Feedback Loop of ER- $\alpha$ 36/EGFR Promotes Malignant Growth of ER-negative Breast Cancer Cells. *Oncogene*, 30 (7), 770–780.

Zhao, H., Zhou, L., Shanguan, A. J. & Bulun, S. E. (2016). Aromatase expression and regulation in breast and endometrial cancer. *Journal Molecular Endocrinology*, 57, 19-33.

Zhou, Q., Jin, P., Liu, J., Wang, F. & Xi, S. (2018). HER2 and Src co-regulate proliferation, migration and transformation by downstream signaling pathways in arsenite-treated human uroepithelial cells. *Metallomics*, 10, 1141-1159.

Zhou, Q. & Xi, S. (2018). A review on arsenic carcinogenesis: Epidemiology, metabolism, genotoxicity T and epigenetic changes. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 99, 78-88.

Zhu, Y.-G., Yoshinaga, M., Zhao, F.-J. & Rosen, B. P. (2014). Earth abides arsenic biotransformations. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, 42, 443-467.



## 8. ANEXOS



# Role of aromatase activation on sodium arsenite-induced proliferation, migration, and invasion of MDA-MB-231 and MDA-MB-453 breast cancer cell lines



Liliana Reyes-Vázquez, A. José Alberto Hernández, Emma S. Calderón-Aranda\*

Departamento de Toxicología, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Cinvestav, IPN, Ciudad de México, Mexico.

## ARTICLE INFO

### Keywords:

Sodium arsenite  
Breast cancer  
Aromatase  
GPER1  
Src

## ABSTRACT

Arsenic is an endocrine disruptor that promotes breast cancer (BCa) development. Estrogen synthesis, through aromatase activation, is essential for BCa promotion and progression through activating the G-coupled estrogen receptor 1 (GPER1), regulating rapid nongenomic effects involved in cell proliferation and migration of BCa cells. Herein, was studied the role of aromatase activation and the GPER1 pathway on sodium arsenite-induced promotion and progression of MDA-MB-231 and MDA-MB-453 BCa cell lines. Our results demonstrated that 0.1  $\mu\text{M}$  of sodium arsenite induces cell proliferation, migration, invasion, and stimulates aromatase activity of BCa cell lines MDA-MB-231, MDA-MB-453, MCF-7, but not in a nontumorigenic breast epithelial cell line (MCF-12A). Using letrozole (an aromatase inhibitor) and G-15 (a GPER1-selective antagonist), we demonstrated that sodium arsenite-induced proliferation and migration is mediated by induction of aromatase enzyme and, at least in part, by GPER1 activation in MDA-MB-231 and MDA-MB-453 cells. Sodium arsenite induced phosphorylation of Src that participated in sodium arsenite-induced aromatase activity, and -cell proliferation of MDA-MB-231 cell line. Overall, data suggests that sodium arsenite induces a positive-feedback loop, resulting in the promotion and progression of BCa cells, through induction of aromatase activity, E2 production, GPER1 stimulation, and Src activation.

## 1. Introduction

Arsenic is a major environmental health threat worldwide due to its widespread contamination in drinking water (WHO, 2018) and classified as a Group 1 carcinogen by the International Agency Research in Cancer (International Agency for Research on Cancer, 2012). Chronic exposure to inorganic arsenic (iAs) is associated with non-melanoma skin cancer, lung, bladder, and possibly kidney and liver cancer (WHO, 2018). In the last decade, epidemiologic studies have investigated the association between arsenic exposure and breast cancer (BCa). Pieces of evidence, mainly from case-control studies, have shown that exposure to iAs may increase breast cancer risk (Baastrup et al., 2008; López-

Carrillo et al., 2014; Marciniak et al., 2019; Pineda-Belmontes et al., 2016). Nevertheless, some ecological studies did not show a significant relationship (Lee Hinwood et al., 1999; Aballay et al., 2012; Garland et al., 1996; Khanjani et al., 2017). In 2015, Liu et al. (2015) found that exposure to high levels of sodium arsenite increases the risk of estrogen receptor alpha (ER $\alpha$ )- and progesterone receptor (PR)-negative BCa. Recently, an association was demonstrated between air emissions of arsenic and other metals and the incidence of all BCa types; arsenic and two different metals (Pb and Hg) were significantly associated with the incidence of ER $\alpha$ <sup>+</sup> BCa (Vu et al., 2019).

Although the association between arsenic exposure and the risk of developing BCa is contradictory and unfinished, exposure to iAs may be

**Abbreviations:** AI, aromatase inhibitors; ANOVA, analysis of variance; AP-1, activating protein-1; ATCC, American type culture collection; BCa, breast cancer; BrdU, bromodeoxyuridine; BSA, bovine serum albumin; CRE, c-AMP responsive elements; CREB, cAMP-responsive element-binding protein; DAPI4', 6-diamidino-2-phenylindole; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; E2, estradiol; EGF, epidermal growth factor; EGFR, epidermal growth factor receptor; EPA, United States Environmental Protection Agency; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FBS, fetal bovine serum; GPCRs, G-protein-coupled receptors; ER $\alpha$ , estrogen receptor alpha; GPER1, G-coupled estrogen receptor 1; HER-2, human epidermal growth factor receptor 2; HRP, horseradish peroxidase; IARC, International Agency for Research on Cancer; iAs, inorganic arsenic; MTT, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; NaAsO<sub>2</sub>, sodium arsenite; PBS, phosphate buffered saline; PR, progesterone receptor; PTPB1, protein tyrosine phosphatase 1B; SDS-Page, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; Src, proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src; T, testosterone; TRITC, tetramethylrhodamine

\* Corresponding author at: Departamento de Toxicología, Cinvestav, 07360, Ciudad de México, Mexico.

E-mail address: [scalder@cinvestav.mx](mailto:scalder@cinvestav.mx) (E.S. Calderón-Aranda).

<https://doi.org/10.1016/j.tox.2020.152440>

Received 10 September 2019; Received in revised form 12 March 2020; Accepted 16 March 2020

Available online 18 March 2020

0300-483X/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

a risk factor in the promotion and progression of BCa since it is a potent endocrine disruptor at low concentrations (0.01–5  $\mu\text{M}$ ). *In vitro* and *in vivo* studies showed that sodium arsenite alters steroid receptor-regulated gene expression (Davey et al., 2007; Bodwell et al., 2004, 2006). Sodium arsenite can mimic estrogen, activating, and modifying ER $\alpha$  expression and promoting MCF-7 hormone-dependent BCa cells growth (Davey et al., 2007; Stoica et al., 2000; Nakareangrit et al., 2015). Besides, the chronic exposure to sodium arsenite (500 nM) generates a change of human breast epithelial cells MCF-10A to acquire the cancer cell phenotype and produces overexpression and increasing activity of aromatase in an ER $\alpha$ -independent manner (Xu et al., 2014).

The cytochrome P-450 complex aromatase is the rate-limiting step in the production of estrogen (Simpson et al., 1994). In BCa, it has been documented that aromatase enzyme overexpression and estrogen production led to tumor tissue growth (Lu et al., 1996; Gérard and Brown, 2018). For that, aromatase is considered a therapeutic target as adjuvant therapy using aromatase inhibitors (AIs) (Yue et al., 1994; Kanomata et al., 2017). Different studies showed aromatase's relevance in BCa promotion and progression; in mice bearing MDA-MB-231 (ER $\alpha$ <sup>-</sup>PR<sup>-</sup>HER2<sup>-</sup>GPER1<sup>+</sup>) BCa tumors, it was demonstrated that the administration of AIs inhibited tumor growth and lung metastases (Sabnis et al., 2011; Wang et al., 2016).

The aromatase expression is regulated through the promoter II/I.3 by different functional motifs: c-AMP responsive elements, a CRE-like sequence, an Ad4BP/SF-1 (steroidogenic factor-1) binding site, and AP-1 (activating protein-1) motifs (Simpson et al., 1994; Bulun et al., 2003). Posttranslational modifications, like phosphorylation/dephosphorylation processes by c-Src protein tyrosine kinase, ERK, tyrosine phosphatase PTP1B, among others, modulate the aromatase activity (Yue et al., 2003; Catalano et al., 2009; Barone et al., 2012).

On the other hand, it has been reported that the GPER1 pathway regulates aromatase expression, promoting the growth of MCF-7 and SKBR3 cells (Catalano et al., 2014). GPER1 is an orphan G protein-coupled receptor with seven transmembrane domains related to the rapid nongenomic effects of estrogen (Filardo et al., 2000). Reports showed that GPER1 is expressed in about 50–60 % of BCa tissues, mainly in invasive tumors, and their expression is not interdependent of ER $\alpha$  expression (Filardo et al., 2006; Steiman et al., 2013). Evidence has shown that cell proliferation is induced by estrogen in cells that express GPER1, despite not having the classical ER $\alpha$  that mediate the genomic stimulus (Filardo et al., 2000; Maggolini et al., 2004; Pandey et al., 2009). In BCa cells, GPER1 transactivates epidermal growth factor receptor (EGFR) through the release of pro-heparan-bound EGF from the cell surface in a G $\beta\gamma$ -subunits dependent manner. Aside from this mechanism, it has been described that GPCRs (G-protein-coupled receptors) stimulation may activate EGFRs through direct phosphorylation of the EGFR cytoplasmic tail by Src tyrosine kinase (Filardo et al., 2002). Then it enables fast actions of estrogen by the EGFR-to-MAPK pathway, promoting the growth and progression of tumor cells (Mukhopadhyay et al., 2015; Huff et al., 2016).

Considering previous results, which suggested that sodium arsenite is capable of inducing aromatase expression and activity MCF10A cell line (Xu et al., 2014), and stimulates lung adenocarcinoma cell proliferation through ER $\alpha$  and GPER1 (Huff et al., 2016), in this study the aimed was to evaluate if sodium arsenite, at environmentally relevant concentrations, induces promotion and progression of BCa cells by inducing aromatase activity or activating the GPER1 pathway. For that propose, we chose as the primary cell model the MDA-MB-231 human cell line, which expresses GPER1 and aromatase, but does not express ER $\alpha$ , PR, neither HER-2 (Sabnis et al., 2011; Krishnan et al., 2010). In this model, was evaluated the sodium arsenite effect on proliferation, migration, invasion, and aromatase activity. The effects on MDA-MB-231 cell line were compared with results from other two BCa cell lines: MDA-MB-453 (ER $\alpha$ <sup>-</sup>PR<sup>-</sup>HER2<sup>+</sup>GPER1<sup>+</sup>) (Holliday and Speirs, 2011), and MCF-7 (ER $\alpha$ <sup>+</sup>PR<sup>+</sup>HER2-GPER1<sup>+</sup>) (Holliday and Speirs, 2011; Yu et al., 2014), and a nontumorigenic cell line MCF-12A

(ER $\alpha$ <sup>-</sup>PR<sup>-</sup>HER2<sup>-</sup>GPER1<sup>+</sup>) (Sweeney et al., 2018; Chen et al., 2017). The role of the aromatase and the GPER1 receptor on cell proliferation and migration was determined using specific inhibitors.

## 2. Methods

### 2.1. Cell culture

The human MDA-MB-231, MDA-MB-453, MCF-7, and MCF-12A cell lines were from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). MDA-MB-231, MDA-MB-453, and MCF-7 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) (GIBCO-BRL, Grand Island, NY, USA) and 1 % penicillin/streptomycin (P/S) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). MCF-12A cells was cultured in DMEM:F12 (1:1) medium supplemented with 5 % FBS, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  insulin, 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  hydrocortisone, 20 ng/ml EGF, and 1 % P/S (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). The cells were grown in a humid incubator at 37 °C and 5 % CO<sub>2</sub>.

### 2.2. Cell treatment

The cells were seeded in plates, and the cultures were allowed to stabilize for 24–36 h to adapt cells after the expansion step. Over this time, the cells overcome the stress, adhered to the plates, and reached the required confluence before starting the treatments. The cells were treated with sodium arsenite (NaAsO<sub>2</sub>) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) at different concentrations and times. DMEM medium alone was used as the control. To some assay, the cultures were pretreated with specific inhibitor: Letrozole (1  $\mu\text{M}$ ) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), a non-steroidal aromatase inhibitor that exerts its function through binding to the heme group of the enzyme complex and blocking NADPH utilization (Brodie and Njar, 1996), G-15 (3  $\mu\text{M}$ ) (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI), a GPER1-selective antagonist (Dennis et al., 2009); and SrcY419 phosphorylation inhibitor (CGP77675, 2  $\mu\text{M}$ ). All these were added 2 h before sodium arsenite treatment.

### 2.3. Cell viability assay

Cells were plated at  $5 \times 10^4$  cells/well in 24-well plates. Cultures were stabilized and then treated with medium alone (control) or with 0.01, 0.1, and 1  $\mu\text{M}$  of sodium arsenite (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for 24, 48, and 72 h. The cell viability was evaluated through the mitochondrial activity using the 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA), according to Mosmann (1983). Absorbance at 590 was measured with a spectrophotometer microplate reader (SpectraMax 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). The percentage of viable cells was calculated compared to the control group that was adjusted at 100 %. Four independent experiments were performed.

### 2.4. Cell proliferation assay

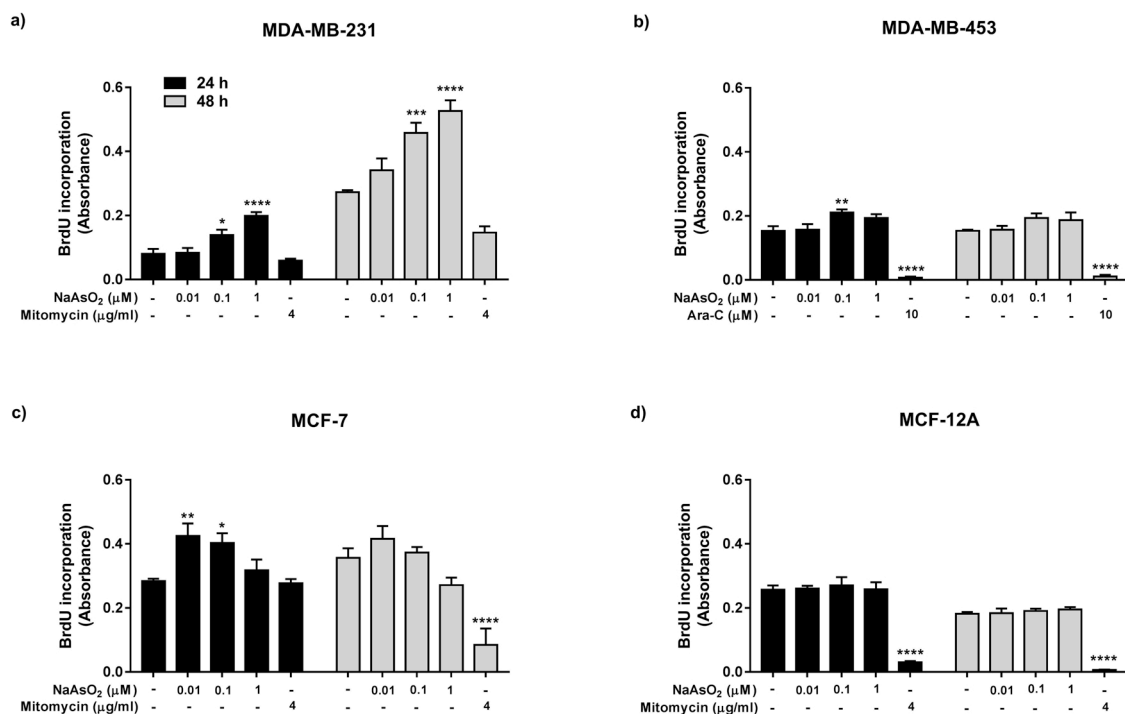
Cell proliferation was measured by Bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation assay using a commercial kit (Roche, IN). MDA-MB-231, MDA-MB-453, MCF-7, and MCF-12A cells were plated at  $15 \times 10^3$  cells/well in 96-well plates. After cell cultures were stabilized for 24–36 h, treatments were added and evaluated at 24 and 48 h. Medium alone was the control. Mitomycin C (4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (TEVA, CDMX, MEX) or cytosine  $\beta$ -D-arabinofuranoside hydrochloride (Ara-C) (10  $\mu\text{M}$ ) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was used as negative control for cell proliferation. Mitomycin C is an alkylating agent that inhibits DNA synthesis and therefore inhibits cell proliferation. Ara-C is incorporate into DNA and allows its fragmentation by forming cleavage complexes with topoisomerase I. The cells were treated with BrdU (10  $\mu\text{M}$ ) for 12 h before the end of the assay. The BrdU incorporation rates of controls and sodium arsenite-treated cells were determined by ELISA according

**Table 1**  
Sodium arsenite does not affect the cell viability of breast cancer cells at 24, 48, and 72 h.

Treatments / Cell line	MDA-MB-231			MDA-MB-453		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Control	100	100	100	100	100	100
Sodium arsenite 0.01 $\mu$ M	97.5 $\pm$ 3.9	99.3 $\pm$ 0.6	101 $\pm$ 3.0	98.0 $\pm$ 5.7	98.8 $\pm$ 4.9	98 $\pm$ 7.6
Sodium arsenite 0.1 $\mu$ M	101.5 $\pm$ 3.0	103 $\pm$ 2.5	106 $\pm$ 3.0	93.5 $\pm$ 4.2	101 $\pm$ 3.0	94 $\pm$ 6.9
Sodium arsenite 1 $\mu$ M	103 $\pm$ 1.6	94.7 $\pm$ 4.0	97.7 $\pm$ 2.0	102.3 $\pm$ 4.0	101 $\pm$ 3.1	100 $\pm$ 8.8
MCF-7						
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Control	100	100	100	100	100	100
Sodium arsenite 0.01 $\mu$ M	94.5 $\pm$ 1.0	95.3 $\pm$ 1.4	88.8 $\pm$ 3.0	100.8 $\pm$ 2.3	96.8 $\pm$ 3.4	91.5 $\pm$ 2.3
Sodium arsenite 0.1 $\mu$ M	97.5 $\pm$ 0.9	94.5 $\pm$ 2.3	93.5 $\pm$ 2.4	100.5 $\pm$ 3.7	99.2 $\pm$ 4.1	94.3 $\pm$ 1.4
Sodium arsenite 1 $\mu$ M	104.8 $\pm$ 0.9	106 $\pm$ 2.3	106 $\pm$ 4.1	93.2 $\pm$ 2.7	91.3 $\pm$ 3.3	93.3 $\pm$ 0.6

Data are expressed as percentages against the control.

The cytotoxicity was evaluated by MTT assay. Data were analyzed using a two-way ANOVA test, followed by Tukey's *post hoc* test. Data correspond to the mean  $\pm$  SEM of the percentage of cell viability of four independent experiments.



**Fig. 1.** Sodium arsenite induces the proliferation of breast cancer cell lines. The NaAsO<sub>2</sub> effect on cell proliferation was by BrdU incorporation at 24 and 48 h in a) MDA-MB-231, b) MDA-MB-453, c) MCF-7, and d) MCF-12A cells. Mitomycin C and Ara-C were used as a negative control. The bars correspond to the mean  $\pm$  SEM of the absorbance of three independent experiments in duplicate. Data were analyzed using two-way ANOVA, followed by Dunnett's *post hoc* test. Asterisks mean a statistically significant difference vs. control (\* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001, \*\*\*\* P < 0.0001).

to the manufacturer's instructions. Three independent experiments were performed by duplicate.

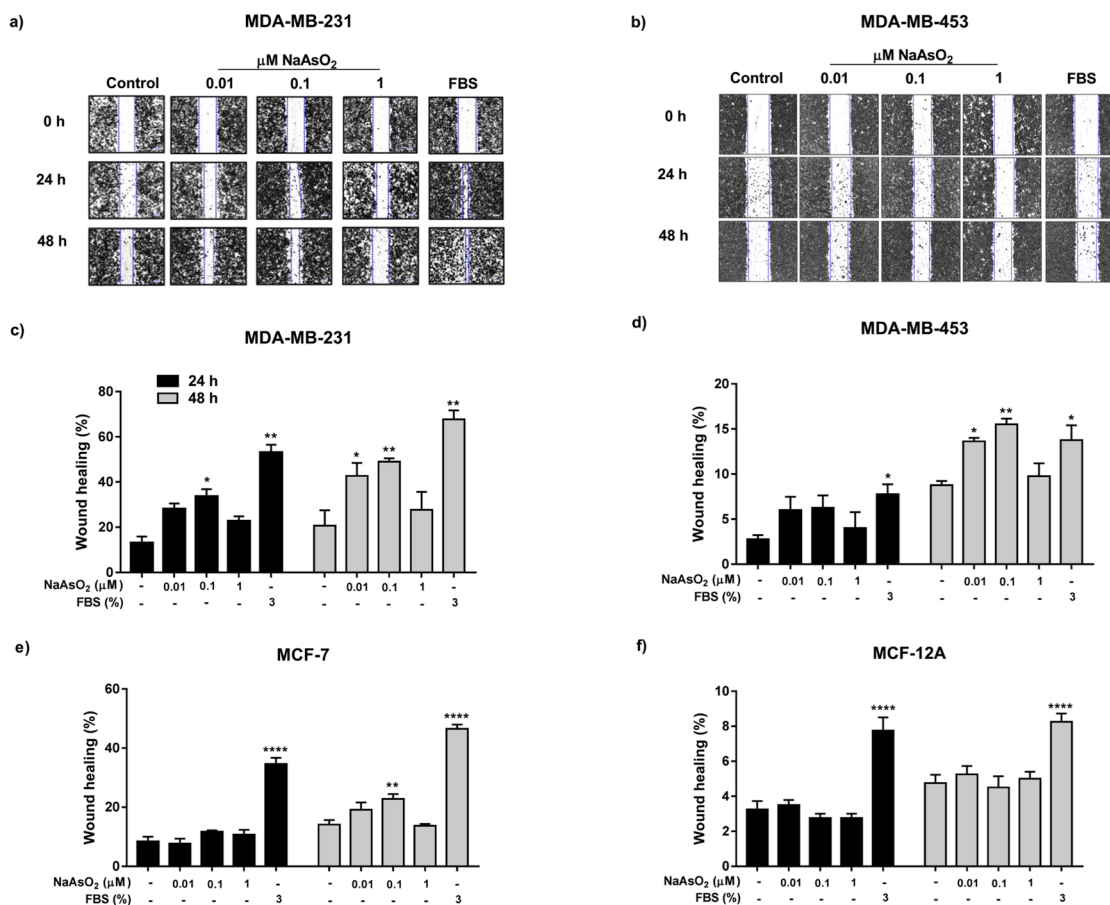
## 2.5. Scratch-wound assay

The cells were grown in 30 mm culture dishes until 95–100 % confluence. Then, MDA-MB-231, MDA-MB-453, and MCF-7 cells were serum-starved for 24 h. MCF-12A cells were serum-starved for 6 h. Two hours before the different treatments, mitomycin C or Ara-C were added to inhibit cell proliferation. After that, the cell monolayer was scratched with a sterile 200  $\mu$ l pipette tip and washed twice with DMEM medium without FBS. Then, cells were incubated with different treatments. The wound healing was evaluated at 0, 24, and 48 h using an Olympus, FSX100 microscope. The scratch-wound closure was quantified using Image J software (NIH, USA), calculating the percentage of wound healing compared to the initial time of the same treatment. Three

independent experiments were performed by duplicate.

## 2.6. Invasion assay

The invasion assay was performed using Matrigel<sup>®</sup> invasion assay in Boyden chambers. Matrigel BD<sup>®</sup> (3 mg/ml) was added to each insert for 2 h at 37 °C to form a semisolid matrix. Cultures were stabilized and serum-starved for 16–18 h. Then, cells were seeded into the insert with 8  $\mu$ m pore size of 24-well plate (Costar, Corning, Inc.) at a density of 1  $\times$  10<sup>6</sup> cell/well. Treatments were added into the lower chamber to the final volume of 600  $\mu$ l during 72 h, medium alone (untreated control) or 5 % FBS (positive control). Cells were fixed with 4 % paraformaldehyde and stained with 0.5 % crystal violet. A swab removed cells on the top surface of the insert. The dye was removed and washed with 30 % acetic acid, and the absorbance at 595 nm was measured. Absorbance was directly proportional to the number of cells that invaded. Four



**Fig. 2.** Sodium arsenite induces the cell migration of breast cancer cells. The cultures were exposed to NaAsO<sub>2</sub> (0.01–1.0 μM), and fetal bovine serum (FBS) used as positive control. Cell migration was evaluated by scratch assay (wound healing) at 0, 24, and 48 h. Representative images of treatment effect on wound healing at different times are in a) MDA-MB-231 cells and b) MDA-MB-453 cells. The percentage of wound healing compared with the initial time (time 0 h) of each treatment are present in c) MDA-MB-231 cells, d) MDA-MB-453 cells, e) MCF-7 cells, and f) MCF-12A cells; bars represent the mean ± SEM of three independent experiments. Note that different scale of the percentage of wound healing is used in each graphic. Data were analyzed using two-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test and T-test with Welch's correction to compare the control group vs. the FBS group. Asterisks indicates statistically significant difference vs. control \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

independent experiments were performed.

## 2.7. Western blot analysis

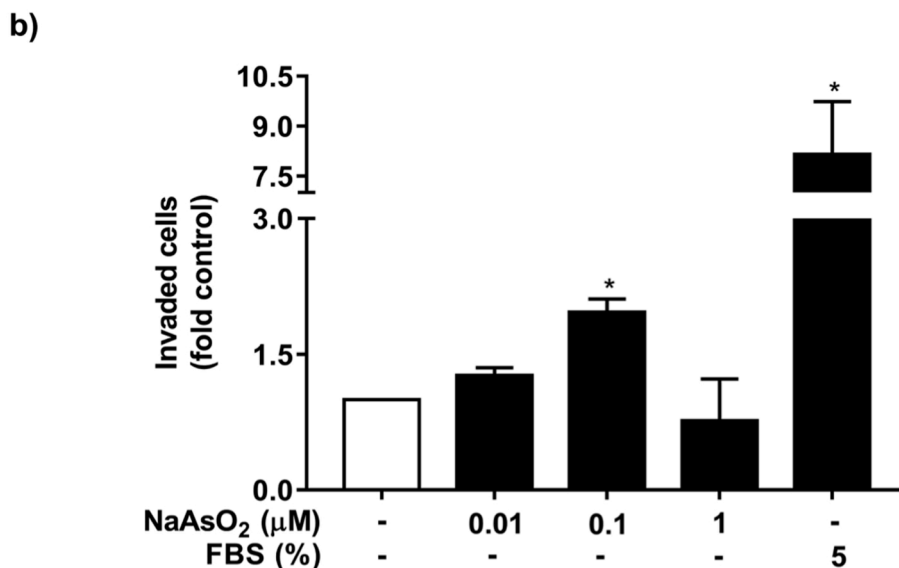
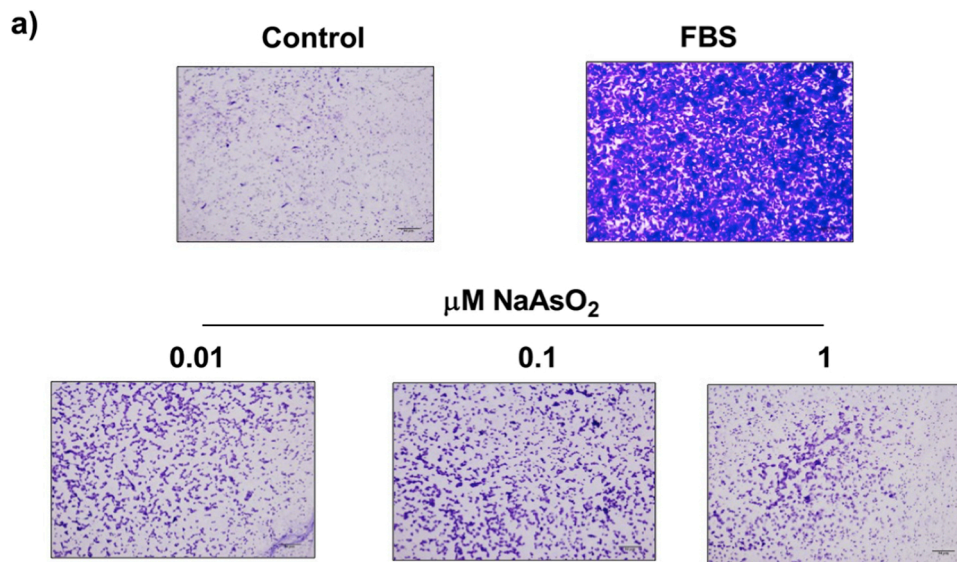
After treatments and times indicated, cell cultures were lysed, separated by sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), electrotransferred, and analyzed by Western blot according to methods previously described (Hernández et al., 2018). Antibodies against-aromatase (MCA2077S) (1:250) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), Src (1:1500) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), p-SrcY419 (1:500) (R&D Systems, Minneapolis, USA), and ERα (sc-787) (1:500) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) were used. β-actin (1:1500) was used as a loading control (kindly donated by Dr. Manuel Hernández, CINVESTAV, Mex). Next, membranes were washed three times with PBS-Tween 1 % and then incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit Ab (1:5000) (Bio-Rad, Hercules CA, USA) or HRP-conjugated anti-mouse Ab (Bio-Rad, Hercules CA, USA, 1:5000) for 2 h at room temperature. After washing three times with PBS-Tween, bands were visualized using Western blotting Luminata™ (Millipore, MA, USA) and X-ray films (Kodak, Palo Alto, CA, USA). Finally, autoradiograms were scanned in a Gene Genius Bio Imaging System (Syngene, USA) and quantified using ImageJ software (NIH, USA). The same membrane was used to detect β-actin as a loading control. Three independent experiments were performed in duplicate.

## 2.8. Aromatase activity determination

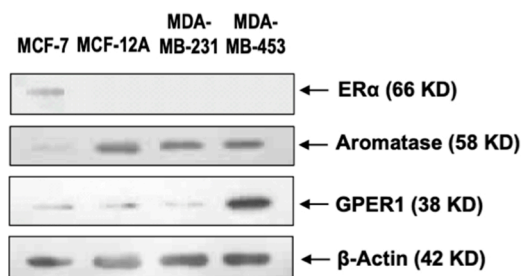
Aromatase activity in MDA-MB-231 cultures was evaluated by quantifying the conversion of testosterone (T) to estradiol (E2). Cells were seeded in six-well tissue culture plates at a density of  $3 \times 10^5$  cells/well. After 24–36 h, the growth medium was replaced with serum-free medium containing the aromatase substrate T (100 nM) (Steraloids Inc., Newport, RI) and the different concentrations of sodium arsenite and incubated for 48 h. Aliquots of the culture media were used to quantify E2 concentrations using an enzyme immunoassay (EIA) kit (Cayman Chemical Co., Ann Arbor, MI) and protein content by the Bradford method (Bradford, 1976). Aromatase activity was expressed as picograms of E2 synthesized per hour per milligram protein.

## 2.9. Immunofluorescence assay

The MDA-MB-231 cells were seeded onto Nunc Lab-Tek™ II chamber slides (Thermo Fisher, SCIENTIFIC, Waltham, MA, USA) and stabilized for 24 h. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min in a wet chamber at 37 °C, permeabilized with 0.1 % Triton X-100 for 10 min at room temperature and blocked with 0.1 % bovine serum albumin (BSA) for 1 h in a wet chamber at 37 °C. Cells were incubated with rabbit anti-GPER1 polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, 1:30) in a wet chamber overnight at 4 °C. After that, cells were incubated with Alexa488-conjugated anti-rabbit-IgG



**Fig. 3.** Sodium arsenite increases the invasion of MDA-MB-231 cells. Cell invasion was determined by the Boyden chamber method modified at 72 h in MDA-MB-231 cells. a) The photographs are representatives of an assay with each treatment with cells stained with crystal violet. b) The graphic represents the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments expressed as the fold of migrated cells in control (unstimulated cells). Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Dunnett's *post hoc* test and T-test with Welch's correction to compare control group vs. FBS group. Asterisks means a statistically significant difference vs. control \*  $P < 0.05$ .

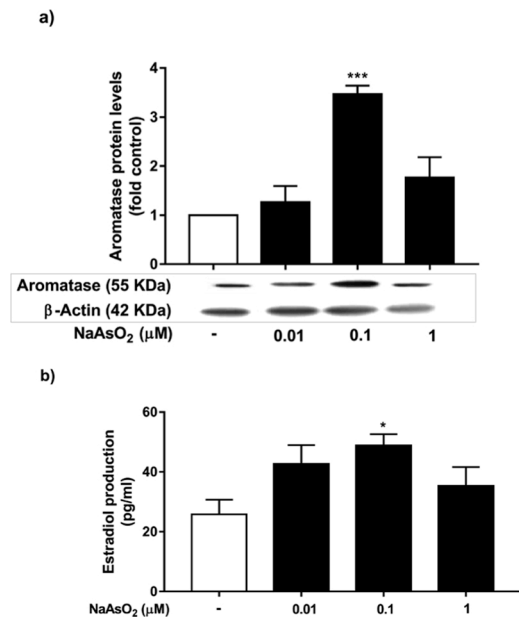


**Fig. 4.** Estrogen receptors and aromatase expression in breast cancer cells. The GPER1 protein, ER $\alpha$  and aromatase evaluated by Western blot with specific antibodies Actin was used as loading control. The blot image corroborates that MCF-12A, MDA-MB-231, and MDA-MB-453 cells did not express ER $\alpha$  but express GPER1 and aromatase. MCF-7 cells were used as positive control of ER $\alpha$  expression. The same membrane was used for all immunodetections.

(Thermo Scientific, Waltham, MA, USA, 1:300) and tetramethylrhodamine B isothiocyanate (TRITC-)phalloidin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, 1:250) for 1 h at 37 °C in a wet chamber. The nuclei were stained with 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, 1:500) for 5 min at room temperature. After each incubation, cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS, 15 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7.4). Then, cells were mounted in Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). The fluorescent images were captured with a confocal laser microscope (TCS SP8, Leica Microsystems).

#### 2.10. Statistical analyses

Data were evaluated using a one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's or Tukey's *post hoc* test, where it was appropriate. A Student's *t*-test was used to compare the control group vs. positive or



**Fig. 5.** Sodium arsenite increases protein levels and enzymatic activity of the aromatase. Evaluation of total levels of aromatase and its activity were in sodium arsenite-treated cells (0.01, 0.1, and 1.0 μM) at indicated times. a) Aromatase protein levels were determined by Western blot at 24 h. The graphic expresses the mean ± SEM of total levels compared to the untreated cells (control) from three independent experiments b) The aromatase activity determined by ELISA kit represents the mean ± SEM of three independent experiments in duplicate; the graphic expresses the fold of activity compared with the control. Data were analyzed using one-way ANOVA, followed by Dunnett's *post hoc* test. Asterisks mean statistically significant difference vs. control \* P < 0.05, \*\*\* P < 0.001.

negative control. Data analyses were performed using Graph Pad Prism version 5.0 (Graph Pad Software, Inc., San Diego CA, USA). P values below 0.05 (p < 0.05) were considered statistically significant.

### 3. Results

#### 3.1. Effect of arsenic exposure on cell viability

In order to determine whether the sodium arsenite concentrations selected were cytotoxic for the cell lines used in this study: BCa cell lines MDA-MB-231, MDA-MB-453, and MCF-7, and a nontumorigenic breast epithelial cell line MCF-12A. The cultures were exposed to 0.01, 0.1, and 1.0 μM of sodium arsenite. Cell viability was determined by MTT assay at 24, 48, and 72 h. The sodium arsenite did not affect the cell viability of MDA-MB-231, MDA-MB-453, MCF-7 BCa lines, neither MCF-12A cells at all concentrations and times evaluated (Table 1).

#### 3.2. Effect of arsenic on cell proliferation

The sodium arsenite (0.01, 0.1, and 1 μM) effect on the proliferation of BCa cells was evaluated at 24 and 48 h. Results showed that in MDA-MB-231 cells, 0.1 and 1 μM of sodium arsenite increased the proliferation (42 and 59 %, respectively) at 24 h and (40 and 48 %, respectively) at 48 h (Fig. 1a). In MDA-MB-453 cells, 0.1 μM sodium arsenite increased the proliferation (27 %) at 24 h (Fig. 1b). In MCF-7 cells, sodium arsenite, at 0.01 and 0.1 μM increased the cell proliferation at 24 h (Fig. 1c). In contrast, sodium arsenite did not increase the MCF-12A cells proliferation at any concentrations and time (Fig. 1d). The mitomycin C or Ara-C used as the negative control, as was expected, inhibited the cell proliferation at 24 h and 48 h. Results suggest that the sodium arsenite is capable of induces proliferation of BCa cells, independently of ERα presence, but did not of nontumorigenic breast epithelial cells.

#### 3.3. Effect of arsenic on migration and cell invasion

Because sodium arsenite increased cell proliferation, we asked the question if sodium arsenite also participates in tumor BCa progression. Thereby, we evaluated the effect of sodium arsenite on the induction of cell migration and invasion. Results showed that in MDA-MB-231 cells, 0.1 μM sodium arsenite-induced migration at 24 and 48 h (61 and 49 %, respectively), and 0.01 μM induced cell migration only after 48 h of exposure (Fig. 2a and c). In MDA-MB-453 cells, 0.01 and 0.1 μM sodium arsenite-induced migration (34 and 44 %, respectively) at 48 h (Fig. 2b and d), but 0.1 μM sodium arsenite-induced migration was similar than migration induced by 0.1 μM sodium arsenite in MDA-MB-231. In MCF-7 cells exposed to 0.1 μM, cell migration was induced at 48 h (Fig. 2e). In MCF-12A cells, sodium arsenite did not induce cell migration at any time and concentrations (Fig. 2f). These data suggest that the sodium arsenite is capable of induces the migration of BCa cells, independently of ERα presence, but did not of nontumorigenic breast epithelial cells.

The effect of sodium arsenite (0.01, 0.1, and 1.0 μM) on cell invasion was evaluated in MDA-MB-231 cell line by the Boyden chamber method, at 72 h of exposure. Results showed that sodium arsenite at 0.1 μM promoted cell invasion (Fig. 3).

#### 3.4. Protein expression of aromatase, GPER1, and ERα in MDA-MB-231, MDA-MB-453, MCF-7, and MCF-12A cell lines

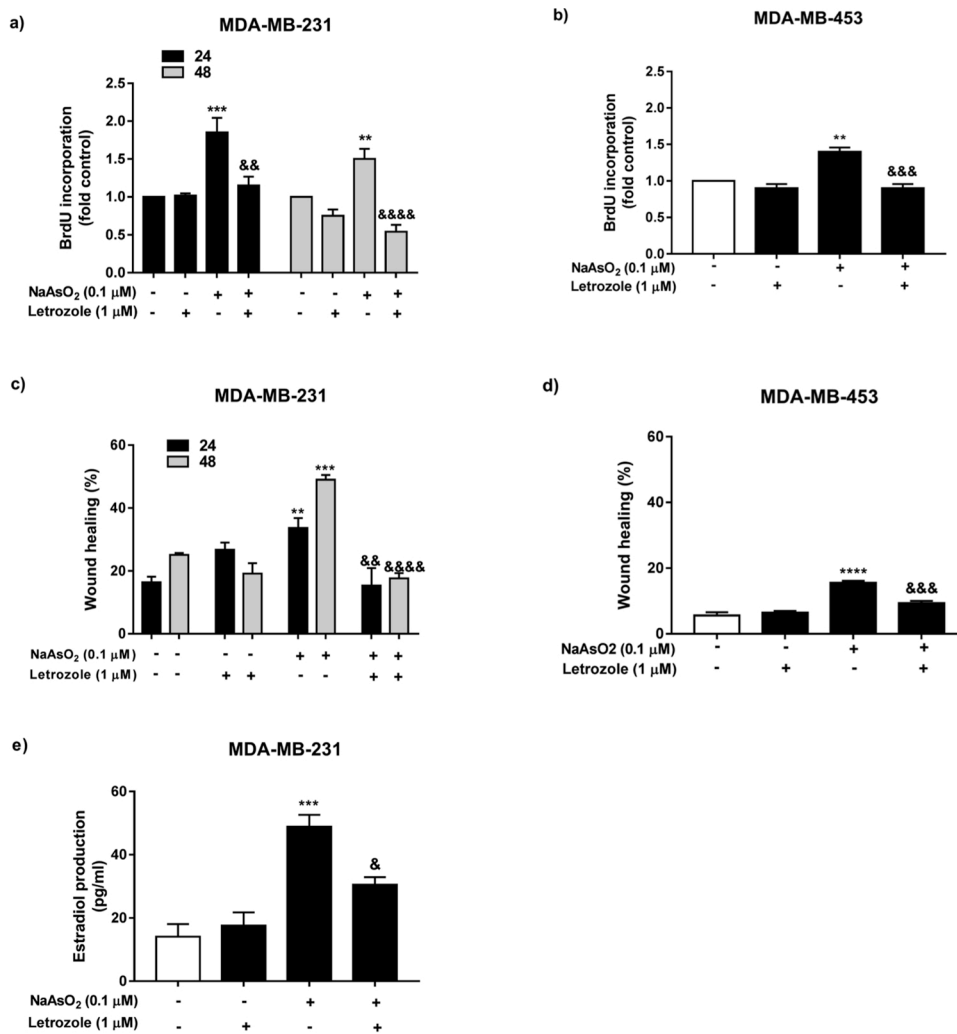
Because the cell lines used in this study belong to different groups according to the molecular classification of BCa, we corroborated the aromatase, GPER1, and ERα expression in the cell lines used. As shown in Fig. 4, aromatase is expressed in all cell lines tested, but the expression was lower in the MCF-7 cell line compared to the other cell lines. The MCF-7 cells express both GPER1 and ERα, whereas MCF-12A, MDA-MB-231, and MDA-MB-453 cells expressed GPER1 but do not express ERα. Notably, MDA-MB-453 line expresses higher GPER1 protein than MDA-MB-231, MCF-7, and MCF-12A.

#### 3.5. Effect of arsenic on aromatase protein level and activity in MDA-MB-231 cell line

It has been reported that the *in situ* aromatase expression and the subsequent estrogen production play an essential role in the stimulation on growth and progression of BCa (Mukhopadhyay et al., 2015; Platet et al., 2004; Gérard and Brown, 2018). For that reason, we evaluated the effect of 0.01, 0.1, and 1.0 μM sodium arsenite on aromatase protein levels and activity, assayed as E2 production in MDA-MB-231 cell line. Results showed that 0.1 μM sodium arsenite significantly increased aromatase protein levels (Fig. 5a) and its enzyme activity (Fig. 5b). Thus, the subsequent assays were performed at 0.1 μM sodium arsenite.

#### 3.6. Aromatase's role in arsenic-induced MDA-MB-231 and MDA-MB-453 cells proliferation and migration

Because of the sodium arsenite-induced proliferation and migration in MDA-MB-231 and MDA-MB-453, both expressing GPER1 and aromatase, but does not ERα, the aromatase role on sodium arsenite-induced cell proliferation and migration was evaluated in cells pretreated with letrozole, a specific aromatase inhibitor. Letrozole prevented the sodium arsenite-induced cell-proliferation in MDA-MB-231 and MDA-MB-453 at times evaluated (Fig. 6a and b, respectively), as well as the sodium arsenite-induced cell-migration of MDA-MB-231 (Fig. 6c), and MDA-MB-453 cells (6d). In MDA-MB-231 cells, the aromatase activity was evaluated through E2 production in the presence of letrozole. Results showed that the aromatase inhibitor reduced the E2 production significantly in these cells (Fig. 6e). These results suggest that sodium arsenite-stimulated cell proliferation and migration in both BCa cell lines require the production of E2



**Fig. 6.** Aromatase participates in sodium arsenite-induced cell proliferation and migration. MDA-MB-231 and MDA-MB-453 cells were treated with letrozole (an aromatase inhibitor) for 2 h before treatment with 0.1 μM sodium arsenite. Cell proliferation by BrdU incorporation is present in a) MDA-MB-231 cells at 24 and 48 h, b) MDA-MB-453 cells at 24 h. Cell migration assays evaluated by wound healing assay are in c) MDA-MB-231 cells at 24 and 48 h, d) MDA-MB-453 cells at 48 h. e) the aromatase activity by estradiol production in MDA-MB-231 cells at 48 h; bars represent the aromatase activity respect of the control (untreated cells). Bars correspond to the mean ± SEM of three independent experiments by duplicate. Data were analyzed using two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test to MDA-MB-231 experiments; One-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test to MDA-MB-453 experiments and aromatase activity assay. Symbols mean statistically significant difference vs. control (\*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001, \*\*\*\*P < 0.0001) or vs. arsenite group (& P < 0.05, && P < 0.01, &&& P < 0.001, &&&& P < 0.0001).

### 3.7. Association of GPER1 pathway with arsenic-induced proliferation, migration, and aromatase activity

In MDA-MB-231 and MDA-MB-453 cells, we determined whether GPER1 had a relationship with the sodium arsenite-induced proliferation and migration. In MDA-MB-231 cells, the G-15, a GPER1-selective antagonist, significantly inhibits the sodium arsenite-induced proliferation (Fig. 7a), and migration (Fig. 7c) at both times tested. In MDA-MB-453 cells, the GPER1 inhibitor prevents the sodium arsenite-induced proliferation (Fig. 7b), and migration (Fig. 7d).

Additionally, we evaluated whether GPER1 had a relationship with the sodium arsenite-induced aromatase activity in MDA-MB-231 cells. Results showed that the GPER1 inhibitor did not affect sodium arsenite-induced aromatase activity (Fig. 7e). All these results suggest that GPER1 participates in sodium arsenite-induced cell proliferation and migration, but not in sodium arsenite-induced aromatase activity.

### 3.8. Association of Src activation with arsenic-induced cell proliferation and aromatase activation

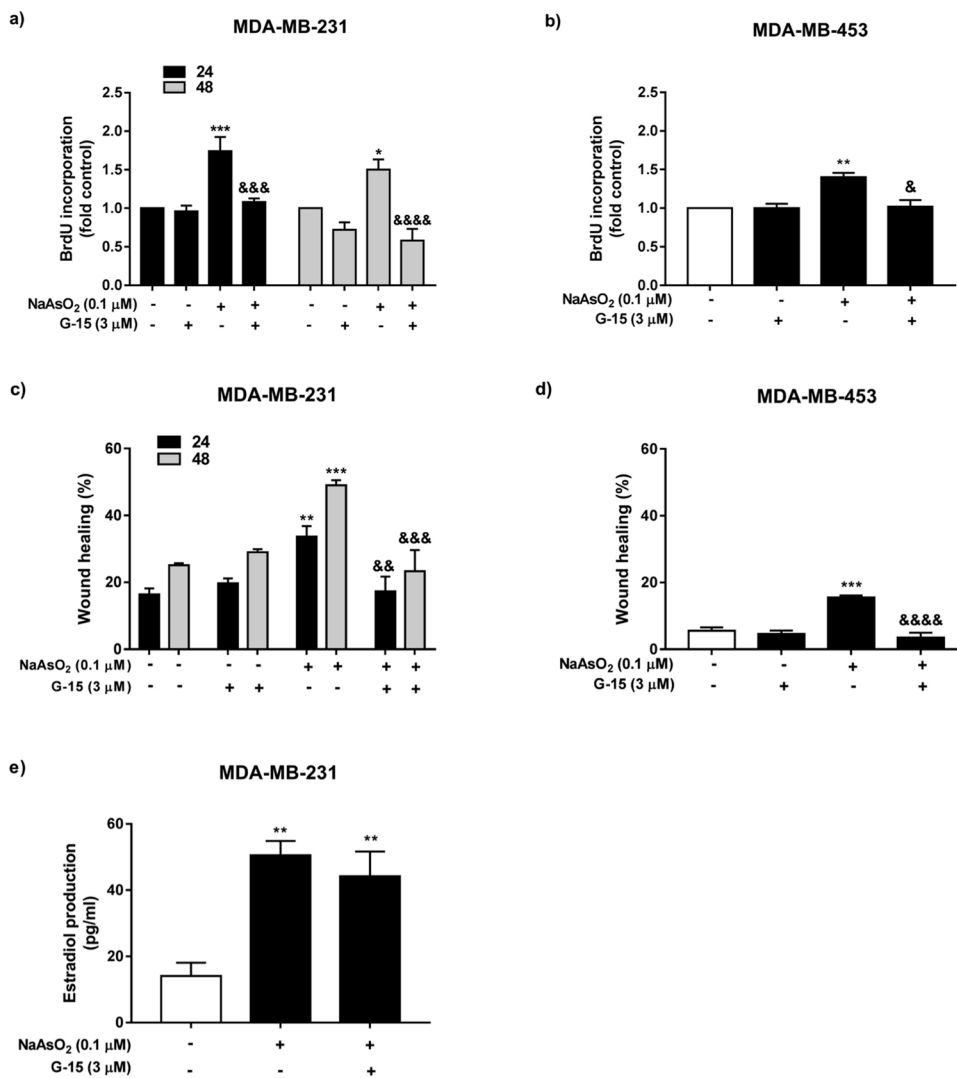
Studies have demonstrated a direct involvement of Src-family protein kinases in cell proliferation, migration, angiogenesis, and metastasis, and it is an essential mediator of GPER1 pathway. Thus, the effect of sodium arsenite on Src activation was analyzed through phosphorylation at Y419 in MDA-MB-231 cell line. Results showed that 0.1 μM of sodium arsenite increased the Src-phosphorylation levels at 5 and 15 min of treatment, and at 30 min, it returned to baseline levels (Fig. 8a,

and b). To determine the specificity of Src phosphorylation signal was used CGP77675 as a SrcY419 phosphorylation inhibitor (Fig. 8a and b). The presence of a GPER1 inhibitor (G-15) showed that at 0.1 μM, sodium arsenite-induced Src-phosphorylation at 15 min was dependent on GPER1 activation (Fig. 8a and 8b). Next, it was determined if Src activation participates in sodium arsenite-induced cell proliferation at 24 and 48 h, observing that the sodium arsenite-stimulated cell proliferation is dependent on Src-activation (Fig. 8c). Because Src was described as a regulator of aromatase activity, we determined the participation of Src on the sodium arsenite-induced aromatase activity. Our result showed that the pretreatment with a specific Src inhibitor avoided the sodium arsenite-induced aromatase activity (Fig. 8d), suggesting that Src is an essential mediator of the effects generated by sodium arsenite in the BCa MDA-MB-231 cell line.

## 4. Discussion

Breast cancer is the second most common cancer worldwide, and the most frequent cancer among women (Ferlay et al., 2015). Several risk factors have been documented, including genetic and endocrine factors in breast cancer etiology; it has been suggested that environmental pollutants and industrialization participate in the disease development and progression (Viñas et al., 2012; White et al., 2019; Byrne et al., 2013). Arsenic exposure is a worldwide environmental health concern and is a carcinogen to different cancer types and hormone-dependent cancers, such as liver, lung, and breast cancer (WHO, 2018; Khanjani et al., 2017). Arsenic is an element widely distributed in the





**Fig. 7.** GPER1 participates in sodium arsenite-stimulated cell proliferation and migration. MDA-MB-231 and MDA-MB-453 cells were treated with a GPER1-selective antagonist G-15 for 2 h before treatment with 0.1 μM sodium arsenite. Cell proliferation by BrdU incorporation is present in a) MDA-MB-231 cells at 24 and 48 h, b) MDA-MB-453 cells at 24 h. Cell migration assays evaluated by wound healing assay are in c) MDA-MB-231 cells at 24 and 48 h, d) MDA-MB-453 cells at 48 h. e) the aromatase activity by estradiol production in MDA-MB-231 cells at 48 h; bars represent the aromatase activity respect of the control (untreated cells). Bars correspond to the mean ± SEM of three independent experiments by duplicate. Data were analyzed using two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test to MDA-MB-231 experiments. One-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test to MDA-MB-453 experiments and aromatase activity assay. Data were analyzed using two-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test to MDA-MB-231 experiments; one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test to MDA-MB-453 experiments and aromatase activity assay. Symbols mean statistically significant difference vs. control (\* P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001) or vs. arsenite group (& P < 0.05, && P < 0.01, &&& P < 0.001, &&&& P < 0.0001).

environment; most people are exposed chronically to a low level of arsenic. The EPA (2001) describes 10 μg/l (10 ppb = 0.13 μM) as the safety limits of arsenic in drinking water. In this study, we used environmentally relevant and not cytotoxic concentrations (0.01, 0.1, and 1 μM) of sodium arsenite, which are into the range of arsenic concentrations found in contaminated drinking water supplies in a large number of countries (International Agency for Research on Cancer, 2012).

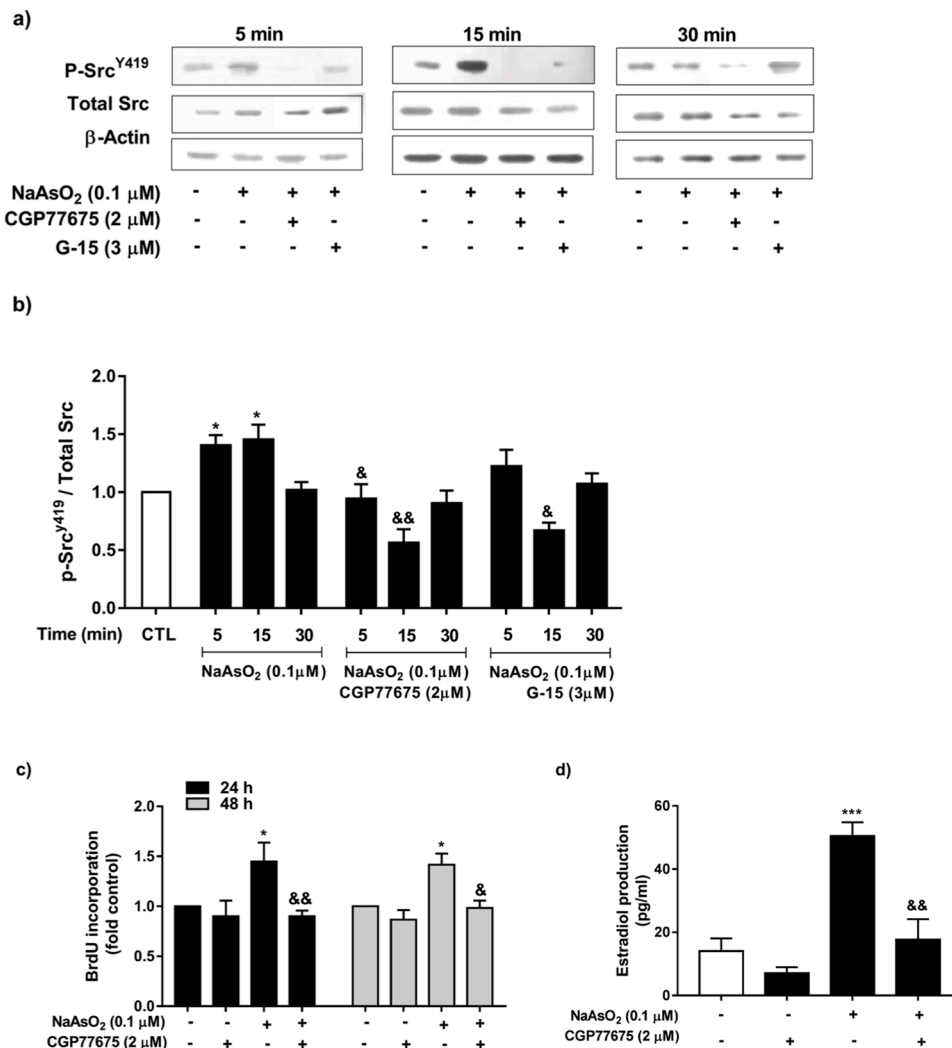
The arsenic carcinogenic molecular mechanisms are not entirely defined. It is suggested that at low levels, arsenic acts as a tumor promoter, inducing intracellular signal transduction, activating transcription factors, and changing the expression of genes involved in cell growth, proliferation, and malignant transformation (Yang and Frenkel, 2002). Our study supports that sodium arsenite exposure, at low concentration (0.1 μM), is a tumor promoter and participates in cancer progression of BCa cells but did not of nontumorigenic breast epithelial cells.

Other studies have reported that sodium arsenite (0.1–1 μM) increased proliferation of BCa cells by its endocrine disruptor ability, altering E2-dependent gene transcription (Stoica et al., 2000; Davey et al., 2007; Nakareangrit et al. 2016). Previously, it was shown that the chronic exposure (24 weeks) to 500 nM of sodium arsenite induces the cancer cell phenotype of the human breast epithelial cell line MCF-10A, concomitantly with overexpression and increasing of aromatase activity, an effect ERα-independent (Xu et al., 2014). On the other hand,

it was reported in the H1793 cell, a cell line from lung adenocarcinoma cells, that sodium arsenite induces cell proliferation through ERα and GPER1 (Huff et al., 2016).

In the present study, were used four cell lines which express aromatase and GPER1. Three of these are BCa cell lines: MDA-MB-231 (ERα<sup>-</sup>PR<sup>-</sup>HER2<sup>-</sup>GPER1<sup>+</sup>), MDA-MB-453 (ERα<sup>-</sup>PR<sup>-</sup>HER2<sup>+</sup>GPER1<sup>+</sup>), and MCF-7 (ERα<sup>+</sup>PR<sup>+</sup>HER2-GPER1<sup>+</sup>); additionally was used a nontumorigenic breast epithelial cell line, MCF-12A (ERα<sup>-</sup>PR<sup>-</sup>HER2<sup>-</sup>GPER1<sup>+</sup>). Data obtained suggest that sodium arsenite is capable of inducing the promotion and progression of BCa cells despite having a different expression of receptors but is not able to induce cell proliferation and migration of nontumorigenic breast epithelial cells despite that this cell line expresses GPER1 and aromatase. However, in MDA-MB-231 line was observed a more persistent effect, unlike the rest of the BCa cell lines. These data could suggest that the expression of other membrane receptors could negatively modulate the sodium arsenite effects. For example, it was suggested that GPER1 acts as a negative regulator of ERα<sup>+</sup> breast cancer cells but promoting the growth of ERα<sup>-</sup> BCa cells (Ariazi et al., 2010).

With these results, we asked the question whether a short time the exposure to environmentally relevant concentrations of sodium arsenite induces promotion and progression of malignant cells by increasing the aromatase activity (and consequently, the E2 production), and what is the role of GPER1 in these effects. For this reason, we used as primary cell model the MDA-MB-231 line, and we compared the results with



**Fig. 8.** Src participates in sodium arsenite-stimulated cell proliferation and aromatase activity. MDA-MB-231 cells treated with 0.1 μM of sodium arsenite, in absence or presence of a p-Src<sup>Y419</sup> phosphorylation inhibitor (CGP77676) and/or a GPER1 inhibitor (G-15). a) Representative Western blot images of the p-Src<sup>Y419</sup> and total Src immunodetection at 5, 15, and 30 min; β-actin was used as a loading control. b) Graphic corresponds to the mean ± SEM from three independent experiments in duplicate and represents the ratio of p-Src<sup>Y419</sup>/c-Src non-phosphorylated at different times. Data were analyzed using one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. c) Cell proliferation by BrdU incorporation; bars show the mean ± SEM of three independent experiments by duplicate. Data were analyzed using two-way ANOVA followed by Dunnett's post hoc test. d) Aromatase activity by E2 production (pg of E2/ml); bars represent the aromatase activity respect of the control (unstimulated cells) at 48 h and represent the mean ± SEM cells of three independent experiments. Data were analyzed using ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Symbols mean statistically significant difference vs. control (\* P < 0.05, \*\*\* P < 0.001), and vs. arsenite group (& P < 0.05, && P < 0.01, &&& P < 0.001).

another BCa cell line, MDA-MD-453, which also express aromatase and GPER1 but not ERα, in order to establish that the effects are not exclusive of a particular BCa cell line.

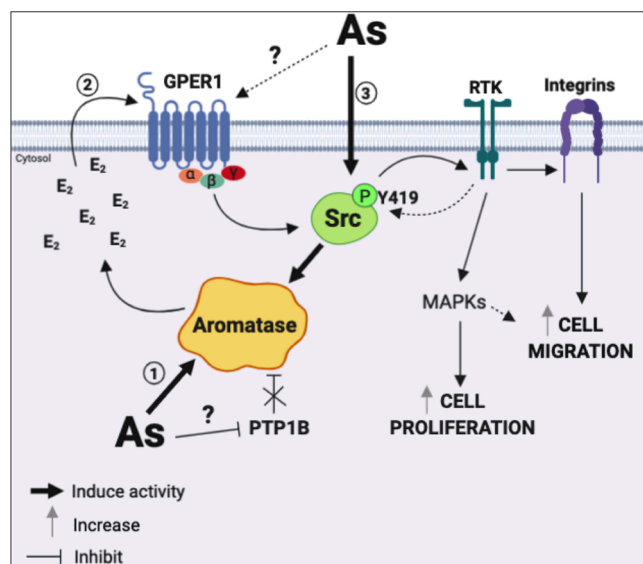
In the MDA-MB-231 cell line, 0.1 μM sodium arsenite induces aromatase protein levels and enzymatic activity. This effect is biologically significant because, during development of BCa and other estrogen-dependent tumors, local estrogen production by aromatase is a mechanism of autocrine stimulation augmenting proliferation, migration, and invasion of tumor cells by binding and activating its receptors (Mukhopadhyay et al., 2015; Sabnis et al., 2011; Kruk and Aboul-Enein, 2006; Key et al., 2002; Kirma et al., 2001). The cell lines MDA-MB-231 and MDA-MD-453 do not express ERα and, for this reason, could be considered as E2-independent BCa type. However, ERα-negative phenotype is acquired through epigenetic modifications that lead to the loss of the expression of ERα (Gajulapalli et al., 2016), but the aromatase expression remains active and the cells can respond to estrogen through another estrogen receptor, the GPER1 (Filardo et al., 2000; Maggiolini et al., 2004; Pandey et al., 2009). The aromatase relevance in BCa has been demonstrated in mice with ERα-negative tumors, in which the administration of AI results in inhibition of tumor growth and lung metastases (Sabnis et al., 2011; Wang et al., 2016).

Using Letrozole, a highly selective AI, (Bhatnagar, 2007; Bhatnagar et al., 2001, 1990; Lang et al., 1993; Miller, 1999) our study showed that 0.1 μM sodium arsenite-induced proliferation and migration of BCa cell lines MDA-MB-231 and MDA-MD-453, requires E2 production. Previous studies demonstrated that environmental chemicals, including

endocrine disruptors, can modulate the expression and activity of aromatase at short times (24 h) through non-genomic mechanism in BCa cells (Kinoshita and Chen, 2003; Kuiper et al., 1998; Han et al., 2010), and it has been reported that aromatase is expressed in BCa tissues independent of ER, PR, and HER2 status (Kanomata et al., 2017). A perspective of this study is determining the molecular mechanisms of aromatase on sodium arsenite-stimulated proliferation, migration, and invasion, and the silencing of the expression of this protein should be useful.

GPER1 mediates rapid estrogen signaling, modulating second messengers and kinase pathways in ERα-positive and -negative BCa cells (Filardo et al., 2000; Maggiolini et al., 2004; Pandey et al., 2009). In our study, we used G-15, a GPER1 selective antagonist that interrupts the GPER1 pathway through the structure similar to its G1 agonist (Dennis et al., 2009; Arterburn et al., 2009; Mendez-Luna et al., 2015; Changyu et al., 2019). Using G-15, our study showed that GPER1 participates in 0.1 μM sodium arsenite-induced cell proliferation and migration in BCa cell lines MDA-MB-231 and MDA-MB-453 cells but not participates in sodium arsenite-induced aromatase activity. The fact that G-15 decreases the sodium arsenite-induced cell proliferation and migration in both cell lines, suggest that the GPER1 activation occurs by E2 binding, which triggers the signaling pathway that stimulates cell proliferation and migration (Fig. 9).

Nevertheless, we observed that the MDA-MB-453 line expresses more GPER1 than MDA-MB-231 cells, and results showed that the sodium arsenite effect was more persistent in MDA-MB-231 cells. These



**Fig. 9.** Proposed mechanism by which sodium arsenite favors the tumor promotion and progression of breast cancer cells. 1) Sodium arsenite increases aromatase activity that can be through PTP inhibition; 2) E2 could be bound and activate GPER1 that triggers crosstalk between RTK and integrins, triggering proliferation, and cell migration-signaling pathways. 3) Sodium arsenite increases Src activation that contributes individually to aromatase activation and consequently, in the E2 release, promoting effects thought GPER1, inducing positive feedback of breast tumor progression.

data suggest that the GPER1 role is not dependent on its quantity express but is more dependent on the E2 produced. Huff et al. (2016) showed that sodium arsenite activates the GPER1 pathway; however, it is not possible to discard the idea that the activation can also occur by direct interaction of sodium arsenite with GPER1 since it was reported that sodium arsenite activates ER $\alpha$  through an interaction with the hormone-binding domain of the receptor (Stoica et al., 2000).

In SKBR3 cells, an ER $\alpha$ <sup>-</sup> GPER1<sup>+</sup> BCa line, it has been reported that aromatase expression occurs via GPER1, which enhances the recruitment of the c-fos/c-jun complex to the AP-1 motifs within the promoter gene of aromatase (Catalano et al., 2014). We observed that the GPER1 inhibition with G-15 did not affect the sodium arsenite-stimulated aromatase activity, suggesting that sodium arsenite-induced aromatase activity is independent of the GPER1 activation. Nevertheless, activation of the GPER1 pathway could participate in the up-regulation of aromatase protein levels induced by sodium arsenite. GPER1 pathway activation also results in the G $\alpha$  release from the heterotrimeric G-protein complex that activates adenylyl cyclase. Then, adenylyl cyclase activates PKA, which in turn activates CREB (the cyclic AMP-regulatory binding-protein) that can bond to CRE DNA sequences in aromatase promoter gene, inducing the aromatase expression (Girgert et al., 2017).

Catalano et al. (2009) and Barone et al. (2012) reported that aromatase activity depends on posttranslational modifications, such as phosphorylation/dephosphorylation processes. Src phosphorylates the Y<sup>361</sup> residue of the aromatase, upregulating its enzymatic activity (Catalano et al., 2009), while PTP1B (protein tyrosine phosphatase 1B) dephosphorylates the same residue on aromatase, reducing the enzymatic activity. Our results showed that sodium arsenite transiently increases Src-Y<sup>419</sup> phosphorylation (5 and 15 min, and at 30 min return to baseline), reflecting its activation status. When using a specific phosphorylation inhibitor of Y<sup>419</sup> residue, we corroborated that Src is a target of sodium arsenite and that the sodium arsenite-induced aromatase activity is dependent on this Src activation. Next, we evaluated the GPER1 participation on Src activation, and we observed that GPER1 participates in sodium arsenite-induced Src activation only at 15 min of

exposure. Our results demonstrated that Src participates in sodium arsenite-induced cell proliferation. Zhou et al. (2018) reported that, in a GPCRs independent event, Src promotes the phosphorylation and activation of RTKs (like HER2), which in turn induces sustained phosphorylation of Src, generating a positive-feedback loop that triggers cell proliferation, migration, and transformation in sodium arsenite-treated human uroepithelial cells. These results are in agreement with our data showing that sodium arsenite-induced MDA-MB-231 cell proliferation is involved in Src-activation. The authors suggested that sodium arsenite-induced Src activation may occur by 1) direct arsenic reactivity on Src sulfhydryl; 2) by cellular integrins rearrangements induced by arsenic accumulation in the extracellular matrix and Src activation, or 3) by ROS production (Simeonova and Luster, 2002). Independently, it has been observed in MDA-MB-231 cells that Src induces Cyclin D1 expression, a critical cell-cycle regulator that controls the G0/G1 progression and contributes to cell proliferation through the STAT5 pathway, in an EGFR-independent manner (Zhang et al., 2012). This event may explain the proliferation and progression effect promoted by aromatase in a GPER1-independent manner, in addition to the activation of Src through the GPER1-signaling pathway.

In conclusion, our results strongly suggest that sodium arsenite, at environmentally relevant concentrations (0.1  $\mu$ M), can stimulate cancer promotion and progression of BCa cells through the increment of aromatase activity, and consequently of E2 levels. Using highly specific inhibitors for GPER1 and Src, it was established that sodium arsenite induces E2 levels via aromatase activation, which is at least partly dependent on Src stimulation but GPER1 independent. Sodium arsenite-induced Src activation contributes to both augmentations of E2 production and estrogen-promoted cell proliferation. Altogether, the data suggest that sodium arsenite induces a positive-feedback loop, resulting in the promotion and progression of breast tumors through induction of aromatase activity, E2 production, GPER1 stimulation, and Src activation (Fig. 9). However, the primary mechanism to sodium arsenite induces aromatase activity, and Src phosphorylation remains to define in further studies.

#### Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgments

The authors thank Dr. J.E. Pérez-Salazar and Dr. L. Vega for helpful discussions and for critical reading of the manuscript, and Dr. P. Cortes-Reynosa for technical assistance. This study was funded by a grant from the National Council for Science and Technology (Conacyt acronym in Spanish) (152491 and 32913).

#### References

- Aballay, L., Díaz, M., Francisca, F., Muñoz, S., 2012. Cancer incidence and pattern of arsenic concentration in drinking water wells in Córdoba, Argentina. *Int. J. Environ. Health Res.* 22 (3), 220–231.
- Ariazi, E.A., Brailoiu, E., Yerrum, S., Shupp, H.A., Sliker, M.J., Cunliffe, H.E., et al., 2010. The G protein-coupled receptor GPR30 inhibits proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Cancer Res.* 70 (3).
- Arterburn, J.B., Oprea, T.I., Prossnitz, E.R., Edwards, B.S., Sklar, L.A., 2009. Discovery of selective probes and antagonists for G protein-coupled receptors FPR/FPRL1 and GPR30. *Curr. Top. Med. Chem.* 9 (13), 1227–1236.
- Baastrop, R., Sørensen, M., Balstrøm, T., Frederiksen, K., Langtofte Larsen, C., Tjønneland, A., et al., 2008. Arsenic in drinking water and risk for cancer in Denmark. *Environ. Health Perspect.* 116 (2), 231–237.
- Barone, I., Giordano, C., Malivindi, R., Lanzino, M., Rizza, P., Casaburi, I., et al., 2012. Estrogens and PTP1B function in a novel pathway to regulate aromatase enzymatic activity in breast cancer cells. *Endocrinology* 153, 5157–5166.
- Bhatnagar, A.S., 2007. The discovery and mechanism of action of letrozole. *Breast Cancer Res. Treat.* 105, 7–17.

- Bhatnagar, A.S., Häusler, A., Schieweck, K., Lang, M., Bowman, R.M., 1990. Highly selective inhibition of estrogen biosynthesis by CGS 20267, a new non-steroidal aromatase inhibitor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 37 (6), 1021–1027.
- Bhatnagar, A.S., Brodie, A.M., Long, B.J., Evans, D.B., Miller, W.R., 2001. Intracellular aromatase and its relevance to the pharmacologic efficacy of aromatase inhibitors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 76 (1–5), 199–202.
- Bodwell, J.E., Kingsley, L.A., Hamilton, J.W., 2004. Arsenic at very low concentrations alters glucocorticoid receptor (GR)-mediated gene activation but not GR-mediated gene repression: complex dose-response effects are closely correlated with levels of activated GR and require a functional GR DNA binding domain. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 1064–1076.
- Bodwell, J.E., Gosse, J.A., Nomikos, A.P., Hamilton, J.W., 2006. Arsenic disruption of steroid receptor gene activation: complex dose-response effects are shared by several steroid receptors. *Chem. Res. Toxicol.* 19, 1619–1629.
- Bradford, M., 1976. Method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Brodie, A., Njar, V., 1996. Aromatase inhibitors and breast cancer. *Semin. Oncol.* 23, 10–20.
- Bulun, S.E., Sebastian, S., Takayama, K., Suzuki, T., Sasano, H., Shozu, M., 2003. The human CYP19 (aromatase P450) gene: update on physiologic roles and genomic organization of promoters. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 86, 219–224.
- Byrne, C., Divekar, S.D., Storchan, G.B., Parodi, D.A., Martin, M.B., 2013. Metals and breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 18 (1), 63–73.
- Catalano, S., Barone, I., Giordano, C., Rizza, P., Qi, H., Gu, G., et al., 2009. Rapid estradiol/ERA signaling enhances aromatase enzymatic activity in breast cancer cells. *Mol. Endocrinol.* 23, 1634–1645.
- Catalano, S., Giordano, C., Panza, S., Chemi, F., Bonofiglio, D., Lanzino, M., et al., 2014. Tamoxifen through GPER upregulates aromatase expression: a novel mechanism sustaining tamoxifen-resistant breast cancer cell growth. *Breast Cancer Res. Treat.* 146, 273–285.
- Changyu, L., Yongde, L., Sheng, F., Xiangning, F., Jing, X., Sheng, Z., et al., 2019. G-protein-coupled estrogen receptor antagonist G15 decreases estrogen-induced development of non-small cell lung cancer. *Oncol. Res. Featur. Preclin. Clin. Cancer Ther.* 27 (3), 283–292.
- Chen, Y., Wang, J., Hong, D.-Y., Chen, L., Zhang, Y.-Y., Xu, Y.-N., et al., 2017. Baicalein has protective effects on the 17 $\beta$ -estradiol-induced transformation of breast epithelial cells. *Oncotarget* 8 (6), 10470–10484.
- Davey, J., Bodwell, J., Gosse, J., Hamilton, J., 2007. Arsenic as an endocrine disruptor: effects of arsenic on estrogen receptor-mediated gene expression in vivo and in cell culture. *Toxicol. Sci.* 98 (1), 75–86.
- Dennis, M.K., Burai, R., Ramesh, C., Petrie, W.K., Alcon, S.N., Nayak, T.K., et al., 2009. In vivo effects of a GPR30 antagonist. *Nat. Chem. Biol.* 5 (6), 421–427.
- EPA, 2001. United States Environmental Protection Agency, EPA. Obtained of Drinking Water Requirements for States and Public Water Systems. <http://www.epa.gov/dwreginfo/drinking-water-arsenic-rule-history>.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., et al., 2015. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int. J. Cancer* 136, 359–386.
- Filardo, E.J., Quinn, J.A., Bland, K.I., Frackelton, A.R., 2000. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol. Endocrinol.* 14 (10), 1649–1660.
- Filardo, E., Quinn, J., Frackelton, A., Bland, K., 2002. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol. Endocrinol.* 16, 70–84.
- Filardo, E.J., Graeber, C.T., Quinn, J.A., Resnick, M.B., Giri, D., DeLellis, R.A., et al., 2006. Distribution of GPR30, a seven membrane-spanning estrogen receptor, in primary breast cancer and its association with clinicopathologic determinants of tumor progression. *Clin. Cancer Res.* 12 (21), 6359–6366.
- Gajulapalli, V.N., Malisetty, V.L., Chitta, S.K., Manavathi, B., 2016. Oestrogen receptor negativity in breast cancer: a cause or consequence? *Biosci. Rep.* 36.
- Garland, M., Morris, S., Colditz, G.A., Stampfer, M.J., Spate, V.L., Baskett, C.K., et al., 1996. Toenail trace element levels and breast Cancer: a prospective study. *Am. J. Epidemiol.* 144 (7), 653–660.
- Gérard, C., Brown, K.A., 2018. Obesity and breast cancer e Role of estrogens and the molecular underpinnings of aromatase regulation in breast adipose tissue. *Mol. Cell. Endocrinol.* 466, 15–30.
- Girgert, R., Emons, G., Gründker, C., 2017. 17 $\beta$ -estradiol-induced growth of triple-negative breast cancer cells is prevented by the reduction of GPER expression after treatment with gefitinib. *Oncol. Rep.* 37, 1212–1218.
- Han, E.H., Kim, H.G., Hwang, Y.P., Choi, J.H., Im, J.H., Park, B., et al., 2010. The role of cyclooxygenase-2-dependent signaling via cyclic AMP response element activation on aromatase up-regulation by o,p'-DDT in human breast cancer cells. *Toxicol. Lett.* 198, 331–341.
- Hernández, J.A., Reyes, L., Albores-García, D., Gómez, R., Calderón-Aranda, E.S., 2018. MeHg affects the activation of FAK, Src, Rac1 and Cdc42, critical proteins for cell movement in PDGF-stimulated SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Toxicology* 394, 35–44.
- Holliday, D.L., Speirs, V., 2011. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res.* 13 (215).
- Huff, M., Todd, S., Smith, A., Elpers, J., Smith, A., Murphy, R., et al., 2016. Arsenite and cadmium activate MAPK/ERK via membrane estrogen receptors and G-protein coupled estrogen receptor signaling in human lung adenocarcinoma cells. *Toxicol. Sci.* 152, 62–71.
- International Agency for Research on Cancer, 2012. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, France.
- Kanomata, N., Matsuura, S., Nomura, T., Kurebayashi, J., Mori, T., Kitawaki, J., et al., 2017. Preparation of a novel antiserum to aromatase with high affinity and specificity: its clinicopathological significance on breast cancer tissue. *PLoS One* 12 (5).
- Key, T., Appleby, P., Reeves, G., Group, E.H., 2002. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal: reanalysis of nine prospective studies. *J. Natl. Cancer Inst.* 94, 606–616.
- Khanjani, N., Jafarnejad, A.-B., Tavakkoli, L., 2017. Arsenic and breast cancer: a systematic review of epidemiologic studies. *Rev. Environ. Health* 32, 267–277.
- Kinoshita, Y., Chen, S., 2003. Induction of aromatase (CYP19) expression in breast cancer cells through nongenomic action of estrogen receptor  $\alpha$ . *Cancer Res.* 63, 3546–3555.
- Kirma, N., Gill, K., Mandava, U., Tekmal, R.R., 2001. Overexpression of aromatase leads to hyperplasia and changes in the expression of genes involved in apoptosis, cell cycle, growth, and tumor suppressor functions in the mammary glands of transgenic mice. *Cancer Res.* 61, 1910–1918.
- Krishnan, A.V., Swami, S., Peng, L., Wang, J., Moreno, J., Feldman, D., 2010. Tissue-selective regulation of aromatase expression by calcitriol: implications for breast cancer therapy. *Endocrinology* 151, 32–42.
- Kruk, J., Aboul-Enein, H., 2006. Environmental exposure and other behavioral risk factors in breast cancer. *Curr. Cancer Ther. Rev.* 2, 3–21.
- Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., Van der Saag, P.T., et al., 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor b. *Endocrinology* 139 (10).
- Lang, M., Batzl, C., Furet, P., Bowman, R., Häusler, A., Bhatnagar, A., 1993. Structure-activity relationships and binding model of novel aromatase inhibitors. *The Journal of Steroids Biochemistry and Molecular Biology* 44, 421–428.
- Lee Hinwood, A., Jolley, D.J., Sim, M., 1999. Cancer incidence and high environmental arsenic concentrations in rural populations: results of an ecological study. *Int. J. Environ. Health Res.* 9 (2), 131–141.
- Liu, R., Nelson, D., Hurley, S., Hertz, A., Reynolds, P., 2015. Residential exposure to estrogen disrupting hazardous air pollutants and breast cancer risk. *The California teachers study. Epidemiology* 26 (3), 365–373.
- López-Carrillo, L., Hernández-Ramírez, R., Gandolfi, A., Ornelas-Aguirre, J., Torres-Sánchez, L., Cebrian, M., 2014. Arsenic methylation capacity is associated with breast cancer in northern Mexico. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 280, 53–59.
- Lu, Q., Nakamura, J., Savinov, A., Yue, W., Weisz, J., Dabbs, D.J., et al., 1996. Expression of aromatase protein and messenger ribonucleic acid in tumor epithelial cells and evidence of functional significance of locally produced estrogen in human breast cancers. *Endocrinology* 137 (7), 3061–3068.
- Maggiolini, M., Vivacqua, A., Fasanella, G., Recchia, A.G., Sisci, D., Pezzi, V., et al., 2004. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17-estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 279 (26), 27008–27016.
- Marciniak, W., Derkacz, R., Muszynska, M., Baszuk, P., Gronwald, J., Huzarski, T., et al., 2019. Blood arsenic levels and the risk of familial breast cancer in Poland. *Int. J. Cancer.* <https://doi.org/10.1002/ijc.32595>.
- Mendez-Luna, D., Martínez-Archundia, M., Marouf, R.C., Ceballos-Reyes, G., Fragos-Vázquez, M., González-Juárez, D., et al., 2015. Deciphering the GPER/GPR30-agonist and antagonists interactions using molecular modeling studies, molecular dynamics, and docking simulations. *J. J. Biomolecular Structure & Dynamics* 2161–2172.
- Miller, W., 1999. Biology of aromatase inhibitors: pharmacology/endocrinology within the breast. *Endocr. Relat. Cancer* 6 (73), 187–195.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Mukhopadhyay, K., Liu, Z., Bandyopadhyay, A., Kirma, N.B., Tekmal, R., Wang, S., et al., 2015. Aromatase expression increases the survival and malignancy of estrogen receptor positive breast cancer cells. *PLoS One* 10, 121–136.
- Nakareangrit, W., Thiantanawat, A., Visitonthachai, D., Watcharasi, P., Satayavivad, J., 2015. Sodium arsenite inhibited genomic estrogen signaling but induced pERa (ser118) via MAPK pathway in breast cancer cells. *Environ. Toxicol.*
- Pandey, D.P., Lappano, R., Albanito, L., Madeo, A., Maggiolini, M., Picard, D., 2009. Estrogenic GPR30 signaling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF. *EMBO J.* 28, 523–532.
- Pineda-Belmontes, C., Hernández-Ramírez, R.U., Hernández-Alcaraz, C., Cebrián, M.E., López-Carrillo, L., 2016. Genetic polymorphisms of PPAR gamma, arsenic methylation capacity and breast cancer risk in Mexican women. *Salud Pública Mex* 58 (2), 220–227.
- Platet, N., Cathiard, A.M., Gleizes, M., Garcia, M., 2004. Estrogens and their receptors in breast cancer progression: a dual role in cancer proliferation and invasion. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 51, 55–67.
- Sabnis, G.J., Goloubeva, O., Chumsri, S., Nguyen, N., Sukumar, S., Brodie, A.M., 2011. Functional activation of the estrogen receptor- $\alpha$  and aromatase by the HDAC inhibitor, entinostat, sensitizes of ER-negative tumors to letrozole. *Cancer Res.* 71 (5), 1893–1903.
- Simeonova, P.P., Luster, M.I., 2002. Arsenic carcinogenicity: relevance of c-Src activation. *Mol. Cell. Biochem.* 277–282.
- Simpson, E.R., Mahendroo, M.S., Means, G.D., Kilgore, M.W., Hinshelwood, M.M., Graham-Lorence, S., et al., 1994. Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr. Rev.* 15 (3), 342–355.
- Steiman, J., Peralta, E., Louis, S., Kamel, O., 2013. Biology of the estrogen receptor, GPR30, in triple-negative breast cancer. *Am. J. Surg.* 206, 698–703.
- Stoica, A., Pentecost, E., Martin, M.B., 2000. Effects of arsenite on estrogen receptor- $\alpha$  expression and activity in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 141 (10), 3595–3602.
- Sweeney, M.F., Sonnenschein, C., Soto, A.M., 2018. Characterization of MCF-12A cell phenotype, response to estrogens, and growth in 3D. *Cancer Cell International* 18 (43).
- Viñas, R., Jeng, Y.-J., Watson, C., 2012. Non-genomic effects of xenoestrogens mixtures.

- Environ. res. public health 9, 2694–2714.
- Vu, V., Navalkar, N., Wei, Y., 2019. Endocrine-disrupting metals in ambient air and female breast cancer incidence in US. *Gynecol. Endocrinol.* 1–4.
- Wang, W., Belosay, A., Yang, X., Hartman, J.A., Song, H., Iwaniec, U.T., et al., 2016. Effects of letrozole on breast cancer micro-metastatic tumor growth in bone and lung in mice inoculated with murine 4T1 cells. *Clin. Exp. Metastasis* 33 (5), 475–485.
- White, A.J., O'Brien, K.M., Niehoff, N.M., Carroll, R., Sandler, D.P., 2019. Metallic air pollutants and breast cancer risk in a nationwide cohort study. *Epidemiology* 30, 20–28.
- WHO, W. A. (2018). World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs372/en/>.
- Xu, Y., Tokar, E.J., Waalkes, M.P., 2014. Arsenic-induced cancer cell phenotype in human breast epithelia is estrogen receptor-independent but involves aromatase activation. *Arch. Toxicol.* 88, 263–274.
- Yang, C., Frenkel, K., 2002. Arsenic-mediate cellular signal transduction, transcription factor activation, and aberrant gene expression: implications in carcinogenesis. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 21 (4), 331–342.
- Yu, T., Liu, M., Luo, H., Wu, C., Tang, X., Tang, S., et al., 2014. GPER mediates enhanced cell viability and motility via non-genomic signaling induced by 17 $\beta$ -estradiol in triple-negative breast cancer cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 143, 392–403.
- Yue, W., Zhou, D., Chen, S., Brodie, A., 1994. A new nude mouse model for post-menopausal breast cancer using MCF-7 cells transfected with the human aromatase gene. *Cancer Res.* 54, 5092–5095.
- Yue, W., Wang, J.-P., Conaway, M., Li, Y., Santen, R., 2003. Adaptive hypersensitivity following long-term estrogen deprivation: involvement of multiple signal pathways. *J. Steroids Biochem. Mol. Biology* 86, 265–274.
- Zhang, X., Ding, L., Kang, L., Wang, Z.-Y., 2012. Estrogen receptor-alpha 36 mediates mitogenic antiestrogen signaling in ER-negative breast cancer cells. *PLoS One* 7 (1).
- Zhou, Q., Jin, P., Liu, J., Wang, F., Xi, S., 2018. HER2 and Src co-regulate proliferation, migration and transformation by downstream signaling pathways in arsenite-treated human uroepithelial cells. *Metallomics* 10, 1141–1159.