



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

**UNIDAD ZACATENCO
Departamento de Toxicología**

**“Efecto de la exposición al BPA en la invasión/metástasis y expresión de GPER
en un modelo *in vitro* y en un modelo murino de cáncer de mama”**

T E S I S

Que Presenta

L.F. Pablo Ismael Torres Alamilla

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

En la especialidad de

TOXICOLOGÍA

Directores de tesis:

Dra. María del Rocío Gómez Ortega

Dr. José Eduardo Pérez Salazar

Ciudad de México

Agosto 2022

Este trabajo se realizó en el Departamento de Toxicología (Laboratorio 14) y en el Departamento de Biología Celular (Laboratorio 42) del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la tutoría de la Dra. María del Rocío Gómez Ortega y el Dr. José Eduardo Pérez Salazar. Durante el desarrollo de esta investigación se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través de la beca de maestría, No 1076935

AGRADECIMIENTOS

A mis directores de tesis, a la Dra. Ma. del Rocío Gómez Ortega, por confiar en mí desde mi ingreso a la maestría y darme la oportunidad de integrarme a un proyecto muy particular de mi agrado, así como por sus enseñanzas y aportaciones a mi formación profesional. Al Dr. José Eduardo Pérez Salazar por abrirme las puertas de su laboratorio, por el tiempo, apoyo y enseñanzas que me brindó durante mi estancia en su laboratorio para poder realizar todas las actividades que se propusieron.

Al Dr. Pedro Cortés Reynosa por su asistencia técnica y contribuir ampliamente a mi formación académica.

A mis asesores de tesis Dra. Emma S. Calderón Aranda, Dra. María Isabel Hernández Ochoa y Dra. Libia Vega Loyo por sus aportaciones muy acertadas que contribuyeron al desarrollo de este trabajo.

A mis padres y a mis hermanos, pues siempre conté con su apoyo en todos los aspectos, su apoyo fue un factor muy importante para poder alcanzar este logro.

A Desiree por animarme siempre a continuar y por haberme brindado su apoyo durante los momentos clave de la maestría, muchas gracias.

A mis compañeros, Karem, Rocío, Kevin, María José y Miao Ling por su gentileza, sus consejos y todo el enorme apoyo que me brindaron durante mi estancia en el Cinvestav.

A la Biol. Ivonne Grisel Sánchez cervantes y a la técnico académica María José Gómora Herrera por su asesoría en la técnica de inmunofluorescencia, observaciones de muestra y captura de micrografías en un microscopio confocal en la unidad de microscopía de la Facultad de Medicina de la UNAM.

Contenido

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Cáncer de mama	5
1.1.1 Generalidades del cáncer de mama	5
1.1.2 Epidemiología del cáncer de mama	6
1.1.3 Cáncer de mama triple negativo	7
1.1.4 Supervivencia del cáncer de mama triple negativo	8
1.1.5 Factores de riesgo para el cáncer de mama	9
1.2 Disruptores endócrinos	10
1.2.1 BPA	11
1.2.2 Toxicocinética	12
1.2.3 Efectos del BPA en la salud	13
1.3 GPER	14
1.3.1 Características generales	14
1.3.2 GPER y su papel en el cáncer de mama	15
1.4 JUSTIFICACIÓN	17
1.5 HIPÓTESIS	19
1.6 OBJETIVOS	19
1.6.1 Objetivo General	19
1.6.2 Objetivos particulares	19
2. METODOLOGÍA	20
2.1 Diseño experimental	20

2.2 Cultivo celular	23
2.3 Métodos modelo <i>in vitro</i>	23
2.3.1 Determinación de la citotoxicidad del BPA por citometría de flujo	23
2.3.1.1 Fundamento de la técnica	23
2.3.1.2 Procedimiento	23
2.3.2 Análisis de migración celular por el método de rayadura	24
2.3.2.1 Fundamento de la técnica	24
2.3.2.2 Procedimiento	24
2.3.3 Análisis de invasión celular en cámaras “transwell” modificadas con matrigel	25
2.3.3.1 Fundamento de la técnica	25
2.3.3.2 Procedimiento	25
2.3.4 Determinación del efecto del BPA en la expresión de la proteína de GPER.	26
2.3.4.1 Fundamento de la técnica	26
2.3.4.2 Procedimiento	26
2.3.5 Análisis de la secreción de MMPs por Western blot.....	27
2.3.5.1 Procedimiento	27
2.3.6 Análisis de la secreción de MMPs por zimografía	27
2.3.6.1 Fundamento de la técnica	27
2.3.6.2 Procedimiento	28
2.3.7 Análisis de la localización celular de GPER por inmunofluorescencia.....	28
2.3.7.1 Fundamento de la técnica	28
2.3.7.2 Procedimiento	29
2.4 Modelo <i>in vivo</i>	30
2.5 Métodos modelo <i>in vivo</i>	30

2.5.1 Administración de BPA en ratones Balb/cJ	30
2.5.2 Inoculación de células cancerosas 4T1 en ratones Balb/cJ.	31
2.5.3 Determinación del crecimiento tumoral.	31
2.5.4 Determinación de tumores secundarios (metástasis).....	32
2.6 Análisis estadístico.	32
3. RESULTADOS.....	33
3.1 El BPA no afecta la viabilidad de las células de cáncer de mama 4T1	33
3.2 El BPA induce un incremento en la expresión del GPER en las células de cáncer de mama 4T1.....	33
3.3 El BPA induce migración de células de cáncer de mama 4T1.	34
3.4 El BPA induce mayor invasión de las células de cáncer de mama 4T1.....	35
3.5 El BPA induce una mayor secreción de MMP-2 y MMP-9 en las células de cáncer de mama 4T1.....	37
3.6 El BPA induce traslocación de GPER a la membrana plasmática	40
3.7. El BPA induce mayor volumen y peso del tumor primario	42
3.8 El BPA induce un mayor número de macrometástasis en pulmón	44
4. DISCUSIÓN	46
5. CONCLUSIÓN	53
6. PERSPECTIVAS.....	53
7. REFERENCIAS.....	54

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figura 1. Diseño experimental del modelo <i>in vitro</i>	15
Figura 2. Diseño experimental modelo <i>in vivo</i>	16
Tabla 1. Características de los modelos de estudio	16

ABREVIATURAS

6-TG	6-tioguanina
AKT	Proteína cinasa B
AKT1	Akt serina/treonina cinasa 1
<i>BCRA1</i>	Gen cáncer de mama 1
<i>BCRA2</i>	Gen cáncer de mama 2
BL1	Subtipo basal-like 1
BL2	Subtipo basal-like 2
BPA	Bisfenol A
<i>BRCA</i>	Gen cáncer de mama
CaMa	Cáncer de mama
CDH1	Cadherina 1
CHEK1	Cinasa de punto de control 1
Da	Dalton
DMSO	Dimetilsulfóxido
E2	17 β -Estradiol
EDCs	Químicos disruptores endocrinos
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EMT	Transición epitelio mesénquima
ERK-2	Cinasa regulada por señales extracelulares
ERR- γ	Receptor gama relacionado con el estrógeno
ER α	Receptor de estrógeno α
ER β	Receptor de estrógenos β
FAK	Cinasa de adhesión focal
SFB	Suero fetal bovino
GPER	Receptor de estrógenos acoplado a proteínas G
HB-EGF	Factor de crecimiento epidérmico ligado a heparina
HER2	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano
HR	Cociente de riesgo

IC	Intervalo de confianza
IGF1R	Factor de crecimiento similar a la insulina tipo 1
LAR	Receptor de andrógeno luminal
LOAEL	Nivel mínimo de efecto adverso observado
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
MDC1	Mediador del punto de control del daño del ADN 1
MMP-2	Metaloproteinasa dos
MMP-9	Metaloproteinasas nueve
MTT	Bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazolio
NGF	Factor de crecimiento nervioso
NOAEL	Nivel sin efectos adversos observados
OR	Razón de momios
PBS	Amortiguador fosfato salino
PI3K	Fosfatidilinositol 3 cinasa
PI3KCA	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinasa subunidad catalítica alfa
PLK1	Cinasa tipo polo 1
PR	Receptores de progesterona
RfD	Dosis de referencia oral
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
Src	Tirosina cinasa c-src
TDI	Ingesta diaria tolerable
TNBC	Cáncer de mama triple negativo
TP63	Proteína tumoral 63
UGTs	UDP- glucuroniltransferasa
UPEAL	Unidad de producción y experimentación de animales de laboratorio

RESUMEN

El cáncer de mama es una condición multifactorial que afecta principalmente a las mujeres mayores de 40 años. Entre el 15% al 20% de los diferentes subtipos de cáncer de mamá presentan un fenotipo triple negativo (TNBC), caracterizado por la ausencia de receptores de estrógeno y progesterona además de presentar una baja expresión de HER2. Consecuentemente, las mujeres con tumores de mama TNBC no responden a la terapia hormonal teniendo un pronóstico no satisfactorio al compararse con otros subtipos. El receptor de estrógenos acoplado a proteínas G (GPER) ha sido recientemente reportado como prevalente en el TNBC; su expresión se ha relacionado con un mayor tamaño tumoral, metástasis y un bajo pronóstico de vida. Los estudios *in vitro* han demostrado su activación por disruptores endocrinos, como el bisfenol A (BPA), induce procesos de migración e invasión celular. El BPA también induce secreción de metaloproteinasas (MMPs), la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidérmico y la alteración del microambiente tumoral. Dado su amplio uso en plásticos de policarbonato y resinas epoxi el BPA se distribuye de forma ubicua en el ambiente. Este disruptor endócrino actúa como ligando e inductor de la expresión de GPER, resultando pertinente evaluar su efecto en el proceso de metástasis, así como en la expresión de GPER en modelos tumorales TNBC *in vivo*. En el presente trabajo, demostramos que la exposición al BPA incrementa la migración e invasión en células TNBC 4T1. Así mismo demostramos que el BPA induce un incremento en la expresión de GPER de manera dependiente del tiempo. Resultados similares encontramos al evaluar el efecto del BPA en la secreción de MMP-2 y MMP-9 favoreciendo un incremento en su secreción. El estímulo con BPA generó también una mayor relocalización de GPER en forma de agregados hacia la membrana plasmática y zona perinuclear. Por lo que respecta al modelo tumoral murino con células 4T1 demostramos que el BPA genera un mayor volumen y peso del tumor primario, así como un incremento de metástasis a pulmones. Nuestros resultados sugieren que el BPA favorece el proceso de metástasis en TNBC destacando la importancia del estudio de la exposición y efectos que induce el BPA en pacientes oncológicos con TNBC.

ABSTRACT

Breast cancer is a multifactorial condition that mainly affects women over 40 years of age. Between 15% to 20% of the different subtypes of breast cancer have a triple negative phenotype (TNBC), characterized by the absence of estrogen and progesterone receptors and low HER2 expression. Consequently, women with TNBC breast tumors do not respond to hormonal therapy and have an unfavorable prognosis when compared to other subtypes. The G-protein-coupled estrogen receptor (GPER) has recently been reported to be prevalent in TNBC; its expression has been associated with larger tumor size, metastasis, and worse survival prognosis. In vitro studies have shown that its activation by endocrine disruptors, such as bisphenol A (BPA), induces cell migration and invasion processes. BPA also induces secretion of metalloproteinases (MMPs), transactivation of the epidermal growth factor receptor and alteration of the tumor microenvironment. Given its widespread use in polycarbonate plastics and epoxy resins BPA is ubiquitously distributed in the environment. This endocrine disruptor acts as a ligand and inducer of GPER expression, making it relevant to evaluate its effect on the metastatic process as well as on GPER expression in TNBC tumor models in vivo. In the present work, we demonstrate that BPA exposure increases migration and invasion TNBC 4T1 cells. We also show that BPA induces a time-dependent increase in GPER expression. Similar results were found when evaluating the effect of BPA on the secretion of MMP-2 and MMP-9 by favoring an increase in their secretion. The BPA stimulus also caused a greater relocalization of GPER as aggregates towards the membrane and in a perinuclear manner. Regarding the murine tumor model using 4T1 cells, we demonstrated that BPA generates a greater volume and weight of primary tumor with an increased metastasis to the lungs. Our results suggest that BPA could favor the metastasis process in TNBC, highlighting the importance of studying the exposure and effects induced by BPA in TNBC oncological patients.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Cáncer de mama

1.1.1 Generalidades del cáncer de mama

El cáncer de mama (CaMa) es un tipo de neoplasia que se desarrolla en el tejido epitelial mamario, incluido los ductos y los lobulillos (glándulas productoras de leche) (Ataollahi et al., 2015). Esta condición compleja involucra factores de riesgo genéticos y ambientales, impactando en la salud física, mental y social de las pacientes que lo desarrollan (Wei et al., 2016). Una de las clasificaciones del CaMa consiste en tres subtipos clínicos principales que determinan el tratamiento y pronóstico (Stillwater et al., 2020):

- Subtipo positivo para receptores de hormonas (estrógenos y progesterona) (Stillwater et al., 2020).
- Subtipo positivo para el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER2, por sus siglas en inglés) (Stillwater et al., 2020).
- Subtipo triple negativo, que no posee receptores para estrógeno y progesterona además de presentar una baja expresión de HER2 (Stillwater et al., 2020).

Los receptores de estrógeno (ER, por sus siglas en inglés) así como los receptores de progesterona (PR, por sus siglas en inglés) son factores de transcripción (Hu et al., 2021). La activación del receptor de estrógeno α (ER α), activa vías de crecimiento oncogénico en las células de CaMa (Waks & Winer, 2019). Por el contrario, el receptor de estrógenos β (ER β) está asociado con efectos anti-proliferativos (Zhou & Liu, 2020). El PR, miembro de la familia de receptores nucleares (Lim et al., 2016), cuya expresión depende de la actividad del ER (Zhao et al., 2015) y la ciclina D1 (Hu et al., 2021) se ha asociado a una disminución de la proliferación mediada por estrógenos y a la actividad transcripcional del ER en las células de CaMa ER+, así como con un peor pronóstico de vida en pacientes con CaMa invasivo ER+ con baja expresión de PR (Yao et al., 2017).

HER2, es un receptor tirosina cinasa, que carece de ligando natural y se caracteriza por tener un dominio extracelular de unión a ligandos, un dominio transmembranal y un dominio catalítico intracelular con actividad tirosina cinasa (Harbeck et al., 2019). Tras la unión de ligando ocurre una dimerización de los receptores HER, seguido por una autofosforilación y transfosforilación de sus residuos intracelulares de tirosina que lleva a la activación de vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K) y activación de la proteína cinasa C PKC (Shah & Osipo, 2016) involucradas en crecimiento, proliferación celular, evasión de la apoptosis y potencial metastásico de las células cancerosas (Bychkovsky et al., 2016).

Dadas las características de cada subtipo clínico de CaMa, existen tratamientos específicos para cada uno de ellos. En pacientes con tumores con receptores hormonales se emplea la terapia antihormonal y la quimioterapia antineoplásica, mientras que en pacientes con tumores HER2 positivos se emplea la terapia con anticuerpos dirigidos a HER2 combinado con quimioterapia antineoplásica. Por lo que respecta a las pacientes con tumores triple negativos se emplea la quimioterapia antineoplásica (Waks & Winer, 2019). Para el caso específico del CaMa con metástasis, proceso definido como el desarrollo de tumores secundarios en órganos del cuerpo diferentes al del tumor primario original (Fares et al., 2020a), el tratamiento tiene como objetivo retrasar la progresión tumoral y prolongar la supervivencia y mantener la calidad de vida de la paciente (Hattori & Iwata, 2018), siendo un tratamiento paliativo (Mutebi et al., 2020).

1.1.2 Epidemiología del cáncer de mama

A nivel mundial, la incidencia de CaMa en el año 2020 se estimó en 58.51 casos por cada 100,000 habitantes, lo que representa más dos millones de nuevos casos; representando la neoplasia mayoritariamente diagnosticada en mujeres (24.5% del total de casos de cáncer en mujeres a nivel global) (Global Cancer Observatory, 2021). Epidemiológicamente, el CaMa es la neoplasia más frecuente tanto en los países menos desarrollados como en los industrializados, representando la segunda causa de mortalidad en Europa y los Estados Unidos de América, después del cáncer de

pulmón (Medina et al., 2020). Las poblaciones Latinas como las Afrodescendientes han mostrado una mayor susceptibilidad a su desarrollo (Lopes da Silva et al., 2020).

En México, el CaMa es la primera causa de muerte por cáncer (Flamand et al., 2020). Su incidencia en 2020 fue de 45.44 casos por cada 100,000 habitantes (29,929 nuevos casos), con una mortalidad de doce casos por cada 100,000 habitantes (7,931 muertes) (Global Cancer Observatory, 2021a). De los fallecimientos por CaMa, el 1% correspondió a jóvenes de 15 a 29 años, el 13% fueron del grupo de edad de 30 a 44 años, el 38 % al grupo de edad de 45 a 59 años y el 48% a edades de 59 años o más (INEGI, 2020). Del total de casos nuevos de CaMa se estima que el subtipo ER+ y PR+ corresponde al 70% de los casos, el subtipo HER2+ representa entre el 15-20% (Stillwater et al., 2020) y el subtipo TNBC representa aproximadamente del 15-20% de los casos totales (Lyons, 2019).

1.1.3 Cáncer de mama triple negativo

El TNBC posee el peor pronóstico de vida comparado con otros subtipos de CaMa (Yin et al., 2020). Este subtipo presenta una marcada heterogeneidad en términos de histología y respuesta de los pacientes al tratamiento y en la mayoría de los casos se presentan como carcinomas ductales invasivos (Ellsworth et al., 2019).

Se ha reportado una asociación entre el TNBC y las mutaciones en el gen CaMa (*BRCA*, por sus siglas en inglés). Alrededor del 35% de las pacientes con TNBC presentan mutaciones en *BCRA1*; mientras que el 8% son portadoras de mutaciones en *BCRA2* (Mehanna et al., 2019). En este sentido, las pacientes portadoras de *BRCA1* mutado tienen dos y ocho veces más riesgo de padecer TNBC con respecto a las portadoras de *BRCA2* mutado (OR: 3.29; 95%IC: 2.77–3.91) y a las no portadoras de mutaciones (OR: 8.89; 95%IC: 6.92–11.41), respectivamente (H. Chen et al., 2018).

Al analizar en mayor detalle la expresión de genes en este tipo de cáncer, se han identificado diferentes subtipos:

- Subtipo *Basal-Like 1* (BL1). Este subtipo se caracteriza por una expresión aumentada de los genes relacionados con el ciclo celular (*v.gr.*, *PLK1*, *CHEK1*) y la respuesta al ADN (*v.gr.*, *NRAS*, *MYC*, *MDC1*, *BRCA*) (Garpis

et al., 2020), así como a altas tasas de mutación (> 92%) en el gen que codifica para la proteína tumoral p53 (*TP53*) (Bareche et al., 2018).

- Subtipo *Basal-Like 2* (BL2). En este subtipo se involucran vías de señalización de factores de crecimiento (*v.gr.*, EGF, NGF, IGF1R). Así como genes involucrados en la expresión de factores mioepiteliales, como la proteína tumoral 63 (*TP63*) (Garmpis et al., 2020). El subtipo BL2 está enriquecido en receptores EGFR (Hubalek & Müller, 2017).
- Mesenquimal (M). El subtipo mesenquimal se caracteriza por un enriquecimiento de genes implicados en la motilidad celular y la transición epitelio mesénquima (EMT) (Marra et al., 2020).
- Receptor de andrógeno luminal (LAR). Se caracteriza por una mayor carga de mutaciones en los genes, *PI3KCA*, *AKT* y *CDH1* (Marra et al., 2020). LAR posee una alta expresión del receptor de andrógenos, hasta diez veces mayor respecto a los otros subtipos (Mehanna et al., 2019).

Respecto a los sitios de metástasis, estos ocurren principalmente en órganos viscerales, como el pulmón, hígado y sistema nervioso central (Lopes da Silva et al., 2020). Esta neoplasia tiene una respuesta satisfactoria de corta duración a las terapias actuales basadas en quimioterapia citotóxica, generando resistencia a fármacos tales como antraciclinas y taxanos (Reilly et al., 2015).

1.1.4 Supervivencia del cáncer de mama triple negativo

Debido a la falta de respuesta de los TNBC a las terapias hormonales dirigidas, las opciones terapéuticas y su eficacia son limitadas (Spini et al., 2020; Yin et al., 2020). Además, al realizarse el diagnóstico es común que las pacientes presenten metástasis a ganglios axilares y mayor tamaño del tumor primario (Lopes da Silva et al., 2020). Basado en el diagnóstico inicial, este subtipo de cáncer presenta una supervivencia del 91% a cinco años, solo cuando no se ha extendido fuera de la mama. Sin embargo, sí es de localización regional (se ha extendido fuera de la mama a nódulos linfáticos) o es distante (se ha extendido a órganos como pulmones, hígado o

huesos) la supervivencia es del 65% y 12%, respectivamente (American Cancer Society, 2021).

En la actualidad, se calcula que aproximadamente el 46% de las pacientes con TNBC tendrán metástasis distal, ocurriendo principalmente al tercer año después del diagnóstico (Yin et al., 2020). La recurrencia después de la cirugía se presenta hasta en un 25% de las pacientes, con un tiempo medio de recidiva entre 19 a 40 meses; mientras que en pacientes con CaMa no TNBC la recidiva es de 35 a 67 meses (Yin et al., 2020). En cuanto a la mortalidad, esta alcanza hasta el 75% de las pacientes en los tres meses siguientes a la recidiva (Yin et al., 2020).

1.1.5 Factores de riesgo para el cáncer de mama

Existen diferentes factores de riesgo que contribuyen al desarrollo de CaMa entre los cuales destacan:

- **La edad.** El riesgo de CaMa aumenta con la edad y aproximadamente un tercio de los CaMa femeninos se diagnostican en pacientes mayores de 70 años (Tesarova, 2013). Es de destacar que del total de diagnósticos de CaMa, más del 40% corresponde al grupo de edad de 40 años, el 20% al grupo de 30 años y alrededor del 2% al grupo de 20 años (Anders et al., 2009). Sin embargo, la probabilidad de diagnóstico aumenta en 0.1% en el grupo de 20 años hasta alcanzar un máximo de 4.1% en el grupo de edad de 70 años (DeSantis et al., 2019).
- **La historia familiar.** El CaMa ha mostrado un incremento de casi tres veces en el riesgo cuando se tienen dos o más familiares de primer grado que hayan padecido CaMa (Y. Sun et al., 2017).
- **Factores reproductivos.** Una menarca temprana (cada año de retraso disminuye el riesgo en un 5%), el embarazo tardío (cada nacimiento adicional disminuye el riesgo un 10%) y la menopausia tardía (cada año de retraso incrementa el riesgo en un 3%) (Y. Sun et al., 2017).
- **Estilo de vida.** Se ha relacionado un modesto, pero significativo incremento, en el riesgo de CaMa en mujeres fumadoras habituales (fumar la mayoría de los

días en los últimos seis meses) (HR=1.14; 95%IC: 1.03-1.25; $p = 0,010$) sobre todo entre las que se iniciaron a edades menores a 17 años (HR= 1.24; 95%IC: 1.08–1.43; $p = 0.002$) o en la edad perimenárquica (1-4 años después de la menarquia) (HR= 1.23; 95%IC: 1.07–1.41; $p = 0.004$) (Jones et al., 2017). Así mismo se ha reportado un aumento en el riesgo de CaMa en consumidoras habituales de alcohol (consumo de al menos tres o cuatro días por semana) (<50 años, OR 4.7; 95%IC: 1.4-16.2; ≥50 años, OR 3.9; 95%IC:1.2 13.4) (Vieira et al., 2018). Una dieta alta en grasas (consumo de grasa vegetal, vitamina E, ácidos grasos monoinsaturados, ácidos grasos poliinsaturados y proteína vegetal) se ha asociado con incremento de más de tres veces el riesgo de desarrollar CaMa (OR 3.88; 95% IC, 1.58-9.51) (Tayyem et al., 2019). La incidencia de CaMa también ha sido relacionada con la exposición a niveles altos de hormonas endógenas (v.gr., andrógenos y estrógenos) (Reeves & Key, 2021), así como a la exposición a hormonas exógenas provenientes de terapia hormonal combinada y terapia con estrógenos (American Cancer Society, 2019).

- **Exposición a disruptores endocrinos.** La exposición al BPA ha sido relacionada con el desarrollo de lesiones neoplásicas mamarias y tumores malignos tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (Wang et al., 2017).

1.2 Disruptores endócrinos

Los químicos disruptores endocrinos (EDCs, por sus siglas en inglés) se definen como compuestos exógenos que tienen la capacidad de interferir en la síntesis, secreción, transporte, metabolismo, unión a receptor o eliminación de hormonas endógenas, alterando la homeostasis del sistema endocrino (Lauretta et al., 2019). Existe una gran variedad de EDCs entre los que se encuentran los compuestos farmacéuticos (v.gr., parabenos), industriales (v.gr., dioxinas, bifenilos policlorados), los pesticidas (v.gr., organofosforados, carbamatos) y los plastificantes como el BPA (Encarnação et al., 2019; Lauretta et al., 2019).

1.2.1 BPA

El BPA es un químico sintético orgánico sólido $[(CH_3)_2C(C_6H_4OH)_2]$, incoloro, moderadamente soluble en agua y completamente soluble en disolventes orgánicos (Khan et al., 2021) como la N,N-dimetilformamida, el acetato de etilo, el acetato de metilo y alcoholes como el etanol y metanol (J. Sun et al., 2020). Este disruptor endócrino presenta un peso molecular de 228.18 g/mol, un punto de fusión de 156 °C y un punto de ebullición de 220 °C (Almeida et al., 2018). El BPA se encuentra comercialmente disponible desde 1957 y es utilizado en la manufactura de plásticos de policarbonato y resinas epoxi para la producción de botellas de agua, recubrimientos de latas de comida, juguetes, utensilios de cocina, dispositivos médicos y selladores dentales, por lo que se encuentra de forma ubicua en el entorno doméstico (Khan et al., 2021; Stillwater et al., 2020). En cuanto a las vías de exposición al BPA en los seres humanos, éstas pueden ser (Almeida et al., 2018):

1. **Ocupacional.** Durante el proceso de síntesis de BPA, plásticos de policarbonato, resinas epóxicas y papel térmico entre otros (Almeida et al., 2018).
2. **Ambiental.** Por la presencia del BPA en el aire, suelo y agua (Almeida et al., 2018).
3. **Consumo de alimentos.** Es la Principal fuente de exposición en la población general (Almeida et al., 2018). Cabe resaltar que la temperatura o las sustancias ácidas y básicas aceleran la ruptura del enlace éster que une a los monómeros de BPA liberándolos de los contenedores o empaques hacia los productos, principalmente alimentos y agua (Stillwater et al., 2020). Asimismo, se ha reportado que también existe la migración de monómeros de BPA residuales del proceso de polimerización de resinas epóxicas o plásticos (Almeida et al., 2018).

Al ser el BPA un agonista de los receptores ER α y ER β incrementa la proliferación celular (Acconcia et al., 2015). El BPA también puede interactuar con el receptor gama relacionado con el estrógeno (ERR- γ , por sus siglas en inglés) incrementando la expresión de la MMP-2 y MMP-9 (Stillwater et al., 2020). Además, el

BPA interactúa con el receptor de andrógenos (AR, por sus siglas en inglés), impidiendo que los andrógenos endógenos regulen la transcripción de genes dependientes de éstos (Gao et al., 2015). Recientemente, nuestro grupo de investigación reportó que el BPA también puede interactuar con el receptor de estrógenos acoplado a proteínas G (GPER) promoviendo migración, invasión y transactivación EGFR en células TNBC MDA-MB-231 (Castillo Sánchez et al., 2020).

Respecto a la regulación del BPA la Agencia de Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos (U.S. EPA) establece una dosis de referencia oral de 50 µg/kg peso/día en humanos, basado en una reducción de 1000 veces el nivel mínimo de efecto adverso observado (LOAEL, por sus siglas en inglés) en ratas de 50 mg/kg peso/día (Stillwater et al., 2020; Z. Wang et al., 2017). En cuanto al nivel sin efectos adversos observados (NOAEL, por sus siglas en inglés), la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos lo ha establecido en 5mg/kg peso/día basado en toxicidad sistémica en ratas (Gao et al., 2015), mientras que la ingesta diaria tolerable ha sido establecida por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria en 4 µg/kg peso/día basado en el efecto del peso relativo medio de los riñones en los ratones (Gundert-remy et al., 2017).

1.2.2 Toxicocinética

El BPA entra al cuerpo humano por inhalación, ingestión o a través de la vía dérmica. Por vía oral, la absorción es rápida (Cimmino et al., 2020) y una vez absorbido (alrededor del 77%) (Gayrard et al., 2019) es metabolizado por el hígado a través de glucuronidación (90%) por la enzima UDP-glucuroniltransferasa 2B15 o mediante sulfonación (10%), siendo excretado mayormente a través de la bilis o la orina en forma de glucurónido de BPA o BPA sulfatado (Almeida et al., 2018; Khan et al., 2021). Posterior a ocurrir la excreción de bilis al tracto gastrointestinal, el BPA no conjugado se reabsorbe en el torrente sanguíneo y se elimina lentamente por circulación enterohepática (Almeida et al., 2018). La vida media biológica del BPA, tras la exposición oral, es alrededor de seis horas (Liu & Martin, 2017). No obstante, el BPA

puede considerarse un químico persistente ya que puede bioacumularse en el tejido graso por sus propiedades lipofílicas, así como a su amplia presencia y la continua exposición de la población (Encarnaçãõ et al., 2019).

En cuanto a la vía dérmica, al ser un compuesto pequeño (288 Da) y lipofílico (log P=3.4) puede atravesar la piel humana con relativa facilidad, la absorción se encuentre en el rango de 9.5% al 33%, tal como lo demuestran estudios de explantes de piel humana (Healy et al., 2015). La mayor parte del BPA absorbido por vía dérmica no es metabolizado (81%-100%), entrando directamente a la circulación sistémica (Reale et al., 2021; Toner et al., 2018). La fracción de BPA que llega a metabolizarse se conjuga con el ácido glucurónico o sulfato (el cual es donado por la molécula adenosina 3'-fosfato 5'-sulfato, *PAPS*) (Ijm et al., 2007; Liu & Martin, 2017). El BPA no conjugado es lipofílico por lo que al tener afinidad por el tejido adiposo se bioacumula liberándose gradualmente a otros tejidos (Almeida et al., 2018).

Por vía inhalatoria existe poca información sobre la toxicocinética del BPA, estimándose que entra a circulación sistémica en su forma libre (Healy et al., 2015) al no tener un metabolismo de primer paso (Hines et al., 2018).

1.2.3 Efectos del BPA en la salud

Se han reportado distintos efectos tóxicos causados por la exposición al BPA, entre los cuales se encuentran la ansiedad, comportamientos del trastorno del espectro autista, así como deterioro de la memoria y el aprendizaje en niños expuestos durante la etapa prenatal (Almeida et al., 2018). Sin embargo, los estudios no son consistentes respecto a los efectos a la salud (Liu & Martin, 2017).

El BPA ha demostrado suprimir, en explantes de tejido adiposo, la liberación de adiponectina, la cual es responsable de incrementar la sensibilidad a insulina y reducir la inflamación, por lo que podría generar resistencia a la insulina (Preethi et al., 2014) y obesidad (Hernández-Tobías et al., 2016). Así mismo, se ha reportado que el BPA reduce la producción diaria de esperma, su recuento y motilidad (Abraham & Chakraborty, 2019). Al interactuar con los receptores ER α y ER β , el BPA puede

contribuir al desarrollo y la progresión del CaMa al incrementar la proliferación y migración, así como disminuir la apoptosis las células cancerosas (Gao et al., 2015; Ulm et al., 2019). No obstante, el BPA también puede contribuir a la progresión del CaMa y a la resistencia a fármacos antineoplásicos como el tamoxifeno, a dosis ambientalmente relevantes, al actuar como un agonista de GPER (L. Hsu et al., 2019).

1.3 GPER

1.3.1 Características generales

El GPER, inicialmente denominado GPR30, es un receptor que posee siete dominios transmembranales α hélice con cuatro segmentos extracelulares y cuatro segmentos intracelulares que se asocia a complejos heterotriméricos de proteínas G_s y G_i (Figueira et al., 2018; Filardo & Thomas, 2005).

GPER es activado por hormonas endógenas como los estrógenos y la aldosterona, así como por ligandos sintéticos, fitoestrógenos y xenoestrógenos como el BPA (Feldman & Limbird, 2017). El GPER se encuentra expresado en el 50% al 60% de los tejidos tumorales de mama y de manera específica se considera un receptor prevalente en TNBC (L. H. Hsu et al., 2019).

La expresión fisiológica del GPER es dependiente de la edad, especie, género y tejido (Luo & Liu, 2020). En el ser humano se encuentra expresado de manera ubicua en diversos sistemas, incluyendo el sistema nervioso central, musculoesquelético, digestivo, renal y cardiovascular (Singh et al., 2022). Existe una mayor expresión de GPER en la placenta comparado con el músculo esquelético (Zimmerman et al., 2016), de manera similar la expresión de RNAm de GPER en el músculo esquelético tiende a ser mayor en las mujeres premenopáusicas (Nilsson et al., 2015).

La activación de GPER involucra la activación de vías de señalización no genómicas o extranucleares (Pupo et al., 2016). Estas vías generan diferentes respuestas celulares. En el sistema inmunológico, su activación se asocia a la inducción de apoptosis en células T y a la inhibición de la inflamación al inducir la expresión de citocinas anti-inflamatorias como la interleucina 10 (Molina et al., 2017a; Singh et al., 2022). En células endoteliales se ha propuesto que el BPA posee un efecto

anti-angiogénico al inhibir su proliferación (Molina et al., 2017a). Además, GPER puede mediar efectos vasodilatadores en arterias coronarias como se ha demostrado en modelos porcino y murinos (Debortoli et al., 2017; Meyer et al., 2010). En tejido óseo humano GPER media la acción de 17β -estradiol (E2) respecto a la preservación de la densidad ósea ya que se expresa en osteoblastos, osteocitos y osteoclastos (Heino et al., 2008). Durante el trabajo de parto, la activación de GPER incrementa la respuesta contráctil del miometrio (Maiti et al., 2011).

La expresión de GPER en las células la encontramos de manera específica en la membrana citoplasmática (Xu et al., 2019) así como en membranas intracelulares (Prossnitz & Barton, 2014), como en la del retículo endoplásmico (Zimmerman et al., 2016), el aparato de Golgi (Molina et al., 2017) y en el núcleo (Figueira et al., 2018).

1.3.2 GPER y su papel en el cáncer de mama

La expresión de GPER se ha asociado con un mayor tamaño de tumor, metástasis y bajo pronóstico de vida en CaMa (Prossnitz & Barton, 2014). Así mismo, se ha propuesto que el GPER media la transactivación del EGFR (L. H. Hsu *et al.*, 2019), vía involucrada en la producción de AMPc, movilización de calcio y la activación del proto-oncogén tirosina cinasa c-Src (Src). Este último activa a las MMPs que escinden al HB-EGF, transactivando finalmente a EGFR (Prossnitz & Barton, 2012). El GPER también activa las vías de señalización MAPK y PI3K/AKT regulando diferentes eventos celulares relacionados con el cáncer. (Rigiracciolo *et al.*, 2019), siendo uno de estos eventos la proliferación de fibroblastos asociados a cáncer (CAFs) en condiciones de hipoxia (Xu et al., 2019).

Por otro lado, también se ha demostrado que el BPA vía GPER es capaz de favorecer la adhesión de células tumorales mamarias a través de la cisteína proteasa dependiente del calcio (calpaína), facilitando de este modo procesos metastásicos (Lappano *et al.*, 2014). Recientemente se ha demostrado que en células TNBC MDA-MB-231, el BPA, a través del GPER, FAK, Src, ERK2 y EGFR, induce y promueve la migración celular (Castillo Sánchez *et al.*, 2020).

La activación de GPER incrementa la expresión de la aromatasa (Zimmerman et al., 2016), dando lugar a niveles elevados de E2, ligando natural de GPER (Revankar et al., 2005) por lo que es un potente estímulo que induce proliferación de células ER-, permitiendo la progresión tumoral.(Thomas et al., 2005).

La activación de GPER incrementa la expresión de la aromatasa (Zimmerman et al., 2016), dando lugar a niveles elevados de E2, ligando natural de GPER (Revankar et al., 2005). Por otro lado, GPER incrementa la expresión de HIF1 α y consecuentemente la regulación al alza de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un marcador de angiogénesis, lo que involucra a GPER en la progresión del CaMa (Figueira et al., 2018). Se ha reportado que fármacos empleados en el tratamiento de CaMa como el tamoxifen, raloxifen y fulvestrant son agonistas de GPER lo que puede generar un mal pronóstico clínico (L. Hsu et al., 2019).

1.4 JUSTIFICACIÓN

El CaMa es una enfermedad multifactorial en la que la predisposición genética y los factores ambientales tienen una participación conjunta, representando un problema de salud pública mundial y una de las principales causas de muerte en mujeres en todo el mundo, con incidencia creciente en la edad avanzada (Kumar & Aggarwal, 2016). El CaMa triple negativo, caracterizado por la ausencia de receptores de estrógeno y progesterona, así como bajos niveles de expresión del gen HER2/neu, es de los más agresivos y de peor pronóstico con respecto a otros subtipos, y está asociado a un alto grado de metástasis y resistencia a medicamentos (Waks & Winer, 2019; Yin et al., 2020).

Los disruptores endócrinos (Calaf et al., 2020) pueden bloquear, alterar o interferir con la actividad hormonal endógena de receptores, tales como los de estrógeno, así como con las vías de señalización del sistema endócrino (Lauretta et al., 2019).

Al ser la mama un órgano sensible a hormonas, los disruptores endócrinos pueden tener un papel importante en el desarrollo de cáncer (Z. Wang et al., 2017).

El BPA, considerado como un contaminante ambiental ubicuo y uno de los químicos sintéticos más producidos y empleados a nivel mundial (Shafei et al., 2018). El BPA presenta una gran afinidad por ER α y ER β , así como por GPER, los cuales al ser activados inducen, de manera directa, procesos celulares como diferenciación, proliferación y migración celular (Murata & Kang, 2018). Interesantemente, la expresión de GPER, se considera prevalente en el CaMa triple negativo y se asocia positivamente con el tamaño del tumor, la expresión de HER2 y la metástasis en cáncer mamario (Xu et al., 2019).

Previamente, nuestro grupo de investigación ha demostrado que el BPA induce la activación de las cinasas FAK, Src y ERK-2 así como la trans-activación del EGFR, a través de éste, incrementando el número de contactos de adhesión focal y la migración e invasión en células cancerosas mamarias TNBC MDA-MB-231. Por consiguiente, el BPA podría favorecer la progresión del TNBC, siendo necesario

estudiar su participación en los mecanismos de progresión en modelos “*in vitro* e *in vivo*”.

El presente proyecto, plantea determinar los efectos del BPA en la metástasis en un modelo “*in vivo*” empleando células cancerosas mamarias murinas 4T1, que corresponde a un fenotipo TNBC. Los resultados obtenidos permitirán dilucidar sobre la importancia del BPA en la progresión del cáncer mamario.

1.5 HIPÓTESIS

La exposición al BPA induce un incremento en la migración, invasión, secreción de MMP-2 y MMP-9 así como de la expresión de GPER en células 4T1 *in vitro*. En un modelo tumoral mamario murino de células 4T1 la exposición al BPA por vía oral induce un mayor tamaño de tumor primario y mayor número de metástasis.

1.6 OBJETIVOS

1.6.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de la exposición al BPA en el desarrollo de metástasis en un modelo tumoral murino de células 4T1, así como la expresión proteica de GPER en un modelo *in vitro* de células 4T1.

1.6.2 Objetivos particulares

1. Determinar el efecto de la exposición a BPA, sobre la viabilidad celular de células de cáncer mamarias murinas 4T1, con fenotipo de TNBC.
2. Determinar el efecto del estímulo con BPA en la expresión proteica de GPER en cultivos de células 4T1.
3. Evaluar el efecto de la exposición a BPA sobre la migración e invasión de células 4T1. o.
4. Evaluar el efecto de la exposición a BPA sobre la secreción de MMP-2 y MMP-9 de células 4T1.
5. Determinar el efecto de la exposición a BPA la localización celular de GPER en células 4T1 estimuladas con BPA en un modelo *in vitro*.
6. Inducir la formación de tumores mamarios en ratones hembra de la cepa Balb/cJ empleando células 4T1.
7. Determinar el efecto de la exposición *in vivo* a BPA, sobre el desarrollo de un tumor primario y la metástasis en pulmón, hígado y cerebro, en un modelo tumoral murino.

2. METODOLOGÍA

2.1 Diseño experimental

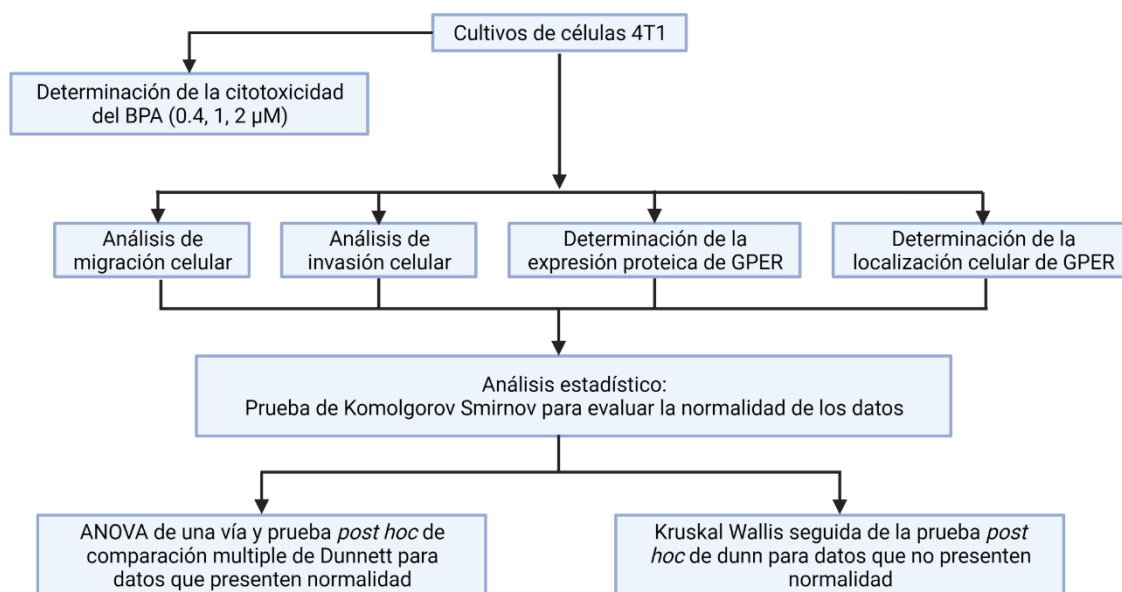


Figura 3. Diseño experimental del modelo *in vitro*.

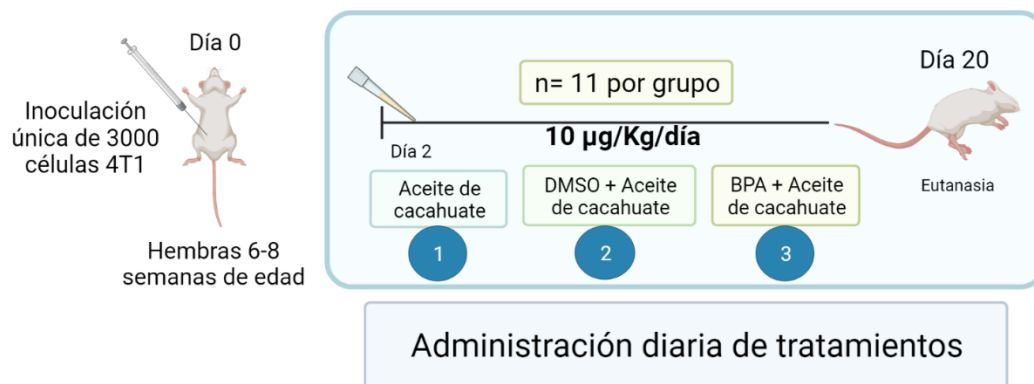
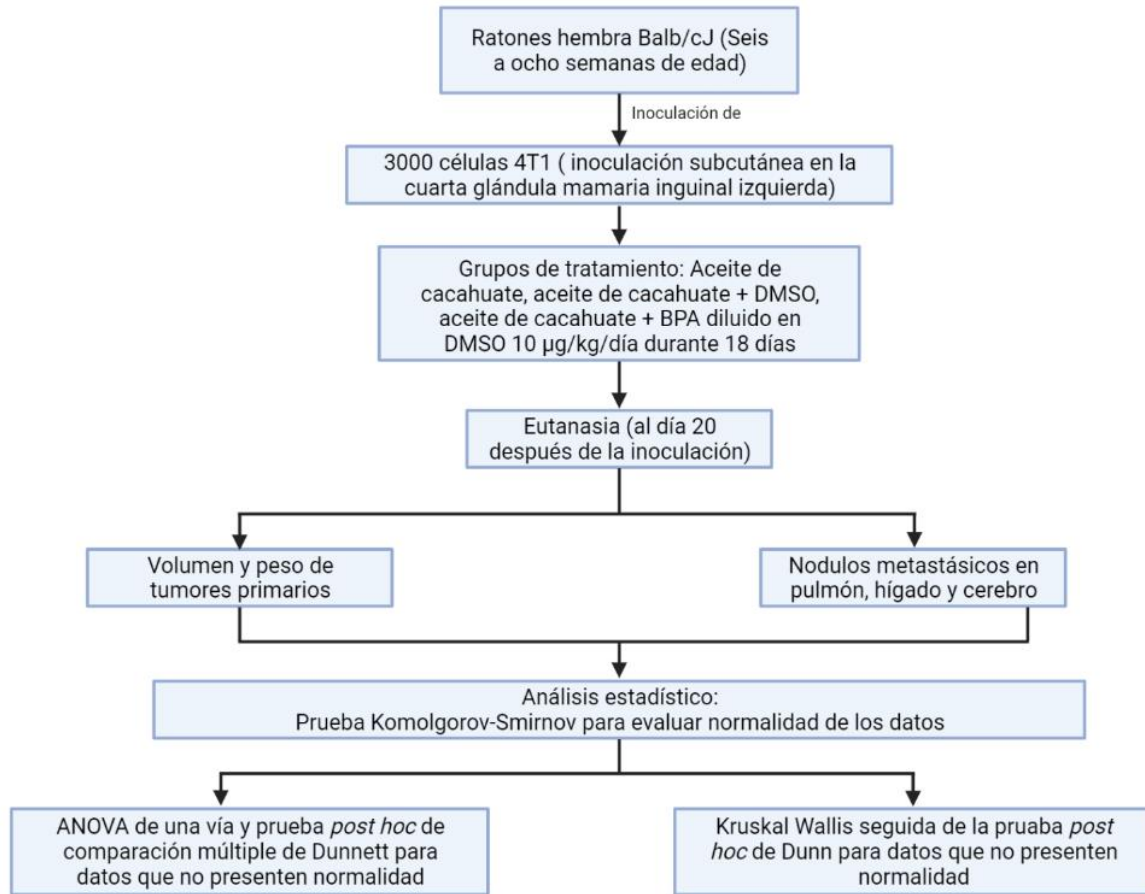


Figura 4. Diseño experimental modelo *in vivo*

Tabla 1. Características de los modelos de estudio

Modelo	Características
Línea celular murina 4T1 (CRL-2539)	Línea celular de carcinoma mamario murino utilizada ampliamente como modelo tumoral para el CaMa humano triple negativo ya que no expresa receptores de estrógeno, progesterona y HER2 (Schrörs et al., 2020). Estas células se pueden trasplantar fácilmente en la glándula mamaria generando tumores altamente invasivos, poco inmunogénicos y con metástasis espontánea a sitios distantes incluyendo los ganglios linfáticos, sangre, hígado, pulmón, cerebro y hueso (Pulaski & Ostrand-Rosenberg, 2001).
Ratones hembra Balb/cJ	Ratones albinos derivados de la cepa BALB/c con un periodo de vida de alrededor de un año y medio (Conduct Science, 2020). Presentan una incidencia de tumor mamario normalmente baja. Son frecuentemente usados en una gran variedad de estudios inmunológicos ya que se ha demostrado que tienen una respuesta TH2 aumentada (The Jackson Laboratory, 2021; University of kentucky, n.d.).

2.2 Cultivo celular

La línea celular 4T1 fue mantenida en medio “Roswell Park Memorial Institute” (RPMI) 1640, suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina en una incubadora a 37 °C con 5% de CO₂ y 95% de oxígeno.

Para los propósitos experimentales, las células se colocaron 24 horas antes de los tratamientos en medio RPMI 1640 con 0.5% SFB.

2.3 Métodos modelo *in vitro*

2.3.1 Determinación de la citotoxicidad del BPA por citometría de flujo

2.3.1.1 Fundamento de la técnica

La determinación de la citotoxicidad del BPA se llevó a cabo empleando el reactivo comercial LIVE/DEAD® viabilidad/citotoxicidad (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). A través de este ensayo se discriminan las células vivas de las muertas mediante una tinción simultánea con éster de acetoximetilo de calceína (calceína AM) verde fluorescente que indica la actividad esterasa intracelular (detección de células vivas) y el homodímero-1 de etidio rojo fluorescente para indicar la pérdida de integridad de la membrana plasmática (detección de células muertas) (Thermo Fisher Scientific, 2005).

2.3.1.2 Procedimiento

Las células 4T1 fueron sembradas en cajas de Petri de 60 mm y mantenidas en medio RPMI-1640 hasta alcanzar 80% de confluencia. A continuación, las células fueron ayunadas por 7 horas y estimuladas con BPA a concentraciones 0.4, 1 y 2 µM durante 24 horas las cuales corresponden a concentraciones de BPA reportadas en el tejido graso de la glándula mamaria. Posteriormente fue retirado el medio RPMI-1640, se les agregó verseno al 0.02% (K₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 10 mM, NaCl 150 mM pH 7.4, a pH 7.2, EDTA al 0.02%; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y posteriormente tripsina para desprenderlas de las cajas Petri. La suspensión celular fue tratada de

acuerdo con las instrucciones indicadas en el protocolo del proveedor para la determinación de citotoxicidad utilizando citometría de flujo. La fluorescencia fue analizada para 20,000 eventos utilizando el citómetro de flujo FACScan (Dako Cytomation®) en tres ensayos independientes.

2.3.2 Análisis de migración celular por el método de rayadura

2.3.2.1 Fundamento de la técnica

Para analizar la migración celular por exposición a BPA se utilizó el método de rayadura. Este método consiste en cultivar una monocapa de células hasta alcanzar confluencia, posteriormente generar una región libre de células (herida o rayadura), estimular con el compuesto de interés (en nuestro estudio BPA) y monitorear la recolonización de dicha región libre de células para la cuantificación de la migración (Bobadilla et al., 2019; Martinotti & Ranzato, 2020).

2.3.2.2 Procedimiento

Se utilizó la técnica reportada previamente por Castillo-Sánchez et al. (2013) para lo cual se cultivaron células 4T1 en cajas Petri de 60 mm hasta alcanzar 80% de confluencia, 7 horas antes del ensayo se realizó un cambio de medio de cultivo con el medio RPMI 1640 0.5% SFB. La rayadura se realizó utilizando la punta de una pipeta estéril de 200 microlitros sobre la parte media de la caja de Petri. Posteriormente se realizaron dos lavados con solución salina amortiguadora de fosfato (PBS) 1X para retirar las células desprendidas, después se colocaron de nuevo medio RPMI 1640 0.5% SFB y agregando concentraciones de 0.4, 1 y 2 μ M de BPA. Como control positivo se utilizaron células tratadas con medio de cultivo RPMI-1640 5% SFB. Las células se incubaron durante 24 horas a 37 °C en ambiente con 5% CO₂ y 95% oxígeno, finalmente se retiró el medio y se fijaron con 2 ml de paraformaldehído al 4% durante veinte minutos, en seguida las células se tiñeron con cristal violeta al 1% (en etanol al 50% durante 10 minutos). Finalmente se utilizó un microscopio de contraste de fase para capturar las imágenes y la migración será analizada con el software ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland, USA,). Se realizaron cinco ensayos independientes.

2.3.3 Análisis de invasión celular en cámaras “transwell” modificadas con matrigel

2.3.3.1 Fundamento de la técnica

La invasión celular fue determinada por el método del ensayo de invasión en cámaras “transwell” modificadas con matrigel. Este método consiste en la utilización de una cámara de “Boyden” en donde una membrana porosa es recubierta con el matrigel que representa la matriz extracelular. Posteriormente se colocan en la parte superior del matrigel un determinado número de células y se determina la invasión celular al cuantificar las células que logran degradar y migrar a través del matrigel atravesando la membrana porosa en la parte inferior (Mcneeley et al., 2013).

2.3.3.2 Procedimiento

Se utilizaron placas de 24 pozos conteniendo insertos de cultivo celular con tamaño de poro de 8 μm , los cuales fueron cubiertos con matrigel (10 $\mu\text{g/ml}$.) e incubados durante doce horas a 37 °C para formar una matriz semisólida. Posteriormente cultivos celulares 4T1 fueron ayunados durante 7 horas y colocados sobre el matrigel a una cantidad de 250 mil células por inserto. En la cámara inferior se añadió el estímulo con 1 μM de BPA, y se incubó durante 40 horas. Como control positivo se utilizaron células tratadas con medio de cultivo RPMI-1640 5% SFB. Posterior a la incubación se removió el matrigel y se fijaron las células con metanol absoluto frío durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células se tiñeron con cristal violeta al 0.5% durante veinte minutos. Posteriormente las membranas fueron lavadas tres veces con agua bidestilada y se retiró cualquier residuo de matrigel o células de la parte interna del inserto con ayuda de un cotonete con algodón. Finalmente, los insertos se colocaron en 750 μL de ácido acético al 10% durante 30 segundos para liberar el cristal violeta de las células que invadieron y se cuantificó por espectrometría a 600 nm. Se realizaron cuatro ensayos independientes.

2.3.4 Determinación del efecto del BPA en la expresión de la proteína de GPER.

2.3.4.1 Fundamento de la técnica

La detección de la expresión proteica de GPER se llevó a cabo mediante la técnica de inmunodetección en fase sólida (Western blot). Esta técnica se basa en la separación de proteínas en función de su carga y tamaño en un campo eléctrico, transferencia a un soporte sólido y detección de la proteína de interés utilizando anticuerpos primarios y secundarios (Mahmood & Yang, 2012).

2.3.4.2 Procedimiento

Se siguió la metodología descrita por Castillo-Sanchez et al. (2013) para lo cual a cultivos de células 4T1 con 80% de confluencia se les realizó un cambio de medio de cultivo a medio RPMI 1640 0.5% SFB durante 7 horas, posteriormente fueron tratadas con 1 μ M BPA y se recolectaron los lisados celulares a las 12, 18 y 24 horas. Como control negativo se estimularon células con medio de cultivo RPMI-1640 0.5% SFB sin estímulo de BPA. Un volumen constante de lisado celular (20 μ L) se separó utilizando electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) al 10% a un voltaje de 70 V durante dos horas. Una vez terminado el tiempo, se realizó la transferencia a una membrana de nitrocelulosa empleando 200 miliamperes durante dos horas a cuatro grados centígrados. Estas membranas fueron bloqueadas con PBS-Tween-leche en polvo al 5% durante una hora y se incubaron toda la noche a 4 °C con el anticuerpo anti-GPER o anti-actina como control de carga a dilución de 1:1000. Las membranas fueron lavadas tres veces durante 5 minutos con PBS-Tween al 0.01% y posteriormente se incubaron con un anticuerpo secundario especie-específico acoplado a peroxidasas (dilución 1:5000) durante dos horas a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo se realizaron tres lavados durante 5 minutos con PBS-Tween al 0.01% y se realizó el revelado de las membranas mediante quimioluminiscencia. Finalmente se escanearon los *films* revelados y se realizó un análisis densitométrico empleando el *software* ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland, USA,). Se realizaron tres experimentos independientes.

2.3.5 Análisis de la secreción de MMPs por Western blot

La detección de la secreción de MMPs se llevó a cabo mediante Western blot cuyo fundamento fue descrito previamente.

2.3.5.1 Procedimiento

Se siguió la metodología descrita por Castillo-Sánchez y colaboradores (2013). Células 4T1 fueron cultivadas en cajas de 60 mm dejándolas alcanzar una confluencia cercana al 80%, posteriormente se realizó cambio al medio de cultivo RPMI 1640 0.5% SFB durante 7 horas. Luego de este tiempo se trataron las células con 1 μ M BPA y se recolectaron los sobrenadantes celulares a las 12, 18 y 24 horas. Dichos sobrenadantes se centrifugaron a 10,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos a cuatro grados centígrados. Los sobrenadantes se recolectaron y se centrifugaron a 2500 rpm durante dos horas a 4°C utilizando filtros de 3000 KDa. Una vez centrifugados un volumen constante de sobrenadante celular se empleó para la detección proteica de GPER siguiendo la técnica de inmunodetección. Se realizaron tres experimentos independientes.

2.3.6 Análisis de la secreción de MMPs por zimografía

2.3.6.1 Fundamento de la técnica

La detección de la secreción de MMP-2 y MMP-9 se realizó por zimografía. En esta técnica se emplea electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio copolimerizado con gelatina en la matriz del gel de poliacrilamida. Las muestras se preparan en condiciones no reductoras y una vez finalizada la electroforesis se retira el SDS realizando lavados con un detergente no iónico (Tritón X-100) que permite la renaturalización parcial de las MMPs. Finalmente, el gel es incubado por un periodo de tiempo óptimo en el cual las MMPs degradan la gelatina, que al teñir el gel con azul de Coomassie se distinguen zonas blancas de digestión en un fondo teñido de azul (Cal & Obaya, 2018).

2.3.6.2 Procedimiento

Se siguió la metodología descrita por Castillo-Sánchez et al. (2013). Células 4T1 fueron cultivadas en cajas de 60 mm dejándolas alcanzar una confluencia cercana al 80%, posteriormente se realizó cambio al medio de cultivo RPMI 1640 0.5% SFB durante 7 horas y se trataron las células con 1 μ M BPA recolectando los sobrenadantes celulares a las 12, 18 y 24 horas. Posteriormente se centrifugaron los sobrenadantes celulares a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Seguidamente se recolectaron los sobrenadantes y se centrifugaron a 2500 rpm durante 2 horas a 4°C utilizando filtros de 3000 KDa. Una vez centrifugados, un volumen constante de sobrenadante celular (4 μ L + 11 μ L RPMI 1640 0.5% SFB) se separó utilizando PAGE al 8% copolimerizado con geletina 1 mg/ml durante 3 horas a 4 °C utilizando 70 V. Una vez terminada la corrida electroforética se lavó el gel con Tritón X-100 al 2.5% tres veces a temperatura ambiente retirando la solución cada 30 minutos y posteriormente se incubó el gel en amortiguador para actividad enzimática por 20 horas a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo se tiñó el gel con azul de Coomassie R-250 (Coomassie Brilliant Blue R-250: solución de trabajo para tinción de proteínas) para visualizar la actividad enzimática, luego se destiñó con solución para desteñir geles (metanol absoluto al 50%, ácido acético glacial al 10%, agua bidestilada 40%) hasta que se lograron visualizar lo mejor posible las bandas correspondientes a la actividad de las MMPs. La actividad proteolítica se detectó como una banda clara correspondiente a gelatina degradada, en un fondo azul de gelatina sin digerir. Finalmente se colocaron los geles en una placa de acetato, se escanearon y las bandas se analizaron por densitometría empleado el *software* ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland, USA,). Se realizaron tres experimentos independientes.

2.3.7 Análisis de la localización celular de GPER por inmunofluorescencia

2.3.7.1 Fundamento de la técnica

La detección de la distribución de GPER en células 4T1 se llevó a cabo empleando microscopia de fluorescencia. Esta técnica se basa en incubar las células

con compuestos fluorescentes o anticuerpos marcados con un fluoróforo el cual puede estar conjugado con un anticuerpo primario o secundario. Esto permite que el microscopio de fluorescencia excite el fluoróforo a determinada longitud de onda y al mismo tiempo capte la luz emitida por dicho fluoróforo detectando las estructuras celulares de interés (Carl Zeiss Microscopy GmbH, 2019).

2.3.7.2 Procedimiento

Se siguió la metodología descrita por Castillo-Sánchez et al. (2013); células 4T1 fueron cultivadas sobre un cubreobjetos en cajas de 35 mm dejándolas alcanzar una confluencia cercana al 25%. Posteriormente se realizó cambio al medio de cultivo RPMI 1640 0.5% SFB durante 5 horas y seguidamente se estimularon con 1 μ M de BPA o 10 nM de 17 β -estradiol a tiempos de 15 y 30 minutos; el DMSO se usó como control del diluyente. Terminado el tiempo de estímulo, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos y lavadas 3 veces con PBS 1X. Después las células fueron permeabilizadas con Tritón X-100 al 0.5% durante 20 minutos y lavadas 3 veces con PBS 1X. A continuación, se realizó el bloqueo de las células empleando buffer de bloqueo (PBS 1X con gelatina al 5%, CaCl₂ 1mM, MgCl₂ 0.5 mM) durante 20 minutos. Acto seguido se incubó con un anticuerpo policlonal primario anti-GPER (dilución 1:150) durante toda la noche a 4°C. Finalizando el tiempo de incubación se realizaron 4 lavados con buffer de lavados (PBS 1X con gelatina al 0.1%, CaCl₂ 1mM, MgCl₂ 0.5 mM). GPER fue detectado empleando un anticuerpo secundario especie-específico acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) (dilución 1:150) y se detectó actina con faloidina rodamina (dilución 1:200) incubando durante 2 horas a 4°C realizando seis lavados con buffer de lavados una vez finalizado el tiempo de incubación. El núcleo fue teñido con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindole) (0.5 μ g/ml) durante 3 minutos, realizando tres lavados con agua bidestilada al finalizar el incubado. Finalmente, los cubreobjetos se colocaron sobre un portaobjetos conteniendo 12 μ L de aceite de montaje para microscopía (Vectashield; Vector Laboratories, USA). Las células se observaron en un microscopio de fluorescencia (modelo LSM880 Zeiss). Las imágenes fueron analizadas con el programa ZEN Blue edition v. 3.5 (Zeiss, Germany). Se realizaron tres experimentos independientes.

2.4 Modelo *in vivo*

Se utilizaron ratones hembra Balb/cJ de seis a ocho semanas de edad provenientes del bioterio del CINVESTAV unidad Zacatenco, lugar donde fueron alojados. Los ratones tuvieron acceso libre al agua y alimento manteniéndose a una temperatura controlada por el bioterio con un fotoperiodo de 12 horas luz-oscuridad. Todos los experimentos se realizarán siguiendo los lineamientos y recomendaciones de ética de la Unidad de producción y experimentación de animales de laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV unidad Zacatenco. El número de protocolo aprobado por el UPEAL sobre el cual se basó la realización del presente trabajo es 0294-14.

2.5 Métodos modelo *in vivo*

2.5.1 Administración de BPA en ratones Balb/cJ

Para la experimentación *in vivo* se agruparon a ratones hembra Balb/cJ en cinco grupos de estudio y un grupo control, utilizando once ratones por grupo (33 ratones en total), como a continuación se describe.

Grupos de estudio:

- Grupo 1: ratones inoculados con 3000 células 4T1 con administración de aceite de cacahuate vía oral.
- Grupo 2: ratones inoculados con 3000 células 4T1 con administración de aceite de cacahuate y DMSO vía oral.
- Grupo 3: ratones inoculados con 3000 células 4T1 con administración de BPA 10 µg/kg/día diluido aceite de cacahuate vía oral.

Para la solución madre de BPA, este compuesto se disolvió en DMSO alcanzando una concentración de 2 mM y posteriormente para los tratamientos se disolvió en aceite de cacahuate hasta alcanzar 10 µg/kg/día de BPA, que corresponde a la quinta parte de la dosis de referencia establecida por la EPA en 2012 (50 µg/kg/día de BPA), así mismo, considerando estudios de biomonitoreo en humanos y estudios toxicocinéticos en monos, ratas, ratones y humanos, representa una dosis de BPA ambientalmente relevante. La administración se realizó de manera oral empleando

puntas estériles de 200 µl cada 24 horas durante 18 días, frecuencia y duración del tratamiento determinado como óptimo por el grupo de investigación en trabajos en desarrollo. El volumen máximo de administración fue de 0.025 mL. Los animales fueron pesados cada tercer día para el cálculo de la dosis a administrar.

2.5.2 Inoculación de células cancerosas 4T1 en ratones Balb/cJ.

Para la inoculación de células cancerosas 4T1 se utilizó la metodología descrita por Yang et al. (2012) con algunas modificaciones. Se preparó una suspensión celular en medio RPMI libre de SFB y antibióticos con 3×10^3 células por cada 50 µL de suspensión celular. El número de células se determinó utilizando una cámara de Neubauer. Dentro de un tiempo no mayor a 40 minutos después de haber preparado la suspensión celular se inoculó 50 µL de la suspensión celular (3000 células 4T1) a ratones hembra Balb/cJ de seis a ocho semanas de edad de manera subcutánea en la cuarta almohadilla de grasa mamaria inguinal izquierda. Para dicho procedimiento se utilizó una jeringa de tuberculina de 1 mL con una aguja de ½ pulgada calibre 26. Los ratones fueron sacrificados al día 20 después de la inoculación de células 4T1.

2.5.3 Determinación del crecimiento tumoral.

Se monitoreó diariamente la aparición del tumor palpando la zona de la inoculación con los dedos índice y pulgar en búsqueda de presencia del tumor (Pulaski & Ostrand-Rosenberg, 2001). El volumen tumoral se determinó con un calibrador digital marca REXQuialis (Rango de medición de 0.01 mm a 50 mm, en incrementos de 0.01 mm) diariamente, empleando la ecuación $V = (W^2 \times L)/2$, donde W es el ancho del tumor y L la longitud del mismo (Faustino-Rocha et al., 2013).

El desarrollo de signos clínicos de malestar causados por metástasis (ratones moribundos), así como la pérdida de peso corporal mayor al 20% fue motivo para la eutanasia de los animales (Gregório et al., 2016; Pulaski & Ostrand-Rosenberg, 2001).

2.5.4 Determinación de tumores secundarios (metástasis).

Después de haber realizado la eutanasia de los animales, se recolectó el tumor primario, el cerebro, hígado y pulmones. Posteriormente fueron colocados en solución de Bouin durante 24 horas y posteriormente fueron colocados en etanol al 70%. Una vez fijados los órganos, se procedió al conteo macroscópico de los sitios de metástasis, en cuanto a los tumores primarios se procedió a la determinación del peso y volumen.

2.6 Análisis estadístico.

Los resultados fueron analizados utilizando el programa GraphPad Prism v9 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Para evaluar la normalidad de los datos se utilizó la prueba estadística Komolgorov-Smirnov. Los datos que presentaron normalidad fueron analizados mediante la prueba estadística ANOVA de una vía, y la prueba *post hoc* de comparación múltiple de Dunnett. Para aquellos datos que no se distribuyeron de forma normal se utilizó la prueba estadística Kruskal-Wallis y la prueba *post hoc* de comparación múltiple de Dunn. Los resultados fueron expresados como la media \pm desviación estándar. Un valor de $p \leq 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

3. RESULTADOS

3.1 El BPA no afecta la viabilidad de las células de cáncer de mama 4T1

Para determinar el rango de concentraciones de BPA en el que no presentan efectos citotóxicos, se evaluó la viabilidad celular a diferentes concentraciones. Para ello las células tumorales 4T1 fueron tratadas con concentraciones de 0.4, 1 y 2 μM de BPA durante 24 horas y posteriormente se determinó la viabilidad celular por citometría de flujo. Los resultados muestran que las concentraciones empleadas de BPA no disminuyen la viabilidad celular (Figura 1).

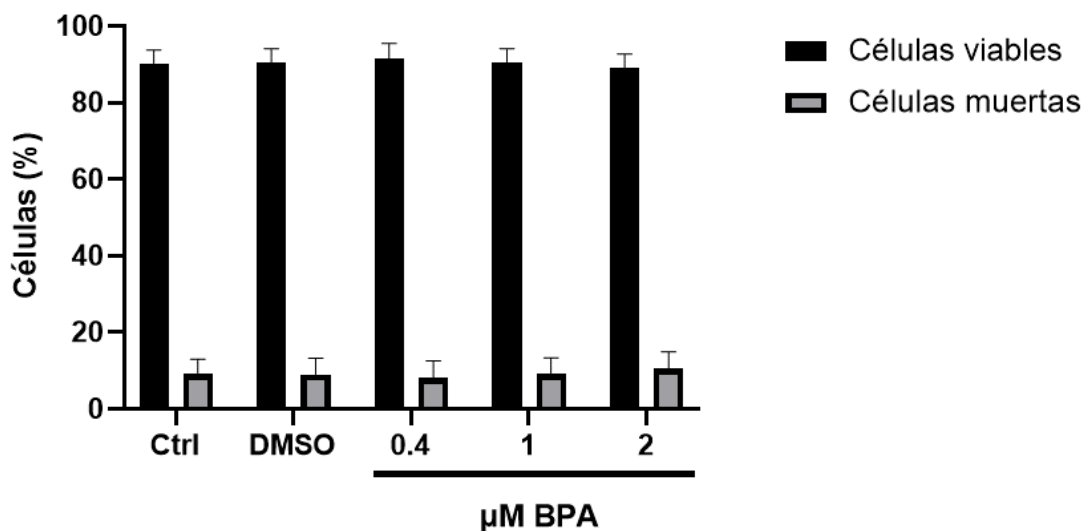


Figura 1. El BPA no es citotóxico para las células de cáncer de mama 4T1. Las Células 4T1 fueron tratadas con concentraciones de 0.4, 1 y 2 μM de BPA durante 24 horas. La grafica representa la media \pm D.E de tres experimentos independientes. Los datos se expresan como el porcentaje de células vivas y muertas.

3.2 El BPA induce un incremento en la expresión del GPER en las células de cáncer de mama 4T1.

En trabajos previos, nuestro grupo de investigación demostró que el BPA induce un incremento significativo de la migración celular de manera dependiente de GPER en células mamarias cancerosas humanas MDA-MB-231 (Castillo Sánchez et al.,

2016). Tomando en cuenta dichos hallazgos, se decidió evaluar el efecto del BPA sobre la expresión de GPER en la línea celular cancerosa 4T1, las células 4T1 fueron estimuladas con 1 μM de BPA durante 24 horas, se recolectaron los lisados celulares a diferentes tiempos (12, 18 y 24 horas). Los resultados demuestran que el BPA incrementa significativamente la expresión de GPER a las 12 y 18 horas al compararlo con el grupo control ($p \leq 0,001$) (Figura 2).

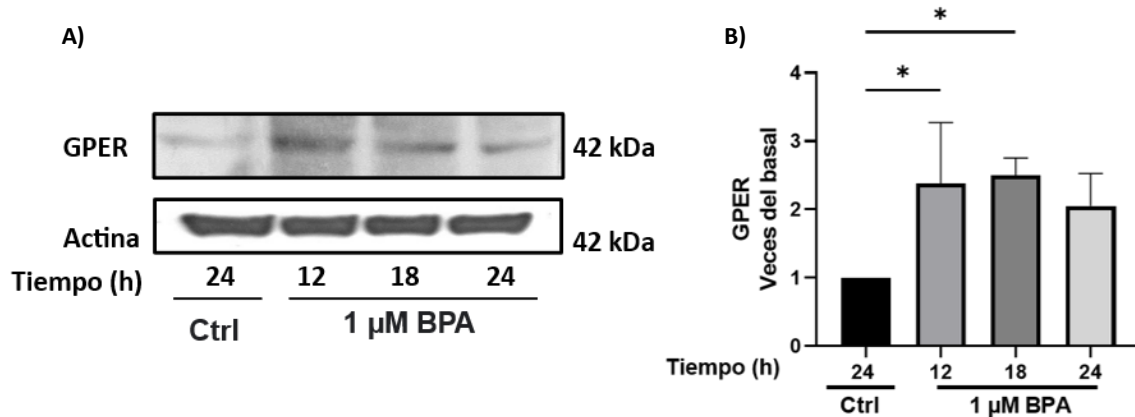


Figura 2. El BPA induce un aumento dependiente del tiempo en la expresión de GPER en las células de cáncer de mama 4T1. (A) *Blot* representativo de 3 experimentos independientes en los cuales las células 4T1 fueron estimuladas con 1 μM de BPA; se evaluaron lisados celulares de las 12, 18 y 24 hrs. La expresión de GPER fue analizada por *Western blot*. Los datos obtenidos fueron normalizados contra la condición sin estímulo. (B) El gráfico muestra la media \pm SD de tres experimentos independientes. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Los asteriscos denotan las diferencias estadísticas ($*p \leq 0.05$) con respecto al grupo control que consistió de células en medio de cultivo RPMI-1640 0.5% SFB sin estímulo de BPA.

3.3 El BPA induce migración de células de cáncer de mama 4T1.

Con la finalidad de determinar el efecto del BPA sobre la migración celular, se realizaron ensayos de migración celular empleando el método de rayadura. Para dichos ensayos las células fueron estimuladas con concentraciones de 0.4, 1 y 2 μM de BPA durante 24 horas, los datos obtenidos fueron normalizados contra la condición sin estímulo. Los resultados demuestran que el BPA es capaz de inducir de manera significativa una mayor migración celular en concentraciones al compararlo con la condición control sin estímulo (Figura 3A).

La migración celular inducida por las tres concentraciones de BPA (0.4, 1 y 2 μM), no fue dependiente de la concentración. Dado que la concentración de 1 μM de BPA se aproxima más a las concentraciones de BPA que han sido encontradas en el tejido graso mamario humano (Keshavarz Maleki y Kaviani, 2021), decidimos trabajar con esta concentración como estímulo para los siguientes experimentos *in vitro*.

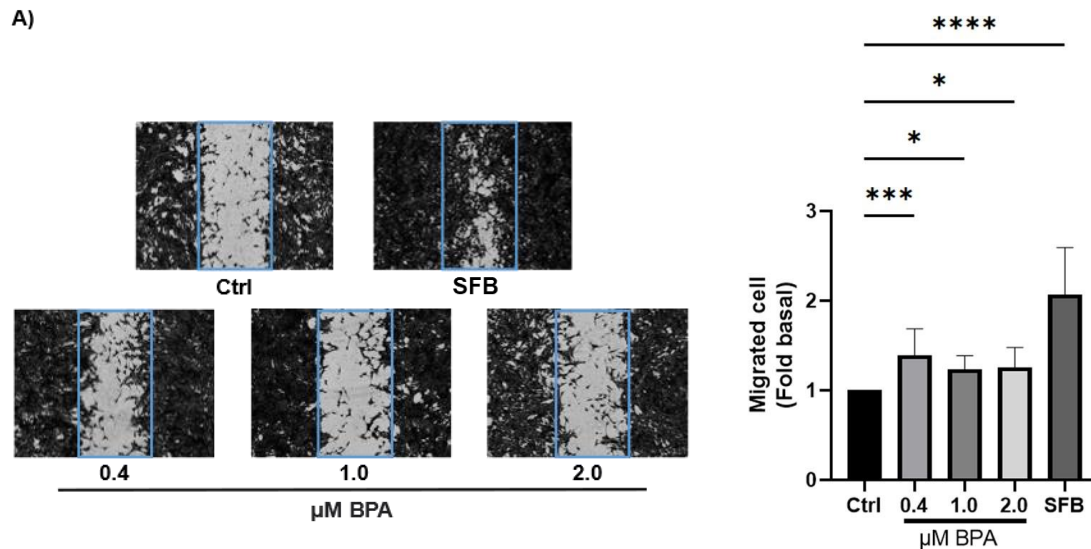


Figura 3. El BPA induce migración de las células de cáncer de mama 4T1. La migración celular se analizó con el método de rayadura. Las células 4T1 se trataron con diferentes concentraciones de BPA y se fijaron tras 24 horas de estímulo. Los datos obtenidos fueron normalizados contra la condición sin estímulo. **A)** El gráfico muestra la media \pm D.E de cinco experimentos independientes. Los datos se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Los asteriscos denotan las diferencias significativas al comparar con la condición control que consistió de células en medio de cultivo RPMI-1640 0.5% SFB sin estímulo de BPA. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,001$ *** $p \leq 0,0001$.

3.4 El BPA induce mayor invasión de las células de cáncer de mama 4T1

Considerando que las células cancerosas deben migrar e invadir los tejidos para diseminarse en la circulación sanguínea o linfática y generar metástasis en órganos distantes (Friedl & Wolf, 2003), se evaluó el efecto del BPA en la invasión celular. Para lo cual se emplearon cámaras de Boyden modificadas con matrigel, los datos obtenidos fueron normalizados contra la condición sin estímulo. Los resultados

muestran que el BPA induce un incremento en la invasión celular comparado con el control negativo ($p \leq 0.05$) (Figura 4A).

A)

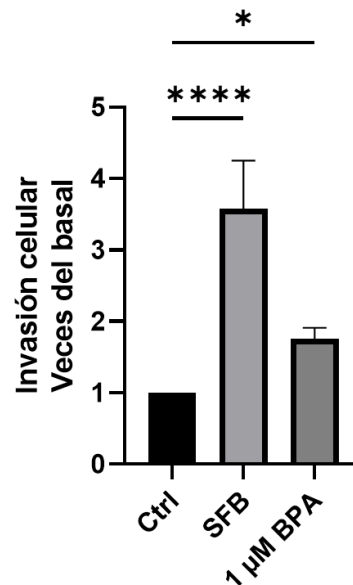
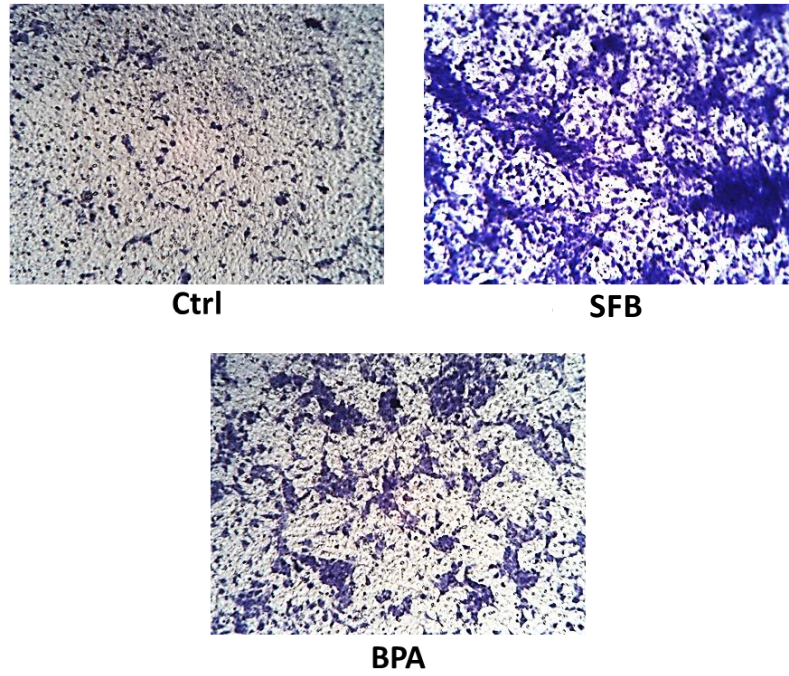


Figura 4. El BPA induce un incremento en la invasión en células 4T1. Células 4T1 fueron estimuladas con 1 μ M de BPA o medio RPMI-1640 con SFB al 5% durante 40 horas en ensayos de invasión en matrigel. Los datos obtenidos fueron normalizados contra la condición sin estímulo. **A)** El

gráfico muestra la media \pm D.E de cuatro experimentos independientes analizados por espectrofotometría. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Los asteriscos denotan las diferencias estadísticas al comparar con la condición control que consistió de células en medio de cultivo RPMI-1640 0.5% SFB sin estímulo de BPA. * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.0001$.

3.5 El BPA induce una mayor secreción de MMP-2 y MMP-9 en las células de cáncer de mama 4T1.

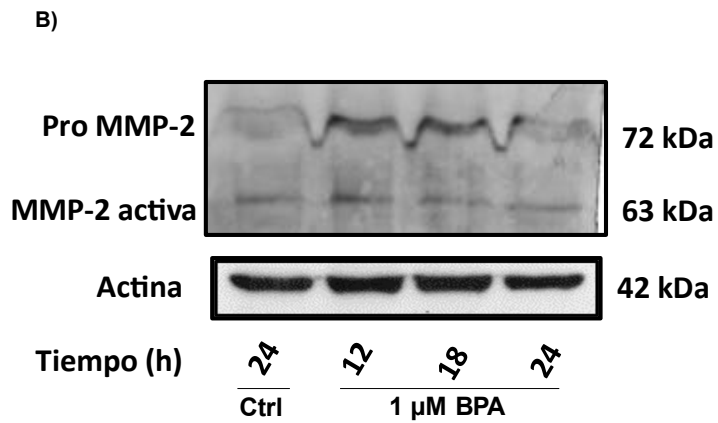
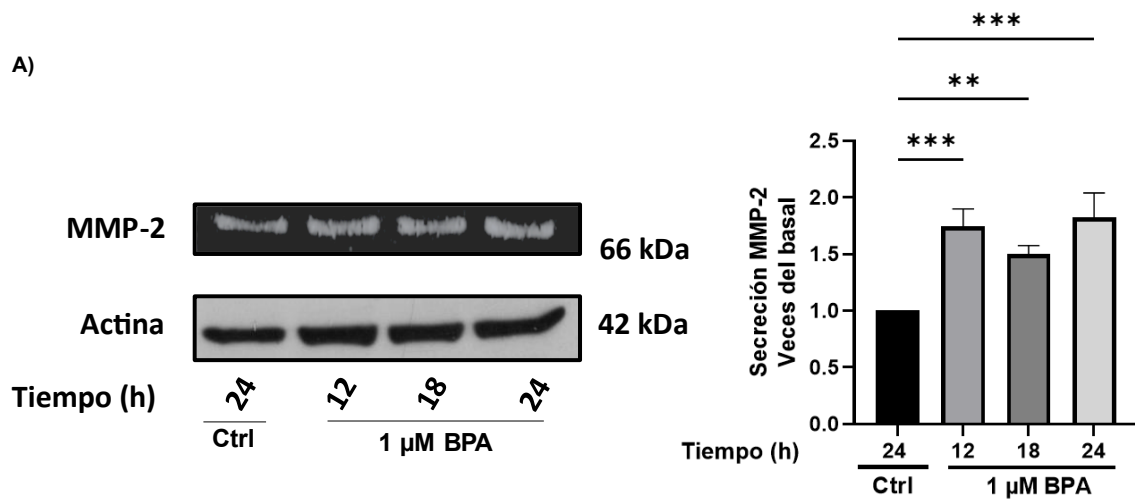
La secreción de MMPs ha sido relacionada con un peor pronóstico de vida en personas con cáncer. En CaMa, se han descrito 2 principales MMPs conocidas como gelatinasas MMP-2 y MMP-9 que son capaces de degradar colágeno tipo IV, abundante en la lámina basal de los ductos mamarios (Fares et al., 2020). De acuerdo con los resultados obtenidos en la Figura 4 decidimos evaluar el papel del BPA en la secreción de MMP-2 y MMP-9 en la línea celular 4T1.

La secreción de la MMP-2 se determinó mediante la técnica de zimografía, para lo cual se emplearon sobrenadantes de células 4T1 estimuladas con 1 μ M de BPA recolectados durante un curso temporal de diferentes tiempos (12, 18 y 24 horas). Los resultados mostraron que el BPA induce un incremento en la secreción de MMP-2 a las 12, 18 y 24 horas al compararlo con el control (Figura 5A).

Para soportar los resultados obtenidos (Figura 5A), se evaluó la expresión de MMP-2 empleando sobrenadantes de las células 4T1 tratadas con 1 μ M de BPA mediante la técnica de *Western blot*, normalizando los datos obtenidos contra la condición sin estímulo. Nuestros resultados mostraron que el BPA incrementó notablemente la secreción de la forma activa de MMP-2 a las 12 y 18 horas en comparación con el control (Figura 5B). Se observaron resultados similares respecto a la forma pro-MMP-2, encontrándose que a las 12 y 18 horas el BPA incrementó su secreción al compararlo con el control (Figura 5B). A las 24 horas de estímulo no se encontró un incremento significativo en la secreción de ambas formas de MMP-2.

Para evaluar la secreción de MMP-9, se realizó un ensayo de zimografía conservando las condiciones utilizadas al evaluar MMP-2. Nuestros resultados

revelaron que el BPA indujo un notable incremento de la secreción de MMP-9 a las 18 horas en comparación con la condición control (Figura 5C).



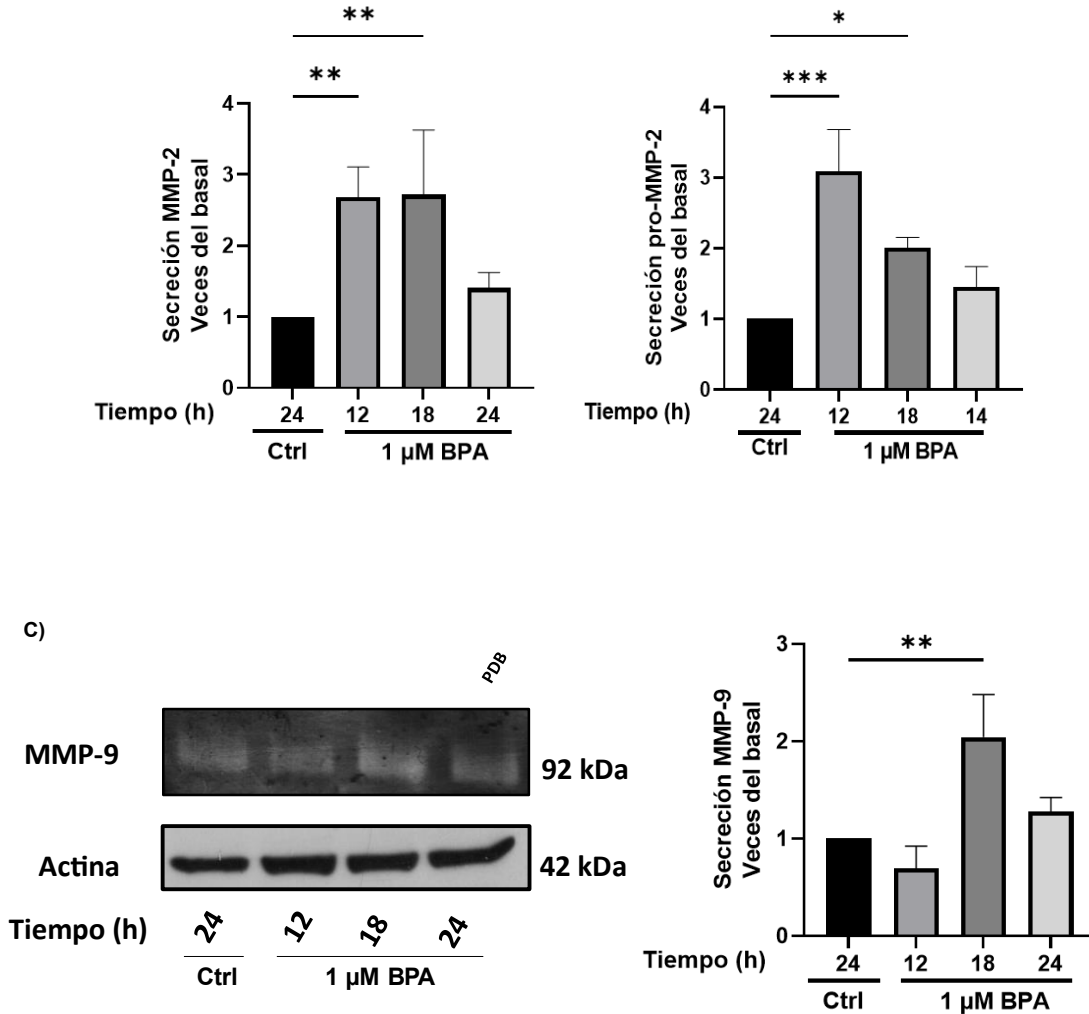


Figura 5. El BPA induce una mayor secreción de MMP-2 y MMP-9 en las células de cáncer de mama 4T1. Células 4T1 fueron tratadas con 1 μM de BPA obteniéndose los sobrenadantes celulares a las 12, 18 y 24 horas. La secreción de MMP-2 se analizó mediante zimografía (A) y por *Western blot* (B). La secreción de MMP-9 se analizó mediante zimografía (C). Los datos obtenidos fueron normalizados contra la condición sin estímulo. Los gráficos representan la media ± D.E de tres experimentos independientes. Los datos se analizaron mediante Kruskal-Wallis seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn (Zimografía de MMP-2) o ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett (*Western blot* de MMP-2 y zimografía de MMP-9). Los asteriscos denotan las diferencias estadísticas al comparar con la condición control que consistió de células en medio de cultivo RPMI-1640 0.5% SFB sin estímulo de BPA. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ *** $p \leq 0.001$.

3.6 El BPA induce traslocación de GPER a la membrana plasmática

El BPA se encuentra expresado tanto en la membrana plasmática como en la membrana de organelos como aparato de Golgi y del retículo endoplásmico (Molina et al., 2017b) y debido a que encontramos un incremento en la expresión de GPER inducido por el BPA (Figura 2), decidimos determinar la existencia de cambios en la distribución celular de GPER inducidos por el BPA, para lo cual se empleó microscopia confocal. Los resultados muestran una distribución homogénea de GPER tanto en el citoplasma como en la membrana plasmática en los grupos control (A y B). Sin embargo, a los 15 minutos de estímulo con 17- β estradiol o BPA se observaron agregados de GPER citoplasmáticos, perinucleares y en la membrana plasmática (C y E). Estos efectos se incrementaron notablemente a los 30 minutos de estímulo. Respecto a la distribución de la actina, se encontró que el tratamiento con 17- β estradiol y BPA indujo una mayor formación de fibras de estrés a los 30 minutos, las cuales están asociadas y promueven la formación de adhesiones focales, involucradas en la migración celular (Livne y Geiger, 2016).

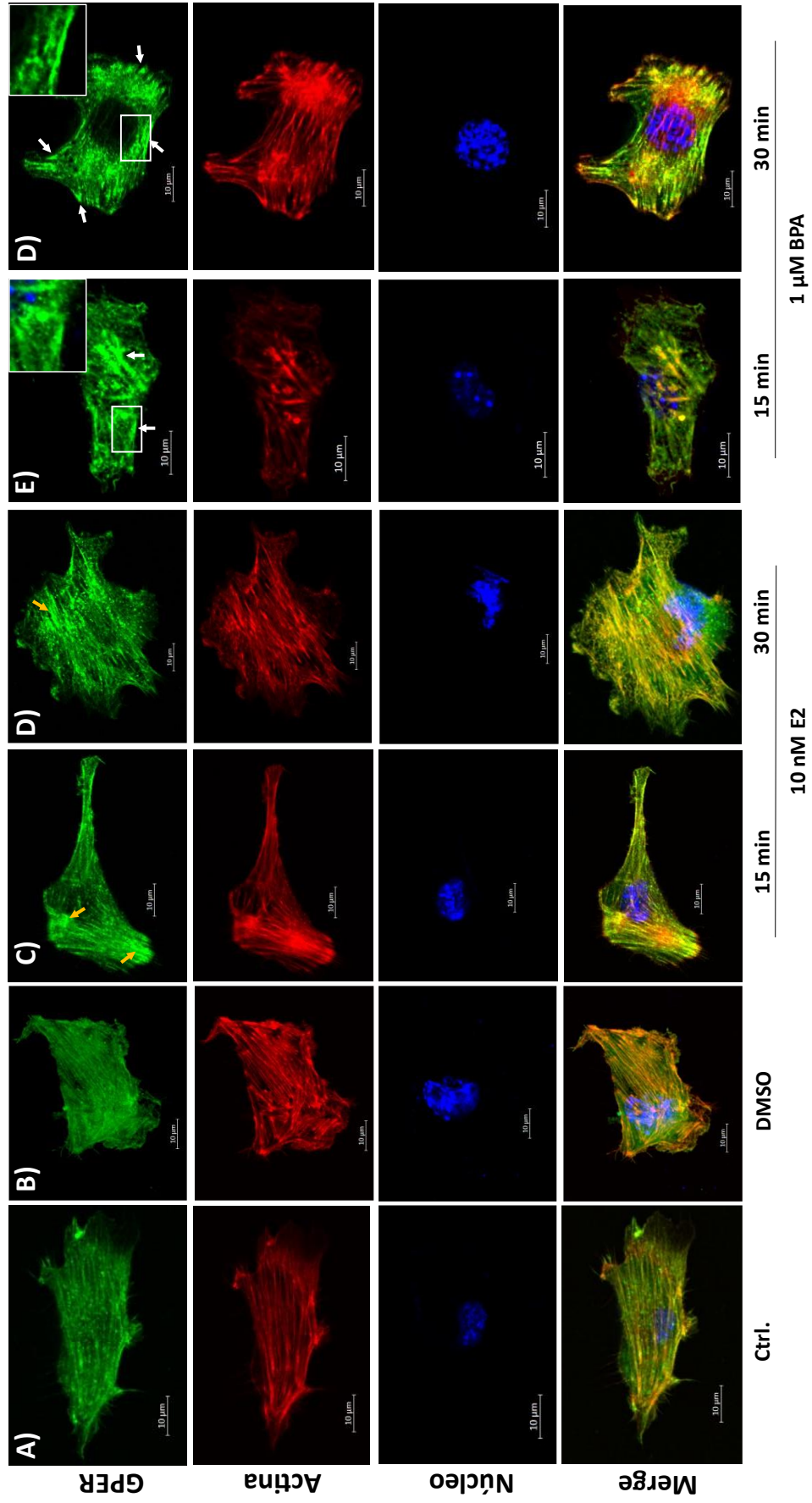


Figura 6. El BPA induce mayor secreción de MMP-2 de manera dependiente del tiempo en las células de cáncer de mama 4T1. En todos los paneles, GPER fue reconocido con un anticuerpo policlonal contra *rabbit* acoplado a FITC (Verde) y el citoesqueleto de F-Actina con rodamina-faloidina (rojo). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (Azul). (A) Muestra el grupo control a los 30 minutos de estímulo. (B) Se muestra el grupo control del vehículo (DMSO) a los 30 minutos de estímulo. En los paneles B-C las células se incubaron con 17-β estradiol (E2) (10 nM) durante 15 y 30 minutos. El estímulo con BPA a los 15 y 30 minutos se muestra en los paneles E y D respectivamente. Se observó la formación de agregados citoplasmáticos, perinucleares y membranales a los 15 y 30 minutos de estímulo con E2 (Flechas amarillas) y BPA (Flechas blancas). Barras de escala: 10 μm.

3.7. El BPA induce mayor volumen y peso del tumor primario

Nuestros resultados anteriores demostraron que en un sistema *in vitro*, el BPA incrementa notablemente los procesos de migración, invasión, así como la secreción de MMP-2 y MMP-9, sugiriendo que el BPA puede tener un papel importante en el proceso de metástasis, por lo cual decidimos evaluar el papel del BPA en la metástasis en un modelo *in vivo*.

La medición del tumor primario disectado mostró que el tratamiento con BPA indujo un incremento del peso (Figura 7A) y del Volumen (Figura 7B y 7C) siendo estadísticamente significativo (** $p \leq 0.01$).

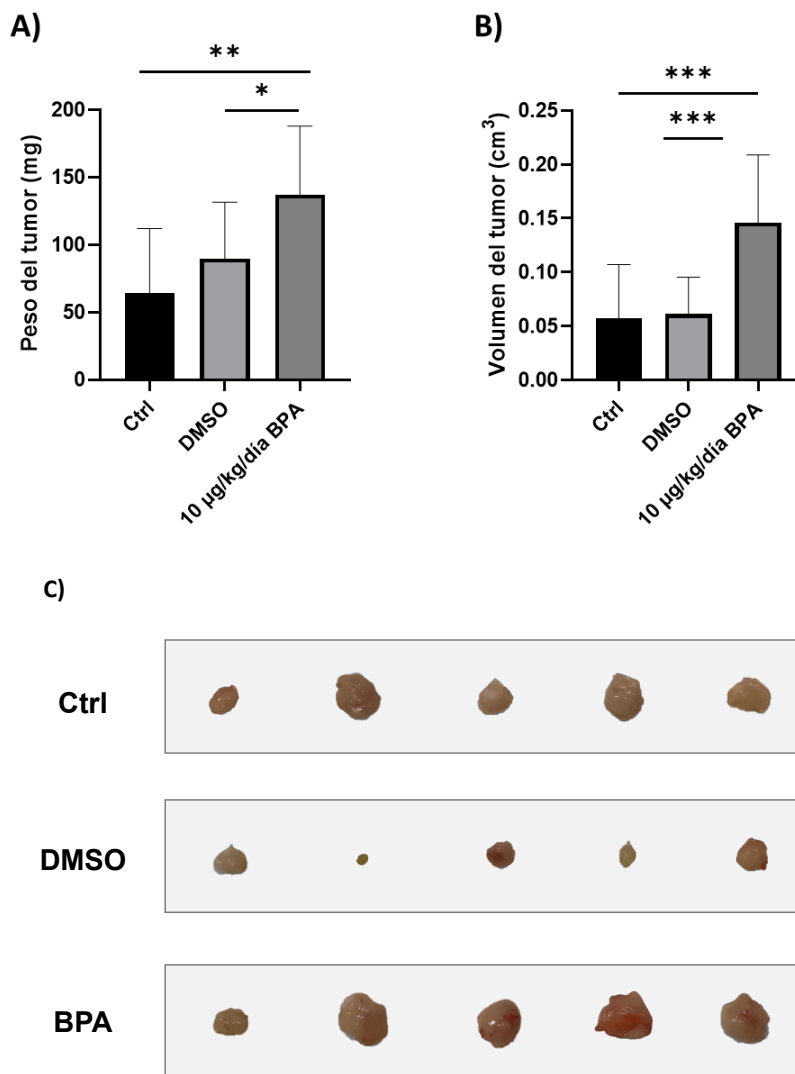


Figura 7. El BPA induce mayor volumen y peso del tumor primario. Tumores primarios de ratones Balb/cJ hembra fueron disectados al día 20 después de la inoculación de células 4T1. **(A)** Análisis del peso de tumores primarios disectados. **(B)** Análisis del volumen de los tumores disectados. **(C)** Imagen representativa de tumores primarios de diferentes ratones. Los gráficos representan la media \pm D.E de once ratones por grupo. Los datos se analizaron mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Los asteriscos denotan las diferencias estadísticas al comparar con los grupos control. $**p \leq 0.01$.

3.8 El BPA induce un mayor número de macrometástasis en pulmón

Entre los principales sitios de metástasis en CaMa se encuentra el cerebro, hígado y pulmón (M. T. Chen et al., 2017). Por lo tanto, evaluamos el papel del BPA como inductor de mayores nódulos metastásicos en estos órganos. Luego de la disección, los órganos fueron fijados durante 24 horas en solución de Bouin, y posterior a este tiempo se colocaron en etanol al 70%. Los nódulos metastásicos se identificaron como áreas blancas esféricas en un fondo de tejido teñido de color amarillo (Figura 8C).

No se encontraron metástasis a nivel de cerebro. En el hígado, se encontró un aumento no significativo de nódulos metastásicos en el grupo tratado con BPA (Figura 8A). En los pulmones se encontró que el tratamiento con BPA indujo un incremento estadísticamente significativo ($**p \leq 0.01$), en el número de nódulos metastásicos (Figura 8B).

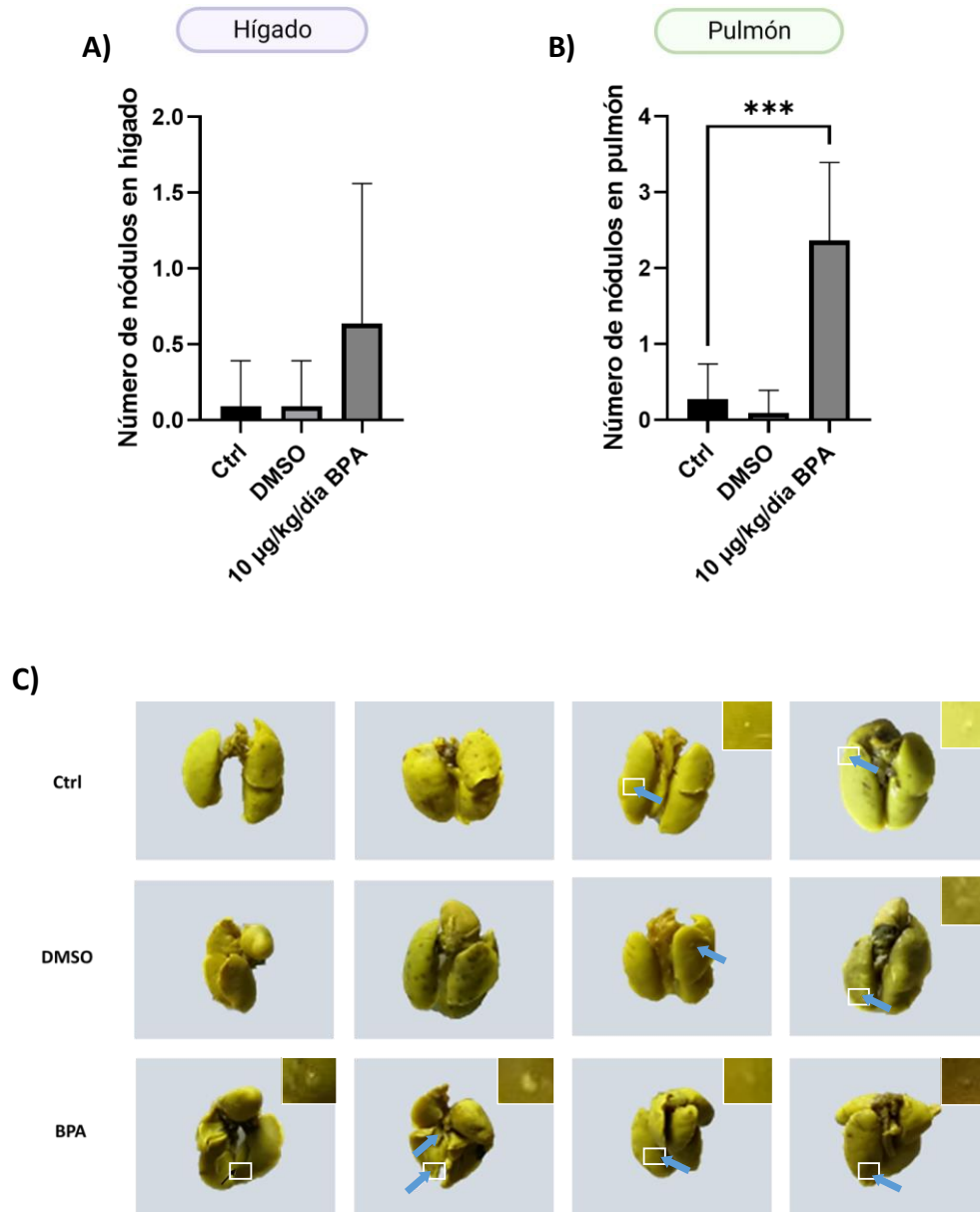


Figura 8. El BPA a dosis de 10 µg/kg induce mayor metástasis a pulmón. Cerebro, hígado y pulmones de ratones Balb/cJ hembra fueron disectados al día 20 posterior a la inoculación de células 4T1. **(A)** Análisis del número de nódulos metastásicos en hígado. **(B)** Análisis del número de nódulos metastásicos en pulmón. **(C)** Imagen representativa de pulmones, las flechas azules señalan los nódulos metastásicos. El tratamiento con BPA incrementó significativamente la cantidad de nódulos metastásicos en pulmón comparado con el grupo control. Los gráficos representan la media \pm D.E de seis ratones por grupo. Los datos se analizaron mediante Kruskal-Wallis seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunn's. Los asteriscos denotan las diferencias estadísticas al comparar con el grupo control. $**p \leq 0.01$.

4. DISCUSIÓN

El CaMa es una enfermedad que posee una incidencia elevada en todo el mundo representando el tipo cáncer más frecuentemente diagnosticado, así como la principal causa de muerte por cáncer en mujeres (Global Cancer Observatory, 2021). Diversos factores de riesgo se han relacionado al desarrollo del CaMa, entre los que se encuentra la edad, los factores reproductivos y los factores ambientales, en este último tiene relevancia la exposición a disruptores endócrinos como el BPA (Bhattacharyya et al., 2020; Eve et al., 2020),(Calaf et al., 2020). En los últimos años se ha relacionado la exposición al BPA con un incremento en la proliferación y migración celular, así como a un incremento en la expresión de MMPs en líneas celulares humanas TNBC. Dichos hallazgos han sido relacionados con la capacidad que tiene el BPA de interactuar con receptores de estrógeno, receptores relacionados al estrógeno gama y el receptor de estrógeno acoplado a proteínas G (Castillo Sánchez et al., 2016; Stillwater et al., 2020; X. L. Zhang et al., 2016). Por lo que, en el presente estudio se evaluó el efecto del BPA en la inducción de procesos celulares de migración, invasión, secreción de MMPs y expresión y localización celular de GPER en la línea celular murina TNBC 4T1. También, se evaluó su papel en el tamaño del tumor primario y la metástasis en un modelo tumoral murino empleando células 4T1.

En nuestro estudio utilizamos una concentración de 1 μ M de BPA como estímulo para los experimentos del modelo *in vitro*, dicha concentración no afectó la viabilidad celular, siendo importante a considerar que esta concentración es más elevada que la que se ha reportado en tejido graso de la mama en concentraciones de 1.80 a 12.1 ng/g (Fernandez et al., 2007; Keshavarz-Maleki & Kaviani, 2021). Respecto a la concentración de BPA elegida como estímulo para los estudios *in vivo* (10 μ g/kg peso corporal/día), esta correspondió a la quinta parte de la dosis de referencia establecida por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos de 50 μ g/kg de peso corporal al día (Gao et al., 2015; Hong & Yang, 2017). Es importante considerar que actualmente existe una controversia en cuanto a los niveles a los que se encuentra expuesta la población humana, así como las concentraciones de BPA en matrices como la sangre que son reportadas en concentraciones de 0.2-20 ng/mL (Hong &

Yang, 2017) o en orina que son reportadas en concentraciones $\geq 0.1 \mu\text{g/L}$ (media geométrica $1.33 \mu\text{g/L}$ de orina) en poblaciones representativas de Estados Unidos (Calafat et al., 2005). Vale la pena destacar que son pocos los estudios que han estimado la exposición total de BPA en poblaciones humanas de diferentes países. Sin embargo, concentraciones menores a la dosis de referencia establecida por la EPA han mostrado alteraciones en la estructura de la glándula mamaria en estudios *in vivo* (Moral et al., 2008).

Los estudios de exposición aguda del BPA reportan concentraciones en sangre en el rango de picogramos a nanogramos por mililitro. No obstante, estos estudios no reflejan la exposición crónica en humanos (Vandenberg et al., 2007) ya que el BPA puede presentar bioacumulación en tejido graso debido a su naturaleza lipofílica (Almeida et al., 2018; Valentino et al., 2016). Aunado a esto, es muy importante considerar que existen diferencias respecto a los niveles de exposición diaria al BPA en diferentes países alrededor del mundo (Huang et al., 2017). En este contexto, estudios recientes, empleando modelos toxicocinéticos han reportado que para alcanzar concentraciones de BPA en sangre de 1-3 ng/mL se requieren exposiciones por vía oral que exceden los $500 \mu\text{g/kg}$ peso corporal/día (Vandenberg et al., 2007). Esta evidencia ha sido soportada por estudios toxicocinéticos *in vivo* (Taylor et al., 2011) por lo que la exposición de las poblaciones humanas al BPA podría ser más alta que la que se ha estimado previamente (Gerona et al., 2020). Esta evidencia también es soportada por reportes en humanos que indican que es necesaria la administración por vía oral de 30 a $100 \mu\text{g/kg}$ peso corporal/día de BPA para alcanzar los niveles en sangre reportados en humanos (Teeguarden et al., 2015; Thayer et al., 2015), contrastando con estudios que indican la existencia de una ingesta baja de BPA en el rango de 1 a $5 \mu\text{g/kg}$ peso corporal/día (Murata & Kang, 2018). Estos datos en conjunto sugieren que existe un riesgo de estar subestimando las concentraciones de BPA a las cuales la población se encuentra expuesta y sobre las cuales se basan las decisiones legislativas para su regulación (Gerona et al., 2020). Por lo que, con base en la evidencia presentada, sugerimos que las concentraciones de BPA empleadas en nuestros modelos de estudio son ambientalmente relevantes y podrían estar presentes en tejido graso de la glándula mamaria, reiterando que existe la necesidad de

determinar los niveles de exposición, así como la concentración de BPA en tejidos humanos de diferentes poblaciones especialmente las pertenecientes a países pobres y en vías de desarrollo que probablemente empleen una mayor cantidad de plásticos en su vida diaria y en donde la regulación del BPA es todavía nula.

Estudios recientes han planteado un papel del BPA en la carcinogénesis de distintos cánceres hormono-dependientes entre los cuales destaca el CaMa (D Seachrist et al., 2015). En este estudio se demostró que el BPA induce un incremento en la migración celular de células 4T1. Estos hallazgos concuerdan con estudios previos que demuestran que el BPA induce mayor migración celular en células de cáncer hormono-dependientes tales como células de cáncer de ovario BG-1 and OVCAR-3 (Kim et al., 2015; Ptak et al., 2014), cáncer cervical HeLa, C-33A y SiHa (Ma et al., 2015) y de CaMa humano MDA-MB-231 (Castillo Sanchez et al., 2016), así como en células de cáncer no hormono-dependientes como las células de cáncer de pulmón A549 (K. Zhang et al., 2014). Respecto a la invasión celular, nuestros resultados son consistentes con reportes en los que el BPA induce un incremento en la invasión celular en otros modelos celulares de cáncer. Entre ellos destacan los de CaMa MDA-MB-231 (Castillo Sanchez et al., 2016), BT-549 (X. L. Zhang et al., 2016), de endometrio RL95-2 (K. H. Wang et al., 2015), ovario OVCAR-3 (Sang et al., 2021) y cérvix HeLa, SiHa, y C-33A (Ma et al., 2015) y así como también en células de estroma endometrial humano (HESCs) (Wen et al., 2020). Todos estos hallazgos sugieren que el BPA favorece la progresión tumoral y la metástasis al incrementar la motilidad y comportamiento invasivo de las células cancerosas, lo que en nuestro modelo *in vivo* se reflejó como mayor número de nódulos metastásicos. Aunado a esto, se ha reportado que el BPA induce proliferación e inhibe la apoptosis en células epiteliales no tumorales MCF12A (Marchese & Silva, 2012) así como también induce transformación neoplásica en células epiteliales de mama humanas (S. V. Fernandez & Russo, 2010). Estos datos sugieren que el BPA también puede participar en las primeras etapas del desarrollo de cáncer mamario.

Las MMP-2 y MMP-9 se han reportado ampliamente expresadas en células tumorales y se involucran en la progresión tumoral (Polette et al., 2004; Quintero-

Fabián et al., 2019). En nuestro estudio nosotros demostramos que el BPA induce un incremento en la secreción de MMP-2 y MMP-9. Con lo anterior proponemos que el BPA favorece los procesos de migración e invasión celular a través del incremento en la secreción de MMP-2 y MMP-9. Apoyando nuestra propuesta diversos estudios describen que el BPA induce la secreción de estas dos MMPs además de inducir migración e invasión en células de CaMa MDA-MB-231 (Castillo Sánchez et al., 2016), células de cáncer de pulmón BT549 (X. L. Zhang et al., 2016) y células de cáncer de ovario OVCAR-3 (Sang et al., 2021).

Con respecto al papel del BPA en la expresión de GPER, previamente nuestro equipo de trabajo ha demostrado que el estímulo con 1 μ M de BPA incrementa la expresión de RNAm y de la proteína de GPER en células de CaMa humanas MDA-MB-231 de manera tiempo dependiente (Castillo Sánchez et al., 2020). De forma similar en este estudio demostramos que en células de CaMa murinas 4T, el estímulo con 1 μ M de BPA induce un incremento en la expresión de GPER. La relación entre la exposición al BPA y la expresión de GPER es muy limitada. Sin embargo, otros estudios han reportado que los niveles de RNAm y proteicos de GPER se incrementan ante estímulos de BPA en células de espermatogonias GC-1. (Sheng et al., 2013). Por otro lado, se ha descrito una asociación positiva entre los niveles de GPER y BPA ($r = 0.708$; $p = .001$) en pacientes con enfermedad de Crohn (Linares et al., 2021). Los resultados de estos estudios en conjunto con nuestros hallazgos permiten sugerir que el BPA, al actuar como ligando de GPER, activa vías de señalización estrogénicas rápidas como la vía MAPK/ERK provocando cambios en la expresión génica que conllevan al incremento en la transcripción del gen de GPER. Posteriormente, el BPA, al interactuar con GPER, favorece los procesos de migración y el comportamiento invasivo de las células cancerosas al regular el recambio de los contactos de adhesión focal (Castillo Sánchez et al., 2016, 2020). Pero también GPER puede inducir la transactivación de EGFR el cual también favorece la migración e invasión de células cancerosas (Filardo et al., 2000; Liang et al., 2017; Quinn et al., 2009). Lo descrito anteriormente también contribuye a explicar nuestros hallazgos con respecto a los ensayos de migración e invasión empleando células 4T1. Por otra parte, sugerimos que el efecto observado respecto a la disminución de la expresión de GPER luego de

24 horas de estímulo con BPA se puede deber a procesos de desensibilización de GPER que evitan una señalización excesiva del receptor.

No obstante, nuestros resultados contrastan con reportes en los que la expresión de GPER no se ha visto modificada por el estímulo de BPA en células de CaMa BT-549 (X. L. Zhang et al., 2016). Dicha discrepancia podría deberse a las diferencias existentes entre las líneas celulares, pues se trata de células provenientes de diferentes especies (Luo & Liu, 2020).

Con respecto a la distribución de GPER en la célula, ésta se ha descrito tanto en la membrana citoplasmática como en organelos celulares (Figueira et al., 2018; Molina et al., 2017; Xu et al., 2019; Zimmerman et al., 2016). Nuestros resultados demuestran que el BPA induce una relocalización de GPER de manera tiempo dependiente, y de manera muy interesante, induce la formación de agregados en la membrana citoplasmática, espacio perinuclear y en el citoplasma. El significado biológico del tráfico subcelular de GPER no ha sido determinado por completo (Cheng et al., 2011), siendo pocos los estudios que han evaluado la redistribución de GPER en CaMa. En este sentido, la expresión citoplasmática de GPER en pacientes se ha asociado con subtipos histológicos no ductales, menor estadio tumoral y mayor diferenciación histológica, mientras que la localización nuclear se ha asociado con carcinomas poco diferenciados y con el subtipo triple negativo (Samartzis et al., 2014). Previamente hemos reportado que GPER induce mayor migración celular en células MDA-MB-231 a través de la activación de la cinasa de adhesión focal (FAK), la tirosina cinasa Src y ERK2 favoreciendo el recambio de los contactos de adhesión focal y consecuentemente la migración celular (Castillo Sánchez et al., 2020). Consecuentemente, nosotros proponemos que la relocalización de GPER que observamos en el presente estudio hacia la membrana citoplasmática en forma de agregados, se encuentra estrechamente relacionada con el recambio de los contactos de adhesión focal en los frentes de migración, en donde GPER tendría una participación directa en la migración celular. Interesantemente, se ha reportado que en el proceso de desensibilización de GPER ocurre un transporte retrogrado desde la membrana plasmática hacia el espacio perinuclear y seguidamente una dispersión en

el citoplasma (Cheng et al., 2011). Lo anterior es consistente con el patrón de distribución que nosotros observamos en los tiempos evaluados (15 y 30 minutos). Sin embargo, la razón de la existencia de una redistribución del receptor hacia la región perinuclear no es del todo clara. Una posibilidad es que GPER retorne al aparato de Golgi o al retículo endoplásmico para su degradación proteosomal o lisosómica, en donde incluso puede ser reciclado hacia la membrana plasmática (Cheng et al., 2011). Este tráfico intracelular de GPER puede reflejar un comportamiento biológico en TNBC y estar siendo modulado por el BPA. No obstante, son necesarios más estudios que esclarezcan este fenómeno.

Otro hallazgo interesante fue lo observado en nuestro modelo *in vivo* en el cual la exposición subaguda diaria al BPA indujo un incremento en el volumen y peso del tumor primario. Esta observación puede ser explicada por los hallazgos en diferentes estudios en el que el BPA induce la activación de vías de señalización involucradas en la proliferación celular tales como MAPK, PI3K y mTOR (Dairkee et al., 2013; Murata & Kang, 2018). Siendo consistente con esta información, existen reportes de la existencia de un efecto inductor de proliferación celular luego de la exposición al BPA a células cancerosas MCF-7 a diferentes concentraciones (0.1, 1 y 10 μ M) (Deng et al., 2021). Por su parte, Murata & Kang (2018) han reportado un incremento en la proliferación de células epiteliales de la glándula mamaria y un aumento en el número y el tamaño de los acinos y ductos en ratas expuestas a 5 mg/kg de BPA por ocho semanas. De manera muy similar Acevedo et al. (2013) reportaron la inducción de hiperplasia ductal y un incremento en la incidencia de tumores mamarios en ratas luego de la exposición gestacional y durante la lactancia al BPA en concentraciones de 0.25, 25, y 250 μ g/kg/día. A pesar de estos reportes, nuestro conocimiento sobre papel del BPA en TNBC sigue siendo limitado. Hasta donde sabemos, nuestro estudio es el primero en reportar efectos en el volumen y peso del tumor primario en un modelo tumoral murino TNBC. Con base en esta evidencia, proponemos que la exposición al BPA está asociado a la progresión tumoral de este subtipo de CaMa.

Por otra parte, la metástasis es una característica de las células cancerosas que contribuye de manera importante a la mortalidad en TNBC (X. L. Zhang et al., 2016),

siendo la razón de una baja supervivencia durante los primeros tres años después del diagnóstico (Dent et al., 2007; Liedtke et al., 2008). Por lo tanto, en este estudio investigamos el papel del BPA en la metástasis a pulmón, hígado y cerebro. Nuestros hallazgos indican que el BPA induce un mayor número de nódulos metastásicos en el pulmón. En este sentido, estudios sobre la exposición del BPA en la contribución a la progresión del tumor y metástasis son muy limitados, ya que la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha se basan en modelos *in vitro*. Apoyando nuestros resultados Jenkins et al. (2011) demostraron que la exposición oral crónica de ratones MMTV-erbB2 a dosis de 2.5 y 25 µg/L de BPA en el agua de bebida incrementa significativamente el número de ratones que desarrollaran metástasis a pulmón. Nuestros hallazgos son los primeros en reportar un incremento en la metástasis a pulmón en TNBC por exposición subaguda al BPA en un modelo *in vivo*.

En conjunto, nuestros resultados tanto del modelo *in vitro* como en el modelo *in vivo* sugieren que el BPA puede actuar como un promotor tumoral y contribuir al desarrollo de la metástasis en TNBC poniendo de manifiesto la relevancia que tiene el efecto de la exposición al BPA en las poblaciones humanas, especialmente en pacientes con CaMa.

5. CONCLUSIÓN

EL BPA induce un incremento en la migración e invasión celular, la secreción de MMP-2 y MMP-9, la expresión de GPER y su redistribución en forma de agregados en la membrana, espacio perinuclear y citoplasma. Así mismo la exposición de ratones a BPA incrementa el peso y volumen de tumores primarios al igual que un incremento de metástasis a pulmones. Nuestro estudio aporta una nueva comprensión del impacto potencial de la exposición al BPA en la progresión y metástasis del TNBC, el cual podría tener implicaciones clínicas y afectar el pronóstico de los pacientes.

6. PERSPECTIVAS

- Evaluar la expresión diferencial de GPER inducida por BPA en membrana plasmática, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y núcleo en respuesta a estímulos con BPA en células de CaMa TNBC.
- Evaluar el papel y expresión de GPER en el tumor primario y metástasis en un modelo tumoral murino TNBC expuesto al BPA.
- Evaluar sitios de micrometástasis en pulmón y en el sistema óseo al igual que la expresión de GPER en dichos sitios así como en el tumor primario en un modelo tumoral murino TNBC expuesto al BPA.
- Analizar histológicamente el perfil de expresión de citosinas, factores angiogénicos como VEGF e infiltrado de células inmunes intratumorales en un modelo tumoral murino TNBC expuesto al BPA

7. REFERENCIAS.

- Abraham, A., & Chakraborty, P. (2019). A review on sources and health impacts of bisphenol A. *Reviews on Environmental Health*, 8, 1–10. <https://doi.org/10.1515/reveh-2019-0034>
- Acconcia, F., Pallottini, V., & Marino, M. (2015). Molecular mechanisms of action of BPA. *Dose-Response*, 13(4), 1–9. <https://doi.org/10.1177/1559325815610582>
- Acevedo, N., Davis, B., Schaeberle, C. M., Sonnenschein, C., & Soto, A. M. (2013). Perinatally administered bisphenol A as a potential mammary gland carcinogen in rats. *Environmental Health Perspectives*, 121(9), 1040–1046. <https://doi.org/10.1289/ehp.1306734>
- Almeida, S., Raposo, A., Almeida-González, M., & Carrascosa, C. (2018). Bisphenol A: Food Exposure and Impact on Human Health. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17(6), 1503–1517. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12388>
- American Cancer Society. (2019). *Lifestyle-related Breast Cancer Risk Factors*. <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/risk-and-prevention/lifestyle-related-breast-cancer-risk-factors.html>
- American Cancer Society. (2021). *Triple-negative Breast Cancer*. <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/about/types-of-breast-cancer/triple-negative.html>
- Anders, C. K., Johnson, R., Litton, J., Phillips, M., & Bleyer, A. (2009). Breast Cancer Before Age 40 Years. *Seminars in Oncology*, 36(3), 237–249. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2009.03.001>
- Ataollahi, M. R., Sharifi, J., Paknahad, M. R., & Paknahad, A. (2015). Breast cancer and associated factors: a review. *Journal of Medicine and Life*, 8(Spec Iss 4), 6–11. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28316699/>
- Bareche, Y., Venet, D., Ignatiadis, M., Aftimos, P., Piccart, M., Rothe, F., & Sotiriou, C. (2018). Unravelling triple-negative breast cancer molecular heterogeneity using an

- integrative multiomic analysis. *Annals of Oncology*, 29(4), 895–902. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy024>
- Bhattacharyya, G. S., Doval, D. C., Desai, C. J., Chaturvedi, H., Sharma, S., & Somashekhar, S. P. (2020). Overview of Breast Cancer and Implications of Overtreatment of Early-Stage Breast Cancer: An Indian Perspective. *JCO Global Oncology*, 6, 789–798. <https://doi.org/10.1200/go.20.00033>
- Bobadilla, A. V. P., Arévalo, J., Sarró, E., Byrne, H. M., Maini, P. K., Carraro, T., Balocco, S., Meseguer, A., & Alarcón, T. (2019). In vitro cell migration quantification method for scratch assays. *Journal of the Royal Society Interface*, 16(151). <https://doi.org/10.1098/rsif.2018.0709>
- Bychkovsky, B. L., Dizon, D. S., Sikov, W. M., & Farber, D. (2016). Systemic Therapies for Nonmetastatic Breast Cancer: The Role of Neoadjuvant and Adjuvant Chemotherapy and the Use of Endocrine Therapy. *Clinical Obstetrics and Gynecology*, 59(4), 756–771. <https://doi.org/10.1097/GRF.0000000000000237>.
- Cal, S., & Obaya, A. J. (2018). *Proteases and Cancer Methods and Protocols Methods in Molecular Biology*. <http://www.springer.com/series/7651>
- Calaf, G. M., Ponce-Cusi, R., Aguayo, F., Muñoz, J. P., & Bleak, T. C. (2020). Endocrine disruptors from the environment affecting breast cancer (Review). *Oncology Letters*, 20(1), 19–32. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11566>
- Calafat, A. M., Kuklennyik, Z., Reidy, J. A., Caudill, S. P., Ekong, J., & Needham, L. L. (2005). Urinary concentrations of bisphenol A and 4-Nonylphenol in a human reference population. *Environmental Health Perspectives*, 113(4), 391–395. <https://doi.org/10.1289/ehp.7534>
- Carl Zeiss Microscopy GmbH. (2019). *Principles of Fluorescence and Fluorescence Microscopy*. https://en.wikipedia.org/wiki/Aequorea_victoria
- Castillo Sanchez, R., Gomez, R., & Perez Salazar, E. (2016). Bisphenol A Induces Migration through a GPER-, FAK-, Src-, and ERK2-Dependent Pathway in MDA-

- MB-231 Breast Cancer Cells. *Chemical Research in Toxicology*, 29(3), 285–295. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.5b00457>
- Castillo Sanchez, R., Ramirez-Ricardo, J., Martinez-Baeza, E., Cortes-Reynosa, P., Candanedo-Gonzales, F., Gomez, R., & Salazar, E. P. (2020). Bisphenol A induces focal adhesions assembly and activation of FAK, Src and ERK2 via GPER in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Toxicology in Vitro*, 66(January), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2020.104871>
- Chen, H., Wu, J., Zhang, Z., Tang, Y., & Li, X. (2018). Association Between BRCA Status and Triple-Negative Breast Cancer: A. *Frontiers in Pharmacology*, 9(August), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00909>
- Chen, M. T., Sun, H. F., Zhao, Y., Fu, W. Y., Yang, L. P., Gao, S. P., Li, L. D., Jiang, H. L., & Jin, W. (2017). Comparison of patterns and prognosis among distant metastatic breast cancer patients by age groups: A SEER population-based analysis. *Scientific Reports*, 7(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10166-8>
- Cheng, S. bin, Graeber, C. T., Quinn, J. A., & Filardo, E. J. (2011). Retrograde transport of the transmembrane estrogen receptor, G-protein-coupled-receptor-30 (GPR30/GPER) from the plasma membrane towards the nucleus. *Steroids*, 76(9), 892–896. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2011.02.018>
- Cimmino, I., Fiory, F., Perruolo, G., Miele, C., Beguinot, F., Formisano, P., & Oriente, F. (2020). Potential Mechanisms of Bisphenol A (BPA) Contributing to Human Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21165761>
- Conduct Science. (2020). *BALB/CJ Mouse Strain*. <https://conductscience.com/maze/balb-cj-mouse-strain/#4>
- D Seachrist, D., W. Bonk, K., Ho, S.-M., Prins, G. S., Soto, A. M., & Keri, R. A. (2015). A Review of the Carcinogenic Potential of Bisphenol A. *Reproductive Toxicology*, 59, 167–182. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.09.006>

- Dairkee, S. H., Luciani-Torres, M. G., Moore, D. H., & Goodson, W. H. (2013). Bisphenol-A-induced inactivation of the p53 axis underlying deregulation of proliferation kinetics, and cell death in non-malignant human breast epithelial cells. *Carcinogenesis*, *34*(3), 703–712. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs379>
- Debortoli, A. R., Rouver, W. D. N., Delgado, N. T. B., Mengal, V., Claudio, E. R. G., Pernomian, L., Bendhack, L. M., Moysés, M. R., & dos Santos, R. L. (2017). GPER modulates tone and coronary vascular reactivity in male and female rats. *Journal of Molecular Endocrinology*, *59*(2), 171–180. <https://doi.org/10.1530/JME-16-0117>
- Deng, P., Tan, M., Zhou, W., Chen, C., Xi, Y., Gao, P., Ma, Q., Liang, Y., Chen, M., Tian, L., Xie, J., Liu, M., Luo, Y., Li, Y., Zhang, L., Wang, L., Zeng, Y., Pi, H., Yu, Z., & Zhou, Z. (2021). Bisphenol A promotes breast cancer cell proliferation by driving miR-381-3p-PTTG1-dependent cell cycle progression. *Chemosphere*, *268*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129221>
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. A., Lickley, L. A., Rawlinson, E., Sun, P., & Narod, S. A. (2007). Triple-negative breast cancer: Clinical features and patterns of recurrence. *Clinical Cancer Research*, *13*(15), 4429–4434. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-3045>
- DeSantis, C. E., Ma, J., Gaudet, M. M., Newman, L. A., Miller, K. D., Goding Sauer, A., Jemal, A., & Siegel, R. L. (2019). Breast cancer statistics, 2019. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *69*(6), 438–451. <https://doi.org/10.3322/caac.21583>
- Ellsworth, D. L., Turner, C. E., & Ellsworth, R. E. (2019). A Review of the Hereditary Component of Triple Negative Breast Cancer : High- and Moderate-Penetrance Breast Cancer Genes , Low-Penetrance Loci , and the Role of Nontraditional Genetic Elements. *Journal of Oncology*, *2019*, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2019/4382606>
- Encarnação, T., Pais, A. A. C. C., Campos, M. G., & Burrows, H. D. (2019). Endocrine disrupting chemicals: Impact on human health, wildlife and the environment. *Science Progress*, *102*(1), 3–42. <https://doi.org/10.1177/0036850419826802>

- Eve, L., Fervers, B., Romancer, M. le, & Etienne-selloum, N. (2020). Exposure to Endocrine Disrupting Chemicals and Risk of Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms21239139>
- Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., & Fares, Y. (2020a). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>
- Fares, J., Fares, M. Y., Khachfe, H. H., Salhab, H. A., & Fares, Y. (2020b). Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>
- Faustino-Rocha, A., Oliveira, P. A., Pinho-Oliveira, J., Teixeira-Guedes, C., Soares-Maia, R., da Costa, R. G., Colaço, B., Pires, M. J., Colaço, J., Ferreira, R., & Ginja, M. (2013). Estimation of rat mammary tumor volume using caliper and ultrasonography measurements. *Lab Animal*, 42(6), 217–224. <https://doi.org/10.1038/labam.254>
- Feldman, R. D., & Limbird, L. E. (2017). GPER (GPR30): A Nongenomic Receptor (GPCR) for Steroid Hormones with Implications for Cardiovascular Disease and Cancer. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 57(October 2016), 567–584. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010716-104651>
- Fernandez, M. F., Arrebola, J. P., Taoufiki, J., Navalón, A., Ballesteros, O., Pulgar, R., Vilchez, J. L., & Olea, N. (2007). Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women. *Reproductive Toxicology*, 24(2), 259–264. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.06.007>
- Figueira, M. I., Cardoso, H. J., & Socorro, S. (2018). The role of GPER signaling in carcinogenesis: A focus on prostate cancer. In *Recent Trends in Cancer Biology: Spotlight on Signaling Cascades and MicroRNAs: Cell Signaling Pathways and MicroRNAs in Cancer Biology*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-71553-7_5
- Filardo, E. J., Quinn, J. A., Bland, K. I., Frackelton, A. R., & Williams, 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. In *Molecular Endocrinology* (Vol. 14).

Filardo, E. J., & Thomas, P. (2005). GPR30: A seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 16(8), 362–367. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2005.08.005>

Flamand, L., Moreno Jaimes, C., & Arraiga Carrasco, R. (2020). *Cáncer y desigualdades sociales en México*. El Colegio de México.

Friedl, P., & Wolf, K. (2003). Tumour-cell invasion and migration: Diversity and escape mechanisms. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 3, Issue 5, pp. 362–374). <https://doi.org/10.1038/nrc1075>

Gao, H., Yang, B., Li, N., Feng, L., & Shi, X. (2015). *Bisphenol A and Hormone-Associated Cancers: Current Progress and Perspectives*. 94(1), 1–8. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000000211>

Garpis, N., Damaskos, C., Garpis, A., Nikolettos, K., Dimitroulis, D., Diamantis, E., Farmaki, P., Patsouras, A., Voutyritsa, E., Syllaios, A., Zografos, C., Antoniou, E., Nilolettos, N., Kostakis, A., Kontzoglou, K., Schizas, D., & Nonni, A. (2020). Molecular Classification and Future Therapeutic Challenges of Triple negative Breast Cancer. *In Vivo*, 34, 1715–1727. <https://doi.org/10.21873/invivo.11965>

Gayraud, V., Lacroix, M. Z., Grandin, F. C., Collet, S. H., Mila, H., Viguié, C., Gély, C. A., Rabozzi, B., Bouchard, M., Léandri, R., Toutain, P. L., & Picard-Hagen, N. (2019). Oral systemic bioavailability of bisphenol A and bisphenol S in pigs. *Environmental Health Perspectives*, 127(7), 1–12. <https://doi.org/10.1289/EHP4599>

Gerona, R., vom Saal, F. S., & Hunt, P. A. (2020). BPA: have flawed analytical techniques compromised risk assessments? In *The Lancet Diabetes and Endocrinology* (Vol. 8, Issue 1, pp. 11–13). Lancet Publishing Group. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(19\)30381-X](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(19)30381-X)

- Global Cancer Observatory. (2021). *900-world-fact-sheets*.
<https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>
- Gregório, A. C., Fonseca, N. A., Moura, V., Lacerda, M., Figueiredo, P., Simões, S., Dias, S., & Moreira, J. N. (2016). Inoculated cell density as a determinant factor of the growth dynamics and metastatic efficiency of a breast cancer murine model. *PLOS ONE*, *11*(11), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165817>
- Gundert-remy, U., Bodin, J., Bosetti, C., Fitzgerald, R., Hanberg, A., Hooijmans, C., Rooney, A. A., Rousselle, C., Loveren, H. van, Barizzone, F., Croera, C., Putzu, C., & Castoldi, A. F. (2017). *Bisphenol A (BPA) hazard assessment protocol*.
<https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2017.EN-1354>
- Harbeck, N., Cortes, J., Gnant, M., Houssami, N., Poortmans, P., Ruddy, K., Tsang, J., & Cardoso, F. (2019). Breast cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, *5*(66), 1–31. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0111-2>
- Hattori, M., & Iwata, H. (2018). Advances in treatment and care in metastatic breast cancer (MBC): Are there MBC patients who are curable? *Chinese Clinical Oncology*, *7*(3), 21–24. <https://doi.org/10.21037/cco.2018.05.01>
- Healy, B. F., English, K. R., Jagals, P., & Sly, P. D. (2015). Bisphenol A exposure pathways in early childhood : Reviewing the need for improved risk assessment models. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, *July*, 544–556. <https://doi.org/10.1038/jes.2015.49>
- Heino, T. J., Chagin, A. S., & Sävendahl, L. (2008). The novel estrogen receptor G-protein-coupled receptor 30 is expressed in human bone. *Journal of Endocrinology*, *197*(2). <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0629>
- Hernández-tobías, E. A., Torres-sánchez, L., Noris, G., Santana, C., Samano, M. R., Arellano-galindo, J., Arenas-sordo, M. D. L., Brooks, D., Rodríguez-ventura, A. L., Meraz-ríos, M. A., & Gómez, R. (2016). PPARγ-LYPLAL1 Multi-Allelic Combination Associated with Obesity and Overweight in Mexican Adolescent Females. *Ethnicity & Disease*, *26*(4), 477–484. <https://doi.org/10.18865/ed.26.4.477>. Keywords

- Hines, C. J., Christianson, A. L., Jackson, M. v., Ye, X., Pretty, J. R., Arnold, J. E., & Calafat, A. M. (2018). An evaluation of the relationship among urine, air, and hand measures of exposure to bisphenol A (BPA) in US manufacturing workers. *Annals of Work Exposures and Health*, 62(7), 840–851. <https://doi.org/10.1093/annweh/wxy042>
- Hong, Y., & Yang, Y. (2017). Low-Dose Exposure to Bisphenol A in Early Life. In *Bisphenol A Exposure and Health Risks* (pp. 127–141). <https://doi.org/10.5772/intechopen.68428>
- Hsu, L., Chu, N., & Lin, Y. (2019). G-Protein Coupled Estrogen Receptor in Breast Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(306), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms20020306>
- Hsu, L. H., Chu, N. M., Lin, Y. F., & Kao, S. H. (2019). G-protein coupled estrogen receptor in breast cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(2). <https://doi.org/10.3390/ijms20020306>
- Hu, T., Chen, Y., Liu, Y., Zhang, D., Pan, J., & Long, M. (2021). Classification of PR-positive and PR-negative subtypes in ER-positive and HER2-negative breast cancers based on pathway scores. *BMC Medical Research Methodology*, 21(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12874-021-01297-8>
- Huang, R. ping, Liu, Z. hua, Yuan, S. fen, Yin, H., Dang, Z., & Wu, P. xiao. (2017). Worldwide human daily intakes of bisphenol A (BPA) estimated from global urinary concentration data (2000–2016) and its risk analysis. *Environmental Pollution*, 230, 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.026>
- Hubalek, M., & Müller, H. (2017). Biological Subtypes of Triple-Negative Breast Cancer. *Breast Care*, 8–14. <https://doi.org/10.1159/000455820>
- Ijm, D. T. H. M. S., Ikken, M. G. J. R., Orije, E. R., Raas, T. P. T., Achlan, M. S. M. C. L., & Eijnenburg, W. J. G. M. P. (2007). 3 . Transport, accumulation and transformation processes. In *Risk Assessment of Chemicals: An Introduction* (pp. 73–158). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6102-8_3

- INEGI. (2020). Estadísticas a propósito del día mundial de la lucha contra el cáncer de mama (19 de octubre). *Comunicado De Prensa*, 462(20), 1/7.
- Jenkins, S., Wang, J., Eltoum, I., Desmond, R., & Lamartiniere, C. A. (2011). *Chronic Oral Exposure to Bisphenol A Results in a Nonmonotonic Dose Response in Mammary Carcinogenesis and Metastasis in MMTV-erbB2 Mice*. 1604(11), 1604–1609.
- Jones, M. E., Schoemaker, M. J., Wright, L. B., Ashworth, A., & Swerdlow, A. J. (2017). Smoking and risk of breast cancer in the Generations Study cohort. *Breast Cancer Research*, 19(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13058-017-0908-4>
- Keshavarz-Maleki, R., & Kaviani, A. (2021). *Bisphenol-A in biological samples of breast cancer mastectomy and mammoplasty patients and correlation with levels measured in urine and tissue*.
- Khan, N. G., Correia, J., Adiga, D., Rai, P. S., Dsouza, H. S., Chakrabarty, S., & Kabekkodu, S. P. (2021). A comprehensive review on the carcinogenic potential of bisphenol A: clues and evidence. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(16), 19643–19663. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-13071-w>
- Kim, Y. S., Choi, K. C., & Hwang, K. A. (2015). Genistein suppressed epithelial-mesenchymal transition and migration efficacies of BG-1 ovarian cancer cells activated by estrogenic chemicals via estrogen receptor pathway and downregulation of TGF- β signaling pathway. *Phytomedicine*, 22(11), 993–999. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.08.003>
- Kumar, P., & Aggarwal, R. (2016). An overview of triple-negative breast cancer. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 293(2), 247–269. <https://doi.org/10.1007/s00404-015-3859-y>
- Lauretta, R., Sansone, A., Sansone, M., Romanelli, F., & Appetecchia, M. (2019). Endocrine Disrupting Chemicals: Effects on Endocrine Glands. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00178>

- Liang, Y., Xu, X., Wang, T., Li, Y., You, W., Fu, J., Liu, Y., Jin, S., Ji, Q., Zhao, W., Song, Q., Li, L., Hong, T., Huang, J., Lyu, Z., & Ye, Q. (2017). The egfr/mir-338-3p/eya2 axis controls breast tumor growth and lung metastasis. *Cell Death and Disease*, 8(7). <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.325>
- Liedtke, C., Mazouni, C., Hess, K. R., André, F., Tordai, A., Mejia, J. A., Symmans, W. F., Gonzalez-Angulo, A. M., Hennessy, B., Green, M., Cristofanilli, M., Hortobagyi, G. N., & Pusztai, L. (2008). Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 26(8), 1275–1281. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.14.4147>
- Lim, E., Palmieri, C., & Tilley, W. D. (2016). Renewed interest in the progesterone receptor in breast cancer. *British Journal of Cancer*, 115(8), 909–911. <https://doi.org/10.1038/bjc.2016.303>
- Linares, R., Fernández, M. F., Gutiérrez, A., García-Villalba, R., Suárez, B., Zapater, P., Martínez-Blázquez, J. A., Caparrós, E., Tomás-Barberán, F. A., & Francés, R. (2021). Endocrine disruption in Crohn's disease: Bisphenol A enhances systemic inflammatory response in patients with gut barrier translocation of dysbiotic microbiota products. *FASEB Journal*, 35(7), 1–13. <https://doi.org/10.1096/fj.202100481R>
- Liu, J., & Martin, J. W. (2017). Prolonged Exposure to Bisphenol A from Single Dermal Contact Events. *Environmental Science and Technology*, 51(17), 9940–9949. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03093>
- Lopes da Silva, J., Cristina, N., Nunes, C., Izetti, P., Mesquita, G. G. de, & Melo, A. C. de. (2020). Critical Reviews in Oncology / Hematology Triple negative breast cancer: A thorough review of biomarkers. *Critical Reviews in Oncology / Hematology*, 145, 145:102855. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2019.102855>
- Luo, J., & Liu, D. (2020). Does GPER Really Function as a G Protein-Coupled Estrogen Receptor in vivo? In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00148>

- Ma, X. F., Zhang, J., Shuai, H. L., Guan, B. Z., Luo, X., & Yan, R. L. (2015). IKK β /NF- κ B mediated the low doses of bisphenol A induced migration of cervical cancer cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 573, 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.03.010>
- Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429–434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Maiti, K., Paul, J. W., Read, M., Chan, E. C., Riley, S. C., Nahar, P., & Smith, R. (2011). G-1-activated membrane estrogen receptors mediate increased contractility of the human myometrium. *Endocrinology*, 152(6), 2448–2455. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0979>
- Marchese, S., & Silva, E. (2012). Disruption of 3D MCF-12A Breast Cell Cultures by Estrogens - An In Vitro Model for ER-Mediated Changes Indicative of Hormonal Carcinogenesis. *PLoS ONE*, 7(10), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045767>
- Marra, A., Trapani, D., Viale, G., Criscitiello, C., & Curigliano, G. (2020). Practical classification of triple negative breast cancer : intratumoral heterogeneity, mechanisms of drug resistance, and novel therapies. *Npj Breast Cancer*, 6(54), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41523-020-00197-2>
- Martinotti, S., & Ranzato, E. (2020). Scratch wound healing assay. *Methods in Molecular Biology*, 2109, 225–229. https://doi.org/10.1007/7651_2019_259
- Mcneeley, K. M., Lyon, J. G., & Bellamkonda, R. (2013). Biomaterial strategies to modulate cancer. In *Biomaterials for cancer therapeutics*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857096760.4.417>
- Medina, M. A., Oza, G., Sharma, A., Arriaga, L. G., Hern, M., Rotello, V. M., & Ramirez, J. T. (2020). Triple-Negative Breast Cancer : A Review of Conventional and Advanced Therapeutic Strategies. *Int J Environ Res Public Health*, 17(6), 1–32. <https://doi.org/10.3390/ijerph17062078>.

- Mehanna, J., Fady, H., Eid, R., Lambertini, M., & Kourie, H. R. (2019). Triple-negative breast cancer: current perspective on the evolving therapeutic landscape. *International Journal of Women's Health*, 11, 431–437. <https://doi.org/10.2147/IJWH.S178349>
- Molina, L., Figueroa, C. D., Bhoola, K. D., & Ehrenfeld, P. (2017a). GPER-1/GPR30 a novel estrogen receptor sited in the cell membrane: therapeutic coupling to breast cancer. In *Expert Opinion on Therapeutic Targets* (Vol. 21, Issue 8, pp. 755–766). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1350264>
- Molina, L., Figueroa, C. D., Bhoola, K. D., & Ehrenfeld, P. (2017b). GPER-1/GPR30 a novel estrogen receptor sited in the cell membrane: therapeutic coupling to breast cancer. In *Expert Opinion on Therapeutic Targets* (Vol. 21, Issue 8, pp. 755–766). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/14728222.2017.1350264>
- Moral, R., Wang, R., Russo, I. H., Lamartiniere, C. A., Pereira, J., & Russo, J. (2008). Effect of prenatal exposure to the endocrine disruptor bisphenol A on mammary gland morphology and gene expression signature. *Journal of Endocrinology*, 196(1), 101–112. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0056>
- Murata, M., & Kang, J. H. (2018). Bisphenol A (BPA) and cell signaling pathways. *Biotechnology Advances*, 36(1), 311–327. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.12.002>
- Mutebi, M., Anderson, B. O., Duggan, C., Adebamowo, C., Agarwal, G., Ali, Z., Bird, P., Bourque, J. M., DeBoer, R., Gebrim, L. H., Masetti, R., Masood, S., Menon, M., Nakigudde, G., Ng'ang'a, A., Niyonzima, N., Rositch, A. F., Unger-Saldaña, K., Villarreal-Garza, C., ... Eniu, A. (2020). Breast cancer treatment: A phased approach to implementation. *Cancer*, 126, 2365–2378. <https://doi.org/10.1002/cncr.32910>
- Nilsson, M. E., Vandenput, L., Tivesten, Å., Norlén, A. K., Lagerquist, M. K., Windahl, S. H., Börjesson, A. E., Farman, H. H., Poutanen, M., Benrick, A., Maliqueo, M., Stener-Victorin, E., Ryberg, H., & Ohlsson, C. (2015). Measurement of a comprehensive sex steroid profile in rodent serum by high-sensitive gas

- chromatography-tandem mass spectrometry. *Endocrinology (United States)*, 156(7), 2492–2502. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1890>
- Polette, M., Nawrocki-Raby, B., Gilles, C., Clavel, C., & Birembaut, P. (2004). Tumour invasion and matrix metalloproteinases. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 49(3), 179–186. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2003.10.008>
- Preethi, S., Sandhya, K., Lebonah, D. E., Prasad, C. V., Sreedevi, B., Chandrasekhar, K., & Kumari, J. P. (2014). Toxicity of bisphenol a on humans: a review. *International Letters of Natural Sciences*, 27, 32–46. <https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/ILNS.27.32>
- Prossnitz, E. R., & Barton, M. (2014). Estrogen biology: New insights into GPER function and clinical opportunities. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 389(1–2), 71–83. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.02.002>
- Ptak, A., Hoffmann, M., Gruca, I., & Barć, J. (2014). Bisphenol A induce ovarian cancer cell migration via the MAPK and PI3K/Akt signalling pathways. *Toxicology Letters*, 229(2), 357–365. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.07.001>
- Pulaski, B. A., & Ostrand-Rosenberg, S. (2001). Mouse 4T1 Breast Tumor Model. *Current Protocols in Immunology*, 39(1), 20.2.1-20.2.16. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im2002s39>
- Pupo, M., Maggiolini, M., & Musti, A. M. (2016). GPER mediates non-genomic effects of estrogen. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1366, pp. 471–488). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3127-9_37
- Quinn, J. A., Graeber, C. T., Frackelton, A. R., Kim, M., Schwarzbauer, J. E., & Filardo, E. J. (2009). Coordinate regulation of estrogen-mediated fibronectin matrix assembly and epidermal growth factor receptor transactivation by the G protein-coupled receptor, GPR30. *Molecular Endocrinology*, 23(7), 1052–1064. <https://doi.org/10.1210/me.2008-0262>
- Quintero-Fabián, S., Arreola, R., Becerril-Villanueva, E., Torres-Romero, J. C., Arana-Argáez, V., Lara-Riegos, J., Ramírez-Camacho, M. A., & Alvarez-Sánchez, M. E.

- (2019). Role of Matrix Metalloproteinases in Angiogenesis and Cancer. *Frontiers in Oncology*, 9(December), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01370>
- Reale, E., Vernez, D., & Hopf, N. B. (2021). Skin Absorption of Bisphenol A and Its Alternatives in Thermal Paper. *Annals of Work Exposures and Health*, 65(2), 206–218. <https://doi.org/10.1093/annweh/wxaa095>
- Reilly, E. A. O., Gubbins, L., Sharma, S., Tully, R., Ho, M., Guang, Z., Weiner-gorzel, K., Mccaffrey, J., Harrison, M., Furlong, F., Kell, M., & Mccann, A. (2015). The fate of chemoresistance in triple negative breast cancer (TNBC). *BBA Clinical*, 3, 257–275. <https://doi.org/10.1016/j.bbacli.2015.03.003>
- 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(5715), 1625–1630. <https://doi.org/10.1126/science.1106943>
- Samartzis, E. P., Noske, A., Meisel, A., Varga, Z., Fink, D., & Imesch, P. (2014). The G protein-coupled estrogen receptor (GPER) is expressed in two different subcellular localizations reflecting distinct tumor properties in breast cancer. *PLoS ONE*, 9(1), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083296>
- Sang, C., Song, Y., Jin, T., Zhang, S., Fu, L., Zhao, Y., Zou, X., & Wang, Z. (2021). Bisphenol A induces ovarian cancer cell proliferation and metastasis through estrogen receptor- α pathways. *Environmental Science and Pollution Research*, 36060–36068.
- Schrörs, B., Boegel, S., Albrecht, C., Bukur, T., Bukur, V., Holtsträter, C., Ritzel, C., Manninen, K., Tadmor, A. D., Vormehr, M., Sahin, U., & Löwer, M. (2020). Multi-Omics Characterization of the 4T1 Murine Mammary Gland Tumor Model. *Frontiers in Oncology*, 10(July), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01195>
- Shafei, A., Ramzy, M. M., Hegazy, A. I., Husseny, A. K., EL-hadary, U. G., Taha, M. M., & Mosa, A. A. (2018). The molecular mechanisms of action of the endocrine disrupting chemical bisphenol A in the development of cancer. *Gene*, 647, 235–243. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.01.016>

- Shah, D., & Osipo, C. (2016). Cancer stem cells and HER2 positive breast cancer: The story so far. *Genes and Diseases*, 3(2), 114–123. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2016.02.002>
- Sheng, Z. G., Huang, W., Liu, Y. X., & Zhu, B. Z. (2013). Bisphenol A at a low concentration boosts mouse spermatogonial cell proliferation by inducing the G protein-coupled receptor 30 expression. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 267(1), 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.12.014>
- Singh, R., Nasci, V. L., Guthrie, G., Ertuglu, L. A., Butt, M. K., Kirabo, A., & Gohar, E. Y. (2022). Emerging Roles for G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1 in Cardio-Renal Health: Implications for Aging. In *Biomolecules* (Vol. 12, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biom12030412>
- Spini, A., Donnini, S., Pantziarka, P., Crispino, S., & Ziche, M. (2020). Repurposing of drugs for triple negative breast cancer : an overview. *Ecancermedicalscience*, 14, 1–33. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2020.1071>
- Stillwater, B. J., Bull, A. C., Romagnolo, D. F., Neumayer, L. A., Donovan, M. G., & Selmin, O. I. (2020). Bisphenols and Risk of Breast Cancer: A Narrative Review of the Impact of Diet and Bioactive Food Components. *Frontiers in Nutrition*, 7(November), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.581388>
- Sun, J., Wang, L., Ding, S., Sun, X., & Xu, L. (2020). Solubility Behavior and Thermodynamic Analysis of Bisphenol A in 14 Different Pure Solvents. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 65(5), 2846–2858. <https://doi.org/10.1021/acs.jced.0c00166>
- Sun, Y., Zhao, Z., Yang, Z., Xu, F., Lu, H., Zhu, Z., & Shi, W. (2017). Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 13(11), 1387–1397. <https://doi.org/10.7150/ijbs.21635>
- Taylor, J. A., vom Saal, F. S., Welshons, W. v., Drury, B., Rottinghaus, G., Hunt, P. A., Toutain, P. L., Laffont, C. M., & VandeVoort, C. A. (2011). Similarity of bisphenol A pharmacokinetics in rhesus monkeys and mice: Relevance for human exposure.

- In *Environmental Health Perspectives* (Vol. 119, Issue 4, pp. 422–430).
<https://doi.org/10.1289/ehp.1002514>
- Tayyem, R. F., Mahmoud, R. I., Shareef, M. H., & Marei, L. S. (2019). Nutrient intake patterns and breast cancer risk among Jordanian women: a case-control study. *Epidemiology and Health*, *41*, 1–7. <https://doi.org/10.4178/epih.e2019010>
- Teeguarden, J. G., Twaddle, N. C., Churchwell, M. I., Yang, X., Fisher, J. W., Seryak, L. M., & Doerge, D. R. (2015). 24-hour human urine and serum profiles of bisphenol A: Evidence against sublingual absorption following ingestion in soup. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *288*(2), 131–142. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.01.009>
- Tesarova, P. (2013). Breast cancer in the elderly-Should it be treated differently? *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy*, *18*(1), 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.rpor.2012.05.005>
- Thayer, K., Deorge, D. R., & Hunt, D. (2015). Pharmacokinetics of Bisphenol A in Humans Following a Single Oral Administration. *Environ Int.*, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.06.008>. Pharmacokinetics
- The Jackson Laboratory. (2021). *BALB/cJ*. <https://www.jax.org/Strain/UrlAsPDF/000651>
- Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E. J., & Dong, J. (2005). Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*, *146*(2), 624–632. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1064>
- Toner, F., Allan, G., Dimond, S. S., Waechter, J. M., & Beyer, D. (2018). In vitro percutaneous absorption and metabolism of Bisphenol A (BPA) through fresh human skin. *Toxicology in Vitro*, *47*(July 2017), 147–155. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.11.002>
- Ulm, M., Ramesh, A. v., McNamara, K. M., Ponnusamy, S., Sasano, H., & Narayanan, R. (2019). Therapeutic advances in hormone-dependent cancers: Focus on

prostate, breast and ovarian cancers. *Endocrine Connections*, 8(2), R10–R26.
<https://doi.org/10.1530/EC-18-0425>

University of Kentucky. (n.d.). *Commonly Used Mouse Strains*.
<https://www.research.uky.edu/uploads/commonly-used-mouse-strains>

Valentino, R., D'Esposito, V., Ariemma, F., Cimmino, I., Beguinot, F., & Formisano, P. (2016). Bisphenol A environmental exposure and the detrimental effects on human metabolic health: Is it necessary to revise the risk assessment in vulnerable population? In *Journal of Endocrinological Investigation* (Vol. 39, Issue 3, pp. 259–263). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/s40618-015-0336-1>

Vandenberg, L. N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., & Welshons, W. v. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). In *Reproductive Toxicology* (Vol. 24, Issue 2, pp. 139–177). <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.07.010>

Vieira, R., Sánchez Tobar, J. S., Dardes, R., & Thuler, L. C. S. (2018). Alcohol consumption as a risk factor for breast cancer development: A case-control study in Brazil. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 19(3), 703–707. <https://doi.org/10.22034/APJCP.2018.19.3.703>

Waks, A. G., & Winer, E. P. (2019). Breast Cancer Treatment A Review. *JAMA*, 321(3), 288–300. <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19323>

Wang, K. H., Kao, A. P., Chang, C. C., Lin, T. C., & Kuo, T. C. (2015). Bisphenol A-induced epithelial to mesenchymal transition is mediated by cyclooxygenase-2 up-regulation in human endometrial carcinoma cells. *Reproductive Toxicology*, 58, 229–233. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.10.011>

Wang, Z., Liu, H., & Liu, S. (2017). Low-Dose Bisphenol A Exposure: A Seemingly Instigating Carcinogenic Effect on Breast Cancer. *Advanced Science*, 4(2). <https://doi.org/10.1002/advs.201600248>

Wei, D., Liu, X. Y., Chen, Y. Y., Zhou, X., & Hu, H. (2016). Effectiveness of Physical , Psychological, Social , and Spiritual Intervention in Breast Cancer Survivors : An

- Integrative Review. *Asia Pac J Oncol Nurs*, 3(3), 226–232.
<https://doi.org/10.4103/2347-5625.189813>
- Wen, X., Xiong, Y., Jin, L., Zhang, M., Huang, L., Mao, Y., Zhou, C., Qiao, Y., & Zhang, Y. (2020). Bisphenol A Exposure Enhances Endometrial Stromal Cell Invasion and Has a Positive Association with Peritoneal Endometriosis. *Reproductive Sciences*, 27(2), 704–712. <https://doi.org/10.1007/s43032-019-00076-7>
- Xu, S., Yu, S., Dong, D., & Lee, L. T. O. (2019). G Protein-Coupled Estrogen Receptor: A Potential Therapeutic Target in Cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 10(October), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00725>
- Yao, N., Song, Z., Wang, X., Yang, S., & Song, H. (2017). Prognostic impact of progesterone receptor status in Chinese estrogen receptor positive invasive breast cancer patients. *Journal of Breast Cancer*, 20(2), 160–169. <https://doi.org/10.4048/jbc.2017.20.2.160>
- Yin, L., Duan, J., Bian, X., & Yu, S. (2020). Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Res*, 22(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13058-020-01296-5>.
- Zhang, K., Chen, H., Chen, Y., Qiu, K., Zheng, X., Li, G., Yang, H., & Wen, C. (2014). Bisphenol A stimulates human lung cancer cell migration via upregulation of matrix metalloproteinases by GPER / EGFR / ERK1 / 2 signal pathway. *Biomedicine et Pharmacotherapy*, 68(8), 1037–1043. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2014.09.003>
- Zhang, X. L., Liu, N., Weng, S. F., & Wang, H. S. (2016). Bisphenol A Increases the Migration and Invasion of Triple-Negative Breast Cancer Cells via Oestrogen-related Receptor Gamma. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 119(4), 389–395. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12591>
- Zhao, Y., Dong, X., Li, R., Song, J., & Zhang, D. (2015). Correlation between clinical-pathologic factors and long-term follow-up in young breast cancer patients. *Translational Oncology*, 8(4), 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2015.05.001>

- Zhou, Y., & Liu, X. (2020). The role of estrogen receptor beta in breast cancer. *Biomarker Research*, 8(39), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s40364-020-00223-2>
- Zimmerman, M. A., Budish, R. A., Kashyap, S., & Lindsey, S. H. (2016). GPER - novel membrane estrogen receptor. *Physiology & Behavior*, 130(12), 1005–1016. <https://doi.org/10.1042/CS20160114>