



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
BIOMEDICINA

**Efecto de la exposición perinatal a Bisfenol A sobre la susceptibilidad al
desarrollo tumoral y respuesta inmune asociada.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Biomedicina

PRESENTA:

Q.F.B. Ricardo Ramírez Nieto

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DR. JORGE MORALES MONTOR
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. PEDRO ULISES GUADALUPE OSTOA SALOMA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DRA. JULIETA IVONE CASTRO ROMERO
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA, SECRETARÍA DE SALUD

MÉXICO, Cd. Mx. Junio, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
BIOMEDICINA

**Efecto de la exposición perinatal a Bisfenol A sobre la susceptibilidad al
desarrollo tumoral y respuesta inmune asociada.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
Biomedicina

PRESENTA:

Q.F.B. Ricardo Ramírez Nieto

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DR. JORGE MORALES MONTOR
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. PEDRO ULISES GUADALUPE OSTOA SALOMA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

DRA. JULIETA IVONE CASTRO ROMERO
INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA, SECRETARÍA DE SALUD

MÉXICO, Cd. Mx. Junio, 2016



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM.
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 30 de noviembre del 2015, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **RAMÍREZ NIETO RICARDO** con número de cuenta **303264589** con la tesis titulada **"Efecto de la exposición perinatal a Bisfenol A sobre la susceptibilidad al desarrollo tumoral y la respuesta inmune asociada"**, realizada bajo la dirección del **DR. JORGE MORALES MONTOR**:

Presidente: Dra. Aliesha Araceli González Arenas
Vocal: Dra. Samira Muñoz Cruz
Secretaria: Dra. Julieta Ivonne Castro Romero
Suplente: Dra. Saé Muñiz Hernández
Suplente: Dr. Pedro Ulises Guadalupe Ostoa Saloma

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 23 de mayo del 2016.



M. del Cora Arizmendi Arriaga

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por darme la oportunidad de continuar con mi desarrollo profesional.

A CONACYT, por la beca con que fui apoyado, con número de CVU/Becario: 593114/306004.

Para la realización del presente proyecto, se agradece el apoyo financiero del donativo # 176803 obtenido del Programa de Fondos Sectoriales Ciencia Básica (CB-SEP), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y el donativo IN-208715 otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México. Ambos donativos otorgados al Dr. Jorge Morales-Montor, Tutor principal de la presente Tesis.

A los miembros de mi Comité Tutor:

Dr. Jorge Morales Montor

Dra. Julieta Ivone Castro Romero

Dr. Pedro Ulises Guadalupe Ostoa Saloma

Por su valioso tiempo, pero sobre todo por su paciencia.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Jorge Morales Montor por permitirme trabajar y ser parte de su equipo de investigación, en general por compartir su sabiduría, por enseñarme a considerar lo mejor de cada persona, pero sobre todo por su confianza y paciencia.

A la pDra. Marisa Palacios Arreola y al M.V. Z. Víctor del Rio Araiza por su gran apoyo en la realización de este proyecto, pero principalmente por su gran amistad.

A la Dra. Aliesha Araceli Gonzáles Arenas, Dra. Sae Muñiz Cruz y a la Dra. Samira Muñoz Cruz, por su paciencia y apoyo.

Al Dr. Armando Pérez Torres por su gran ayuda en los procedimientos de histología y por su gran actitud de ayuda para con nosotros los estudiantes.

Agradezco a mis compañeros y amigos: Dr. Hugo Aguilar, pDra. Rosalía Hernández Cervantes, Nelly Tiempos Guzmán, Nash Pérez Sánchez, Esteban Santa Cruz y M. V. Z. Rocío Ruiz Manzano por su amistad y compañerismo.

DEDICATORIA

Todo el esfuerzo de este trabajo esta dedicado a:

Mis padres Irma Nieto Espino y Aarón Juan Ramírez Téllez por su gran e incondicional apoyo, cada uno de mis logros es de ellos; se los debo en gran parte pues a ellos debo mi formación como ser humano.

Dedicado con mucho amor y esmero a Diana Toscano Pérez por convertirse en mi mejor motivación y ser testigo de la gran cantidad de sensaciones que conllevó este proyecto.

A mis hermanos con cariño y esmero, para ellos que simplemente son grandiosos compañeros de vida.

Índice.....	8
Lista de figuras y cuadros.....	9
Resumen.....	11
Abstract.....	12
Introducción.....	13
1. Interacción neuroinmunoendócrina.....	14
1.1 Efecto de los estrógenos sobre el sistema inmune.....	15
2. Compuestos Disruptores endócrinos.....	17
3. Bisfenol A.....	18
3.1 Ingesta de BPA.....	19
3.2 Efectos en sistema reproductivo.....	21
3.3 Efectos de BPA en el Sistema Inmune.....	24
4. Respuesta Inmune a Tumor.....	25
Justificación del Proyecto.....	30
Planteamiento del Problema.....	32
Hipótesis.....	34
Objetivos.....	36
Metodología Experimental.....	38
Resultados.....	52
Discusión.....	63
Conclusiones.....	69
Bibliografía.....	71

Lista de figuras y cuadros

Figuras

1. Efecto de la concentración de Estradiol en la polarización de linfocitos T colaboradores (Th).(De León-Nava MA, Morales-Montor J.- 2006)
2. Parecido en la estructura molecular de Estradiol, BPA y Dietiestilbestrol.
3. Estructura molecular del polímero de policarbonato.
4. Estepas de la inmunoección del cáncer: Eliminación, Equilibrio y Escape.
5. Procedimiento de eliminación de las células tumorales por el sistema inmune denominado “inmunovigilancia”.
6. La secreción de interleucinas por linfocitos T cooperadores influye importantemente en la polarización de linfocitos.
7. Estrategias de las células tumorales para evadir respuesta inmune.
8. Diagrama del procedimiento de análisis de Citometría las poblaciones CD3+, CD4+, CD8+ y FoxP3+.
9. Diagrama del procedimiento de análisis de Citometría en el programa FlowJo para la poblaciones CD3+, CD4+, CD8+ y FoxP3+
10. Diagrama del procedimiento de análisis de Citometría en el programa FlowJo para la poblaciones F4/80y PD-L2+.
11. Diagrama del procedimiento de análisis de Citometría la población CD19+
12. Diagrama del procedimiento de análisis de Citometría la población $\delta\gamma$ +.
13. Diagrama del procedimiento de análisis de Citometría la población NKp46+.
14. Resultado de la administración de 10 000 células 4T1 en el escroto de ratón Balb/C macho.
15. Masa tumoral dependiente del tratamiento Control Vehículo y BPA.
16. Tinciones de Hematoxilina y Eosina a 10X y 40X de tumores extirpados a los 21 días.
17. Diferencias en porcentajes celulares por tratamiento en bazo.
18. Diferencias en porcentajes celulares por tratamiento en GLP.
19. Diferencias en porcentajes celulares por tratamiento en tumor.

20. Diferencias en expresión relativa de IL-10 y TNF- α en bazo.

21. Diferencias en expresión relativa de IL-10 y TNF- α y TGF- β en tumores.

Cuadros

1. Grupos experimentales.
2. Características de anticuerpos utilizados en la Citometría de flujo.
3. Secuencias de nucleótidos utilizados en la amplificación mediante PCR de ARN total.
4. Condiciones de elongación en la RT-PCR de las citocinas analizadas.

Resumen

El Bisfenol A (BPA) es un compuesto disruptor endocrino estrogénico al que nos encontramos altamente expuestos de diversas formas. Se ha descrito su relación con la incidencia en el cáncer, mediante la exposición en etapas críticas del desarrollo como la neonatal y prenatal. Existen diferentes experimentos in vivo e in vitro en los que se ha demostrado su efecto sobre diferentes poblaciones del sistema inmune. Se sabe que el BPA puede afectar a la respuesta inmune, sin embargo no está descrito su efecto en la respuesta inmune al desarrollo tumoral y la susceptibilidad al desarrollo de cáncer en el tracto reproductivo, en la edad adulta. En el presente proyecto se analizó el efecto de la exposición a BPA perinatal (prenatal y neonatal) en ratones machos. Exponiendo a hembras gestantes a una dosis de 250 mg/Kg de peso/día en el agua de beber. Posteriormente las crías macho fueron inoculadas con 10 000 células 4T1 de cáncer de mama en el aparato reproductor. A los 21 días posteriores a la inoculación, fueron sacrificados y los tumores fueron analizados histopatológicamente así como su diferencia en el tamaño. Se realizó el análisis en la diferencia de porcentajes de poblaciones celulares: linfocitos T citotóxicos, linfocitos T colaboradores, linfocitos T reguladores, células NK, y Macrófagos en bazo, Ganglios Linfáticos Periféricos (GLP) y tumores. Se analizó la expresión de interleucinas: TNF- α , TGF- β e IL-10 en el bazo y en los tumores. El tratamiento con BPA no tuvo efecto en el tamaño ni en la estructura del tumor. En el bazo de animales intactos el BPA disminuyó la cantidad de linfocitos T colaboradores y reguladores con respecto al grupo control. En el bazo y en GLP de los animales inoculados el número de linfocitos totales disminuyó con respecto a los animales intactos en todos los tratamientos. En animales inoculados el tratamiento con BPA disminuyó la cantidad de linfocitos T colaboradores y linfocitos B en el bazo y en GLP; mientras que el porcentaje de linfocitos $\gamma\delta$ en GLP aumentó. No se observaron cambios significativos en las poblaciones de Macrófagos, sin embargo el BPA produjo un aumento en la expresión de PD-L2 de animales inoculados respecto a los intactos. No se observaron cambios significativos en linfocitos T citotóxicos ni en ninguna de las poblaciones celulares de tumor. El BPA produjo un aumento en la expresión de IL-10 y TNF- α en el tumor. IL-10 y TNF- α no tuvo cambios significativos en bazo.

Abstract

Bisphenol A (BPA) is an endocrine disruptor compound (EDC), to which we are highly exposed in several ways. Previously, it has been suggested a possible relationship between BPA exposure and cancer incidence. Particularly, exposure to BPA at critical development stages, such as prenatal and neonatal. Recently, *in vivo* and *in vitro* experiments have shown that BPA does affect different cell populations of the immune system in the same fashion as 17 β - estradiol does. BPA also can affect the mounting of a proper immune response, particularly that against cancer. However, so far, it has not been described the effect of BPA on the immune response to tumor growth and development. In this project, we analyze the effect of perinatal exposure to BPA in males, and related that exposure to the immune response to intratesticular tumor growth. Exposing pregnant females at a dose of 250 mg / kg bw / day in drinking water, we subsequently use male offspring to inoculate 10³ 4T1 cancer cells in the reproductive system of them. At day 21 post inoculation, mice were sacrificed, and tumors were weighted, and analyzed histopathologically. Also, by flow cytometry, we perform an analysis of the difference in rates of immune cell populations, such as B lymphocytes, cytotoxic T lymphocytes, helper T lymphocytes, T reg lymphocytes; $\gamma\delta$ lymphocytes, NK cells and macrophages, all of them in Peripheral Lymph Nodes (PLN), Spleen (PLN) and tumors of control, vehicle and BPA treated animals. Furthermore, expression of cytokines (IFN- γ , TNF- α , TGF- β , IL-4 and IL-10) was analyzed by RT-PCR, in spleen and tumors. Our results showed that BPA treatment had no effect on tumor size neither the tissue structure. In spleen of intact animals BPA decreases the amount of helper and regulatory lymphocytes T over control. In spleen and PLN of animals inoculated had less of total lymphocytes over all treatment groups of intact animals. In inoculated animals BPA treatment decreased the amount of T helper and B lymphocytes in spleen and PLN as well as the population of $\gamma\delta$ lymphocytes increase in PLN. Not significant changes were observed in macrophage populations; however the BPA resulted in an increase expression of PD-L2 of inoculated animals relative to intact. Not significant changes were observed in cytotoxic T lymphocytes as well as all of tumor cell populations. The expression of IL-10 and TNF- α in the tumor was increase by BPA. IL-10 and TNF- α in spleen wasn't had significant changes.

INTRODUCCIÓN

Interacción Inmunoendócrina

El Sistema Inmune de los mamíferos, es el sistema fisiológico encargado de reconocer y eliminar agentes exógenos como virus, bacterias y parásitos. Además, tiene la capacidad de eliminar células propias, ya sea que estén infectadas intracelularmente con algún patógeno o por qué son células propias transformadas con capacidad de desarrollar un tumor. Lo anterior lo hace produciendo una respuesta inmune específica y dirigida mediante células de linajes específicos y macromoléculas. Las células y macromoléculas realizan sus funciones interactuando en una red dinámica y compleja (Thomas J. et al., 2007). Por otra parte, el Sistema Endócrino se encarga del control y homeostasis de diversos procesos fisiológicos, entre ellos el desarrollo y el metabolismo. Dicha regulación se produce mediante la secreción de hormonas, generalmente en el torrente sanguíneo a partir de glándulas, órganos o tejidos específicos como la hipófisis, la glándula tiroides y las suprarrenales.

Aunque el Sistema Inmunológico originalmente se ha descrito como un sistema fisiológico complejo, independiente y autorregulado casi en su totalidad, se han observado diferencias asociadas al sexo, principalmente en algunos procesos patológicos entre los cuales se encuentran mejor descritos: infecciones parasitarias y enfermedades autoinmunes. Esto sugiere que los esteroides sexuales tienen la capacidad de afectar las funciones de sistema inmune (Camacho I. *et al.*, 2001).

A través de diferentes estudios se ha demostrado la existencia de una comunicación bidireccional entre el sistema inmune y el sistema endócrino (Olsen N.J. et al. 1996). De ésta forma, los dos sistemas fisiológicos actúan formando una red de comunicación bidireccional. A partir de ello, se han descrito diversos efectos de las hormonas sexuales en las funciones del sistema neuroinmunoendócrino (Besedovsky HO, et. Al., 2001).

Durante la etapa perinatal de desarrollo tiene lugar un proceso llamado "imprinting" hormonal, cuando las hormonas tienen su primer contacto con los receptores hormonales. Este es un proceso puede afectar la capacidad de unión a los receptores

hormonales, la síntesis hormonal de diversas células y la regulación de las funciones hormonales, entre otras funciones. Sin embargo, análogos hormonales, contaminantes y compuestos de diferentes familias con capacidad similar de unión, pueden alterar este proceso, causando consecuencias a lo largo de la vida. Las células del sistema inmune (linfocitos, monocitos, macrófagos, células dendríticas, granulocitos y células cebadas) también tienen receptores hormonales y producen hormonas, las cuales son secretadas a la circulación. Estas células pueden ser perturbadas por alteraciones durante el proceso de imprinting, principalmente en el periodo perinatal. Por esta razón, podría afectar la producción de anticuerpos, de citocinas y la proliferación de éstos tipos celulares durante la vida adulta (Csaba G., 2014).

Estrógenos y su efecto sobre el sistema inmune

Los estrógenos son hormonas esteroides producidas principalmente en el sexo femenino por los ovarios y en menor medida en las glándulas adrenales. El estradiol es el principal estrógeno en la etapa reproductiva. La función fisiológica del estradiol no solo es el funcionamiento sexual, también interviene en la proliferación celular durante el desarrollo de diferentes tejidos. El estradiol es el estrógeno con mayor afinidad a los receptores estrogénicos ($ER\alpha$, $ER\beta$) a los cuales se une después de atravesar la membrana celular y ser transportado al núcleo, para activar o desactivar ciertos genes y regular la síntesis de proteínas. Se ha descrito que las células del sistema inmunológico también expresan receptores estrogénicos y que su actividad pueden ser modulada por hormonas esteroides (De León-Nava MA., et al. 2006).

Cuando el sistema inmune monta una respuesta específica, los linfocitos T colaboradores (Th) son las principales células en dirigir dicha respuesta. Aunque han sido descritos diferentes perfiles de linfocitos T colaboradores, dependiendo de la respuesta que ejercen, han sido descritas principalmente dos tipos de respuesta de acuerdo a la secreción de interleucinas. La respuesta tipo Th1, que se caracteriza por la secreción de IL-2 e IFN- γ , mediante la cual se produce la eliminación de patógenos intracelulares y células tumorales, y la respuesta tipo Th2, caracterizada por la secreción de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 mediante la cual son eliminados bacterias y

parásitos. Esta es variable dependiendo de la presencia de diferentes factores inmunológicos y no inmunológicos (De León-Nava MA., et al. 2006) Existen otras poblaciones de linfocitos T cooperadores con capacidad de modular la respuesta inmune, como las células secretoras de IL-17 (Th 17) y células T reguladoras (T_{reg}). Se ha observado que los estrógenos no solo son capaces de modular la cantidad de células reclutadas y la producción de citocinas, sino también la expresión de marcadores de activación como CD40, CD44 del receptor de IL-2. (Camacho Arroyo I. et al., 2001).

A partir de esto, se ha descrito que el patrón de secreción de citocinas en una respuesta inmune también depende del ambiente endócrino. Particularmente, se ha asociado al 17β -estradiol con el incremento en la secreción de citocinas tipo Th2 y la disminución de las citocinas tipo Th1, así como del perfil regulador en linfocitos T (Figura 1). En particular, estudios en pacientes con esclerosis, han demostrado que concentraciones de estradiol >5 ng/mL estimulan la secreción de IL-10 por células T_{reg} , mientras que concentraciones menores estimulan la secreción de IFN- γ (Gilmore W. Weiner LP. et al., 1997).

Sin embargo, existen agentes ajenos al sistema endócrino con capacidad de ejercer efectos fisiológicos igual al de las hormonas endógenas en el organismo, llamados compuestos disruptores endócrinos. Por lo tanto, las hormonas sexuales no son los únicos compuestos capaces de afectar la función de células del sistema inmune.

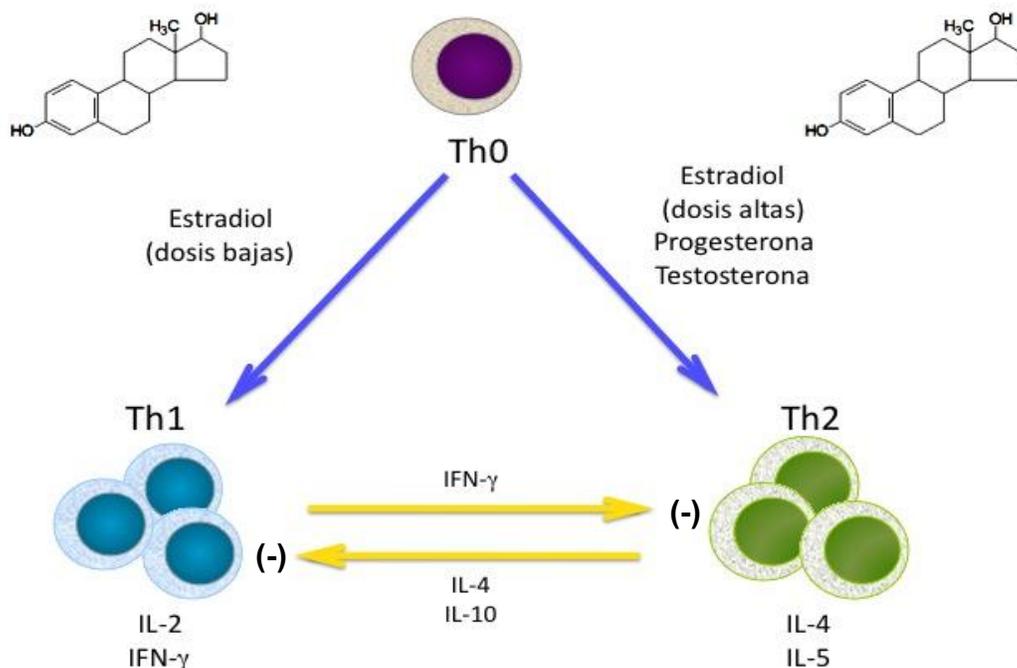


Figura 1. Las citocinas producidas por linfocitos Th1 y Th2 determinan su función efectora. El estradiol tiene un papel dual dependiente de la concentración, pudiendo inducir la polarización de los linfocitos hacia Th1 y Th2. (De León-Nava MA, Morales-Montor J.- 2006)

Compuestos Disruptores Endócrinos

Se han descrito como Compuestos Disruptores Endócrinos (CDEs), a los agentes exógenos al organismo con capacidad de interferir en la síntesis, liberación, eliminación, transporte, metabolismo y unión, de las hormonas esteroideas responsables del mantenimiento, homeostasis y desarrollo del organismo (Kavlock RJ., et al 1996). Los CDEs, pueden ejercer efectos fisiológicos en el organismo, actuando o efectuando la función de diferentes hormonas. Los CDEs, pueden ser de origen natural, como los fitoestrógenos y la soya contenida en alimentos. También pueden ser de origen sintético como los utilizados en la producción y manufactura de diversos productos de uso común y químicos como plaguicidas. Sus efectos pueden variar dependiendo de la vía de exposición y del tiempo de exposición.

Los disruptores endócrinos pueden actuar como agonistas o antagonistas de receptores a hormonas. Pueden actuar sobre receptores nucleares, receptores a hormonas esteroides de membrana y sobre receptores de hormonas no esteroides o bien interfiriendo vías enzimáticas relacionadas con la biosíntesis o metabolismo de hormonas. Uno de los principales y mejor descrito grupo de disruptores endócrinos son los xenoestrógenos, pero hay otros compuestos con capacidad de unirse al receptor de estrógenos por su parecido en su estructura molecular con la molécula de estradiol, como son dietilestilbestrol y el Bisfenol A (Figura 2.)

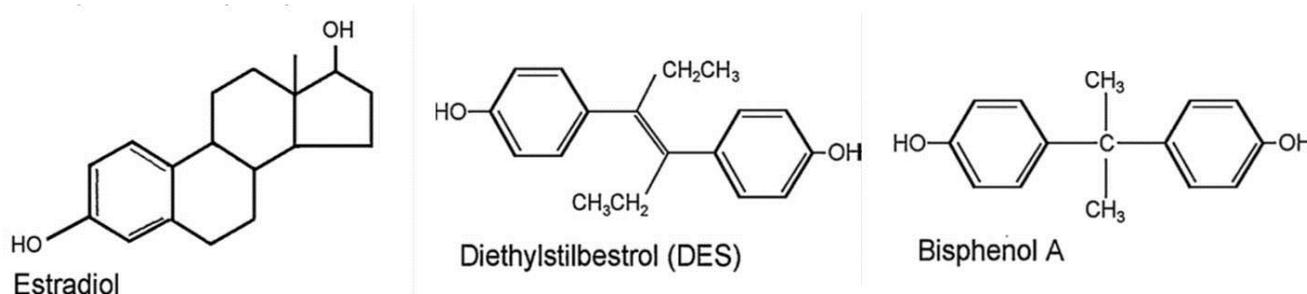


Figura 2. Estructura molecular de BPA, DES (dietilestilbestrol) y estradiol. La afinidad al receptor de estrógenos se debe al parecido en su estructura molecular.

En la naturaleza, existen una gran variedad de sustancias con actividad estrogénica. Dependiendo de su origen, se pueden clasificar como naturales: isoflavonas, flavonoides, terpenos, fitoestrógenos o industriales, como: alquilfenoles, bifenilos policlorados (insecticidas) y de manufactura de plásticos como los bisfenoles (De Coster S, van Larebeke N., 2012).

Bisfenol A

El Bisfenol A (2,2-bis (4-hidroxifenil) propano), es un compuesto químico ampliamente utilizado en la manufactura de plásticos policarbonados, resinas epóxicas y como aditivo polimérico en otros plásticos. En 1940 y en los 50's, fue descubierta su gran capacidad de uso, en la industria del plástico como aditivo con otros polímeros. El BPA

se encuentra en una gran variedad de productos utilizados cotidianamente, como: contenedores de agua y de comida, discos compactos, biberones, equipo electrónico, recubrimientos de alimentos enlatados, recibos de papel y en resinas dentales, además de una amplia variedad de productos (NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Bisphenol A, vol. 83).

Las moléculas de BPA en el polímero de policarbonato están enlazadas por enlaces éster los cuales pueden hidrolizarse mediante altas temperaturas y pH's muy básicos o muy ácidos (Figura 3). Se ha demostrado que el BPA se libera de su matriz polimérica en recipientes hechos a base de este polímero, por lo que podemos estar expuestos mediante el uso de contenedores hechos a base de BPA, y consumirlo constantemente (Vandenberg L.N. et al., 2007).

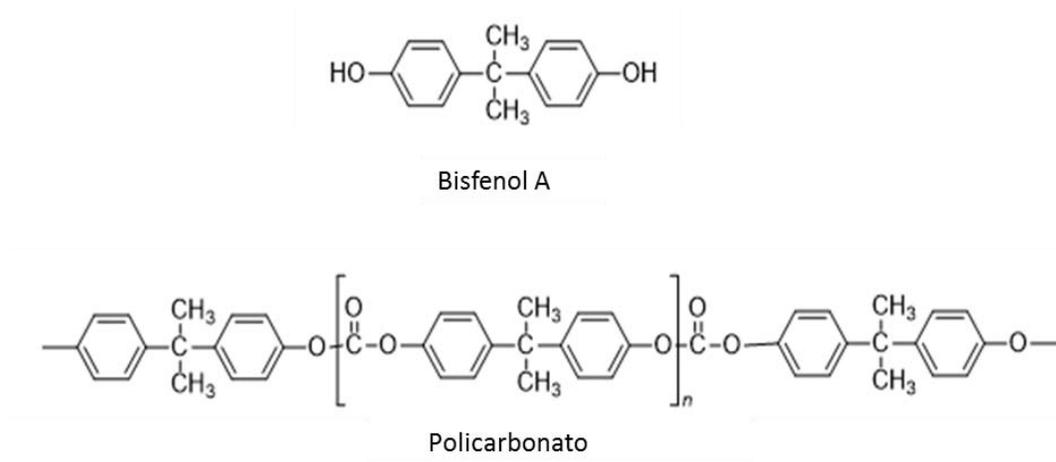


Figura 3. El polímero de policarbonato está enlazado mediante enlaces éster. La hidrolisis de estos enlaces produce liberación del BPA.

Ingesta de BPA

A partir del conocimiento de la constante exposición en el ambiente, se han realizado mediciones en humanos de las cantidades de BPA excretadas en orina. En un estudio, se observó que fue cuantificable en el 92.6% de 2500 sujetos. Los niveles de BPA encontrados fueron 4.5 ng/mL en niños de 6 a 12 años; 3.0 ng/mL en adolescentes de 12 a 19 años de edad y 2.5 ng/mL en adultos mayores a 20 años de edad. Se utilizaron

diferentes metodologías para la medición de BPA y observaron que en neonatos e infantes menores de 44 semanas la cantidad de BPA es mas alta que en adolescentes así como en mujeres comparado con la población de hombres (Calafa AM et al., 2008). En otros estudios se encontraron concentraciones de BPA en liquido amniótico (8.3 ng/mL), leche materna (3.4 ng/mL) y tejido placentario (11.2 ng/g) (Vandenberg L.N. et al., 2007). Este dato resulta importante si consideramos la capacidad del BPA de afectar múltiples mecanismos del sistema endócrino en etapas críticas de su desarrollo principalmente en la etapa prenatal, neonatal y prepuberal. Los efectos reportados del BPA varían dependiendo de la cantidad, y del tiempo de exposición. Sin embargo, todos concurren en que la exposición prenatal y neonatal es el periodo más vulnerable del organismo para la exposición al BPA (Vandenberg M.V., et al. 2009).

A partir de diferentes estudios la EPA (Environmental Protection Agency) ha establecido como NOAEL (Nivel Mínimo de Efecto Adverso Observable) 50 µg BPA/kg peso/día para humanos, y 50 mg BPA/kg/día peso, para animales de experimentación. A partir de aquí, han sido descritos efectos tales como, alteraciones en el ciclo estral, alteraciones en glándula mamaria, neoplasias en glándula prostática e hiperplasias y lesiones preneoplásicas en tejido mamario (Rubin BS., 2011).

Se ha demostrado que el BPA se une selectivamente a ER β con mayor afinidad que a ER α , pues es 6.6 veces mayor la afinidad relativa del BPA y 17- β estradiol al ER β con respecto al ER α (Kuiper GG., et al.1997). Se ha observado también que la constante de disociación del BPA para ER β es 195 nM y 35 nM para ER α (Routledge EJ., et al. 2000). Esto significa, que la interacción del BPA con los receptores a estrógenos puede inducir diferentes cascadas de señalización, sin embargo esto depende del tipo y sensibilidad celular.

Efectos en Sistema Reproductivo

Se han realizado diferentes estudios en modelos animales para observar los efectos del BPA en diferentes partes del sistema reproductivo masculino, principalmente en testículos y en la glándula prostática. En un estudio se observó la disminución significativa en la cuenta de espermatozoides testicular y en epidídimo de ratones macho administrados diariamente con 25 y 100 µg/kg/día (Al-Hiyasat A.S. et al., 2002). En estudios similares, se demostró que una dosis de 0.01 nM de BPA administrada oralmente, disminuye la producción de testosterona en un 25%, así como la expresión de la enzima 17 α-monoxigenasa, la enzima principal en la producción de andrógenos (Akingbemi B.T. et al., 2004), en un estudio similar se observó que la síntesis de testosterona fue disminuida a una concentración de 10 µM y de la expresión de los genes de las enzimas 3-β hidroxisteroide desihidrogenasa, 17 α-monoxigenasa y P450cc, encargadas de la biosíntesis de testosterona (Hunag J. et al., 2013). Con una administración de 20 o 200 µg/kg peso de BPA subcutánea en rata y ratones de 6 días, fueron observadas anomalías por microscopia y microscopía electrónica. Las espermátidas se observaron deformadas, también se observó un incompleta especialización entre células de Sertoli y espermátidas; rata y ratón respondieron similarmente al tratamiento (Toyama Y et al., 2014). También se han hecho estudios en células de Leydig fetales para conocer el efecto durante una etapa crítica de desarrollo; se hizo en cultivo de células de humano de 6 a 10 semanas de edad y al día 14 y 12 para rata y ratón respectivamente, se observó una disminución en la secreción de testosterona por las células testiculares humanas a una concentración de 10 nM de BPA a las 24 horas, en rata y ratón fue necesaria una concentración 10 µM para observar una respuesta equivalente (N'Tumba Byn T. et al., 2012).

Por otra parte, recientemente se ha publicado el primer reporte clínico en el que se ha asociado el BPA y la incidencia de cáncer de próstata (Tarapore P. et al., 2014.). En éste estudio, se midieron los niveles de BPA en orina mediante normalización de creatinina para cuantificar la dilución de la orina. El estudio reveló, que los pacientes con biopsias confirmadas para cáncer prostático menores de 65 años, tenían niveles séricos más altos de BPA, además de que la correlación de la medición de BPA fue

mejor que la de antígeno prostático. Sin embargo, esto depende mucho del estilo de vida del paciente. Un análisis en ratas Sprague Dawley administradas neonatalmente con BPA, a las 15 semanas de edad les produjo efectos patológicos como hiperplasia e inflamación de glándula prostática (Prins G.S. et al., 2001).

Estudios Recientes, evaluaron dosis bajas y altas de BPA (25 o 250µg/Kg/día) en ratas Sprague Dawley, administradas prenatalmente vía oral, y se observó que el BPA causó un incremento significativo en el desarrollo de hiperplasia/displasia en el tracto ventral de la glándula próstática en el grupo tratado con BPA (Brandt J.Z. et al., 2014). En otro estudio similar, administrando 10µg/Kg/día, los animales desarrollaron neoplasia intraepitelial en la glándula prostática, a las 28 semanas de edad. (Ho S.M. et al., 2006, Prins G.S. et al., 2011). Otro estudio con ratas Sprague Dawley que fueron tratadas neonatalmente al día 3 de edad, con 10 y 50 µg/Kg/día, y posteriormente tratadas con estradiol y testosterona, observaron baja incidencia de adenocarcinoma bien diferenciado en ductos periuretrales prostáticos, aunque el tratamiento con BPA no aumentó la misma patología, pero sí produjo neoplasia intraepitelial e inflamación prostática comparada al grupo control (Ittmann M. et al., 2013).

Aunque en conjunto estos estudios han demostrado que la exposición a BPA en etapas tempranas de desarrollo, tiene un potencial efecto en la incidencia de lesiones en modelos de cáncer prostático en animales, son necesarias investigaciones independientes para documentar al BPA como agente carcinógeno (Seachrist DD. et al., 2015).

Efectos reportados de BPA en el Sistema Inmune

Aunque el BPA es uno de los CDEs más estudiados, y se ha documentado sus efectos fisiológicos, se calcula que los humanos siguen expuestos a concentraciones >10nM, los que se han encontrado al medirlo en diversos cuerpos de agua alrededor del mundo (Rogers JA., et al. 2012). Estudios recientes, han demostrado que lo CDEs no solo pueden afectar el sistema endocrino; a partir del conocimiento de la interacción entre

los esteroides sexuales y el sistema inmunológico resulta importante en el estudio del efecto de compuestos como el BPA en células del sistema inmune. Existen pocos estudios con información relacionada con el BPA y su efecto sobre los linfocitos T colaboradores (Th). En ellos, se ha reportado que cuando los linfocitos de ratones previamente expuestos durante 4 semanas al BPA en el agua de bebida, fueron cultivados en presencia de concanavalina A, se observó un aumento en la secreción de interferón- γ , así como la reducción en la IL-4, lo que sugiere una inducción de una respuesta tipo Th1 por el BPA (Youn et al., 2002). En otro estudio, en ratones hembra alimentadas con BPA diariamente durante la gestación, las crías fueron inmunizadas en el día 77 de edad, con lisozima de huevo de gallina, 3 semanas después cuando se examinó la respuesta proliferativa de células del bazo, se observó el aumento de las citocinas tanto interferón- γ (Th1) e IL-4 (Th2), sin embargo el aumento de interferón- γ es mayor, con lo que concluyen que la respuesta tipo Th1 fue mayor a la tipo Th2 (Yoshino et al., 2004).

Otros estudios han mostrado que los linfocitos de ratón estimulados con BPA (50 mM) producen una respuesta polarizada hacia Th2, con una elevación de IL-4, así como de la de IL-10 (Lee y Lim., 2010). Del mismo modo, se observó que el BPA mejora la producción de IL-4 en las células T antígeno específicas, en concentraciones de exposición de BPA ≈ 10 -50 M (Lee et al., 2003). En otros estudios, las células dendríticas expuestas a concentraciones de BPA (10-100 nM), se observa que las células T producen una respuesta hacia un tipo Th2 (Guo et al., 2010). Además, las células dendríticas expuestas a BPA (100 nM) y TNF- α producen altos niveles de IL-10 en contraste con los de la IL-12, induciendo una desviación hacia Th2 (Liu et al., 2009). Además, animales alimentados durante la gestación hasta el destete con 0.1ppm y 1ppm de BPA y administrados con ovoalbumina mostraron una disminución de linfocitos T reguladores. (Yan et al., 2008). A pesar de que existe evidencia de que el BPA tiene la capacidad de producir efecto en particular en linfocitos T colaboradores, no se observa una tendencia clara.

Respuesta Inmune al Tumor

Las células transformadas son reconocidas y eliminadas por el sistema inmune. En 1957, Burnet McFarlane y Thomas Lewis, fueron los primeros en proponer y llamar a este proceso inmunovigilancia. Subsecuentes experimentos, demostraron que efectivamente el sistema inmune se encarga de realizar este procedimiento. Sin embargo, las clonas de células tumorales menos inmunogénicas escapan, permaneciendo las variantes que han desarrollado mecanismos de evasión y eliminación, al sistema inmune. A partir de estos datos, se ha descrito que el sistema inmune además de interactuar de manera negativa, finalmente también contribuye de forma positiva en el desarrollo tumoral, puesto que la eliminación produce una presión selectiva sobre las diferentes variantes de clonas de células transformadas. En este proceso, las clonas variantes de células tumorales menos inmunogénicas sobreviven evadiendo al sistema inmune. A este hecho se le ha denominado inmunoedición (Dunn GP., et al 2002).

A partir de la evidencia mostrada en diferentes laboratorios, ahora se conoce que el sistema inmune, tanto innato como adaptativo, interviene temporalmente de diferentes maneras en la respuesta inmune al desarrollo tumoral, desde la eliminación hasta el desarrollo y metástasis del tumor. Para su mejor descripción y comprensión el proceso de “inmunoedición” se ha dividido en tres etapas: eliminación, equilibrio y escape (Figura 4).

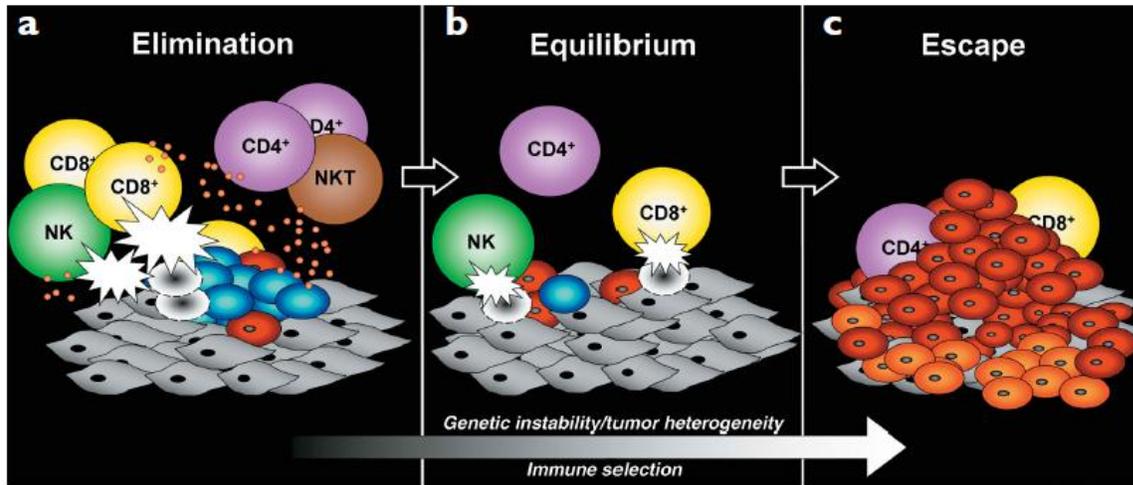


Figura4. La inmunoedición del cáncer confiere tres procesos. La eliminación confiere "inmunovigilancia". El equilibrio representa la selección y el desarrollo de variantes, con capacidad de sobrevivir. En el Escape las células crecen incontroladamente y la respuesta inmune ya no es efectiva (Dunn GP, et al., 2002).

Eliminación

En el proceso de eliminación, se comprende desde el concepto de "inmunovigilancia" hasta la selección positiva de células tumorales. En ella, participan células del sistema inmune innato así como células NK y NKT; éstas reconocen células transformadas mediante la molécula MHC clase I y secretan IFN- γ , activando a los Macrófagos y linfocitos $\gamma\delta$. Las células que presentan antígenos transformados o externos, son eliminadas por las células NK, mediante la secreción de TNF- α y mecanismos apoptóticos (perforinas, granzimas y FasL). El IFN- γ por su parte, activa a los macrófagos, así como induce la maduración de células dendríticas. Los macrófagos, secretan especies reactivas de O_2 y N_2 , y secretan citocinas pro-inflamatorias como el IFN- γ . Las células dendríticas y macrófagos a su vez, fagocitan los restos de células transformadas y migran hacia los órganos linfáticos periféricos presentando antígenos a los linfocitos T y B. De esta forma, se producen linfocitos CD4 específicos, iniciando una respuesta inmune específica. La presentación antigénica mediante MHC clase I induce la activación de linfocitos T citotóxicos (proceso denominado presentación cruzada). La secreción de IFN- γ , por los linfocitos mediante perfil inflamatorio (Th1) facilita la diferenciación y activación de los linfocitos CD8 (T citotóxicos). Finalmente,

los linfocitos migran hacia el sitio del tumor y eliminan células tumorales. De esta manera se produce la disminución en la progresión y desarrollo del tumor (Figura 5).

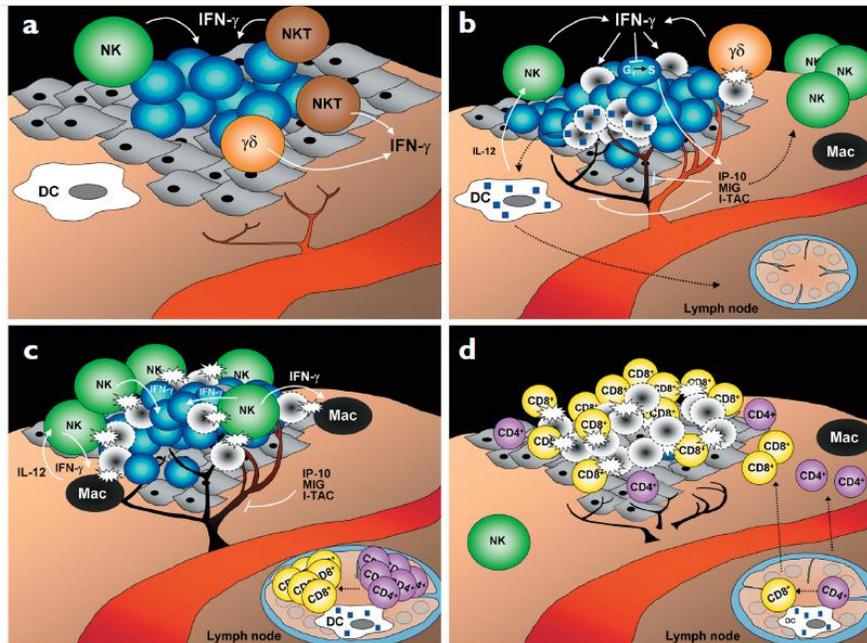


Figura5. Las células NK y los linfocitos CD8 reconocen células transformadas (a), posteriormente las células dendríticas (b) producen una respuesta específica presentando antígenos a linfocitos T vírgenes (d) y macrófagos(c) eliminan células tumorales. A este proceso se le llama “Inmunovigilancia” (Dunn GP, et al., 2002).

Equilibrio

El proceso de eliminación produce una selección sobre las diferentes variantes de clonas de células transformadas. En este proceso las clonas variantes de células tumorales sobrevivientes a la eliminación inmunogénica entran en equilibrio con las células que son eliminadas. La presencia de las citocinas IL-4 e IL-5 en el microambiente tumoral, inducen la proliferación de linfocitos CD4 tipo Th2, estos secretan diferentes citocinas como INF- γ , TGF- β , IL-4 e IL 17 produciendo diferentes tipos y respuestas de linfocitos colaboradores, de esta manera se puede polarizar la respuesta inmune y producir la eliminación de las células tumorales o su desarrollo (Figura 6.). La inflamación producida en el microambiente tumoral, crea inestabilidad genética, lo que aumenta la probabilidad de formar mutaciones y clonas con una

variedad mayor de modificaciones, las cuales pueden evadir la respuesta inmune. En esta etapa en el microambiente tumoral se desarrolla la misma cantidad de células tumorales que las que el sistema inmune elimina. Se ha descrito que ésta etapa es la mas larga en humanos pudiendo comprender años (Koebel C.M., et al. 2007).

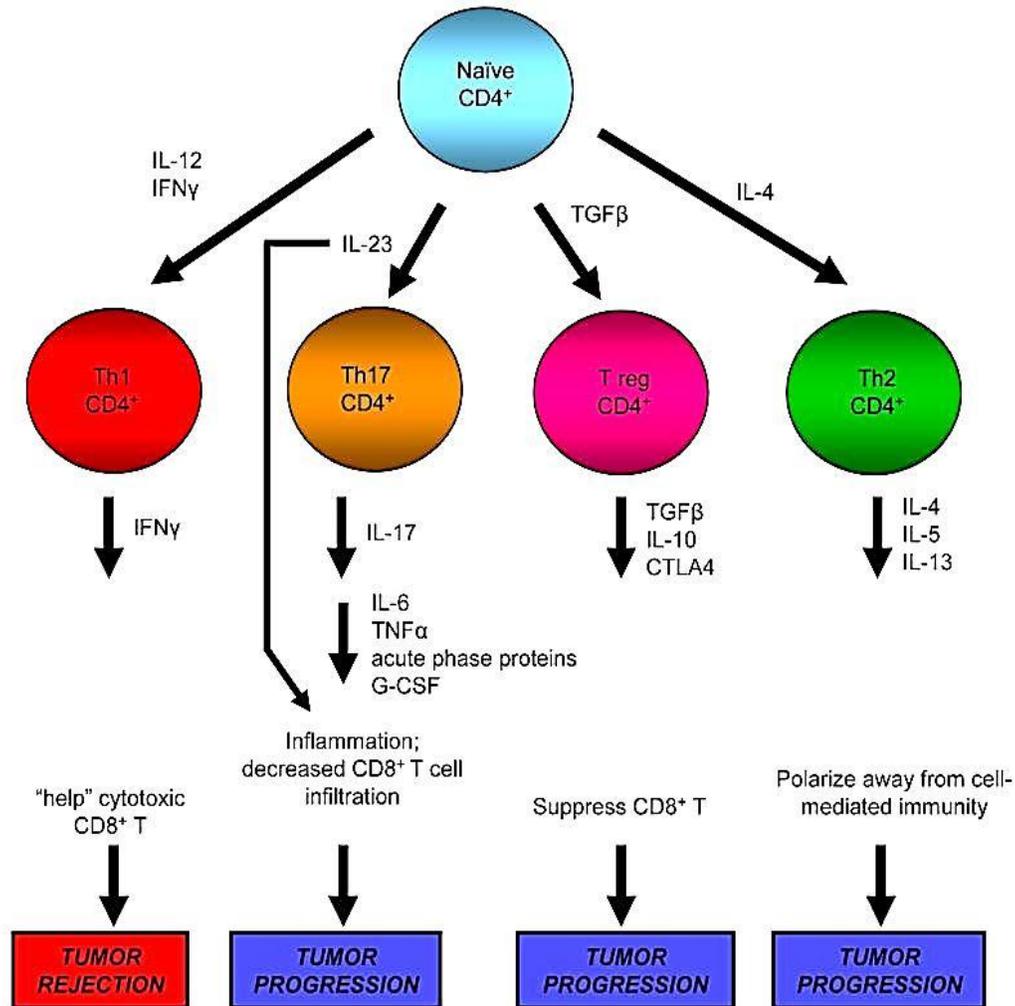


Figura6. La secreción de interleucinas por linfocitos T cooperadores influye importante en la polarización de linfocitos produciendo fenotipos que pueden inducir la eliminación o progresión del tumor. (Ostrand-Rosenberg S. et al., 2008)

Escape

Por otra parte, los Macrófagos Asociados a Tumores (MATS) tienen un papel crucial en el desarrollo del tumor, ya que intervienen en la angiogénesis así como en la reparación de la matriz extracelular del tumor, mediante la presencia de TGF- β ,

produciendo una barrera física e induciendo la formación de vasos, además de expresar moléculas de co-estimulación negativa como PD-L1 y PDL-2, por lo que el fenotipo predominante en el microambiente tumoral determina su papel como promotor o regresor del desarrollo tumoral.

Finalmente, las diferentes clonas de células que han evadido la respuesta inmune dejan de expresar moléculas de co-estimulación y de MHC, y a su vez expresan moléculas de co-estimulación negativa, como CD-80, 86 y PD-L1, inhibiendo la actividad de las células dendríticas, produciendo la apoptosis de linfocitos y células NK, así como la tolerancia de linfocitos. Las células tumorales también producen interleucinas de perfil regulador como IL-10 y TGF- β , además de factores de crecimiento como VEGF que estimulan la angiogénesis. La presencia de todos estos factores en el microambiente tumoral, inhiben la respuesta inflamatoria y la eliminación de células tumorales (Figura 7).

Cabe mencionar que la teoría de la respuesta inmune tumoral es el resultado del conjunto de la investigación en diferentes modelos de desarrollo tumoral. Es de particular importancia, el estudio por separado de los diferentes tipos de cáncer, debido a las diferencias fisiológicas en el microambiente tumoral, entre ellas principalmente se encuentra la presencia de quimiocinas, de factores hormonales de cada microambiente tumoral y de factores de crecimiento del tejido en que se desarrolla.

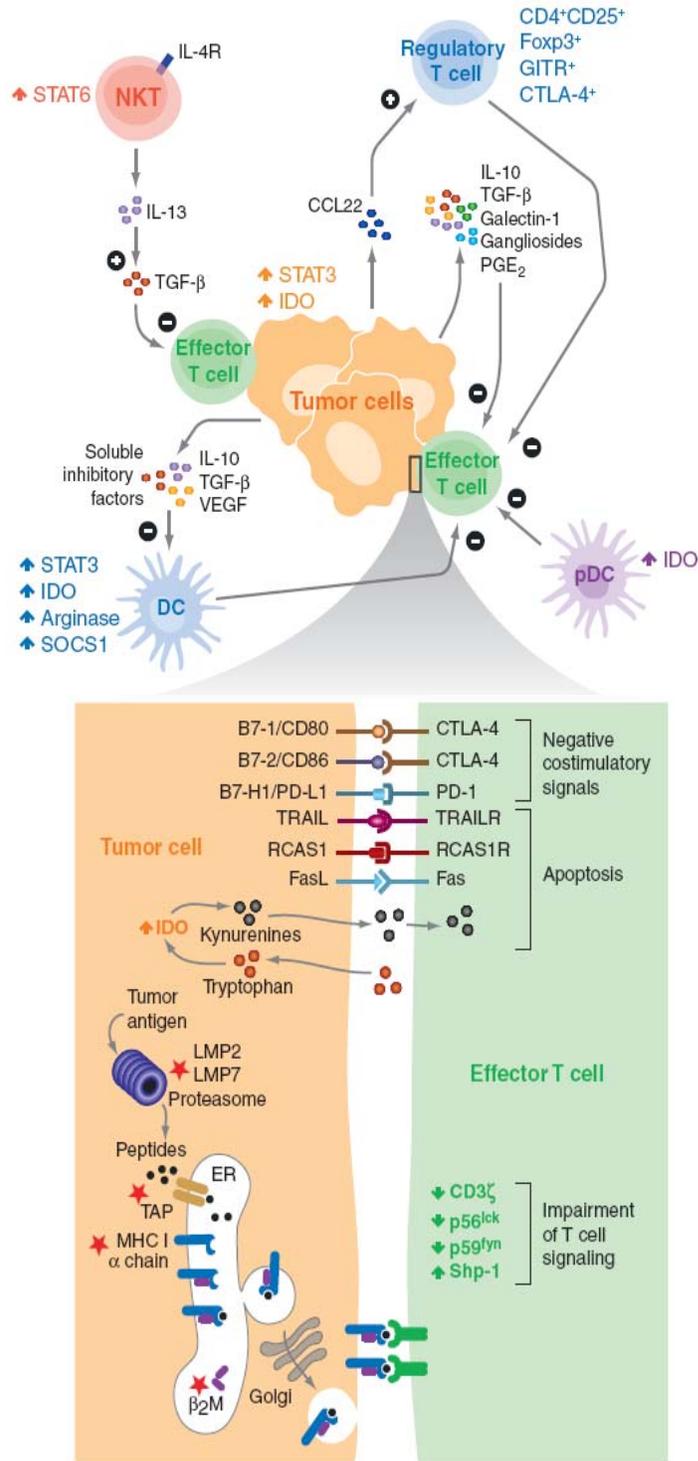


Figura 7. Algunas de las estrategias de las células tumorales para evadir respuesta inmune son la producción de interleucinas reguladoras así como la expresión de diferentes moléculas de coestimulación (Rabinovich GA, et al., 2011).



JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICACION

A pesar del avance en el estudio del desarrollo tumoral, todavía no está bien documentado el efecto en la respuesta inmune debido a la exposición de compuestos disruptores endocrinos. Es por lo anterior, que en este proyecto se evaluará el papel de los compuestos disruptores endocrinos, en particular del BPA, en la susceptibilidad al desarrollo tumoral en el tracto reproductivo mediante la polarización del tipo de respuesta inmunológica.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hasta ahora, el estudio de las alteraciones en el sistema inmune, ocasionadas por la exposición perinatal al BPA y su relación sobre el desarrollo tumoral no han sido documentadas. Se ha demostrado que la exposición neonatal de ratones macho a el disruptor endócrino BPA, modifica el desarrollo de la glándula prostática influyendo en la susceptibilidad de cáncer actuando como un agente estrogénico. El sistema inmunológico también es susceptible a la acción de las hormonas sexuales, por lo que la exposición perinatal a BPA podría influenciar la respuesta inmunológica contra el desarrollo tumoral. Sin embargo, a la fecha, no se ha descrito de qué manera la exposición a BPA puede afectar la respuesta inmune, y cómo éste cambio puede condicionar el desarrollo tumoral en la edad adulta de un individuo.



HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

La exposición perinatal a BPA disminuirá la respuesta inmune contra la línea tumoral 4T1 en ratones macho adultos BalbC, haciéndolos susceptibles al desarrollo tumoral.



OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar la influencia de la exposición perinatal a BPA sobre la susceptibilidad al desarrollo tumoral y la respuesta inmune asociada al mismo en la etapa adulta.

Objetivos particulares

1. Estudiar el efecto de la administración perinatal de BPA sobre la susceptibilidad al desarrollo de tumores, mediante la inyección de la línea celular 4T1 en el escroto de ratones Balb/c macho adultos.
2. Realizar la caracterización histopatológica de las tumoraciones mediante la tinción por hematoxilina y eosina en cortes histológicos de los mismos.
3. Analizar por citometría de flujo el efecto de la administración perinatal de BPA sobre las diferencias en el porcentaje de linfocitos totales, linfocitos T colaboradores, T reguladores, T citotóxicos, células NKs, linfocitos $\gamma\delta$ y macrófagos, en bazo, ganglios linfáticos periféricos y tejido tumoral de ratones macho controles e inoculados con células 4T1.
4. Observar los efectos de la exposición perinatal a BPA sobre la expresión de las citocinas TNF- α , TGF- β , IL-10 por RT-PCR en bazo y tejido tumoral.

MATERIALES Y METODOS

Manejo y uso de animales

Para los experimentos, se utilizaron ratones de la cepa Balb/c de 8 semanas de edad para cruce y uso de la progenie como sujetos experimentales. Con las crías machos resultantes se formaron los siguientes grupos experimentales:

Tabla1. Grupos experimentales.

Tratamiento	Intactos	Inoculados con células 4T1
Control	n=8	n=7
Vehículo	n=6	n=7
BPA	n=7	n=4

Los grupos: Control/4T1, Vehículo/4T1 y BPA/4T1, fueron inoculados a las 9 semanas de edad con 10,000 células de la línea tumoral 4T1 de cáncer de mama.

Los ratones fueron sacrificados a los 21 días posteriores a la inoculación de la línea tumoral y se les extrajo el bazo, ganglios linfáticos inguinales y tumores. Se hicieron tinciones celulares para la cuantificación de Linfocitos CD3, CD4, CD8, FoxP3, Macrófagos, PD-L2 y NK, mediante citometría de flujo. A los tejidos bazo y tumor se realizó la extracción de ARN para realizar la Retro transcripción - Reacción en Cadena de la Polimerasa y hacer el análisis de IL-10, TGF- β y TNF- α .

Las prácticas de experimentación y cuidado animal en el Instituto de Investigaciones Biomédicas son evaluadas continuamente por el Comité de Utilización y Cuidado Animal de la Universidad y del mismo Instituto, para asegurar el cumplimiento de las reglas y recomendaciones internacionales.

Cruza de Ratones

Se utilizaron ratones de la cepa Blab/c, se colocaron hembra y macho durante semana y media en “concubinato”. Se pesaron en una báscula digital para monitorear el cambio de peso de las hembras y para verificar el estado de gestación.

Exposición a BPA

Cuando fue evidente su estado gestante (aproximado al día 11 de gestación) se inició la exposición a BPA en agua de beber. Se diluyeron 50 mg de BPA en 300 μ L de etanol y fueron disueltos 25 μ L de esta dilución en 50 mL de agua en bebederos de vidrio que fueron colocados para el consumo de los animales hasta el destete. Los bebederos se cambiaron cada tercer día para administrar una dosis 250 mg/peso/día. Al grupo Vehículo se administró la misma cantidad de etanol (25 μ L) y los animales del grupo Control no fueron expuestos a ningún compuesto.

Cultivo de la línea tumoral e inoculación.

La línea tumoral 4T1 de cáncer de mama fue cultivada en 4 mL de medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino, en botellas de cultivo de 50 mL. Cuando el cultivo alcanzó un 70% de confluencia se cosecharon las células despegándolas con 20 μ L Tripsina y fueron resuspendidas en buffer de fosfatos. Se ajustó a una cantidad de 10 000 células en 40 μ L que fueron inoculados el ratón previamente anestesiado con Sevofluorano, inyectando directamente en el escroto del animal.

Cortes y tinciones Hematoxilina-Eosina

Se colocaron las muestras de tejido en casetes de fijado en papel filtro y posteriormente en paraformaldehido frío al 4% y pH de 7.4 durante 20 minutos. El tejido se colocó en la orientación y posición deseada y se realiza la inclusión de los tejidos en Tissue-Tek. Los tejidos se congelaron y se hicieron cortes en un criostato, con un grosor de 6 micras. La tinción de Hematoxilina - Eosina se realiza en una serie de pasos consecutivos en donde se colocaron las muestras de la siguiente manera:

1. Xilol durante 5 minutos.
2. alcohol 100% 5 minutos.

-
3. Alcohol 95% 5 minutos.
 4. Alcohol 70% durante 5 minutos.
 5. Lavado agua corriente.
 6. Tinción con Hematoxilina 10 minutos.
 7. Alcohol/acido 5 minutos.
 8. Lavado agua corriente.
 9. Tinción con Eosina 30 segundos.
 10. Alcohol al 70% 5 minutos.
 11. Alcohol al 95% 5 minutos.
 12. Alcohol 100% 5 minutos.

Finalmente se coloca una cubre objetos con resina acrílica. Las fotografías fueron tomadas en la Facultad de Medicina en el laboratorio del Dr. Armando Pérez Torres.

Citometría de flujo de células de bazo, nódulos linfáticos periféricos y tumores.

El tratamiento de los tejidos utilizados para la Citometría de flujo, consistió en inmediatamente después de extirparlos, disgregarlos con malla de nylon y se posteriormente se resuspendieron en buffer de FACS. A el disgregado de células de bazo se le añadieron 0.5 mL de buffer de lisis y se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron 5 minutos a 1200 rpm, posteriormente se resuspendieron en buffer de FACS. Los tumores fueron disgregados en medio de cultivo RPMI sin suplementar con 100U/mL de DNasa y 4.5mg/mL de Colagenasa, se incubaron 20 minutos a 37 °C, se centrifugaron 5 minutos a 1200 rpm y se resuspendieron en buffer de FACS.

Tinción CD3, CD4, CD8 y FoxP3

Se colocaron 25 μ L de muestra de disgregado celular en placas de 96 pozos, se agregaron 25 μ L de Mix de los anticuerpos α -CD3, α -CD4 y α -CD8 y se incubó durante 20 min a 4°C. Se agregaron 200 μ L de buffer FACS para lavado. Se centrifugó 5 min a 1200 rpm y se decantó. Se agregaron 200 μ L de buffer de permeabilización-fijación y se incubó 20 min a temperatura ambiente. Se centrifugó 5 min a 1200 rpm y se decantó. Se añadieron 100 μ L de buffer de FACS para lavado. Se agregaron 250 μ L de buffer de permeabilización para lavado. Se centrifugó 5 min a 1200 rpm y se decantó.

Se agregaron 250 μL de buffer de permeabilización y se incubó 15 min a temperatura ambiente. Se centrifugó 5 min a 1200 rpm y se decantó. Se agregaron 25 μL de buffer de permeabilización. Se agregaron 25 μL α -FoxP3 y se incubó 30 min a temperatura ambiente. Se centrifugó 5 min a 1200 rpm y se decantó. Se añadieron 100 μL de buffer de FACS y 100 μL de paraformaldehído al 4%.

Tinción Macrófagos y PD-L2

De la misma forma a 25 μL de muestra de disgregado celular se añadieron 25 μL de anticuerpo α -FCBlock y se incuban 10min a temperatura ambiente. Se agregaron 100 μL de buffer FACS para lavado. Se centrifugó 5 min a 1200 rpm y se decantó. Se añadieron 25 μL de α F4/80 y se incubó durante 20 min a 4°C. Se añadieron 100 μL de buffer de buffer FACS para lavado. Se centrifugó 5min a 1200 rpm y se decantó Se agregan 25 μL de α PD-L2 se incubó 20 min a 4°C. Se agregaron 100 μL de buffer de FACS para lavado. Se centrifugó 5 min a 1200 rpm y se decantó. Se añadieron 100 μL de buffer FACS y 100 μL de paraformaldehído al 4%.

Tinción de Linfocitos B, $\gamma\delta$ y células NK.

Para cada tinción se agregaron a 25 μL muestra de disgregado celular, 25 μL de anticuerpo α -CD19, 25 μL de anticuerpo α - $\delta\gamma$ y 25 μL de anticuerpo α -NKp46 a 25 μL y se incubaron durante 20 min a 4°C. Se agregaron 200 μL de buffer FACS para lavado. Se centrifugó 5 min a 1200 rpm y se decantó. Se añadieron 100 μL de buffer de FACS y 100 μL de paraformaldehído al 4%.

Las muestras fueron analizadas en un equipo FACS Calibur con un mínimo de 10 000 eventos por muestra. Los datos resultantes se analizaron con el software FlowJo. Las propiedades de los anticuerpos utilizados se muestran en la tabla 3.

Tabla 2. Fluorocromos acoplados y concentración usada de los anticuerpos utilizados en cada tinción.

	CD3	CD4	CD8	FoxP3	F4/80	PD-L2	NKp46	CD19	$\delta\gamma$
Fluorocromo acoplado	Alexa Fluor 488	PE	PE-Cy5	Alexa Fluor 647	Alexa Fluor 647	PE	PE	PE-Cy5	PE
Concentración utilizada	5 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	0.25 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$

Procedimiento de Análisis de Citometría de Flujo

Análisis: Linfocitos T (CD3+), T colaboradores (CD4+), T citotóxicos (CD8+) y T reguladores (FoxP3+).

1. Se seleccionó la población (Figura 9) de linfocitos por tamaño (FSC Forward Scatter) y granularidad (SSC Side Scatter) en los ejes X y Y respectivamente (A)
2. Se comparó el control no teñido de CD3- (B) observado el canal FL1 [Alexa Fluor 488] en el eje X, para seleccionar la población CD3+ (C).
3. De la población CD3+ se separaron las población de linfocitos CD4+ en el canal FL2 [PE], en el eje X y CD8+ en el canal FL3 [PE-Cy5] en el eje Y (D).
4. A partir de la población CD4+, se utilizó un histograma y el canal FL4 [Alexa 647] para observar la población FoxP3+ (E) y se calculó la frecuencia del total, usando el control no teñido como referencia.
5. Este procedimiento de análisis se utilizó para las tinciones de cada muestra de células de bazo, ganglios linfáticos periféricos y tumor.

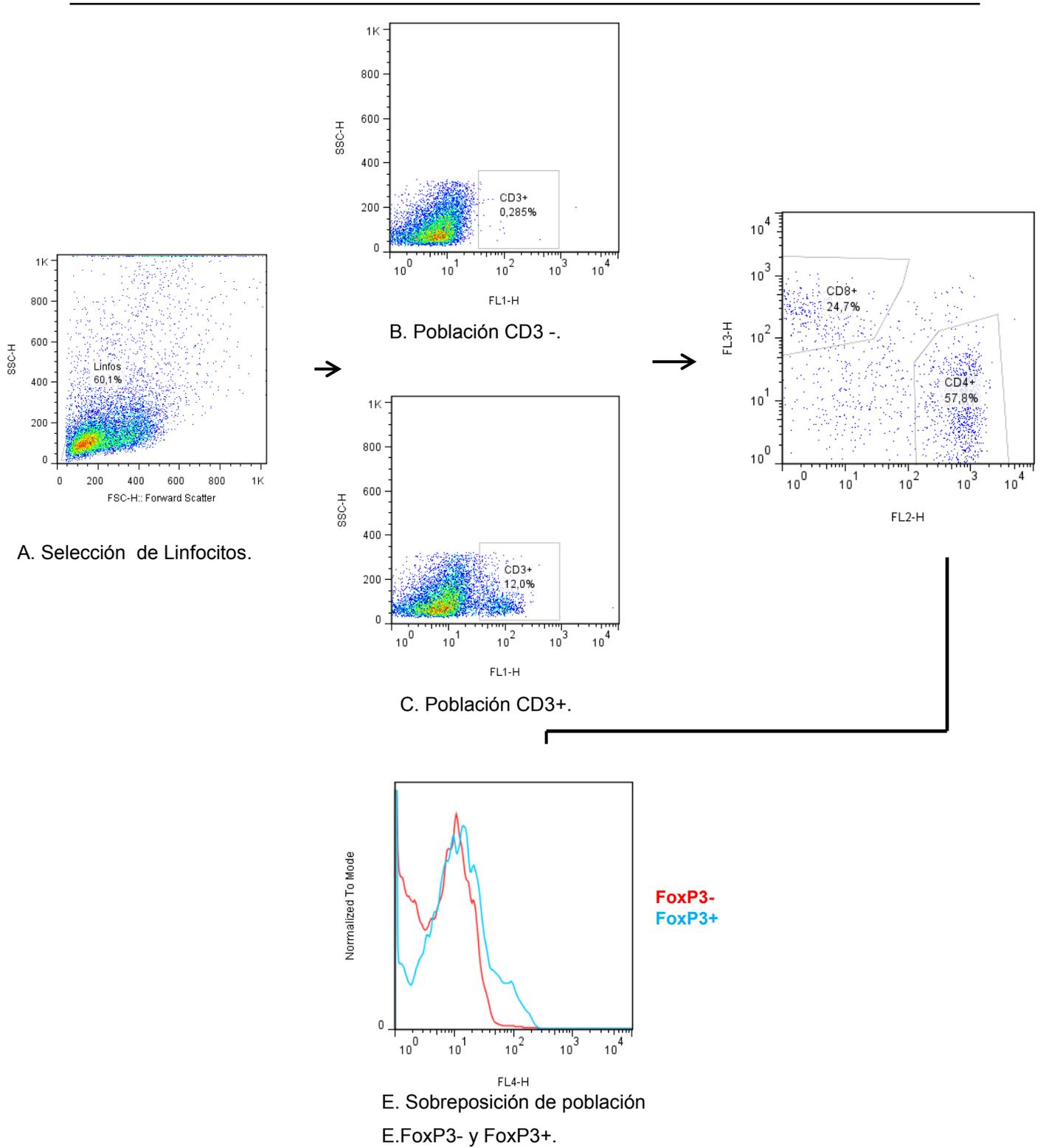


Figura 9. Diagrama del procedimiento de análisis de Citometría en el programa FlowJo para las poblaciones CD3+, CD4+, CD8+ y FoxP3+.

Análisis: Macrófagos (F480+) y PD-L2

1. Se seleccionó la población (Figura 10) de macrófagos por tamaño (FSC Forward Scatter) y granularidad (SSC Side Scatter) en los ejes X y Y respectivamente (A).
2. Se comparó el control no teñido de F480 (B) observado el canal FL4 [Alexa 647] en el eje X, para seleccionar la población F480+ (C).
3. Se obtuvo el resultado de la población PD-L2+ de la muestra, mediante la comparación de poblaciones, utilizando el porcentaje de substracción positiva de Overton (D), para el canal FL1 [PE], usando como control la muestra PD-L2 no teñido.
4. Este procedimiento de análisis se utilizó para las tinciones de cada muestra de células de bazo y tumores.

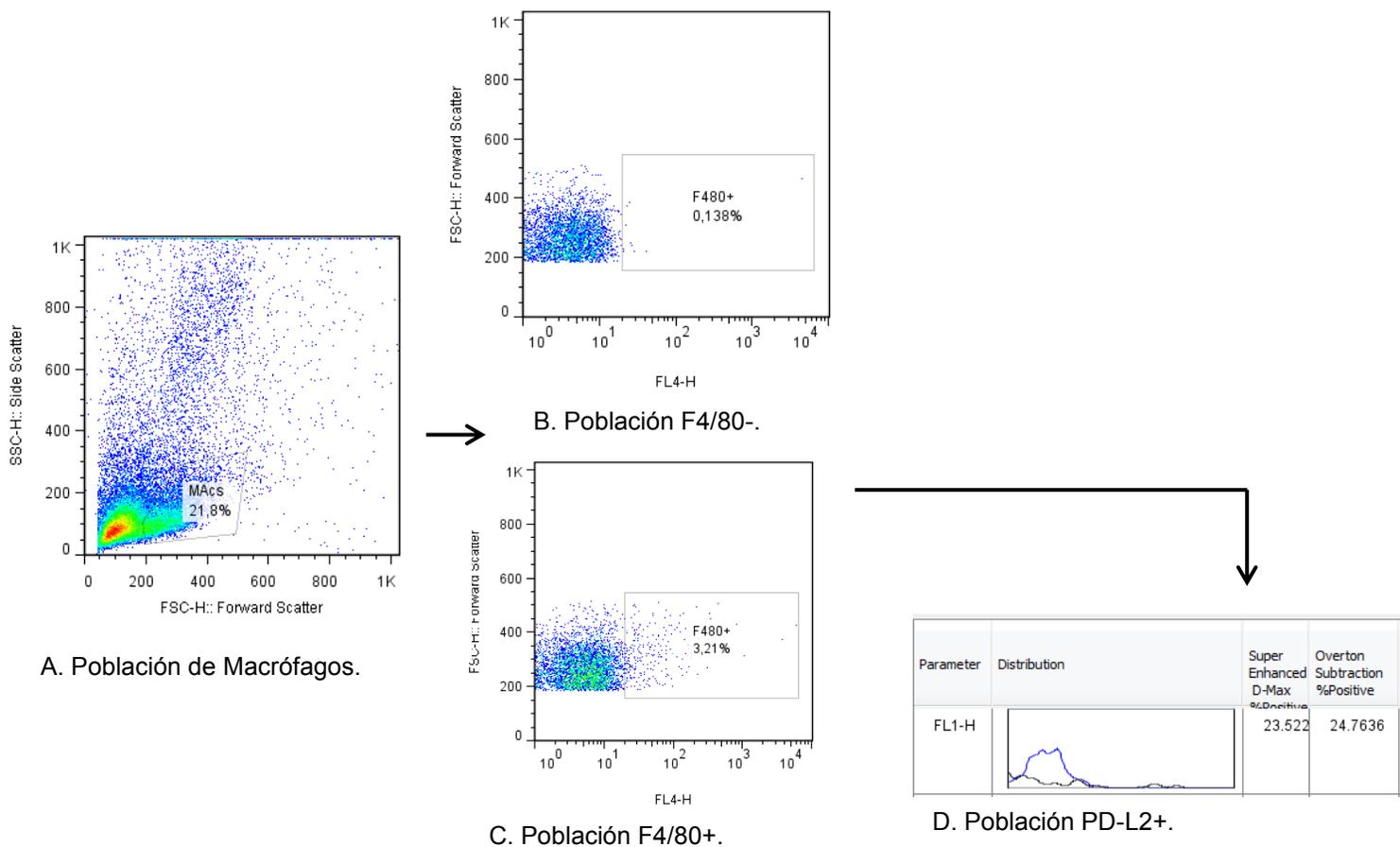


Figura 10. Diagrama de procedimiento de análisis de Citometría en el programa FlowJo para las poblaciones F4/80y PD-L2+.

Análisis: linfocitos B (CD19+).

1. Se seleccionó la población (Figura 11) de linfocitos por tamaño (FSC Forward Scatter) y granularidad (SSC Side Scatter) en los ejes X y Y respectivamente (A).
2. Se comparó el control no teñido de CD19 (B) observado el canal FL2 [PE Cy5] en el eje X, para seleccionar la población CD19+ (C) y se obtuvo el porcentaje celular de la muestra.
3. Este procedimiento de análisis se utilizó para las tinciones de cada muestra de células de bazo y ganglio linfáticos periféricos.

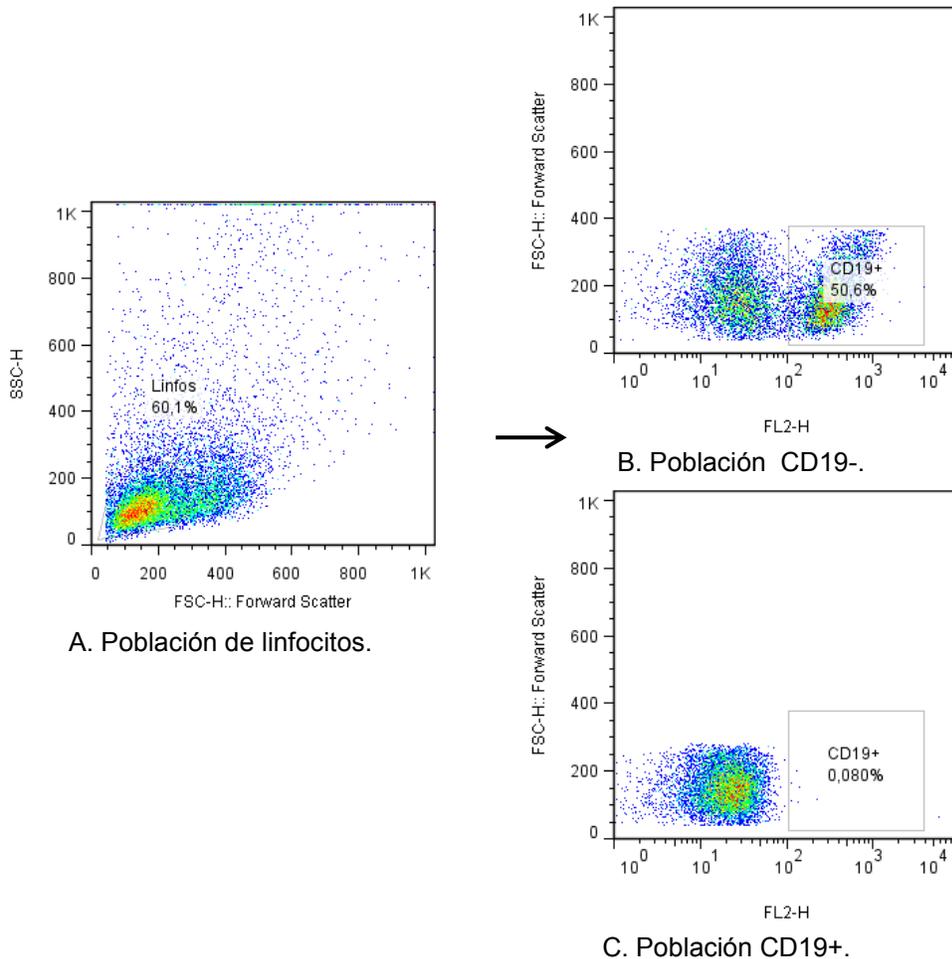


Figura 11. Diagrama de procedimiento de análisis de Citometría en el programa FlowJo para las poblaciones CD19+.

Análisis: linfocitos $\gamma\delta$

1. Se seleccionó la población (Figura 12) de linfocitos por tamaño (FSC Forward Scatter) y granularidad (SSC Side Scatter) en los ejes X y Y respectivamente (A).
2. Se comparó el control no teñido de $\delta\gamma$ (B) observado el canal FL2 [PE] en el eje X, para seleccionar la población $\delta\gamma$ + (C) y se obtuvo el porcentaje celular de la muestra.
3. Este procedimiento de análisis se utilizó par las tinciones de células de cada muestra de bazo y tumor.

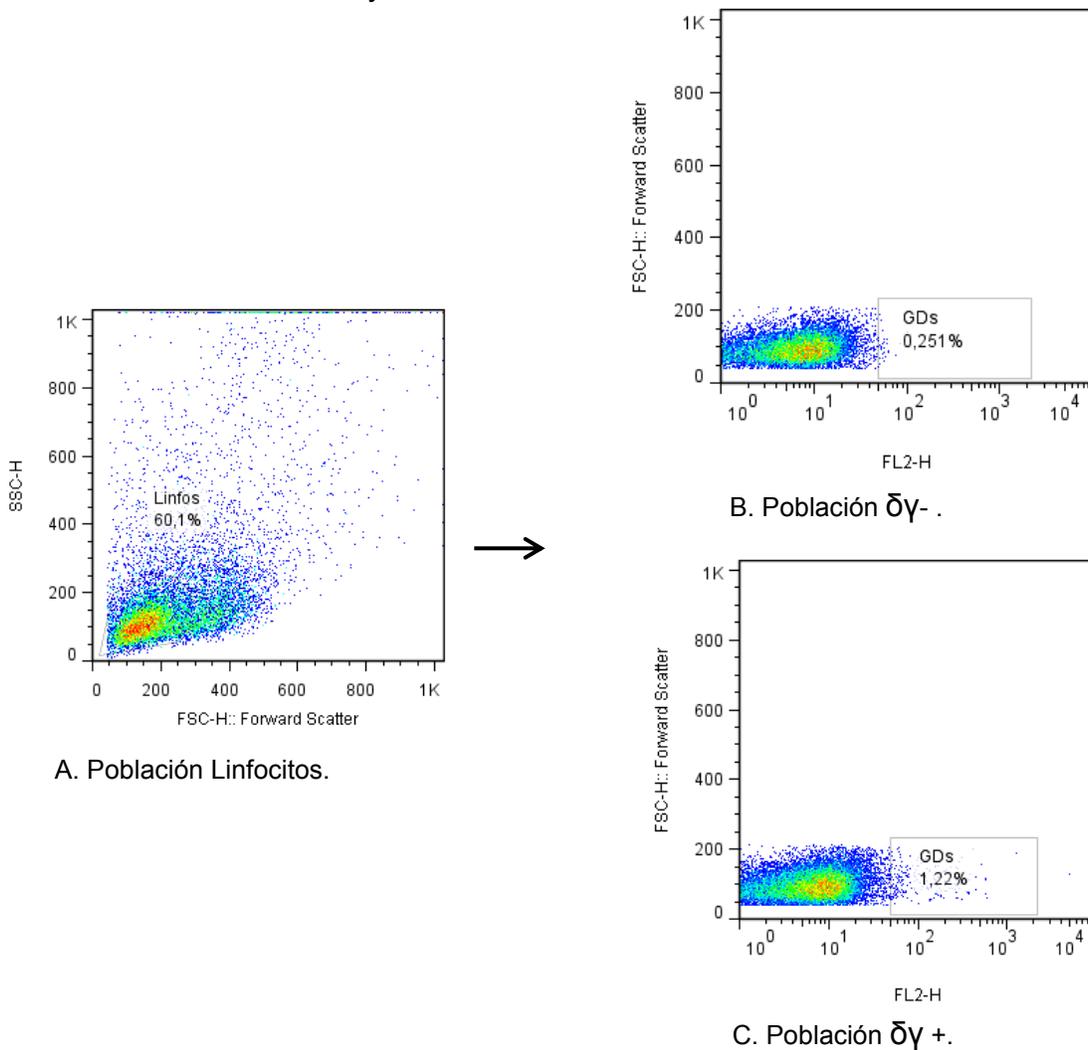


Figura 12. Diagrama de procedimiento de análisis de Citometría en el programa FlowJo para las poblaciones $\delta\gamma$ +.

Análisis: células NKs

1. Se seleccionó la población (Figura 13) de células NK similar a linfocitos por tamaño (FSC Forward Scatter) y granularidad (SSC Side Scatter) en los ejes X y Y respectivamente (A).
2. Se comparó el control no teñido de NKp 46 (B) observado el canal FL2 [PE] en el eje X, para seleccionar la población NKp 46+ (C) y se obtuvo el porcentaje celular de la muestra.
3. Este procedimiento de análisis se utilizó par las tinciones de células de cada muestra de tumores.

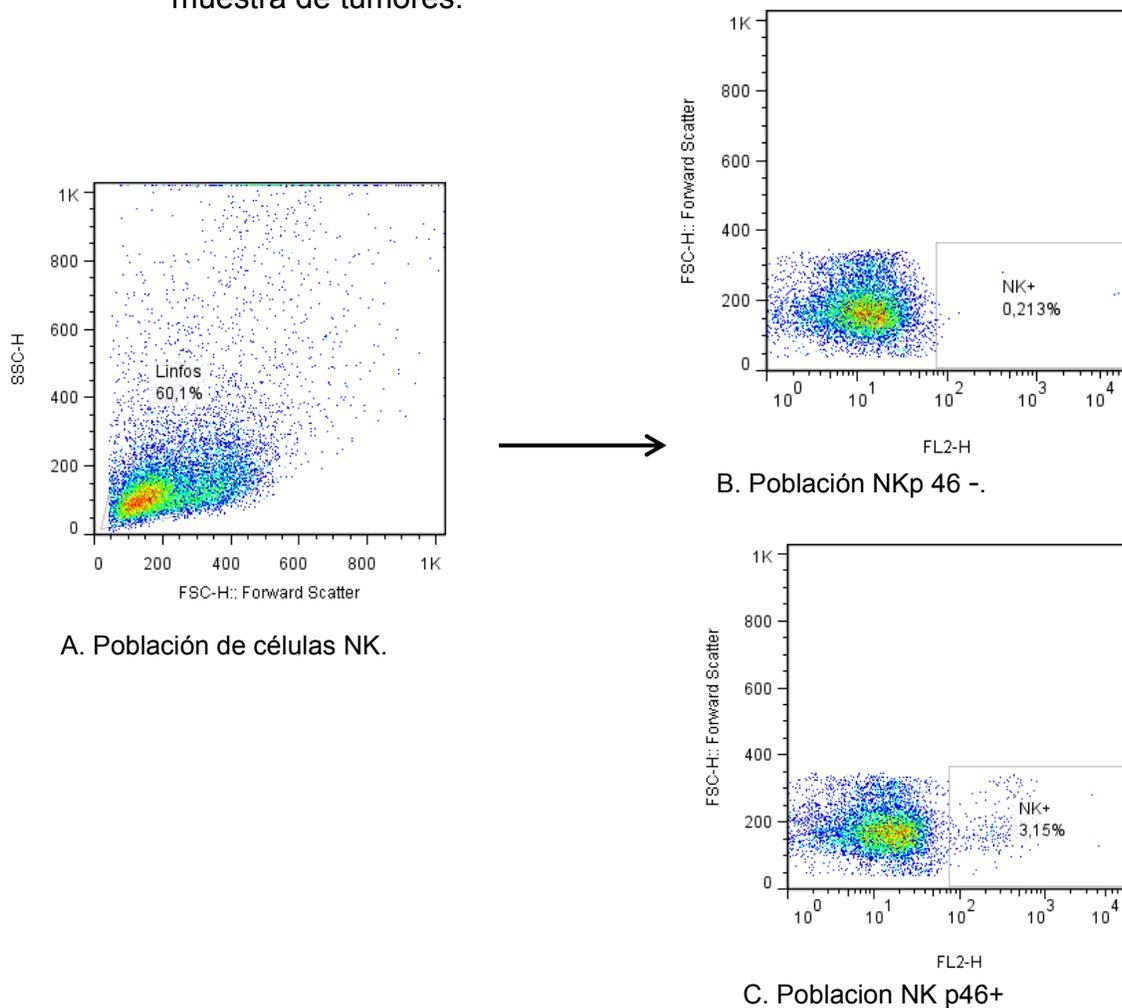


Figura 13. Diagrama de procedimiento de análisis de Citometría en el programa FlowJo para las poblaciones NKp46+.

Retro transcripción - Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)

Extracción de ARN

Durante el sacrificio de los animales fueron disectados 0.5g de bazo y tumor y se agregaron 500 μ L de trizol y se almacenaron a -70°C . Posteriormente se agregaron 0.4mL mas de trizol y se homogenizaron con Politrón durante 5 minutos. Posteriormente se le agregaron 0.2 mL de cloroformo y 0.2mL de agua libre de ARNasas (agua DEPC). Posteriormente se separó la fase acuosa y se agregaron 0.2 mL de una mezcla de fenol/cloroformo. Se agitaron vigorosamente durante 30 segundos y se centrifugaron a 13 500 rpm durante 15 minutos. Se separó de nuevo la fase acuosa y se le agregaron 0.2 mL de Cloroformo. Se separó la fase acuosa y se le agregó la misma cantidad de volumen de Isopropanol y se mantuvieron a 4°C durante 24 horas. Se centrifugaron a 13 500 rpm durante 15 minutos y se retiró el Isoprpanol y se lavaron con 1mL de una solución de Etanol al 70% agitando durante 30 segundos. Se volvió a centrifugar a 13 500 rpm durante 15 minutos y se dejaron secar los “pellets” de ARN resultantes. Se agregaron 20 o 30 μ L de agua DEPC dependiendo del tamaño del “pellet” y se agitó hasta la resuspensión total. Todo este procedimiento se realizó manteniendo las soluciones y el tejido a 4°C . Se cuantificó mediante absorbancia a 260 nm y se verificó su integridad en gel de Agarosa 1% y buffer TBE.

RT

Del ARN total de todas las muestras se utilizaron 4mg, se agregaron 0.5 μ g de Oligo dT, dNTPs a una concentración 10 mM en un volumen de reacción de 17 μ L. Posteriormente se calentó a 65°C por 5 minutos y se enfrió en hielo por 3 minutos. Después se le agregó 5 μ L de buffers FS 5X, 0.2 μ L de DTT 0.1M y 200 U/ μ L (1 μ L) de retrotranscriptasa reversa M-MLV, a un volumen final de reacción de 25 μ L. Posteriormente se calentó A 37°C por 50 minutos, luego a 70°C por 15 minutos y finalmente se enfrió a 4°C . Se cuantifico mediante la absorbancia a 260 nm y se verificó la integridad en un gel de agarosa al 1%.

PCR

Para hacer la amplificación de secuencias específicas de ARN total, se agregaron 2.5 µl de Buffer Amplificasa 10X, 1.5 µL de MgCl₂ 20X (1,5mM), 2µL de dNTP's (10nM) de cada uno, 1.7 µL de oligonucleótidos sentido y antisentido, 2 µL de cDNA previamente sintetizado y 0.25 µL de ADNTaq polimerasa, todo a un volumen final de reacción de 25 µL. Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se encuentran en la tabla 2 y las condiciones de elongación de cada citosina se encuentran en la Tabla 3.

Tabla 3. Secuencias de nucleótidos utilizados en la amplificación mediante PCR de ARN total.

Gen	Sentido	Antisentido
18s	5-CGCGGTTCTATTTTGTGGT-3'	5-AGTCGGCATGCTTTATGGTC-3'
IL-10	5-ACCTGGTAGAAGTGATGCCCCAGGCA-3'	5-ATGCAGTTGATGAAGATGTCAA-3'
TGF-β	5-GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTGC-3'	5-ACATTCGAGACTCCAGTGAATTCGG-3'
TNF-α	5-CTTCAGCTCCACAGAGAAGAAGTGC-3'	5-CACAATCATGTTGGACAAGTCTCC-3'

Los oligonucleótidos se diseñaron en base a las secuencias de los genes de ratón *Mus musculus* (Gene databank, NCBI, NIH).

Tabla 4. Condiciones de elongación.

Gen	Tiempo de desnaturalización (s)	Temperatura de alineamiento (°C)	Tiempo de alineamiento (s)	No. de ciclos	Tamaño de producto (pb)
18s	30	60	45	25	219
IL-10	45	63	45	35	237
TGF-β	45	61	45	45	298
TNF-α	60	63	60	30	300

Los niveles relativos de expresión, se determinaron mediante análisis densitométrico de las fotografías correspondientes de los geles de agarosa. Para ello se utilizó el programa Image J. La expresión se representa numéricamente con la proporción de la densidad óptica de cada gen, relativa a la expresión en el mismo experimento del gen de 18s, un gen expresado constitutivamente usado como control de carga.

Análisis estadístico.

Para analizar las diferencias en las poblaciones celulares obtenidos de citometría de flujo y las diferencias en la densidad óptica de PCRs, se hizo un análisis de varianza (ANOVA) de una vía para los casos en donde la variable independiente fue el tratamiento (control, EtOH y BPA) y se hizo un ANOVA de dos vías en los datos en los que se tuvo como variable el tratamiento y la inoculación de la línea celular 4T1. En ambas pruebas posteriormente se aplicó una prueba de corrección de parámetros Bonferroni. Las diferencias fueron consideradas significantes con una $P < 0.05$.



RESULTADOS

1. Presencia y masa de tumores.

La inoculación de 10 000 células 4T1 en el escroto de ratón Balb/C macho de ocho semanas de edad, dio origen una tumoración alojada en el tracto reproductivo, en medio de los testículos en todos los ratones (Figura 13).



Figura 14. La administración de 10 000 células 4T1 en el escroto de ratón Balb/C macho. En coloración se observa una tumoración aislada, alojada en el tracto reproductivo, fácilmente diferenciable.

La masa tumoral extirpada del aparato reproductor de ratones en los tres grupos experimentales no mostró diferencias significativas dependientes de tratamiento control (sin tratamiento), vehículo (etanol) y BPA (Bisfenol A) Figura 14.

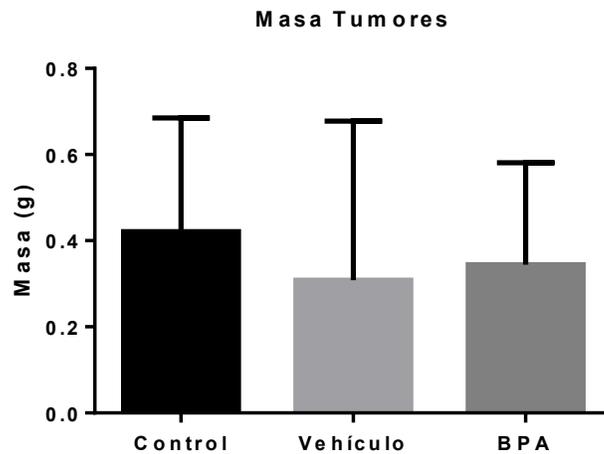


Figura 15. Masa tumoral dependiente del tratamiento; Control (sin tratamiento) n=9, Vehículo (Etanol) n=7 y BPA (Bisfenol A) n=7. Los datos muestran la media y la desviación estándar de la masa tumoral. El tratamiento no mostró diferencias estadísticamente significativas $P < 0.05$.

2. Tinciones de Hematoxilina y Eosina

Para hacer el análisis histopatológico de los tumores resultantes, se hicieron tinciones con Hematoxilina-Eosina de cortes histológicos. Las imágenes fueron seleccionadas como representativas de lo observado en los cortes de todos los tumores, en ellas se observaron características específicas de un tumor como desarrollo del epitelio desordenado, zonas necróticas y núcleos hipercrómicos. El epitelio de los tumores de los grupos tanto control, como BPA se puede observar disperso y la estructura difusa, así como una estructura celular fusiforme y alargada en ambos grupos. Las imágenes a 400X muestran una gran cantidad de núcleos hiperromáticos en grupo control y BPA, por lo tanto no presentan diferencias estructurales evidentes. (Figura 15).

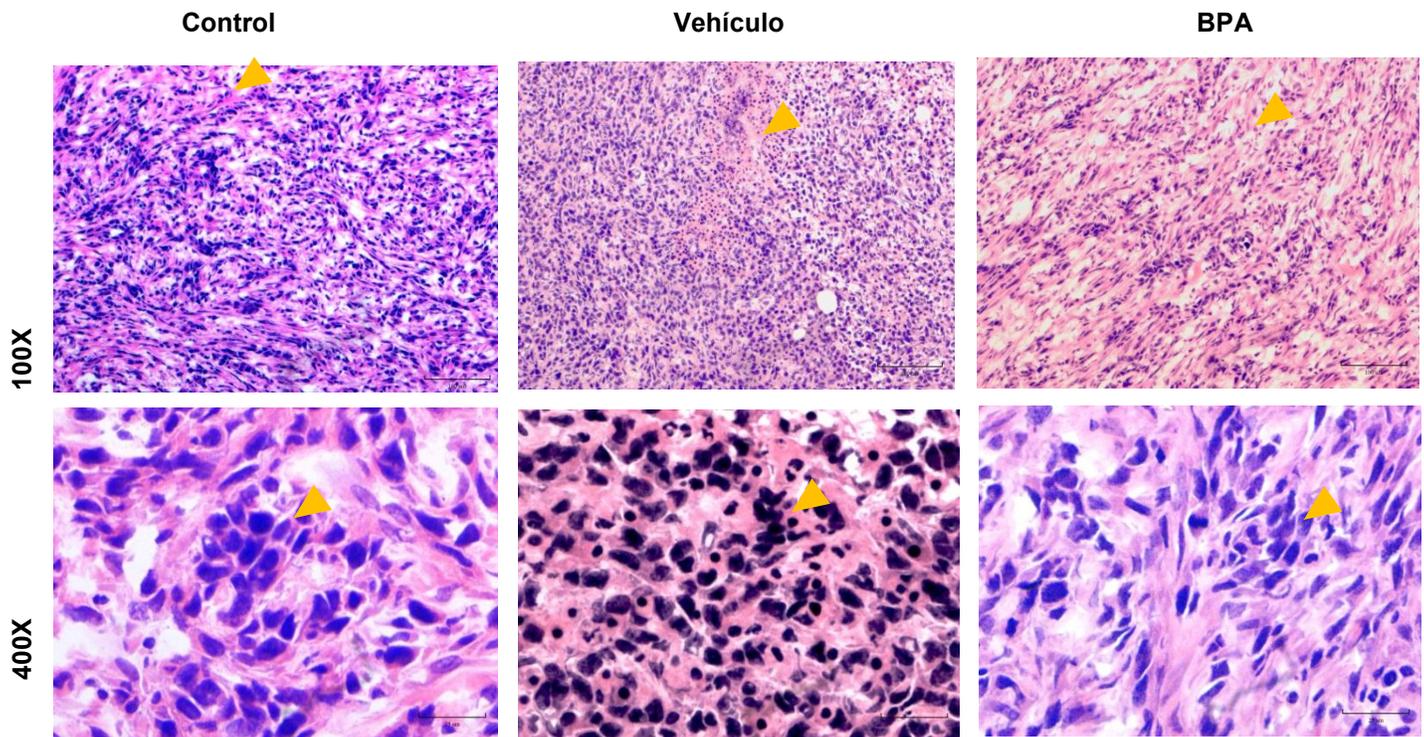


Figura 16. Tinciones de Hematoxilina y Eosina a 10X y 40X de tumores extirpados a los 21 días posteriores a la inoculación. Las imágenes son resultado de dos experimentos.

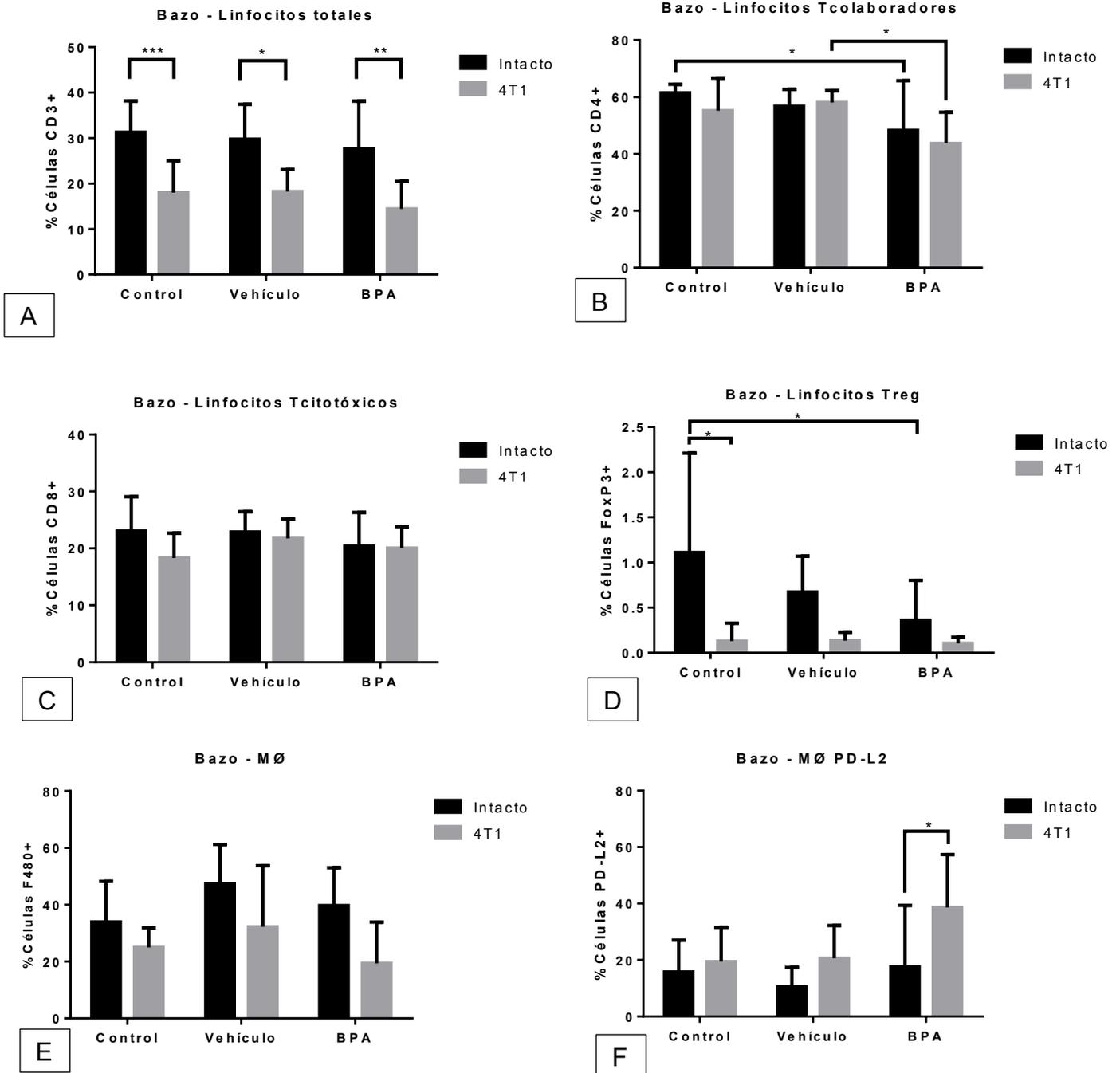
3. Citometría de flujo

Para medir el efecto de la exposición al BPA en etapa perinatal se analizaron mediante citometría de flujo, la diferencias de los porcentajes de poblaciones celulares CD4+, CD8+, macrófagos, células NK, en bazo (Figura 16), ganglios linfáticos periféricos (Figura 17) y tumores (Figura 19), de animales control (sin tratamiento) e inoculados con la línea tumoral, expuestos al vehículo (etanol) e inoculados con la línea tumora, y expuestos BPA e inoculados con la línea tumoral.

a) Diferencia de porcentajes de poblaciones celulares en Bazo.

En bazo, los animales con tumor (grupo 4T1) tienen significativamente menos linfocitos totales (A). La administración de BPA produjo una disminución en la cantidad de linfocitos T colaboradores (B) en animales intactos respecto al control y en animales con tumor respecto al grupo vehículo, la población de linfocitos T citotóxicos (C) no

presenta diferencias significativas. Además el BPA produjo una disminución del porcentaje de células T reguladoras (D) en animales sin tumores, así como de linfocitos B (G) en animales con tumores. El porcentaje en la población de macrófagos (E) no tiene diferencias significativas sin embargo el grupo BPA muestra un aumento en los macrófagos que expresan PD-L2 (F). Los animales sin tumores presentan una mayor cantidad de linfocitos $\gamma\delta$ (H) respecto a los grupos de animales con tumor.



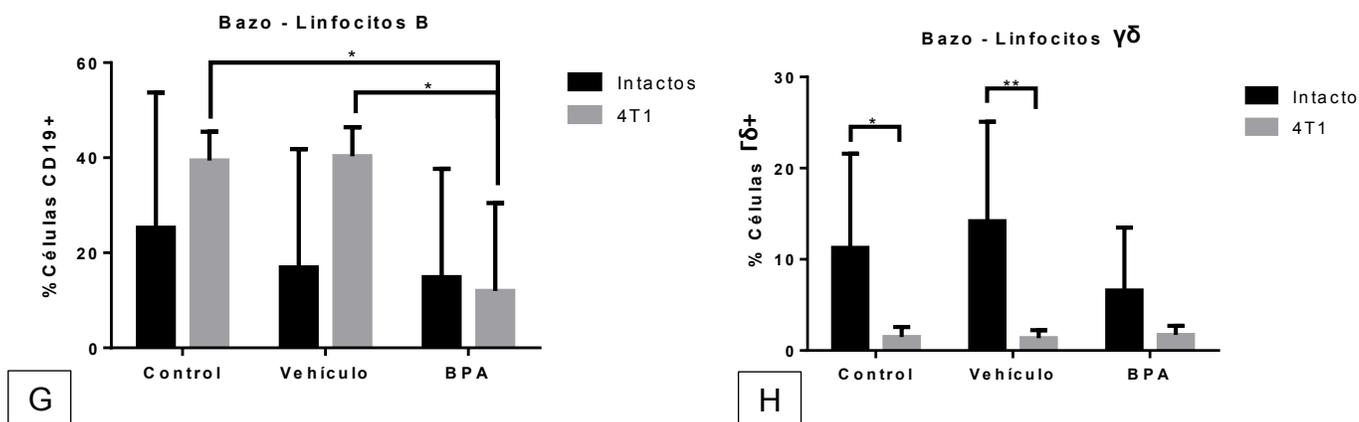
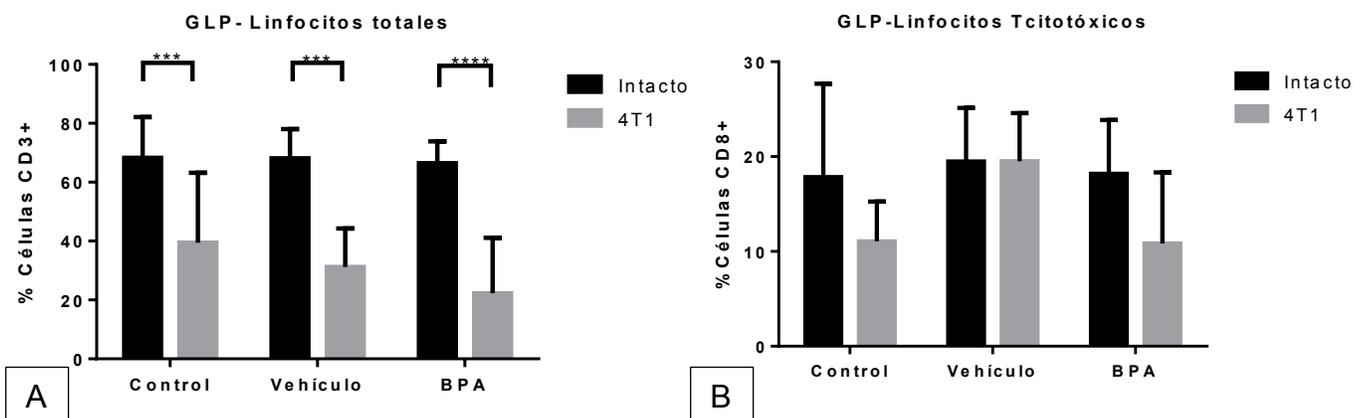


Figura 17. Diferencias en porcentajes celulares por tratamiento en bazo, linfocitos totales (A), células CD4+ (B), células CD8+ (C), células T reguladoras (D) y Macrófagos (E), Macrófagos PD-L2+(F), linfocitos B(G) y linfocitos $\gamma\delta$ (H), de animales controles (n=9), controles/4T1 (n=7), vehículo (n=6), vehículo/4T1 (n=7) y expuestos a BPA (n=7) y BPA/4T1 (n=4). Los datos muestran la media y la desviación estándar del porcentaje de población. *p<0.05, ** p<0.01 y ***p<0.001.

b) Diferencia de porcentajes de poblaciones celulares en Ganglios Linfáticos

En GLP, los animales con tumor (grupo 4T1) tienen significativamente menos linfocitos totales (A), así como los T reguladores (D) pero nos son diferentes por tratamiento. En los linfocitos T citotóxicos (B) y en linfocitos T colaboradores (C) no se observó diferencia significativa. En el grupo control los animales con tumores tuvieron significativamente más linfocitos B (F) respecto los intactos. Los animales tratados con BPA y que desarrollaron tumores, tienen un aumento significativo de linfocitos $\gamma\delta$ (E).



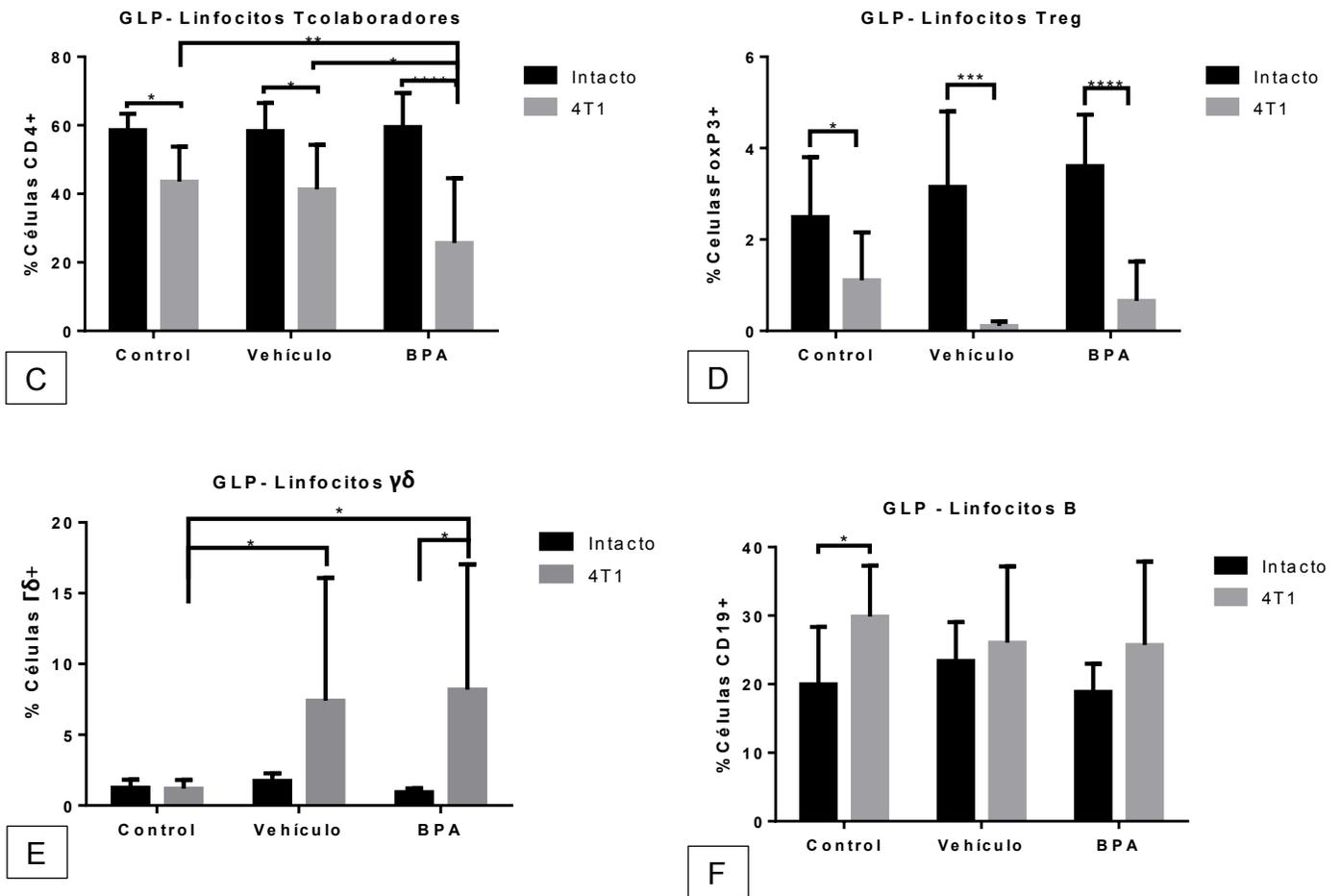
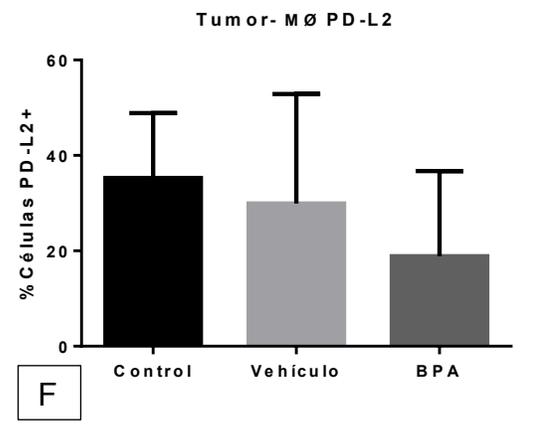
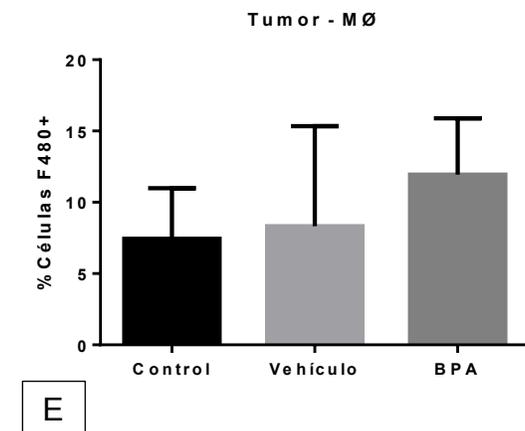
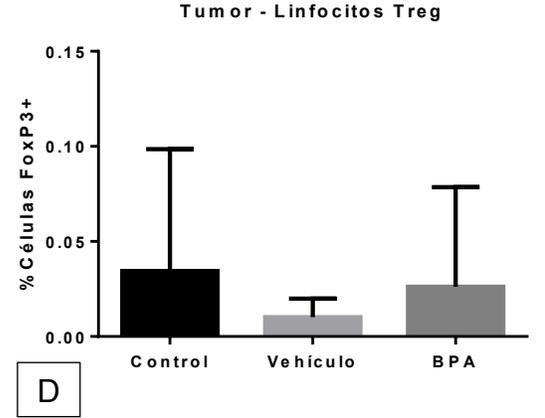
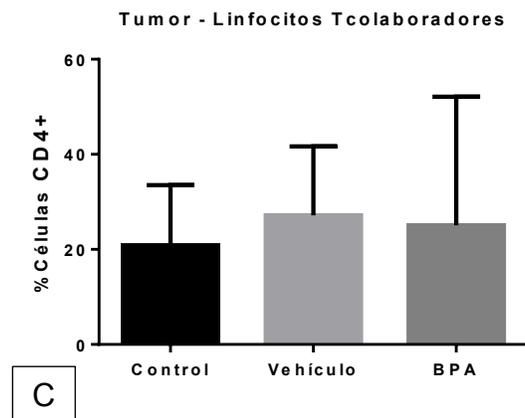
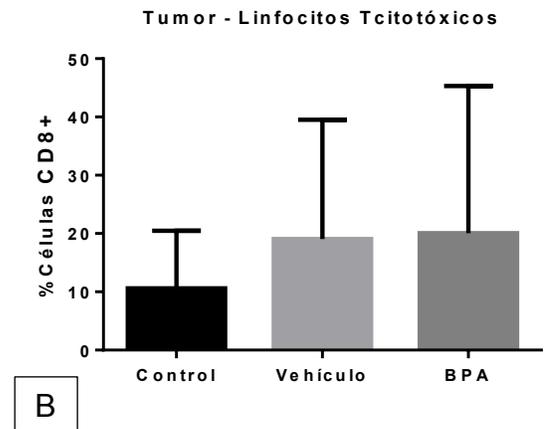
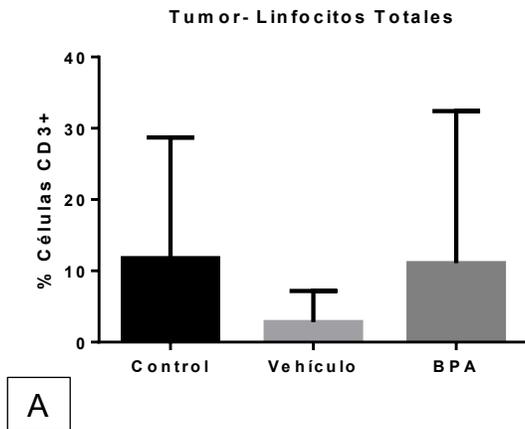


Figura 18. Diferencias en porcentajes celulares por tratamiento en ganglios linfáticos periféricos en , linfocitos totales (A), células CD4+ (B), células CD8+ (C), células T reguladoras (D), células NK (E), linfocitos B (F), y linfocitos $\gamma\delta$ (G), de animales controles (n=9), controles/4T1 (n=7), vehículo (n=6), vehículo/4T1 (n=7) y expuestos a BPA (n=7) y BPA/4T1 (n=4). *p<0.05, ** p<0.01 y ***p<0.001.

c) *Diferencia de porcentajes de poblaciones celulares en Tumores.*

Aunque hay diferencias observables en los porcentajes celulares, dependientes del tratamiento no son estadísticamente significativos en ninguna de las diferentes poblaciones celulares del sistema inmune.



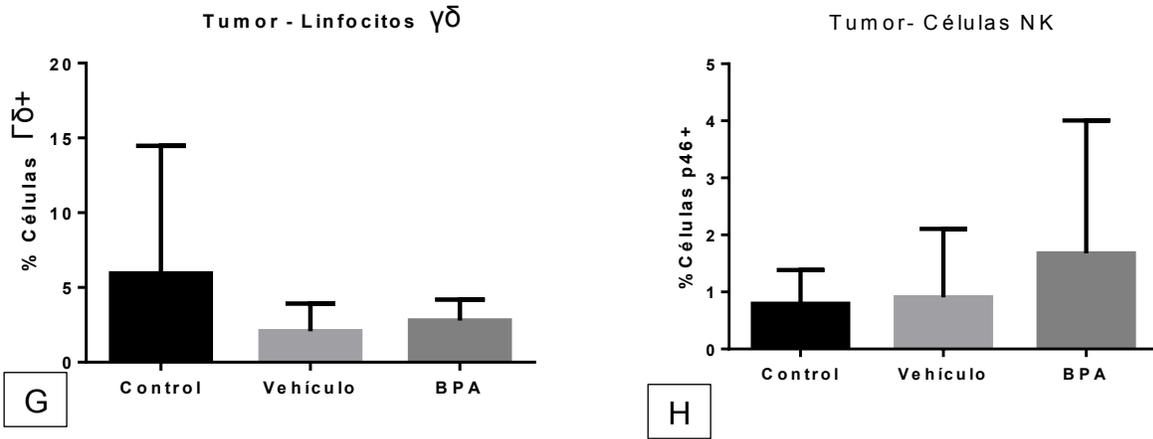


Figura 19. Diferencias en porcentajes celulares por tratamiento en Tumor, linfocitos totales (A), células CD4+ (B), células CD8+ (C), células T reguladoras (D) y Macrófagos (E), Macrófagos PD-L+(F), linfocitos $\gamma\delta$ (G) y células NK (H), de animales controles/4T1 (n=7), vehículo/4T1 (n=7) y BPA/4T1 (n=4). Los datos muestran la media y la desviación estándar del porcentaje de población. *p<0.05, ** p<0.01 y ***p<0.001.

3) Expresión de citocinas

Para evaluar la expresión de los ARNs mensajeros de las interleucinas IL-10, TGF- β y TNF- α se hizo RT-PCR de ARN total y se hizo la comparación relativa con el gen constitutivo 18s en bazo (Figura 19) y tumores (Figura 20) de los tres tratamientos inoculados y no inoculados con la línea 4T1.

a) Diferencia de porcentajes de poblaciones celulares en Tumores.

En bazo IL-10 y TNF- α fueron cuantificables y no se observaron diferencias significativas dependientes del tratamiento ni tampoco en animales con tumores respecto los que no fueron inoculados con la línea tumoral (A) y (B).

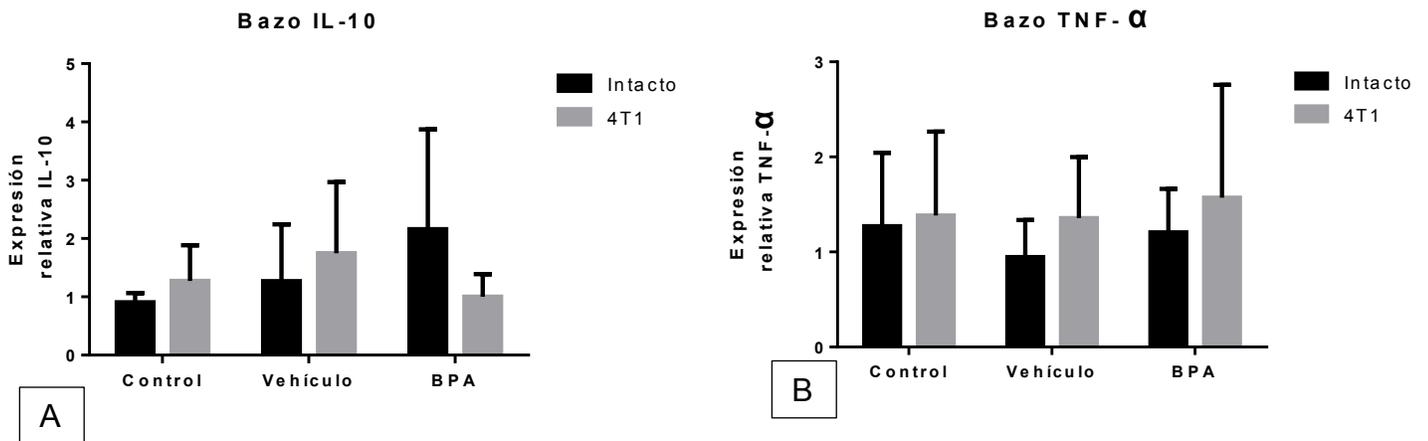


Figura 20. Diferencias en expresión relativa de IL-10(A) y TNF- α (B) en bazo de animales controles (n=8), controles/4T1 (n=7), vehículo (n=6), vehículo/4T1 (n=7) y expuestos a BPA (n=7) y BPA/4T1 (n=4). Los datos muestran la media y la desviación estándar de la expresión relativa de cada citocina. *p<0.05, ** p<0.01 y ***p<0.001.

b) Diferencia de expresión relativa de citocinas en Tumor

En tumor fueron cuantificables IL-10 (A), TGF- β (C) y TNF- α (B) apenas fue cuantificable y se observó una expresión muy baja. No hay diferencias significativas entre tratamiento en las tres citocinas.

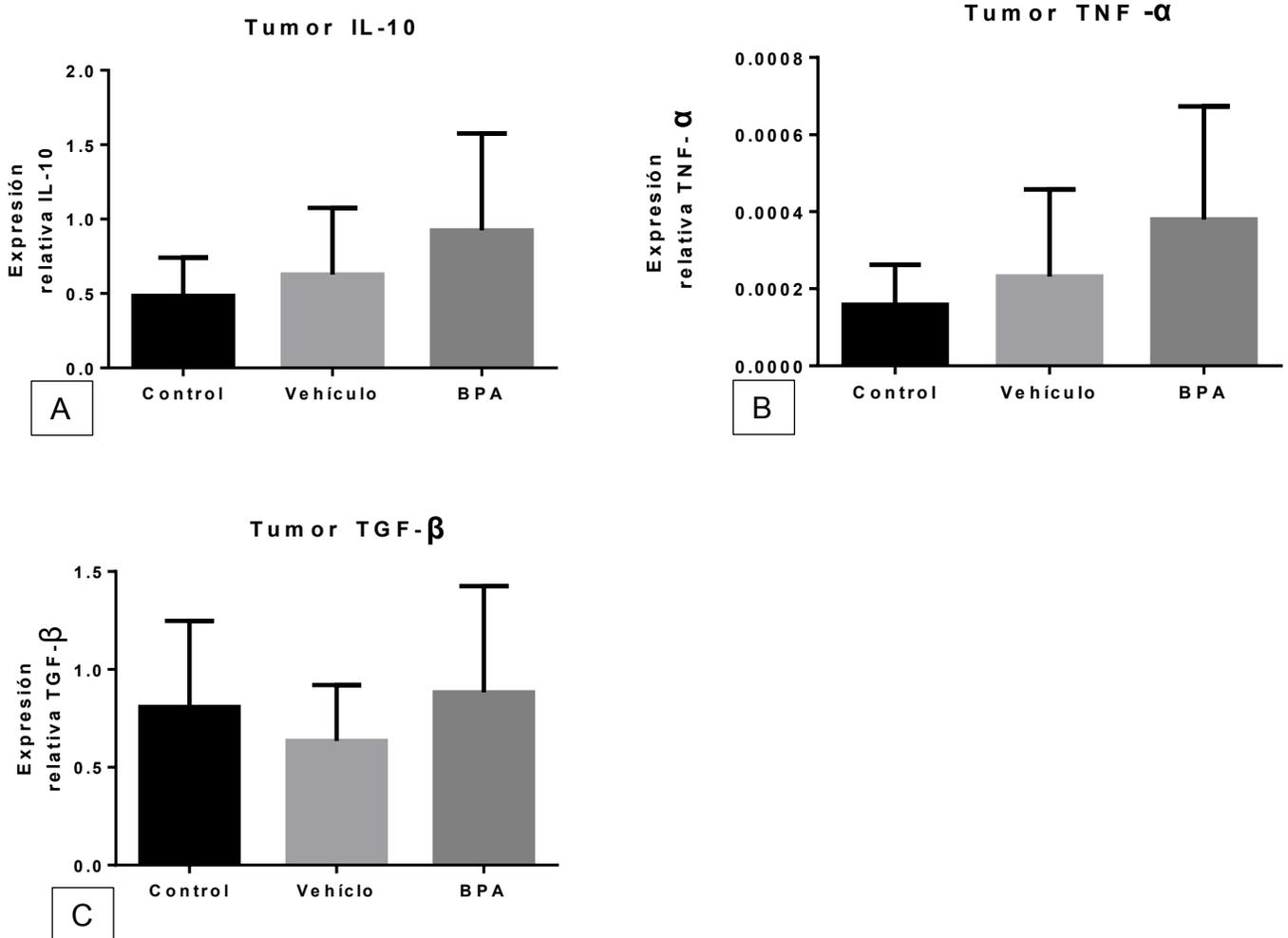


Figura 21. Diferencias en expresión relativa de IL-10 (A) y TNF- α (B) y TGF- β (C) en tumores de animales controles/4T1 (n=7)vehículo/4T1 y BPA/4T1 (n=4). Los datos muestran la media y la desviación estándar de la expresión relativa de cada citocina. *p<0.05, ** p<0.01 y ***p<0.001.



DISCUSIÓN

Considerando la evidencia del efecto de las hormonas sexuales en el sistema inmune los Compuestos Disruptores Estrogénicos, a los que nos encontramos altamente expuestos; en el presente proyecto se evaluó si un individuo expuesto a BPA en la etapa perinatal (prenatal y neonatal) de su desarrollo, sufre una alteración, que posteriormente pueda alterar la respuesta inmune que produce naturalmente frente al desarrollo de un tumor (Csaba G. 2014).

Para ello, ratones macho adultos fueron inoculados con la línea tumoral 4T1 de cáncer de mama para usarse como modelo tumoral y evaluar la respuesta inmune producida. Aunque la línea tumoral es de mama y fueron administradas en el tracto reproductivo del ratón, las células tumorales se desarrollaron exitosamente en un microambiente diferente al de su origen presentando un tejido amorfo aislado, desarrollado en el músculo esquelético dorsal del animal. A partir de ello pudimos analizar la respuesta inmune producida.

Aunque se ha demostrado que el tratamiento perinatal con BPA ha tenido efecto en el tamaño de tumores producidos por líneas de cáncer de mama (Dairkee SH et al., 2008), como primer evaluación extrajimos los tumores y observamos que la exposición a BPA no tuvo efecto significativo en el tamaño del tumor. Sin embargo durante la disección del tumor se observó que el tamaño puede depender de la inoculación celular, puesto que mientras más cerca son inoculadas las células de vasos sanguíneos, más se desarrolla el tumor, siendo éste una variable importante en la evaluación del efecto del tratamiento en el tamaño del tumor.

Para evaluar si la exposición a BPA podría tener efecto en la estructura y conformación tumoral se hicieron análisis mediante tinciones Hematoxilina–Eosina de cortes de los tumores; observamos un tejido característico de tumor mamario de un grupo control de línea 4T1 (Wang P., et al 2014). Los grupos control y de animales expuestos a BPA presentaron una conformación y estructura similar, tienen una estructura fusiforme y con zonas necróticas, así como una gran cantidad de núcleos celulares hipercromáticos; las cuales son características comunes de un tejido tumoral. La exposición a BPA no produjo una diferencia significativa en la distribución y estructura del epitelio celular en el tumor respecto al grupo control, sin embargo el grupo vehículo

presentó una conformación mas uniforme, lo cuál produce un tumor más duro y difícil de penetrar el los linfocitos, pero menos metastásico.

Para saber si el BPA podría afectar la respuesta inmune durante el desarrollo del tumor, se analizó por Citometría de flujo el porcentaje celular de diferentes poblaciones del sistema inmune, en bazo, ganglios linfáticos periféricos y tumores. Lo primero que observamos fue que en Bazo y en GLP, los animales con tumor (grupo 4T1) tienen significativamente menos linfocitos totales, respecto a los animales intactos, resultando esto relevante ya que la cantidad de linfocitos debería ser mayor, puesto que está desarrollando una respuesta hacia el tumor, sin embargo (Yamashita U., et al. 2003) observaron que al administrar BPA en agua durante seis semanas, aumentó la capacidad proliferativa de timocitos. En el presente experimento en los ratones con tumores, el porcentaje de la población de linfocitos totales es menor en bazo y en ganglios linfáticos y en tumores no cambió significativamente por lo tanto es importante destacar que la disminución proliferativa o una menor cantidad de linfocitos, es un factor limitante importante para el desarrollo de la respuesta inmune al tumor efectiva.

Aunque se esperaría o un porcentaje alto de linfocitos T citotóxicos en animales con tumores, puesto que se están eliminando o permitiendo el desarrollo de las células tumorales, no se observó una diferencia significativa en el porcentaje celular, en Bazo, Ganglio Linfáticos Periféricos, tampoco en tumores. En Bazo los animales expuestos a BPA presentaron menos linfocitos T colaboradores y en Ganglios Linfáticos Periféricos, los animales con tumores tienen un porcentaje menor en todos los grupos. Se reportó en que animales expuestos prenatalmente a BPA y posteriormente infectados con *Leishmania major*, cuando fueron adultos, presentaron un aumento en la producción de IL-4, IL-10 e IFN- γ . (YanH et al. 2008). En otro experimento en el que también se expusieron prenatalmente ratones a BPA a diferentes dosis, posteriormente fueron inmunizados con lisozima de huevo y se les midió la secreción de IL-4 e INF- γ de células de bazo y se observó que las dos interleucinas aumentaron, principalmente IFN- γ y así como la cantidad de linfocitos T CD4+ y CD8+, respecto a la concentración de BPA a la que fueron expuestos (Yoshino et al., 2004). Sin embargo, en este trabajo no se observó una tendencia hacia ningún tipo de respuesta inflamatoria Th1 o Th2,

por la cantidad de linfocitos T citotóxicos o de linfocitos T colaboradores, como se ha documentado anteriormente. Debemos considerar que en este experimento, la respuesta inmune desarrollada en el microambiente tumoral se encuentra en la etapa de escape, lo que significa que los linfocitos presentan anergia y las células producen moléculas de estimulación negativa y de muerte programada por lo cual se puede explicar la menor cantidad de linfocitos T colaboradores en ganglios linfáticos y los porcentajes no diferenciados de linfocitos T citotóxicos. El BPA disminuyó el porcentaje de linfocitos T reguladores en animales intactos tal y como se había publicado anteriormente, en ratones expuestos prenatalmente (Yan et al., 2008). Sin embargo sólo se observó en bazo.

Anteriormente se había reportado un aumento de la producción de IgM de linfocitos B1 en un modelo de lupus eritematoso debido exposición in vitro a BPA y DES, así como la sobre expresión de receptor de estrógenos en estas células (Yurino et al., 2004). En este trabajo se observó que la exposición a BPA produjo una disminución de linfocitos B en bazo en animales con tumor respecto a los controles, siendo esto un factor importante para el desarrollo de inmunoglobulinas contra antígenos tumorales y en general en la disminución de la capacidad de eliminar células tumorales.

En cuanto a la población de macrófagos observamos que los animales con tumores tienen menor porcentaje en bazo sin ser significativa, sin embargo si un aumento en la cantidad de macrófagos que expresan la molécula PD-L2 respecto a los controles, siendo una molécula de estimulación negativa importante para considerar a los macrófagos con fenotipo M2, ya que son expresadas por macrófagos alternativamente activados y poseen capacidad inmunosupresora de linfocitos. Anteriormente se reportó que macrófagos provenientes de ratones expuestos oralmente a BPA y activados con LPS disminuyeron la secreción de TNF- α , una interleucina importante en la eliminación de células tumorales, por lo que la exposición a BPA puede disminuir la eliminación tumoral.

Respecto a los linfocitos $\gamma\delta$, pudimos observar que los animales con tumores tienen un porcentaje menor y la exposición a BPA produjo un aumento significativo en NLP de animales con tumores. Siendo éste el primer experimento relacionado con BPA y

linfocitos $\gamma\delta$, es importante destacar que tanto el tratamiento el grupo BPA y vehículo están aumentados por lo que el efecto podría atribuirse al efecto del vehículo en el que fue disuelto el BPA. No se observaron diferencias significativas en células NK. No se observan diferencias significativas en los porcentajes de los tipos celulares analizados dependientes del tratamiento con BPA en los tumores.

Para saber si la cantidad de linfocitos dependía de la proliferación y de la respuesta inmune producida, se cuantificaron por PCR, los ARNs mensajeros de las interleucinas IL-10, TGF- β , TNF- α , IFN- γ e IL-4. No se observaron cambios significativos en las interleucinas en bazo ni en tumores; sin embargo, el tratamiento con BPA produjo un ligero aumento no significativo, en la expresión del ARN mensajero de IL-10 y TNF- α en tumor, es importante resaltar que no podemos saber si el aumento en la expresión de estas citocinas es de células tumorales o del infiltrado linfocítico en el caso de los tumores, es importante resaltar esto, considerando que la IL-10 es una interleucina que inmunoreguladora, que colabora indirectamente en el desarrollo del tumor con una respuesta inmune disminuida. Sin embargo (Yamashita U., et al. 2003) en un experimento in vitro observaron que las células T expuestas mejoraron la producción de interleucinas como IL-3, IL-4 e IFN- γ , no pudimos cuantificar los mensajeros de IL-4 e IFN- γ en bazo ni en tumor, por lo que observamos lo contrario a lo reportado, ya que no fueron expresados ni en células tumorales ni por los linfocitos.

Finalmente pudimos observar que la exposición perinatal a BPA tiene efecto en las poblaciones del sistema inmune cuando son adultos, siendo relevante que la cantidad de células en los órganos linfoides secundarios cambia dependiendo de esta exposición sin embargo no produjo cambios en los animales intactos, es decir, en animales en que no es retado el sistema inmunológico no se podrían ser evidentes las alteraciones de la exposición perinatal a BPA.

Este trabajo es una exploración rápida de cómo puede ser afectada la respuesta inmune por un CDE estrogénico en etapa perinatal; considerando que los experimentos reportados de BPA y células del sistema inmune son pocos además de diferentes en cuanto a la forma de exposición, prenatal, neonatal o perinatal o inclusive ex vivo o in vitro, así como las dosis de exposición; es necesario continuar haciendo experimentos

con variables comparables. Aunque se ha descrito que las células de sistema inmune expresan receptores a estrógenos y los compuestos estrógenicos tiene capacidad de enlazarse y modular la actividad de éstos (De León-Nava MA, et al. 2006 - Rogers JA, et al. 2013) aun así, queda la pregunta: ¿De que manera puede actuar este disruptor endócrino? Específicamente, que factores moleculares y genómicos participan en este proceso, así como si tienen la capacidad de afectar el desarrollo del sistema inmune en etapas importantes del desarrollo.

Para un mejor estudio del efecto del BPA en la respuesta inmune se podría analizar a una etapa temprana e intermedia del desarrollo de la respuesta inmune a las células tumorales. Otra perspectiva a esta metodología es la cuantificación en células tumorales que expresan moléculas de co-estimulación negativa como CD80 y CD86, además de ello, puede ser el uso de inmuno-histoquímica para la cuantificación de factores asociados a desarrollo maligno y proliferativo como TGF- β y VEGF para cuantificar la capacidad invasiva y proliferativa asociada a la exposición de perinatal BPA, considerando que esto no es efecto directo sino el efecto en la respuesta inmune asociada al tumor.

Además de esto, la mayoría de modelos de cáncer de próstata son de ratones transgénicos; su principal dificultad es el precio y su baja seguridad de éxito en el desarrollo de tumor. Otros modelos son de ratones knock-out de algún factor inmunológico como el ratón SCID y NOD o de ratones inmunodeficientes con genotrasplantes de líneas tumorales humanas, con lo que no es posible el estudio de la respuesta inmunológica al desarrollo tumoral. Por lo tanto este experimento puede considerarse como una forma novedosa del estudio de la respuesta inmune al desarrollo tumor el tracto reproductivo en machos.



CONCLUSIONES

Conclusiones

- La exposición perinatal a BPA no tiene efecto directo en el tamaño ni en la morfología del epitelio del tumor, por lo que no fue evidente que el BPA produzca una alteración patológica importante que contribuya en el desarrollo del tumor.
- La exposición perinatal a BPA disminuyó la cantidad de linfocitos T colaboradores, linfocitos T reg, linfocitos B y aumentó la expresión de PD-L de macrófagos en bazo. También disminuyó la cantidad de linfocitos T colaboradores y linfocitos $\gamma\delta$ en ganglios linfáticos periféricos. Esto significa que el BPA afecta a las células del sistema inmune durante su desarrollo y esto tiene una repercusión en la producción de una respuesta inmune específica cuando el individuo es adulto.
- La exposición en etapas críticas del desarrollo a BPA no polarizó la respuesta inmune hacia ningún perfil de citocinas por lo tanto tampoco de proliferación de algún tipo celular inmune a nivel del microambiente tumoral. Por lo tanto no altera ni contribuye en la eliminación del tumor.
- El presente experimento mostró una novedosa alternativa como modelo experimental murino para el estudio de la respuesta inmune al desarrollo tumoral en el tracto reproductivo.
- Es de vital importancia la consideración la interacción de los CDEs con el sistema inmune en el estudio del cáncer para entender de que manera podemos ser afectados por los compuestos a lo que estamos expuestos diariamente.



BIBLIOGRAFIA

Akingbemi B.T., Sottas C.M., Koulova A.I., Klinefelter G.R., Hardy M.P. 2004. Inhibition of testicular steroidogenesis by the xenoestrogen bisphenol A is associated with reduced pituitary luteinizing hormone secretion and decreased steroidogenic enzyme gene expression in rat Leydig cells. *Endocrinology*. 145:592–603.

Al-Hiyasat A.S., Darmani H., Elbetieha A.M. 2002. Effects of bisphenol A on adult male mouse fertility, *Eur J Oral Sci*. 110:163-7.

Armstrong M..D, Klein, J.R. 2001. Immune-endocrine interactions of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis: integration, communication and homeostasis. *Arch Immunol Ther Exp.*;49:231-237.

Besedovsky H.O., del Rey A. 1996. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev*. 17:64-102.

Brandt J.Z., Silveira L.T.R., Grassi T.F., Anselmo-Franci J.A., Fávoro W.J., Felisbino S.L. 2014. Indole-3-carbinol attenuates the deleterious gestational effects of bisphenol A exposure on the prostate gland of male F1 rats. *Reprod. Toxicol*. 23:56–66.

Calafat A.M., Ye X., Wong L.Y., Reidy J.A., Needham L.L.. 2008 Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003–2004. *Environ Health Perspect.* 39–44.

Csaba G. 2014. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 61:89-106.

Camacho Arrollo I., Jorge Morales M.,Javier Velazuqez M. 2001. Efectos no reproductivos de hormonas esteroides, Ignacio Camacho A., 1ª Ed., México. p74.

Dairkee S.H., Seok J., Champion S., Sayeed A., Mindrinos M., Xiao W., Davis R.W., Goodson W.H. 2008. Bisphenol A induces a profile of tumor aggressiveness in high-risk cells from breast cancer patients. *Cancer Res*. 1;68:2076-80.

De Coster S., van Larebeke N. 2012. Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action. *J Environ Public Health*. 713696.

De León-Nava MA, Morales-Montor J. 2006. Immune sexual dimorphism: Can sex steroids affect the Th1/Th2 cytokine profile?. *Rev Invest Clin*. 58:161-9.

Dunn G.P., Bruce A.T., Ikeda H., Old L.J., Schreiber R.D. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 3:991-8.

Gilmore W. Weiner L.P., Correale J. 1997. Effects of estradiol on cytokine secretion by proteolip protein-specific T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *Journal of Immunology*. 43:649-659.

Holladay S.D., Xiao S., Diao H., Barber J., Nagy T., Ye X., Goyal R.M. Jr. 2010. Perinatal bisphenol A exposure in C57B6/129svj male mice: potential altered cytokine/chemokine production in adulthood. *Int J Environ Res Public Health*. 7:2845-52.

Huang J., Xu H., Gao Z., Li M., Zhu Y., Li Y. 2013. Effects of bisphenol A on testis testosterone synthesis in mouse cultured in vitro. 42:543-9.

Ittmann M., Huang J., Radaelli E., Martin P., Signoretti S., Sullivan R. 2013. Animal models of human prostate cancer: the consensus report of the New York meeting of the Mouse Models of Human Cancers Consortium Prostate Pathology Committee. *Cancer Res*. 73: 2718–2736.

Kavlock R.J., Daston G.P., DeRosa C., Fenner-Crisp P., Gray L.E., Kaattari S. 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect*. 104:715–40.

Koebel C.M. 2007. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature*. 450: p 903-907.

Kuiper G.G., Carlsson B., Grandien K., Enmark E., Haggblad J., Nilsson S. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 138:863–70.

Mimeault M, Batra SK. 2013. Development of animal models underlining mechanistic connections between prostate inflammation and cancer.. *World J Clin Oncol*, 10: 4-13.

Olsen N.J., Kovacs W.J. 1996. Gonadal steroids and immunity. *Endocr. Rev*. 17: 369–384.

NTP-CERHR Monograph on the Potential Human Reproductive and Developmental Effects of Bisphenol A, vol. 83, Center for the Evaluation of Risks to Human Reproduction, National Toxicology Program, US Department of Health and Human Services: Research Triangle Park, NC, pp. 157–395. Available from: <http://cerhr.niehs.nih.gov/chemicals/bisphenol/bisphenol.pdf>.

N'Tumba-Byn T., Moison D., Lacroix M., Lecureuil C., Lesage L., Prud'homme S.M., Pozzi-Gaudin S., Frydman R., Benachi A., Livera G., Rouiller-Fabre V., Habert R. 2012. Differential effects of bisphenol A and diethylstilbestrol on human, rat and mouse fetal leydig cell function. *PLoS One*. 7:51579.

Ostrand-Rosenberg S. 2008. Immune surveillance: a Balance between protumor and antitumor immunity. *Curr Opin Genet Dev*. 18:11-8.

Tarapore P., Ying J., Ouyang B., Burke B., Bracken B., Ho S.M. 2014. Exposure to bisphenol A correlates with early-onset prostate cancer and promotes centrosome amplification and anchorage-independent growth in vitro, *PLoS One*. 90332.

Prins G.S., Birch L., Couse J.F., Choi I., Katzenellenbogen B., Korach K.S. 2001. Estrogen imprinting of the developing prostate gland is mediated through stromal estrogen receptor alpha: studies with alpha-ERKO and beta-ERKO mice. *Cancer Res*. 6089–6097.

Prins G.S., Birch L., Tang W.-Y., Ho S.-M. 2007. Developmental estrogen exposures predispose to prostate carcinogenesis with aging. *Reprod. Toxicol*.374–382.

Prins G.S., Ye S.-H., Birch L., Ho S.-M. Kannan K. 2011. Serum bisphenol A pharmacokinetics and prostate neoplastic responses following oral and subcutaneous exposures in neonatal Sprague-Dawley rats. *Reprod. Toxicol*.31:1–9.

Risbridger G.P., Davis I.D., Birrell S.N., Tilley W.D. 2010. Breast and prostate cancer: more similar than different. *Nat Rev Cancer*. 10:205-12.

Rogers J.A., Metz L., Yong V.W. 2013. Review: Endocrine disrupting chemicals and immune responses: a focus on bisphenol-A and its potential mechanisms. *Mol Immunol*. 53:421-30.

Routledge E.J., White R., Parker M.G., Sumpter J.P. 2000. Differential effects of xenoestrogens on coactivator recruitment by estrogen receptor (ER) alpha and ERbeta. *J Biol Chem*. 275:35986–93.

Rubin B.S. 2011. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple multiple effects. *Biochem Mol Biol*. 1-2: 27-34.

Seachrist D.D., Bonk K.W., Ho S.M, Prins G.S., Soto A.M., Keri R.A. 2015. A review of the carcinogenic potential of bisphenol A. *Reprod Toxicol*. 59: 169-82.

Ho S.-M., Tang W.-Y., Belmonte de Frausto J., Prins G.S. 2006. Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Res.* 66: 5624–5632.

Thomas J. Kindt, Richard A. Goldsby, Barbara A. Osborne *Inmunologia de Kubi*, Sexta Ed. México 2007.1-4.

Toyama Y, Suzuki-Toyota F, Maekawa M, Ito C, Toshimori K. Adverse effects of bisphenol A to spermiogenesis in mice and rat. *Arch Histol Cytol.* 2004. 67:373-81.

Vandenberg L.N., Hauser R., Marcus M., Olea N., Welshons W.V. 2007. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod. Toxicol.* 24: 139–177.

Vandenberg L.N., Maffini M.V., Sonnenschein C., Rubin B.S., Soto A.M. 2009. Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr. Rev.* 30:75–95.

Wang P, Li C, Wang X, Xiong W, Feng X, Liu Q, Leung AW, Xu C. 2015. Anti-metastatic and pro-apoptotic effects elicited by combination photodynamic therapy with sonodynamic therapy on breast cancer both in vitro and in vivo., *Ultrason Sonochem.* 23:116-27.

Yamashita U, Kuroda E, Yoshida Y, Sugiura T. Effect of endocrine disrupters on immune responses in vivo. *J UOEH.* 2003. 25:365-74.

Yamashita U, Sugiura T, Yoshida Y, Kuroda E. 2003. Effect of endocrine disrupters on thymocytes in vitro. *J UOEH.* 125:161-70.

Yamashita U, Sugiura T, Yoshida Y, Kuroda E. 2005. Effect of endocrine disrupters on macrophage functions in vitro. *J UOEH.* 27:1-10.

Yan H., Takamoto, M., Sugane, K. 2008. Exposure to Bisphenol A prenatally or in adulthood promotes T(H)2 cytokine production associated with reduction of CD4CD25 regulatory T cells. *Environmental Health Perspectives.* 116: 514–519.

Yang, Y., Lovett-Racke, A.E., Racke, M.K. 2010. Regulation of immune responses and autoimmune encephalomyelitis by PPARs. *PPAR Research.* 104705.

Yurino, H., Ishikawa, S., Sato, T., Akadegawa, K., Ito, T., Ueha, S., Inadera, H., Matsushima, K. 2004. Endocrine disruptors (environmental estrogens) enhance

autoantibody production by B1 cells. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*. 81:139–147.

Yoshino S., Yamaki K., Li X, Sai T, Yanagisawa R, Takano H, Taneda S, Hayashi H, Mori. 2004. Prenatal exposure bisphenol A up regulates immune responses, including T helper 1 and T helper 2 responses on mice. *Immunology*. 112:489-95.

GLOSARIO

ARN.....	Acido desoxirribonucleico
cADN	DNA complementario
BPA.....	Bisfenol A
DEPC	Dietil-pirocarbonato
CD	Cluster of Diefferentiation
CDE.....	Compuestos Disruptores Endocrinos
FACS.....	Fluorescence Activated Cell Sorting
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon- γ
M.....	Molar
NK.....	Natural Killer
NKT.....	Célula T Natural Killer
nM	nano Molar
PBS	Buffer Salino de Fosfatos
rpm.....	Revoluciones Por Minuto
TBE.....	Tris/Borate/EDTA
Th.....	T helper
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral- α