



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES**  
**Maestría en Recursos Bióticos**



**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DISRUPTIVA ESTROGÉNICA DEL  
INSECTICIDA ORGANOFOSFORADO CLORPIRIFOS A TRAVÉS DE LA VÍA  
GPER-1**

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRÍA EN RECURSOS BIÓTICOS**

**PRESENTA**

**BIOL. CRISTINA HERNÁNDEZ MARTÍNEZ**

**DIRECTORES DE TESIS**

**DRA. TERESA GARCÍA GASCA**

**DR. GONZALO MARTÍNEZ DE LA ESCALERA**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO**

**1 FEBRERO 2013**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES  
Maestría en Recursos Bióticos

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DISRUPTIVA ESTROGÉNICA DEL INSECTICIDA  
ORGANOFOSFORADO CLORPIRIFOS A TRAVÉS DE LA VÍA GPER-1

TESIS

Para obtener el grado de

MAESTRA EN RECURSOS BIÓTICOS

Presenta:

Biol. Cristina Hernández Martínez

Codirigido por

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca y Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo

SINODALES

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca  
Directora

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera Lorenzo  
Co-Director

Dra. Karina Acevedo Withehouse  
Vocal

Dra. Silvia Alejandra García Gasca  
Vocal

M en C. Gabriel Nava Pinto  
Suplente

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca  
Directora de la Facultad de  
Ciencias Naturales

Firma

Firma

Firma

Firma

Firma

Dr. Irineo Torres Pacheco  
Director de Investigación y Posgrado

Facultad Ciencias Naturales  
Santiago de Querétaro  
1 Febrero 2013  
México

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE  
BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR DE LA UAQ A CARGO DE LA DRA.  
TERESA GARCÍA GASCA Y EN EL LABORATORIO DE  
NEUROENDOCRINOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN DEL INSTITUTO DE  
NEUROBIOLOGÍA DE LA UNAM A CARGO DEL DR. GONZALO  
MARTÍNEZ DE LA ESCALERA LORENZO**

*No cesaremos de explorar, y si lo hiciéramos, el término de nuestra exploración sería llegar al punto donde empezamos y descubrir ese lugar por primera vez.*

**T.S. Eliot.**

## **AGRADECIMIENTOS:**

*Mi primer agradecimiento expresado en esta tesis está dedicado GAIJA, El espíritu de la tierra, esa “esencia” tan maravillosa que nos permite a todos los enamorados de la vida descubrir con tanta pasión día a día sus secretos, y sorprendernos de las maravillas que existen en este planeta en el cual se me ha otorgado la transformación energética mi ser y mi propia esencia. Dicha esencia ha sido enriquecida con el amor de mis padres y familia, que me aceptan y aman tal y como soy, apoyándome en mis decisiones y enorgulleciéndose de mis actos aunque a veces hay algunos que no son ni parecen los más correctos.*

*GRACIAS FAMILIA: Juanita, José Luis, Juan Luis, Magy y Quetzal, los AMO tanto!!!!*

*A mis tutores Tere, Gonzalo, Ale y Karí y Gabriel que siempre me apoyaron y ayudaron cuando lo necesite y sobre todo que me otorgaron su invaluable conocimiento y confianza para permitirme trabajar a mi manera ☺*

*Tere: Eres parte de mi inspiración profesional, muchas gracias por ser una mujer fuerte y un gran ejemplo a seguir, por ser siempre tan dulce y compartida para con todos.*

*Gonzalo: agradezco que me hayas abierto las puertas de tu confianza y laboratorio, por apoyarme desinteresadamente desde hace ya varios años y cultivarme con múltiples metáforas de la vida y la ciencia con ese particular estilo tuyo de expresar ideas.*

*Gabriel: INEFABLE mi agradecimiento hacia tí por ser mi gran amigo.*

*A mis mentores y maestros de toda la vida, y principalmente a los más recientes de la licenciatura y maestría que han forjado fuertemente con sus enseñanzas biológicas y lo que hoy soy, los doctores y doctoras: Teresa Peña (mi mejor ejemplo a seguir), Kruskaia Fernández (amiga incondicional), Luis Hernández, Juan Malda, Marco Sánchez (mis 3 héroes), Guadalupe Malda, Mahinda Martínez (sorprendentes mujeres), Robert Jones, Joel Quesada (los mejores compañeros en campo), Issac Silva, Mónica López, Aurelio Guevara, Humberto Súzan, Carlos López, Rolando Barcenas, Valentina Serrano, Patricia Paniagua, Juan Campos, por ser siempre tan entregados a su trabajo y enseñarme lo que es la verdadera equidad social sin importar el grado estudiantil.*

*Muy especialmente agradezco a Mónica Figueroa y a Víctor Hugo Cambrón que me ayudaron con mi mayor coco que es el análisis estadístico, dado que a pesar de tener sus propias ocupaciones muy amablemente dedicaron parte de su tiempo para ayudarme ☺*

*A TODOS, TODOS TODOS mis amigos y amigas y compañeros de todos lados, (la facultad y Biología, los del laboratorio, la UNAM, los del MRJ, los rixomaticos, los de la alberca, los de la pachanga, los de Xalapa), y los que me faltan y no mencione debido a que me llevaría una tesis completa, pero A TODOS USTÉDES si quisiera expresar mi agradecimiento y estima pues sin ustedes mi vida no sería la misma, gracias por ser siempre tan lindos conmigo, apoyarme, quererme y regalarme su cariño a cambio de sonrisas :D Los Quiero!!!!*

*Gracias a Rodolfo Mijaíl por colaborar conmigo durante los largos conteos celulares, retroalimentarme de conocimientos y experiencias muy padres!!!*

*A todos mis estimados amigos del laboratorio A-15 de la UNAM que siempre me recibieron con sonrisas, abrazos y buena vibra: Gabriel, David, Don Troño, Mary, Mike, Steph, Juan Pa, Martín, Edna, Pamela y Daniel.*

*A todo el personal administrativo de la FCN y especialmente a la Sra. Pueblito, por ser tan amable y orientarme y ayudarme lo que más me choca de cualquier institución que son los movimientos burocráticos.*

*A la honorable escuela que educa en la verdad y en el honor, la fabulosa y fantástica Universidad Autónoma de Querétaro, que ha sido mi hogar desde hace ya varios años y que hoy me permite expresar orgullosamente YO SOY UAQ!!!!*

*Y claro está que no podía faltar el ENORME agradecimiento a CONACyT por otorgarme la beca PNP (289807) y que junto con los impuestos ciudadanos pagaron mis estudios. Yeah!!!!*



## **CONTENIDO:**

RESUMEN.....	vi
SUMARY.....	vii
1.INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	
2.1 Agricultura y uso de plaguicidas organofosforados .....	3
2.2 Disruptores endocrinos.....	5
2.3 Clorpirifos (CHP).....	7
2.4 Estrógenos: Estradiol y sus vías de activación.....	10
2.5 Receptor estrogénico membranal GPER-1 (GPR30).....	13
2.6 Vía proteína AKT/PKB.....	15
2.7 CTGF (Factor de crecimiento de tejido conectivo).....	17
2.8 CHP y GPER-1.....	18
3.JUSTIFICACIÓN.....	20
4. HIPÓTESIS.....	21
5.OBJETIVO	
5.1 Objetivos específicos.....	22
6. MATERIALES Y METODOS	
6.1 Tratamientos <i>in vitro</i> .....	23
6.2 Curvas dosis respuesta de E2 o CHP.....	24
6.3 Análisis de la expresión génica ER ER y CTGF.....	24
6.4 Evaluación de la actividad de AKT/PKB total y fosforilada.....	27
6.6 Análisis estadístico.....	28

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES	
7.1 Respuesta proliferativa de células MCF-7 con E2 y combinadas con G15.....	29
7.2 Curvas dosis-respuesta de CHP y en combinación con G15.....	30
7.3 Efecto de CHP sobre la expresión de ER $\alpha$ , ER $\beta$ y CTGF.....	33
7.4 Evaluación del efecto de CHP sobre la actividad de AKT/PKB.....	37
9.CONCLUSIONES.....	43
10. EPILOGO.....	44
11.REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	46
12 ANEXOS	
12.1GLOSARIO.....	59
12.2 ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	62

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>CUADRO 1.</b> Ausencia y/o presencia de tres tipos de receptores estrogenicos nucleares y membranales en distintas líneas celulares de cáncer de mama .....	14
<b>CUADRO 2.</b> Tratamientos y concentraciones de los compuestos utilizados en cada uno de los experimentos.....	23
<b>CUADRO 3.</b> Características de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los receptores.....	26

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Estructura química de las principales hormonas esteroides.....	17
<b>FIGURA 2.</b> Mecanismo de acción genómica y no genómica de las hormonas esteroides.....	19
<b>FIGURA 3.</b> Activación del receptor GPER-1.....	21
<b>FIGURA 4.</b> Expresión de CTGF a la acción de GPER-1.....	26
<b>FIGURA 5.</b> Cuadrícula correspondiente a la cámara de Neubauer (Hematómetro).....	33
<b>FIGURA 6.</b> Representación del ARN total extraído de distintas muestras analizadas.....	34
<b>FIGURA 7.</b> Representación de 5 muestras al azar de ARN tratado con DNAsa (AMBION).....	34
<b>FIGURA 8.</b> PCR punto final en gradiente del gen de CTGF en un rango de temperatura 64-66.1.....	36
<b>FIGURA 9.</b> PCR punto final en gradiente del gen ER $\alpha$ en un rango de temperatura de 68.5-70.5 °C.....	36
<b>FIGURA 10.</b> PCR punto final en gradiente del gen ER $\beta$ en un rango de temperatura de 68.5-70.5 °C.....	36
<b>FIGURA 11.</b> Proliferación celular de la línea MCF-7 tratada con E2 y E2+G15.....	39
<b>FIGURA 12.</b> Proliferación de células MCF-7 tratadas con tres dosis diferentes de CHP.....	40
<b>FIGURA 13.</b> Proliferación de células MCF-7 al ser tratadas con CHP y CHP+G15.....	41
<b>FIGURA 14.</b> Expresión del gen ER $\alpha$ (177pb).....	44
<b>FIGURA 15.</b> Expresión del gen ER $\beta$ (174pb).....	45
<b>FIGURA 16.</b> Expresión del gen CTGF (210pb).....	46
<b>FIGURA 17.</b> Actividad de la proteína AKT/PKB Total y fosforilada a los 5 min de exposición al tratamiento.....	48

<b>FIGURA 18.</b> Actividad de AKT/PKB total y fosforilada a los 5 minutos de exposición al tratamiento.....	49
<b>FIGURA 19.</b> Actividad de AKT/PKB total y fosforilada a los 20 minutos de exposición al tratamiento.....	50
<b>FIGURA 20.</b> Relación de la actividad de la proteína AKT/PKB a los 5 y 20 minutos de exposición al tratamiento.....	35

## RESUMEN

Existen una serie de compuestos orgánicos e inorgánicos utilizados en la agricultura con la finalidad de prevenir, destruir y controlar distintos tipos de plagas. Muchos de ellos tienen la capacidad de acumularse tanto en agua como en suelo y además persistir en esos ambientes por intervalos distintos de tiempo. Clorpirifos (CHP) es un compuesto químico ampliamente utilizado alrededor del mundo en más de diez tipos de cultivo. A pesar de que se cuenta con información sobre los efectos adversos que éste pueda causar en organismos vivos, aún no se ha clasificado como un disruptor endocrino que se define como cualquier compuesto capaz de modificar las respuestas de hormonas como los estrógenos. El estradiol actúa mediante dos vías, la vía clásica dependiente de receptores nucleares a estrógenos (ER) y la vía no clásica, dependiente del receptor de membrana GPER-1. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue determinar si CHP es capaz de actuar como un disruptor endocrino por la vía no clásica estrogénica. Células MCF-7 fueron tratadas con CHP en ausencia o presencia del inhibidor específico de GPER-1, G15. CHP provocó proliferación celular a través de la vía de GPER-1 y se observó un 35% de disminución sobre la expresión del gen CTGF, el cual depende directamente de la vía GPER-1. No se observaron efectos sobre la activación de la proteína AKT, la cual es una proteína río abajo de la vía. Los resultados obtenidos sugieren que CHP actúa como disruptor estrogénico por la vía no clásica sin embargo, será necesario confirmar dicho hallazgo estudiando la expresión cuantitativa de genes blanco así como la activación de otras proteínas relacionadas con la vía.

**Palabras Clave:** AKT, cáncer de mama, Clorpirifos, disruptores endocrinos, factor de crecimiento de tejido conectivo, GPER-1, receptores estrogénicos, xenoestrógenos.

## SUMMARY

There are a number of organic and inorganic compounds currently used in agriculture in order to prevent, destroy and control different types of pests. Many of them have the ability to accumulate both in soil and water, and can persist in these environments for different periods of time. Chlorpyrifos (CHP) is a chemical compound widely used around the world in more than ten types of crops. Although information is available about the adverse effects that it can cause in living organisms, is not yet classified as an endocrine disruptor; which is defined as any compound capable of modifying the responses of hormones such as estrogen. Estradiol acts in two ways, the classical pathway dependent on nuclear estrogen receptors (ER) and the nonclassical pathway dependent on the membrane receptor GPER-1. Therefore, the objective of this study was to determine whether CHP is able to act as an endocrine disruptor in the nonclassical estrogenic pathway. MCF-7 cells were treated with CHP in the absence or presence of the specific inhibitor of GPER-1, G15. CHP caused cell proliferation by the GPER-1 pathway and a 35% decrease in the expression of CTGF gene was observed, which depends directly on the GPER-1 pathway. No effects on AKT protein activation were observed, which is a downstream protein on this pathway. The results suggest that CHP acts as an estrogen disruptor of the nonclassical pathway however, it will be necessary to confirm this finding by studying the quantitative expression of target genes as well as the activation of other proteins involved in the pathway.

**Keywords:** AKT, breast cancer, Chlorpyrifos, connective tissue growth factor, endocrine disruptors, estrogen receptors, GPER-1, xenoestrogens.

## 1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia de la civilización humana, una de las actividades que le permitió al hombre un cambio de estilo de vida nómada y convertirse en sedentario fue la agricultura. Sin embargo, con el desmesurado incremento demográfico, el calentamiento global y los cambios de uso de suelo, la demanda alimenticia cada día es mayor. Una de las alternativas empleadas para poder obtener una mayor producción sobre los cultivos agrícolas ha sido el uso de distintas sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo sus vectores (Berge-Santibañez 2004). La mayoría de estos compuestos son de origen químico y/o sintético conocidos como plaguicidas, los cuales pueden clasificarse de acuerdo a su estructura química, función, plaga blanco, toxicidad y persistencia (Shanle y Xu, 2010). Muchos de los compuestos perduran en el ambiente y modifican los ciclos biogeoquímicos por medio de volatilización, lixiviación o escurrimientos. Por lo tanto, los organismos que están en contacto con estos compuestos, conocidos como xenobióticos tienen la capacidad de absorberlos, acumularlos e integrarlos en la cadena trófica, lo cual afecta la salud del ecosistema y de los organismos (Argemi *et al.*, 2005; Tabb y Blumbery, 2006).

Existen múltiples evidencias sobre los efectos de contaminación causados por xenobióticos en muchas especies de animales silvestres y en humanos (Silva *et al.*, 2010). De manera más específica, sólo algunos de los xenobióticos que se producen y liberan tienen la capacidad de actuar como disruptores endocrinos, es decir que cambian o alteran la función endocrina de los organismos, lo cual tiene efectos en ellos mismos y en su progenie a nivel de la síntesis, metabolismo y transporte hormonal (Stahlschidt-Allner *et al.*, 1997). Así mismo, los compuestos que afectan la funcionalidad de hormonas esteroideas tales como los estrógenos se les ha denominado como xenoestrógenos, los cuales afectan el metabolismo a nivel neurológico, inmunológico y reproductivo e incluso pueden llegar a tener impacto sobre el cáncer. A nivel celular estos disruptores compiten por el sitio de unión de las hormonas internas tales como el estradiol ( $E_2$ ) (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

Clorpirifos es un compuesto organofosforado que en su estructura química también posee elementos cloro, lo cual le permite sedimentar y acumularse, aunque sea en pocas cantidades, sobre suelo y agua (Cocker *et al.*, 2002). Dicho compuesto no ha demostrado actuar como un disruptor endocrino fuerte sobre las respuestas celulares que



siguen los estrógenos sobre la ruta clásica donde participan los receptores estrogenicos específicos ER $\alpha$  y ER $\beta$  (Crupton *et al.*, 2000; Ventura *et al.*, 2012). Sin embargo, existe evidencia de que éste es capaz de activar a la proteína adenilato ciclasa (AC) (Song *et al.*, 1997), la cual está involucrada con la acción de receptores acoplados a proteínas G (Filardo, 2002).

Por otro lado, desde hace algunos años se descubrió la participación de un receptor acoplado a proteínas G con alta afinidad por E<sub>2</sub> y se le denominó GPR30 dado que no se conocía su ligando, aunque actualmente en el humano su acrónimo es GPER-1 (Watson *et al.*, 2011). Dicho receptor está compuesto por tres subunidades principales que, al ser activado por E<sub>2</sub> o algunos otros agonistas, da lugar al seguimiento de distintas vías entre las que se encuentran AC-AMPC-PKA por la subunidad  $\alpha$ , mientras que las subunidades  $\beta\gamma$  activan la transactivación de Src-PI3K-AKT-eNOS y Ras-Raf-MEK-MAPK. Su acción también se da sobre la expresión mayoritaria del gen del factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) que está involucrado en adhesión y migración celular (Pandey *et al.*, 2009). Por último, su activación también se ha asociado con la metástasis de células de cáncer mamario dado que su ausencia resulta en un menor riesgo (Wang *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2011).

Con base en esta información, en el presente trabajo se hipotetizó que Clorpirifos podría actuar como un disruptor endocrino, específicamente como xenoestrógeno, por la vía alterna de señalización estrogénica donde participa el receptor membranal GPER-1. Las observaciones experimentales se llevaron a cabo mediante la determinación de tres objetivos específicos que incluyen : *i*) el análisis del comportamiento proliferativo de un modelo celular responsivo a estrógenos (la línea celular de epitelio mamario transformado MCF-7) *ii*) la evaluación de expresión génica específica de los receptores ER $\alpha$ , ER $\beta$ , y el gen CTGF, y *iii*) la determinación del nivel de fosforilación como indicador de la actividad de la proteína AKT, ya que está involucrada en la señalización de receptores acoplados a proteínas G.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 La agricultura y el uso de plaguicidas organofosforados**

Día tras día el aumento de la población humana, el consumo per capita y la complejidad de los centros urbanos han promovido un incremento constante sobre la demanda de alimentos, fibras y energía por lo que se han intensificado actividades antropogénicas tales como la agricultura (De la Fuente y Suarez, 2008). A partir de los años 60, la revolución verde optimizó la producción agrícola mediante el uso de maquinaria tecnológica y compuestos químicos como plaguicidas, herbicidas e insecticidas para el control de plagas de animales como los insectos, plantas u hongos (Carabias, 1988). Desde entonces, la producción agrícola aumentó sustancialmente en los países como Estados Unidos, Brasil, México, China e India a causa de la gran demanda de productos agrícolas y al desarrollo agroindustrial, incluso se considera que más del 60 % de la población económicamente activa de los países en desarrollo depende de la agricultura (Albert, 1996). Sin embargo, estas actividades han acarreado problemas ambientales globales tales como la alteración de ciclos biogeoquímicos, la dispersión de plagas de más allá de los límites geográficos naturales, los cambios en el uso de la tierra, entre otros, (De la Fuente y Suarez, 2008).

La agricultura no sustentable y el mal manejo de los plaguicidas han dado lugar a su libre exposición en el medio aéreo, acuífero o terrestre, lo cual provoca alteraciones de la salud de organismos y del ecosistema, en muchos casos, de manera irreversible (Colborn *et al.*, 1993; Andrei y Mena 2006). A nivel mundial se estima que el 3% de los trabajadores agrícolas expuestos a plaguicidas presentan anualmente intoxicación aguda por plaguicidas y que más del 50% de estas intoxicaciones agudas ocurre en los países en vías de desarrollo (OMS, 2003).

En México, aproximadamente 7 millones de personas se dedican a la agricultura y se estima que alrededor del 25.4% de ellas pueden estar expuestas directamente a los plaguicidas (Leyva-Morales, 2009). Aunado a esto, en nuestro país se utilizan 13 (60%) de de los 22 plaguicidas clasificados como perjudiciales para la salud y el ambiente, el 42% se fabrica en el país y se emplean 30 de 90 plaguicidas que han sido prohibidos o restringidos en EUA (INEGI 1997 en: Martínez-Valenzuela y Gómez-Arroyo, 2007). La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación (FAO, por sus

siglas en inglés) y la Agencia de Protección ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) define a los plaguicidas como “cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo vectores” (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009). Su clasificación está dada de acuerdo a la familia química a la que pertenecen (organoclorados, organofosforados, carbamatos y piretroides), su plaga blanco, su toxicidad, con base en su persistencia en el ambiente o de acuerdo a su función (Leyva-Morales, 2009).

Los plaguicidas son desplazados fuera de las áreas en los cuales son aplicados principalmente mediante la transmisión atmosférica. Se estima que, de acuerdo con las condiciones ambientales, entre el 40 y el 80% del volumen que se aplica se pierde por volatilización (Plimmer, 1992). Diferentes proporciones de estos compuestos se depositan y/o concentran en otras áreas terrestres o directamente en los cuerpos acuáticos. Al entrar al ambiente, los plaguicidas quedan expuestos a los diferentes flujos de energía, como los movimientos del aire y del agua, que actúan como mecanismos de transporte a otro sitio. Las rutas de estos contaminantes pueden ser cíclicas y están condicionadas por factores ecológicos y climáticos (Chiou *et al.*, 1977; Torrence y Fosbraey, 1982). Por ejemplo, pueden ser transportados por las aguas de escurrimiento y ligarse con la materia orgánica a los sólidos suspendidos y a los sedimentos que son arrastrados por la misma escorrentía, fenómeno conocido como adsorción (Vizcaino, 1986).

Los ecosistemas contaminados con compuestos químicos exógenos (CQE) o xenobióticos están siendo perjudicados en más de un nivel sobre la cadena trófica ya que, algunos CQE pueden acumularse y/o persistir en el suelo. Así mismo pueden concentrarse a través de la vía respiratoria y dérmica de los organismos que están en contacto directo (Dinham, 1994; Porte *et al.*, 2002; Matozzo *et al.*, 2008). Consecuentemente, cuando este organismo es depredado, el compuesto se concentrará concentrado en el depredador con respecto a la fuente de origen (Hutchinson y Pickford, 2002). A este tipo de procesos biológicos se les conoce como bioacumulación, bioconcentración y biomagnificación, respectivamente (Colborn *et al.*, 1993).

Respecto al uso de agroquímicos en México, en la década de 1990-2000 los plaguicidas más comercializados fueron los organofosforados (67% de las ventas), los organoclorados (15%) y los carbamatos (6%) (Albert, 1996). Se estima que los

plaguicidas organofosforados como malatión, paratión, monocrotofos y clorpirifos están en el rango de ser los más usados (Mee *et al.*, 1991). Por ejemplo, en áreas agrícolas de la planicie costera del noreste de México los cultivos son muy tecnificados e intensivos y los plaguicidas organofosforados han empezado a desplazar a los organoclorados (Zazueta, 2003).

Los compuestos organofosforados (OFs) son orgánicos pero altamente tóxicos (Zazueta, 2003). Su fórmula general deriva del ácido fosfórico y sus metabolitos (oxones y tiones) son toxinas que actúan a nivel neurológico inhibiendo la actividad de la enzima acetilcolinesterasa. Dicha enzima evita la acumulación de acetilcolina en los huecos sinápticos, por lo tanto su inhibición causa que la transmisión de los impulsos nerviosos sea muy lenta e incluso nula causando así daños en el SNC o la muerte por parálisis respiratoria (Payne *et al.*, 1996; Newman y Unger, 2003, Leyva-Morales, 2009). En general, los OFs son muy poco estables bioquímicamente y, por lo tanto, se supone que el tiempo de vida ambiental medio va de algunas semanas a algunos meses (Osuna-López *et al.*, 1998; Zazueta, 2003). Generalmente tienen una mayor solubilidad que los compuestos organoclorados y se degradan a través de la hidrólisis catalítica de bases sin embargo, son mucho más persistentes en suelo y sedimentos (Newman y Unger, 2003). De esta manera podrían entrar al ambiente causando daños a nivel de los organismos o a nivel ecológico e, incluso, muchos de estos compuestos pudieran presentar potencial de disruptores endocrinos (Anguiano *et al.*, 2007).

## **2.2 Disruptores Endocrinos Químicos**

De acuerdo con la agencia de protección ambiental de los Estados Unidos de América (USEPA, por sus siglas en inglés), los disruptores endocrinos químicos (DEQ) son sustancias exógenas que interfieren con la función homeostática hormonal de un organismo (USEPA, 2000; 2001; 2002). Éstos actúan a distintos niveles celulares donde se incluye la síntesis, secreción, transporte y/o metabolismo hormonal (Tabb y Blumbery, 2006; Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009., Le Maire *et al.*, 2010), mismos que repercuten sobre el desarrollo, la reproducción, y el funcionamiento neurológico e inmunológico, así como procesos oncogénicos. Dichos efectos pueden presentarse tanto en humanos como en animales de vida silvestre (Stahlschmidt-Allner 1997, Blom *et al.*, 1998).

Entre los compuestos disruptores se encuentran diversos plaguicidas, insecticidas y fungicidas que, a su vez, pueden contener compuestos organoclorados y/o organofosfatados generados a partir de actividades humanas como la industria y la agricultura. Al ser liberados al ambiente, éstos pueden infiltrarse en el suelo y contaminar el agua subterránea, las áreas industriales y de agricultura. Así mismo, muchos de ellos forman mezclas complejas e, incluso, pueden actuar de forma sinérgica alterando en mayor grado la homeostasis hormonal del organismo. Además, estas moléculas lipofílicas pueden ser persistentes y liposolubles (Argemi *et al.*, 2005) con capacidad de biomagnificarse en la cadena alimenticia (Orlando y Guillette, 2002; Le Maire *et al.*, 2010). Algunos animales invertebrados no tienen la capacidad de eliminar metabólicamente los insecticidas y se quedan acumulados en sus tejidos (Newman y Unger, 2003).

En el humano, la acumulación de disruptores endocrinos ocurre a través del consumo de agua contaminada, respirar el aire contaminado o ingerir alimentos contaminados e incluso, directamente con el mismo contacto con suelo de los cultivos contaminados (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009). Existen estudios donde se ha mostrado que las personas que trabajan con plaguicidas, fungicidas y otros químicos industriales tóxicos presentan mayor riesgo de padecer anormalidades reproductivas y/o endocrinas (Soto *et al.*, 1991). Una vez que están en contacto con las células blanco, los xenobióticos actúan sobre ellas alterando al sistema endocrino de varias maneras, y utilizando vías celulares que incluyen receptores nucleares, de membrana, el receptor aril hidrocarbon o maquinarias enzimáticas involucradas en la biosíntesis metabólica de hormonas (Le Maire *et al.*, 2010). Algunos ejemplos de vías no reguladas por receptor incluyen alteraciones en la síntesis, metabolismo y secreción de hormonas endógenas (Soto *et al.*, 1995; Denslow y Sepulveda, 2007).

Muchos de los efectos reportados de los DEQ se han atribuido a la interferencia con señalizaciones hormonales mediante receptores nucleares, mimetizando así los efectos de las hormonas endógenas y la subsecuente expresión de genes específicos (Soto *et al.*, 1995). Dichos disruptores tienen la potencialidad de actuar como agonistas o antagonistas de los receptores dependiendo la concentración. Las vías por las que actúan juegan un papel importante sobre la homeostasis hormonal, sexual y reproductiva para diferentes grupos de vertebrados en los que se incluye a aves, peces, anfibios reptiles y

mamíferos como el humano (Colborn *et al.*, 1993). En la actualidad se conocen unos 45 compuestos con propiedades disruptoras confirmadas y unos 600 considerados potenciales disruptores endocrinos, los cuales han sido introducidos en los circuitos ambientales y están presentes en la vida cotidiana (Argemi *et al.*, 2005).

### **2.3 Clorpirifos [O, O-dietil O-(3, 5,6-tricloro-2-piridinil)-fosforotioato]**

Clorpirifos (CHP) Es un compuesto químico comúnmente utilizado en el control de plagas en el suelo, de insectos foliares y en muchas zonas de cultivo agrícola (Kidd, 1991). Introducido al mercado a partir de 1965, ha sido utilizado a nivel mundial (Canesi *et al.*, 2011) en múltiples cultivos entre los que se encuentran jitomate, frijol ejotero, caña de azúcar, chile, maíz, pepino, alfalfa, sorgo, soya, trigo, manzana, naranja, toronja, tabaco, arroz y en potreros (CICOPLAFEST, 2004). Existen múltiples estudios sobre la presencia contaminante del compuesto en diversos ecosistemas. Por ejemplo: Readman *et al.*, (1992), observaron la presencia de CHP en los sedimentos de la región costera de Altata-Ensenada de Pabellón en una concentración por arriba de 34 ng/g en sedimento seco recolectado e, incluso, esta concentración es mucho más alta que la encontrada para ppDDT o Dieldrin. Osuna-López *et al.* (1998) encontraron residuos de 14 compuestos organofosforados en sedimentos colectados en 21 sistemas costeros de Sonora, Sinaloa, Nayarit, Jalisco y Colima; entre ellos CHP estuvo presente en 34 muestras. Kard y McDaniel (1993) observaron 858-990 µg/g de CHP en sedimentos de río Mississippi y después de un año el remanente era de 777-791 µg/g. Así mismo en este mismo año en San Francisco, California se reportó una concentración de CHP de 2.3 y 3.9 ng/g en dos estaciones costeras (Domagalski y Kiuivila, 1993).

Los datos presentados dan evidencia de que este compuesto agroquímico tiene la capacidad de acumularse en sedimentos estuarinos y agrícolas. Por otro lado, CHP se ha llegado a considerar como un compuesto altamente tóxico a pesar de sus características químicas que le confieren la capacidad de degradarse rápidamente en comparación con otros compuestos organoclorados tales como el DDT y que, además, en poco tiempo tiene la potencialidad de afectar a la biota acuática. Por ejemplo, en el sistema estuarino Altata-Ensenada de Pabellón se encontró una dosis letal media (LD<sub>50</sub>) de 10 ng/L de CHP en camarones (la LD<sub>50</sub> del DDT se encuentra en el rango de 0.4-10µg/L) en época de secas (Schimmel *et al.*, 1983). En época de lluvias el CHP se ha reportado en una

concentración de 2.4 ng/g, lo que sugiere que se encuentra en altas concentraciones en esta zona acuática aunque el impacto de los contaminantes que entran a las lagunas costeras tropicales es relativamente desconocido (Carvalho *et al.*, 1996).

Se dice que los agroquímicos organofosforados varían tanto en propiedades químicas como biológicas, son sensibles a la luz y tienen menor tendencia a acumularse ya que son de rápida degradación pero, al parecer, tienen alta capacidad tóxica (Mekebri *et al.*, 2008). Particularmente, en el caso de CHP, se ha determinado que presenta toxicidad aguda sobre animales como insectos y mamíferos y su tiempo de vida media se encuentra desde una semana hasta algunos meses (Osuna-Lopez *et al.*, 1998). CHP es un sólido blanco de apariencia cristalina y de aroma fuerte. No es hidrofílico, de manera que generalmente se mezcla con líquidos aceitosos antes de ser aplicado a los cultivos o a los animales. Dicho compuesto es el ingrediente activo de varios insecticidas comerciales y se encuentra en productos como Dursban®, Lorsban® y Cyren®. Es utilizado ampliamente en la agricultura para controlar las garrapatas del ganado, moscas, mosquitos y polillas, se rocía en los cultivos para controlar este tipo de plagas. En 1997, la empresa Dow Elanco, por iniciativa propia, interrumpió el uso de CHP en mascotas y en espacios interiores debido su volatilidad (Agency for Toxic Substances and Disease Registry Division of Toxicology and Environmental Medicine, 1997)

Este compuesto entra al medio ambiente a través de la aplicación directa a cosechas, prados, animales domésticos, viviendas y sitios de trabajo pero también a través de la volatilización, los derrames y la eliminación de desechos. Una vez que se ha aplicado al suelo, por lo general, permanece en el área donde fue aplicado porque se adhiere firmemente a las partículas del suelo. Debido a esto, hay poca probabilidad de que el CHP se desprenda del suelo y pase a los sistemas locales de agua. Si entra a las aguas naturales será en pocas cantidades y permanecerá por encima o cerca de la superficie y luego se evaporará dada su baja solubilidad. La volatilización es la principal manera en que el CHP se propague después de su aplicación. Una vez que se encuentra en el medio ambiente (suelo, aire o agua), se descompone por efecto de la luz solar, las bacterias u otros procesos químicos. A pesar de que se degrada rápidamente en el medio ambiente, bajos niveles de CHP pueden persistir por mucho tiempo después de su aplicación. En el campo, el mayor riesgo se da después de fumar los cultivos debido a que CHP se encontrará en su nivel más elevado. Así mismo también puede encontrarse en algunos

sitios de desechos peligrosos, de manera que en dichos sitios la exposición a esta sustancia puede ser más alta que la que normalmente se encuentra después de su uso comercial o doméstico (Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Division of Toxicology and Environmental Medicine, 1997).

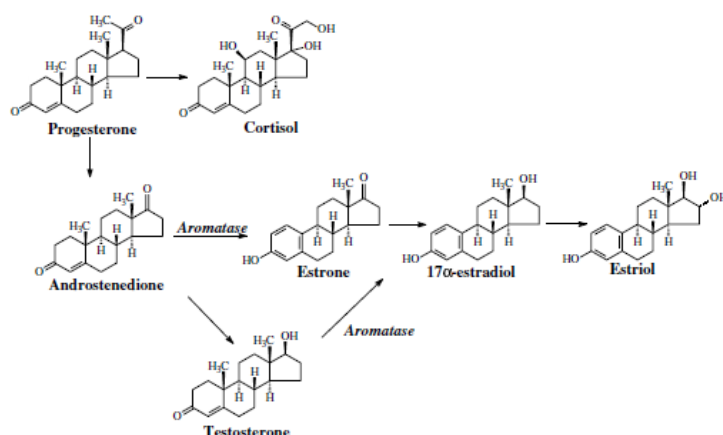
CHP puede entrar en el cuerpo por la boca, los pulmones y la piel (Eaton *et al.*, 2008). Después de ser bebido o ingerido pasa rápidamente de los intestinos al torrente sanguíneo el cual lo distribuye al resto del cuerpo. Las personas expuestas a CHP por poco tiempo (un día) a niveles bajos (miligramos) pueden sufrir mareos, fatiga, secreción nasal, lagrimeo, salivación, náusea, molestia intestinal, sudor y cambios en el ritmo cardíaco. La exposición oral de corta duración a niveles más altos (gramos) de CHP puede causar parálisis, convulsiones, desmayos y muerte. La EPA no ha clasificado a CHP por su carcinogenicidad. Por otro lado, dadas sus características bioquímicas y por clasificarse como un compuesto organofosforado, tiene la capacidad de inhibir la actividad de la acetilcolinesterasa (Slotkin *et al.*, 2008) (enzima encargada de inactivar la acetilcolina) lo que, causa la mayoría de los síntomas tóxicos como las náuseas, mareos, vómitos e incluso la muerte (Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Division of Toxicology and Environmental Medicine, 1997).

CHP está en la lista de sustancias químicas reguladas por la ley del derecho al conocimiento comunitario sobre la planeación para emergencias de 1986 (EPCRA, The Emergency Planning and Community Right-to-Know Act of 1986). Esto exige a los propietarios y operadores de ciertas empresas que fabrican, importan, procesan o usan las sustancias químicas de esta lista que notifiquen anualmente las emisiones de estas sustancias a cualquier tipo de medio ambiente. También se ha considerado una sustancia química peligrosa y está sujeta a regulaciones en la ley de agua limpia (US EPA 2000) y la ley federal de contaminación de agua (US EPA 2001). La EPA ha establecido niveles límites de tolerancia para el CHP en las materias primas para la agricultura, los alimentos y animales (Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for chlorpyrifos, 1997) sin embargo, muchas de las regulaciones o leyes para éste y algunos otros compuestos no se ejecutan de manera estricta.



## 2.4 Estrógenos: Estradiol y sus vías de acción

Los estrógenos son hormonas esteroideas que derivan del colesterol (Figura 1) y son producidas principalmente por las gónadas, aunque las glándulas adrenales también las biosintetizan pero en menor cantidad. Estructuralmente están conformadas por cuatro anillos de 18 a 21 átomos de carbono unidas a diversos grupos hidroxilo y cetona. Dada su cualidad liposoluble estas pueden atravesar las membranas celulares pero necesitan circular unidas a proteínas plasmáticas pues son insolubles en agua (Falkenstein *et al.*, 2000). El estrógeno natural más potente en seres humanos es el  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), seguido por la estrona ( $E_1$ ) y el estriol ( $E_3$ ). Cada una de estas moléculas es un esteroide de 18 átomos de carbono, que contiene un anillo fenólico A (un anillo aromático con un grupo hidroxilo en el carbono 3) y un grupo cetona ( $\beta$ -hidroxilo) en la posición 17 del anillo D, el anillo fenólico A es la principal característica estructural de la cual depende la unión selectiva y es de alta afinidad a receptores a estrógenos (Duax *et al.*, 1988). Su precursor inmediato es la testosterona y se va formando a través de una reacción que comprende la aromatización del anillo A, catalizado por un complejo enzimático llamado P450 aromatasa utilizando la forma reducida NADPH y oxígeno molecular como co-sustratos (Benachour *et al.*, 2007). La síntesis de  $E_2$  por medio de la aromatización de la testosterona es un fenómeno muy importante en una gran variedad de procesos biológicos incluyendo la reproducción, diferenciación, proliferación celular, apoptosis, inflamación, metabolismo, función cerebral y eventos homeostáticos relacionados a hormonas endocrinas (Tsai y O'Malley, 1994).



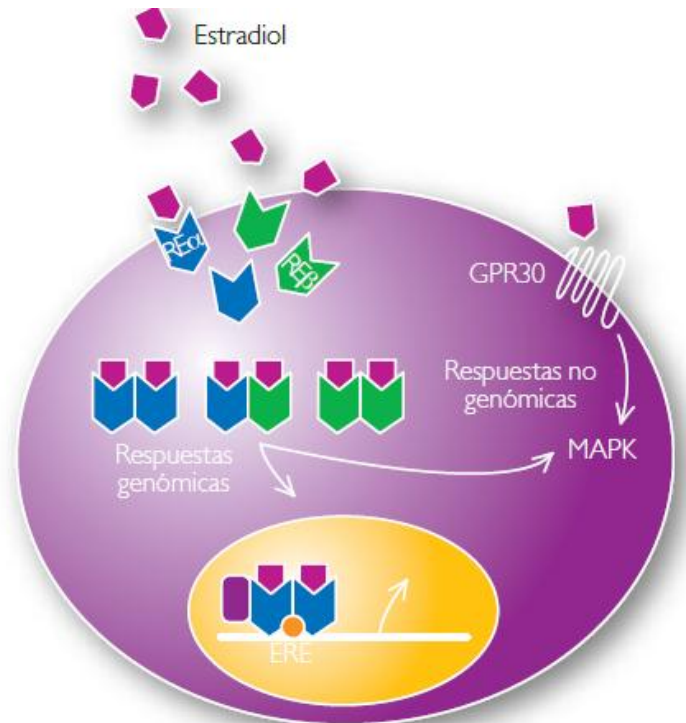
**Figura 1. Estructura química de las principales hormonas esteroideas derivadas del colesterol.**  
Estrona ( $E_3$ ), Estradiol ( $E_2$ ) y Estriol ( $E_1$ ) (Ascenzi *et al.*, 2006).

Los mecanismos de acción mediante los cuales los estrógenos como el E<sub>2</sub> ejercen sus efectos involucran la modulación de la expresión de proteínas es decir, en un primer paso los estrógenos se difunden hacia el interior de la célula en donde pueden modular la expresión de genes mediante mecanismos regulatorios de transcripción y vida media de los RNAm a través de la activación de vías de señalización intracelular (Falkenstein *et al.*, 2000) (Figura 2). Para que estas vías de señalización se lleven a cabo, inicialmente, los estrógenos deben unirse a sus receptores los cuales se clasifican de dos maneras: nucleares y membranales. Así mismo, éstos participan en mecanismos de acción genómica (clásicos) y mecanismos no genómicas (no clásicos), respectivamente; esta última también conocida como una vía alterna. Estos receptores estrogénicos clásicos (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ) modulan respuestas genómicas como la transcripción génica ocurrida en lapsos de tiempo largos que se llevan a cabo en horas o días, razón por la cual también han sido clasificados como mecanismos de acción lentos. Dicha respuesta se activa una vez que el ligando se une a su receptor nuclear y reconoce una secuencia nucleotídica específica conocida como elemento de respuesta a estrógenos (ERE, por sus siglas en inglés), caracterizada por poseer una secuencia palindrómica (GGTCAnnnTGACC), separada por tres nucleótidos que son variables en el extremo 5' de los genes de respuesta a estrógenos (Jacobi *et al.*, 2007).

La respuesta no genómica implica una señalización rápida que ocurre en cuestión de segundos o minutos, donde ocurren varias señalizaciones que pueden ser potencialmente activadas por la unión del E<sub>2</sub> a su receptor membranal. Entre éstas se incluye:

- El flujo de Ca<sup>2+</sup> (Improta-Brears *et al.*, 1999)
- La activación de proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK, por sus siglas en inglés) (Waters *et al.*, 1997)
- La activación de la proteína cinasa A (PKA, por sus siglas en inglés) (Lagrange *et al.*, 1997)
- La activación de la proteína cinasa C (PKC, por sus siglas en inglés) (Qiu *et al.*, 2003)
- La activación de fosfoinositol 3 cinasa (PI3K, por sus siglas en inglés) (Simoncini *et al.*, 2000; Alexaki *et al.*, 2004)
- La activación de la proteína Src (Kennedy *et al.*, 2005)

- La producción de óxido nítrico (Prossnitz *et al.*, 2008)
- La activación de segundos mensajeros incluyendo la inducción de AMPc y adenilato ciclasa (Aronica *et al.*, 1994; Cocker *et al.*, 2002)



**Figura 2. Mecanismo de acción genómica y no genómica de las hormonas esteroides.** Consiste en la entrada de la hormona esteroide como el estradiol (E<sub>2</sub>) a la célula blanco por difusión pasiva a través de la membrana plasmática en donde se une a receptores específicos. Los complejos receptor-esteroide forman dímeros que se activan, el proceso incluye cambios conformacionales que les permiten unirse a sitios selectivos en la cromatina en donde interactúan con secuencias específicas del ADN, denominadas elementos de respuesta estrógenos (ERE). De esta forma, el complejo receptor actúa como un factor transcripcional modulando la expresión génica responsable en última instancia del efecto hormonal. De manera clásica los efectos estrogénicos atribuyen a dos subtipos de receptores ERα y ERβ. Es contraste con los mecanismos de acción genómicos, los efectos esteroideos no genómicos son caracterizados principalmente por su irreversibilidad a inhibidores de la transcripción y de la síntesis de proteínas. Su acción rápida va de segundos a minutos lo cual no es compatible con cambios en la síntesis de ARNm y proteínas. Este mecanismo consiste en la interacción de la hormona esteroidea con receptores específicos de la membrana plasmática de la célula blanco entre los que se incluye GPER-1 (GPR30), generando la liberación de segundos mensajeros por la activación de diversas vías de transducción involucradas en la duplicación celular por ejemplo, la vía MAPK (Ceballos y Hernández-Rodríguez, 2008).

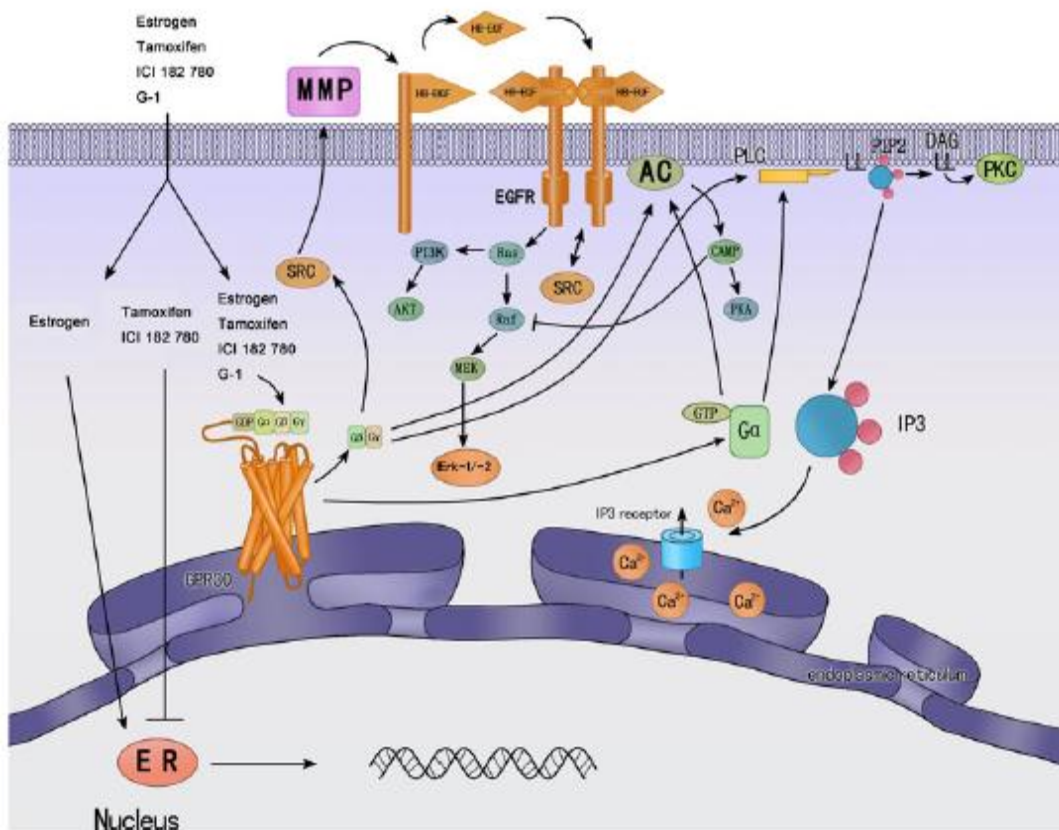
Dichas cascadas de activación proteica surgen a partir de dos rutas particulares que llevan a cabo un entrecruzamiento de vías. La activación del receptor ERα membranal por la unión a estrógenos o factores de crecimiento da lugar a la transactivación del receptor acoplado a proteínas G que activa tres categorías de señalización conocidas como las vías Ras-Raf- MAPK-MEK-ERK, Src-PI3K-AKT-eNOS y PLC-PKC-cAMP-PKA, entre las cuales hay numerosas interacciones (Zhang y Trudeau, 2006), a esto se

le conoce como entrecruzamiento (cross-Talk) de la señalización (Acconcia y Marino 2003)

## **2.5 Receptor estrogénico membranal GPER-1 (GPR30)**

Las hormonas esteroideas como los estrógenos actúan como ligando de receptores nucleares (vía clásica) regulando así la transcripción génica y cambiando la respuesta fisiológica de la célula (Prossnitz y Maggiolini, 2009). Las respuestas rápidas o no genómicas se asocian a receptores estrogénicos que se encuentran en la membrana celular, tal es el caso del receptor GPR30. Dicho receptor pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G que deriva sus siglas debido a que formaba parte de la familia de receptores huérfanos acoplados a proteínas G (GPCR), denominados de esta forma puesto que no se conocía su ligando; su acrónimo en el humano se ha determinado como GPER-1 (Maggiolini y Picard 2010). Dicho receptor es expresado predominantemente en la superficie de la célula de diversos tejidos como la glándula mamaria, corazón, hígado, ovario, cerebro y pulmón. Sin embargo, algunos investigadores han determinado que éste también es expresado sobre la membrana de retículo endoplásmico (Figura 3) (Revankar *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2010).

GPER-1 fue clonado a finales de la década de 1990 como resultado de la elaboración de una biblioteca genómica de GPCR (Vivacqua *et al.*, 2006). Una de las primeras evidencias de que los estrógenos podrían estar actuando por vías alternas a la clásica fue a partir de observar que las hormonas estrogénicas tienen la capacidad de activar la vía adenilatociclasa (AC) y la subsecuente producción de AMPc en células de cáncer de mama MCF-7 (Cuadro 1) (Aronica *et al.*, 1994); las cuales expresan ambos tipos de receptores estrogénicos es decir, expresan tanto a los receptores nucleares como al GPER-1. A diferencia de los RE nucleares, el GPER-1 presenta una alta selectividad para estradiol con una afinidad de  $2.7\mu\text{M}$  (Filardo *et al.*, 2002; Thomas y Dong 2006) en comparación con la unión a otros esteroideas como la estrona  $\text{E}_1$  y el estriol  $\text{E}_3$  (Thomas *et al.*, 2005). Adicionalmente, se ha observado que este último puede actuar como antagonista sobre el receptor GPER-1 probado en células epiteliales de cáncer mamario SKBR3 (Lappano *et al.*, 2009).



**Figura 3. La activación del receptor GPER-1.** E2 y algunos otros agonistas como ICI 182,780, Tamoxifeno o G1 activan múltiples cascadas de señalización determinadas por dos de tres subunidades intracelulares del receptor  $G\alpha$  y  $G\beta\gamma$ . La primera está asociada a liberación de adenilato ciclasa y la segunda activa a la proteína Src que en curso activa a una proteína metaloproteasa de membrana para la liberación del receptor factor crecimiento epidermal unido a heparana (EGF-HB), dimerización del receptor RTK y seguimiento de otras rutas específicas entre las que participan la liberación de segundos mensajeros intracelulares tales como  $Ca^{++}$  y la activación de proteínas tipo MAPK, AMPc, PI3K, AKT entre otras mediante distintas fosforilaciones. La representación del receptor GPER-1 (GPR30) en este esquema se encuentra en el retículo endoplasmático ya que se ha encontrado expresado también sobre la membrana de este organelo celular. En contraste con la vía clásica (genómica), las respuestas celulares de liberación de esta vía alterna se dan en tiempos cortos (segundos a minutos) comparado con la ruta clásica que da lugar a respuestas lentas por su interacción de transcripción génica nuclear (Wang *et al.*, 2010).

**Cuadro 1. Ausencia y/o presencia de tres tipos de receptores estrogénicos tanto nucleares o membranales en distintas líneas celulares de cáncer de mama**

Línea de cáncer de mama	ER $\alpha$	ER $\beta$	GPER-1 (GPR30)
MCF-7	+	+	+
MCF-7 BUS*	+	+	+
SkBR3	-	-	+
MDA-MB-231	-	+	-

\*Sublínea fibroblástica de MCF-7 epitelial.

En el año 2005 grupos independientes demostraron que GPER-1 era blanco de E<sub>2</sub>, con alta afinidad. Dicha respuesta fue observada gracias al uso de antagonistas estrogénicos de receptores nucleares como los son el ICI 182,780 y tamoxifeno (Filardo *et al.*, 2002). Este receptor acoplado a una proteína G trimérica estimula la ruta AMPc principalmente a través de la subunidad G $\alpha$  (Thomas *et al.*, 2005) y Src o transactivación de receptor a través de G $\beta\gamma$  (Filardo, 2002). Subsecuentemente, la proteína Src promueve la liberación del tipo factor de crecimiento EGF unido a heparana y la activación del receptor EGF (Filardo *et al.*, 2000) desencadenándose así una serie de eventos de señalización intracelulares, principalmente la activación de MAPK, Erk1/2, PI3K y fosfolipasa C (Prossnitz *et al.*, 2008) (Figura 3). Algunas otras respuestas río abajo a estas señalizaciones se encuentra la activación de genes como *c-fos* (Maggiolini *et al.*, 2004) Ciclina D1, AP-1 entre otros (Zhang y Trudeau, 2006) lo cual tiene interesantes implicaciones para comprender la progresión del cáncer de mama.

Adicionalmente, se ha observado que los denominados antiestrógenos, ICI 182,780 y tamoxifeno también son capaces de estimular la actividad de la adenilatociclasa en membranas de células HEK 293 transfectadas con el GPR30, pero no en membranas que carecen del receptor (Thomas *et al.*, 2005). La actividad estrogénica se ha encontrado en otras fuentes como lo son los fitoestrógenos (provenientes de las plantas) o materiales hechos por el hombre como en el caso de los xenoestrógenos también conocidos como disruptores endocrinos químicos como los plaguicidas, herbicidas, bisfenoles policlorados, entre otros (Jacobs y Lewis, 2002; Starek, 2003). La respuesta biológica estrogénica del E<sub>2</sub> y xenoestrógenos en una variedad de líneas celulares son producto de las rutas de señalización activadas las cuales se muestran complejas debido al entrecruzamiento entre ellas por parte de los ER $\alpha$ . Dichas rutas se ven implicadas en la determinación de procesos importantes como la apoptosis, migración, adhesión y diferenciación celular en función a los múltiples genes que inhiben o estimulen, y/o a las proteínas que activen mediante fosforilaciones en sitios específicos o muy conservados, tal es el caso sobre la activación de AKT en la Ser<sup>457</sup> (Zhang *et al.*, 2006)

## **2.6 Vía de la proteína tirosina cinasa AKT (PKB)**

En 1991 grupos independientes convergieron al encontrar un cDNA que codificaba para una nueva serina treonina quinasa. Fue clonado de un homólogo celular del oncogen v-AKT de la transformación retroviral (AKT8) en timoma espontaneo de AKR de ratón,

llamando al producto c-AKT. El mismo cDNA fue clonado por otro grupo en busca de nuevas treoninas quinasas que participaran sobre las vías de transducción de señales, tales como PKA y PKC (Kandel y Hay, 1999). Subsecuentes estudios han revelado que conlleva un papel central en la promoción de sobrevivencia celular (Bellacosa *et al.*, 1991), apoptosis y cáncer (Kandel y Hay, 1999).

El 17 $\beta$ -estradiol unido a GPER-1 rápidamente puede inducir río abajo una gran variedad de segundos mensajeros entre los que se encuentra la estimulación de PI3K/AKT (Silva *et al.*, 2010). La consecuencia biológica de esta activación a través de la fosforilación de AKT está íntimamente ligada a funciones celulares en las que se incluye proliferación celular, sobrevivencia y progresión del ciclo celular (Wang *et al.*, 2010). La regulación de múltiples fosforilaciones proteicas río arriba y río abajo de AKT son punto clave también para las respuestas celulares entre estas proteínas, entre las que se encuentran las de la familia de pequeñas GTP-Ras que interactúan directamente con proteínas de la familia Ras o Raf de serina treonina cinasa y proteínas PI3K (Vojtek *et al.*, 1993). Tras la activación, Raf fosforila a MAPK, señalización regulada por cinasa-cinasa, la cual en turno fosforila y activa la expresión a ERK ½ genes implicados sobre proliferación celular (Dong *et al.*, 2010).

Los blancos dirigidos por AKT incluyen cinasas, glucógeno sintetasa cinasa 3 y P70S6 cinasa, factores de transcripción FKHR y respuesta relacionadas con AMPc- así como proteínas asociadas con apoptosis, caspasa 9 y BAD (Datta *et al.*, 1999). Ras promueve crecimiento celular, en parte por la activación de Raf/ERK además de estar íntimamente asociada a diversos tipos de tumor humanos (Bourne *et al.*, 1991) y tener un papel sobre el crecimiento celular. También Ras promueve la sobrevivencia celular a través de la activación de las cascadas de señalización Raf/ERK y PI3K/AKT y promueve la senescencia y muerte celular a través de la activación de proteínas Raf cinasas (Downward, 1998).

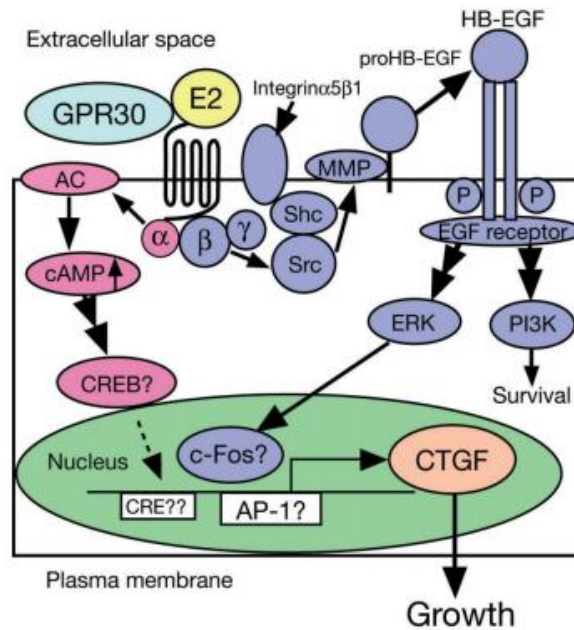
Éstos y muchos efectos contrarios de Ras como diferenciación *vs* bloqueo de diferenciación y promoción de proliferación celular, muerte celular o sobrevivencia requieren de las acciones de la vía Raf/ERK. La activación de proteínas cinasas como Raf conduce a respuestas celulares como proliferación apoptosis o diferenciación. AKT (Proteína Kinasa B o PKB) es un miembro proteínas que regulan estas respuestas interactuando con Raf y fosforilando esta proteína que tiene regiones residuales serina

altamente conservadas y reguladoras de este dominio. La fosforilación de Raf y de AKT inhibe la activación de vías donde participan Raf/Mek/Erk y desplazan las respuestas celulares en células de cáncer mamario desde arresto del ciclo celular hasta proliferación. Estas observaciones proveen la base celular del entrecruzamiento entre dos vías de señalización al nivel de Raf y AKT (Mei *et al.*, 2002). La actividad cinasa de Raf es regulada por la fosforilación de la región altamente conservada del residuo Ser<sup>259</sup> en el aminoácido terminal del dominio regulador (RafNT) mientras que B-Raf contiene múltiples sitios consenso para AKT localizados en el dominio regulatorio del amino terminal y sobre la Ser<sup>428</sup> que es específicamente fosforilada por AKT (Li *et al.*, 2010). Existe evidencia de que al exponer células de la línea de cáncer mamario MCF-7 a EGF (factor de crecimiento epidermal, por sus siglas en inglés) se induce proliferación celular que resulta en la activación de la vía PI3K-AKT y la activación de Raf/MEK/ERK. Además, la activación prolongada de la cascada de Raf inhibe el crecimiento en este tipo celular. La regulación de Raf/MEK/ERK y PI3K en células MCF-7 se da mediante la interacción de AKT determinando así si la respuesta es proliferación o arresto celular (Zimmerman y Moelling 1999).

## 2.7 CTGF

Pandey *et al.* (2009) demostraron que la señalización de GPER-1 tiene consecuencias transcripcionales en células de cáncer de mama sobre genes específicos como el factor de crecimiento tejido conectivo (CTGF, por sus siglas en inglés), sugiriendo una nueva función de la señalización de GPER-1 en la migración celular. Este hallazgo es relevante para el entendimiento de los efectos biológicos de la señalización de GPER-1 (Figura 4). CTGF consiste en una proteína de cuatro dominios desde el amino terminal hasta el carboxilo terminal. Las propiedades biológicas de CTGF involucran la adhesión celular, migración, proliferación, sobrevivencia, diferenciación y tumorigénesis. CTGF puede interactuar físicamente con ER $\alpha$  y ER $\beta$  y funcionalmente también inhibe la señalización regulada por los estrógenos mediante ER clásicos además de ser requerido para efectos proliferativos por E2 (Cheng *et al.*, 2011).





**Figura 4. Expresión de CTGF por la acción de GPER-1.** La unión de E2 al receptor membranar acoplado a proteínas G el GPER-1(GPR30) desencadena una serie de eventos de señalización intracelular que estarán determinadas por la subunidad Gα que da lugar a la señalización PLC-PKC-cAMP-PKA. Las subunidades Gβγ dan lugar a la activación de un receptor membranar tipo RTK a través de la transactivación del receptor por la liberación del HB-EGF por la acción de una metaloproteasa de membrana. Sucesivamente la acción de la proteína Src enciende dos rutas: Ras-Raf-MEK-MAPK y Src-PI3K-AKT-eNOS, involucradas en sobrevivencia y expresión génica de CTGF (Prossnitz y Maggiolini, 2009).

Ante el descubrimiento de la potente inducción de CTGF dada por la activación de GPER-1, la principal pregunta a responder es ¿cuál es su significado biológico?, ya que se ha reportado que este gen es necesario para la estimulación y la migración celular en líneas de cáncer y de otros tipos celulares (Chen *et al.*, 2007). Se ha considerado la posibilidad de que GPER-1 pueda promover la migración a través de la inducción en la expresión de CTGF (Pandey *et al.*, 2009) por lo que dicho gen se ha convertido en un bioindicador de la acción al receptor GPER-1 activo, ya sea por distintos tipos de ligandos como E2, ICI 182780, G1 o algún xenoestrógeno ambiental que sea capaz de unirse a él y promover su expresión (Cheng *et al.*, 2011).

## 2.8 CHP y GPER-1

Así como el 17β-Estradiol unido al receptor GPER-1 es promotor de la proliferación en células epiteliales sanas o transformadas (Renoir *et al.*, 2008), diversos estudios se enfocan en determinar que CHP pertenece al grupo de agonistas sin embargo, el mecanismo de acción sobre la proliferación celular no ha sido establecido claramente

aún (Ventura *et al.*, 2012). Lo anterior se debe a la complejidad de los sistemas celulares y la combinación de eventos extracelulares (no genómicos) y nucleares (genómicos) que puedan estar tomando lugar.

Entre estos estudios se encuentra el de Gore (2002) quien encontró en un modelo celular de neuronas de tipo GnRHérgico responsivo a E2, las cuales poseen tanto receptores clásicos como el membranal GPER-1. Dichas células responden a concentraciones de CHP en un rango de 10-100  $\mu\text{M}$  donde se observa una alta densidad y proyecciones neuronales en sus cultivos. Al ser combinado con un antagonista parcial de los ER clásicos como ICI 182,780 (100 nM) la respuesta no fue inhibida por lo que concluyeron que CHP actúa como DEQ al menos en este modelo celular, pero no determinan por cual tipo de receptor está actuando. En 2002, Andersen *et al.* realizaron ensayos de proliferación celular con diversas concentraciones de CHP observando que éste si influye sobre proliferación a una concentración mínima de efecto (LOEC, por sus siglas en inglés) de 25  $\mu\text{M}$  y una concentración máxima de efecto (MOEC, por sus siglas en inglés) de 50  $\mu\text{M}$ . Ventura *et al.* (2012) sugirió esta ultima dosis como la máxima utilizable ya que a concentraciones mayores muestra ser citotóxica por arresto celular en la fase S del ciclo, acompañada de la subsecuente apoptosis en un máximo de 10 días tanto en células MCF-7 como en la línea MDA-MB-321. Esta última línea celular no poseen RE clásicos pero si GPER-1. Este mismo grupo de investigación reportó por primera vez la respuesta proliferativa por parte de CHP en concentraciones que van desde 0.05, 0.5, a 5  $\mu\text{M}$ . Las respuestas observadas se evaluaron a través de ER $\alpha$  anclado a la membrana y asociado con la transactivación estrogénica. Adicionalmente, se encontró que CHP 50  $\mu\text{M}$  es capaz de producir de forma elevada (58% en células MCF-7) especies reactivas de oxígeno implicados en la inestabilidad y subsecuente arresto del ciclo celular mientras que en células MDA-MB-231, las cuales poseen sólo ER $\beta$ , su aumento se observó hasta del 108% respecto al control.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

En la actualidad CHP se ha convertido en un compuesto blanco de controversia en el estudio de efectos disruptores sobre vías endocrinas. Si bien no ha demostrado ser un DEQ, sí tiene la capacidad de unirse a los receptores estrogénicos clásicos aunque de manera menos afín. Además existe evidencia de que puede aumentar los niveles de AC, respuesta asociada principalmente a la activación de receptores acoplados a proteínas G y su subunidad  $\alpha$ . E2 tiene alta afinidad de unión al receptor GPER-1 (GPR30) y se considera una ruta alterna estrogénica implicada mayoritariamente sobre respuestas metastásicas en células transformadas de epitelio mamario, tal es el caso de la línea MCF-7. Así mismo la activación de GPER-1 da lugar a distintas respuestas celulares, entre ellas la transcripción del gen CTGF, secreción de proteínas y proliferación celular. Por lo anterior en el presente estudio se propuso evaluar si CHP tiene la capacidad de unirse directamente a este receptor y regular respuestas celulares como vías de transducción, expresión génica y proliferación celular.

#### **4. HIPOTESIS**

Si CHP es capaz de unirse al receptor GPER-1 y modificar las respuestas celulares particulares de la ruta tales como comportamiento proliferativo, expresión génica específica y la activación de proteínas implicadas en las vías de transducción activas; entonces dicho compuesto podría compararse a la acción de E<sub>2</sub> y proponerse como candidato disruptivo.

## **5. OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Determinar si el insecticida organofosforado CHP es capaz de mimetizar las acciones de la hormona esteroidea 17 $\beta$ -estradiol al activar el sitio de acción de la vía estrogénica no genómica de señalización a través del receptor membranal acoplado a proteínas G (GPER-1) en el modelo celular responsivo a hormonas esteroideas de la línea epitelial de cáncer mamario MCF-7.

### **Objetivos particulares**

- Determinar el comportamiento y respuesta proliferativa de células MCF-7 tratadas con diferentes concentraciones de E2 o CHP en ausencia o presencia de un inhibidor de la vía no clásica.
- Evaluar el efecto del tratamiento de células MCF-7 a E2, CHP en ausencia o presencia de un inhibidor de la vía no clásica sobre la expresión de genes específicos ER $\alpha$  y ER $\beta$  y CTGF.
- Determinar el nivel de activación de AKT a través del tratamiento de células MCF-7 con E2, CHP en ausencia o presencia de un inhibidor de la vía no clásica.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Tratamientos *in vitro*

Como modelo de estudio se utilizó la línea celular de cáncer mamario epitelial MCF-7 (ATCC, Num Cat. HTB-22) entre los pasajes 12 y 21 las cuales fueron mantenidas en N<sub>2</sub> líquido procurando no rebasar más de cuatro transferencias. Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco alto en glucosa (DMEM) (GIBCO Num Cat. 11965-084) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO Num Cat. 51730072-03) y 5% de penicilina/estreptomicina y anfotericina (GIBCO, Num Cat. 15140) a 37° C, con alta humedad y 5% de CO<sub>2</sub> en aire atmosférico (Thermo Scientific). El medio de cultivo se cambió cada tercer día hasta confluencia específica.

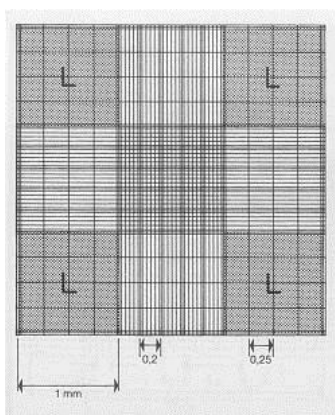
Previo a los tratamientos las células fueron mantenidas en medio libre de rojo fenol DMEM (GIBCO, Num Cat. 21068) suplementado con 1.5% de albumina sérica de bovino (ASB) (Research Organics, Num Cat. 1331A) como fuente de proteína y libre de SFB con el objeto de evitar algún efecto esteroideo. Una vez transcurrido este tiempo, las células se sometieron a distintos tratamientos (Cuadro 2) utilizando 17- $\beta$ -estradiol (Research Biochemicals Incorporated), G-15 como antagonista específico del receptor estrogénico membranar GPER-1 a una concentración final de 20 nM (SIGMA) y/o CHP (SIGMA). En todos los casos los compuestos se disolvieron en dimetilsulfoxido (DMSO) (SIGMA). El medio utilizado para todos los tratamientos fue Optimem-I (GIBCO, Num Cat. 11058) que contiene L-Glutamina, HEPES y sin rojo fenol con la finalidad de evitar ruido de fondo estrogénico (Richards *et al.*, 1988). En todos los experimentos se incluyó un grupo control tratado únicamente con el vehículo de acuerdo a la dilución correspondiente de DMSO 0.1, 0.01, 0.001 %.

**Cuadro 2. Tratamientos y concentraciones de los compuestos utilizados en cada uno de los experimentos.**

<b>Tratamiento</b>	<b>Concentración</b>
<b>E2</b>	10 nM
<b>E2+G15</b>	10 nM + 20 nM
<b>CHP</b>	10, 25 ó 50 $\mu$ M
<b>CHP+G15</b>	50 $\mu$ M + 20 nM

## 6.2 Curvas dosis-respuesta de E2 o CHP

En cajas de 24 pozos ( $2.0 \text{ cm}^2$ ) se sembraron  $1 \times 10^4$  células por pozo en DMEM con rojo de fenol, 10% de SFB y antibióticos/antimicóticos (medio de siembra), dejándolas reposar durante su fase *lag* (4-6 días). El medio se cambió a medio de transición (DMEM sin rojo fenol con 1.5% de ASB) 48 horas posteriores a la siembra y/o 48 horas previas al tratamiento (4 días). Los diferentes tratamientos fueron agregados en Optimem-I durante diferentes tiempos (0, 24, 48, 72, 96, y 120 h) según el caso. Para la cuantificación se recuperaron las células del pozo usando Tripsina/EDTA y se realizó el recuento con un hemocitómetro o cámara de Neubauer (Figura 5) dentro de los cuadrantes L. La sumatoria se dividió entre el número de cuadrantes contados y se multiplicó por 10,000 (valor constante a razón de las propiedades dimensionales de la cámara) así como por el volumen final de la suspensión celular en mL. Cabe mencionar que el seguimiento del escrutinio se llevó a cabo de manera metodológicamente estricta con el fin de obtener la mejor resolución y reproducibilidad posible.



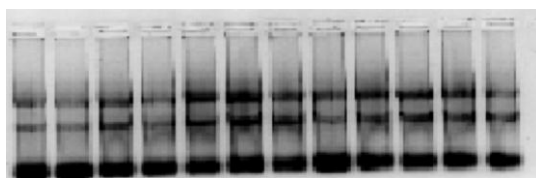
**Figura 5. Cuadrícula correspondiente a cámara de Neubauer (hemocitómetro).** El área marcada con la letra L corresponden al área registrada en el recuento celular.

## 6.3 Análisis de expresión génica

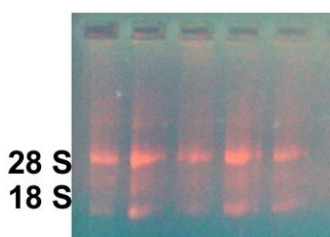
Se sembraron  $1 \times 10^5$  células en cajas de 60 mm y se esperó a que llegaran a confluencia entre el 70-90%. El medio de transición se agregó 24 hr previas al tratamiento y 24 h después se retiró. Las células se congelaron a  $-70^\circ \text{C}$  hasta su análisis.

Se extrajo el ARN total de cada uno de los cultivos utilizando Trizol Reagent (Research Organics Num Cat. 15596-018). El protocolo consiste en la separación de ácidos nucleicos de la parte proteica a través del uso de cloroformo/fenol haciendo lavados con

isopropanol y etanol al 70% y por último disolviendo la pastilla resultante en 50µL de agua estéril libre de enzimas RNAsas para evitar la degradación del material. Así mismo se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa 1.2% con la incorporación de bromuro de etidio 0.1µL/mL (INVITROGEN™) para observar que el material no se haya degradado (Figura 6). Posteriormente, a 25 µL de ARN se le adicionaron 2.5 µL de Buffer DNase 10X y 1 µL de DNAsas (AMBION) para eliminar la presencia de ADN genómico contaminante. Enseguida se incubó a 37° C por 20 minutos y finalmente se agregaron 2.8 µL de inhibidor de DNAsas (AMBION) durante 2 min a temperatura ambiente y 10 min a 65° C. El producto se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% y se visualizó por incorporación de bromuro de etidio (Figura 7). Finalmente, el RNA se cuantificó en el espectrofotómetro (NANODROP ND-1000). A partir del ARN total extraído de cada uno de los cultivos se sintetizó una cadena complementaria de ADN (cDNA, por sus siglas en inglés) mediante transcripción reversa (RT). Esta reacción se llevó a cabo mediante una etapa previa de 5 minutos a 65° C para desnaturalizar estructuras secundarias, seguido de un segundo periodo de 60 minutos a 40° C. La mezcla consistió de H<sub>2</sub>O, 0.5 µL (2 pmol/µL) de un oligonucleótido iniciador dT, 5 µL amortiguador 5X (Tris-HCl 250 mM pH8.3, KCl 375 mM, MgCl<sub>2</sub> 15 mM), 2.5µL (20 mM) de dNTPs, 0.2 µL de inhibidor de ribonucleasas y 1 µL de transcriptasa reversa (INVITROGEN) así como la muestra de 10 ng ARN total.



**Figura 6. Representación del ARN total de distintas muestras analizadas.** Se observa la presencia de las tres bandas correspondientes a ARN.



**Figura 7. Representación de cinco muestras tomadas al azar de ARN total tratado con DNAsa (AMBION).**

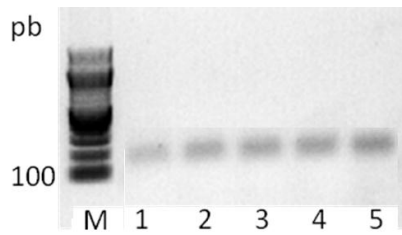


Para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en punto final se utilizó un volumen final de 10  $\mu$ L conteniendo 1  $\mu$ L de una solución amortiguadora 10X, 0.6  $\mu$ L (50 Mm) de  $MgCl_2$ , 0.5  $\mu$ L (20 mM) de dNTP's, 0.5  $\mu$ L (4  $\mu$ M) de oligonucleótidos iniciadores del gen de interés, 0.05  $\mu$ L de Taq polimerasa (INVITROGEN), 1  $\mu$ L de cDNA en 6.95  $\mu$ L de  $H_2O$ . Como control negativo se incluyeron reacciones sin cDNA. Estas reacciones se realizaron en un termociclador (Perkin Elmer GENEAMP 2400) bajo las siguientes condiciones: una fase inicial de desnaturalización por 2 min a 94° C, seguido de 23 y/o 35 ciclos (dependiendo del gen a determinar), 30 seg a 94° C, 30 seg a la temperatura media de hibridación específica y 45 seg a 72° C. Finalmente una fase de extensión durante 7 min a 72° C. Los productos obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % teñidos con bromuro de etidio 10 mg/mL (INVITROGEN<sup>TM</sup>) y analizadas densitométricamente utilizando el software computacional Quantity One. Los nucleótidos iniciadores utilizados para cada reacción se describen en el Cuadro 3. Se utilizaron las mismas condiciones de reacción para la amplificación de los receptores a cuantificar mediante un gradiente de temperatura en el intervalo de 57-68° C.

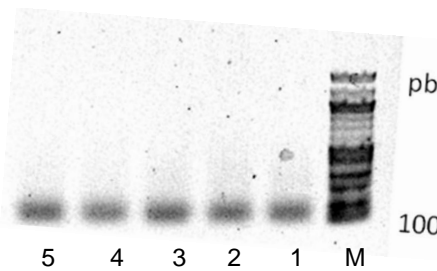
**Cuadro 3. Características de los oligonucleótidos diseñados para la amplificación de los receptores**

<b>PRODUCTO DE INTERÉS</b>	<b>SECUENCIAS (5'-3')</b>	<b>T<sub>m</sub> (° C)</b>	<b>TAMAÑO DEL PRODUCTO (bp)</b>
<b><math>\beta</math>-actina</b>	Fw: CCATCATGAAGTGTGACGTTG Rv: ACAGAGTACTTGCGCTCAGGA	57	173
<b>CTGF</b>	Fw: CCGTACTCCCAAATCTCTCCA Rv: GTAATGGCAGGCACAGGTCT	66	210
<b>ER <math>\alpha</math></b>	Fw: GTATGGCTATGGAATCTGCCAAGG Rv: TTTTATCAATGGTGCCTGGTTGG	68.3	177
<b>ER <math>\beta</math></b>	Fw: ACAGCATTCCCAGCAATGTCACTA Rv: TCTAGCGATCTTGCTTCACACCAG	68.5	174

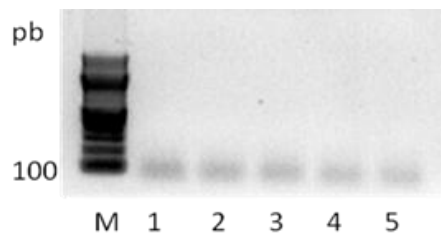
Para la determinación de la temperatura óptima de hibridación de oligonucleótidos sentido (Fw) y antisentido (Rv) para cada uno de los genes fue necesario llevar a cabo un PCR punto final en gradiente de temperaturas. El intervalo de temperaturas para CTGF fue de 64.1-66.1° C con temperatura óptima de 66° C (Figura 8) Para ER $\alpha$  el rango se encontró entre 68.2-68.3° C y ER $\beta$  entre 68.5-70.5° C, con temperaturas óptimas de 68.3 y 68.8° C, respectivamente (Figuras 9 y 10).



**Figura 8. PCR punto final para el gen CTGF en un rango de temperatura de 64-66.1° C.** De izquierda a derecha cada carril corresponde a una temperatura diferente entre estos rangos de temperatura. M, Marcador de peso molecular, 1: 64° C, 2: 64.5° C, 3: 65° C, 4: 65.5° C y 5: 66.0° C.



**Figura 9. PCR punto final para el gen ERα en un rango de temperatura de 68.5-70.5° C.** De derecha a izquierda cada carril corresponde a una temperatura diferente entre estos rangos de temperatura. M, Marcador de peso molecular, 1: 68.0° C, 2: 68.1° C, 3: 68.3° C, 4: 68.5° C y 5: 68.8° C.



**Figura 10. PCR punto final para el gen ERβ en un rango de temperatura de 68.5-70.5° C.** De izquierda a derecha cada carril corresponde a una temperatura diferente entre estos rangos de temperatura. M, Marcador de peso molecular, 1: 68.5° C, 2: 68.8° C, 3: 69.3° C, 4: 69.6° C, 5: 70.0° C.

#### **6.4 Evaluación de la actividad de AKT/PKB fosforilada y total**

Se sembraron  $6 \times 10^5$  células en cajas de 100 mm y se esperó a que llegaran a confluencia sustituyendo el medio 24 h con medio de transición. Las células se sometieron a los tratamientos durante de 5 y 20 min y se aislaron las proteínas de los lisados de células, utilizando como buffer de extracción 0.5% Nonidet P-40, 0.1 % dodecilsulfato de sodio (SDS), 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1µg/mL aprotinina y 0.5 mM PMSF.

Mediante el método de Bradford (1976) se determinó la concentración de proteína de cada una de las muestras comparado con una curva patrón de ASB. Los valores de

absorbancia se determinaron en un lector de microplaca iMark (BIORAD) a 620 nm y se sustituyeron sobre la ecuación lineal interpolando mediante un despeje los valores de lectura de DO (densidad óptica) correspondientes como el valor de “y”, con base a estos valores y una  $R^2$  cercana a 1 (0.98). Se cargaron 30  $\mu\text{g}$  de proteína para electroforesis en gel de poliacrilamida (12%, 1.5 grosor) en condiciones reductoras Laemmli (1970) que contiene SDS para conferirle carga negativa a las proteínas y facilitar la migración en el gel. Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa las cuales se incubaron con anticuerpos policlonales anti- $\beta$ -actina (Santa Cruz, SC-130656) en dilución 1:200 (43 kDa), anti-AKT/PKB total (Santa Cruz, SC-8312) y foforilado Ser<sup>473</sup> (Santa Cruz, SC-33437) (60 kDa). Como segundo anticuerpo se utilizó un anti-conejo acoplado a fosfatasa alcalina y para revelar las membranas se utilizó un kit (BIORAD). Una vez obtenidas las membranas reveladas y secas fueron escaneadas y se cuantificaron mediante densitometría utilizando el software computacional Quantity One 1D (BIORAD).

## **6.5 Análisis estadístico**

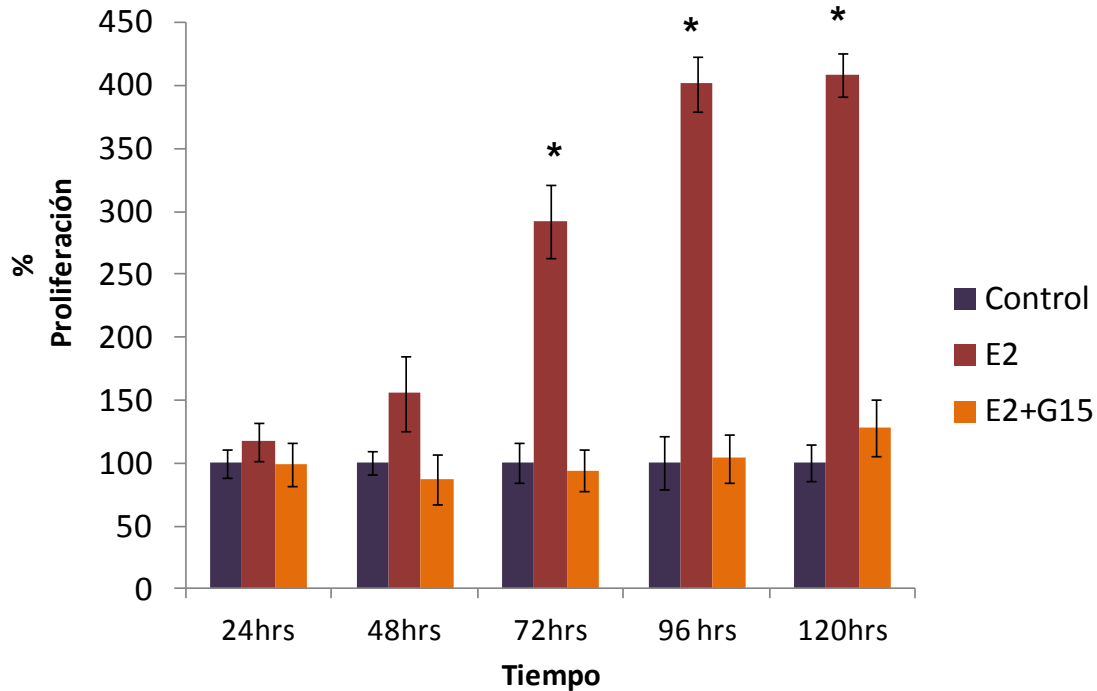
Las pruebas estadísticas se llevaron a cabo mediante el paquete estadístico SAS versión 9.1 (2007). Se realizaron pruebas no paramétricas de tipo Wilcoxon ( $p \leq 0.05$ ) para determinar diferencias entre grupos y prueba Kruskal-Wallis ( $p \leq 0.05$ ) pareada para determinar las diferencias de los tratamientos correspondientes contra el grupo control.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Respuesta proliferativa de células MCF-7 con E<sub>2</sub> y en combinación con G15

Usando como modelo experimental *in vitro* células MCF-7 (de tipo epitelial de cáncer mamario responsivas a estrógenos) se determinó la respuesta proliferativa mediante recuento celular directo. Esta técnica es aceptada como uno de los métodos más confiables comparativamente con otros métodos de detección proliferativa tales como los que utilizan MTT, sulforodamina, BrdU (Bromodiuxiridina) (Soto *et al.*, 1995; Blom *et al.*, 1998; Andersen *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2005; Ventura *et al.*, 2012) entre otros. Las ventajas o desventajas de cada uno de los métodos radican en pequeñas variables al ejecutarlas dado que son técnicamente más largas y requieren condiciones específicas como temperatura y/o luminosidad. Así mismo, algunas técnicas presentan “ruido de fondo” que se refiere a respuestas enmascaradas por los propios elementos que contengan los compuestos del protocolo que interfieran con otras respuestas fisiológicas y se tomen en cuenta siendo estos falsos positivos y/o falsos negativos.

El escrutinio celular se llevó a cabo de manera directa y se representó en unidades porcentuales de proliferación celular. Para el caso de E<sub>2</sub> se encontró una tendencia proliferativa desde las 48 h siendo significativo hasta las 72 h de exposición (Figura 11) con un valor de  $p=0.0321$  y un aumento en la proliferación celular de hasta 4 veces respecto al control. Este comportamiento proliferativo se debe principalmente a que la fase *lag* de duplicación celular ya ha sido superada y las células están ahora en fase exponencial. A este tipo de bioensayos se les conoce como un escrutinio de tiempo doble, “double time” ( $t_d$ ), y se identifica como el intervalo de tiempo en el cual la fase exponencial del cultivo ha duplicado el número de células (Blom *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2006). La respuesta proliferativa observada con E<sub>2</sub> (10 nM) fue similar a la observada en otros estudios (Soto *et al.*, 1995; Jacobi *et al.*, 2007., Rasmussen y Nielsen 2002) El uso del antagonista G15 fue una herramienta útil permitió discriminar el efecto estrogénico entre de la ruta clásica y la vía alterna. La dosis experimental de 20 nM se utilizó de acuerdo a Dennis *et al.* (2009) quienes reportaron su actividad antagonista sobre la unión de E<sub>2</sub> al receptor GPER-1. Se encontró que el efecto proliferativo de E<sub>2</sub> sobre células MCF-7 bajo las condiciones experimentales estudiadas, involucró la ruta GPER-1 dado que el tratamiento E<sub>2</sub>/G15 provocó una respuesta similar al grupo control desde el inicio hasta el final del experimento.



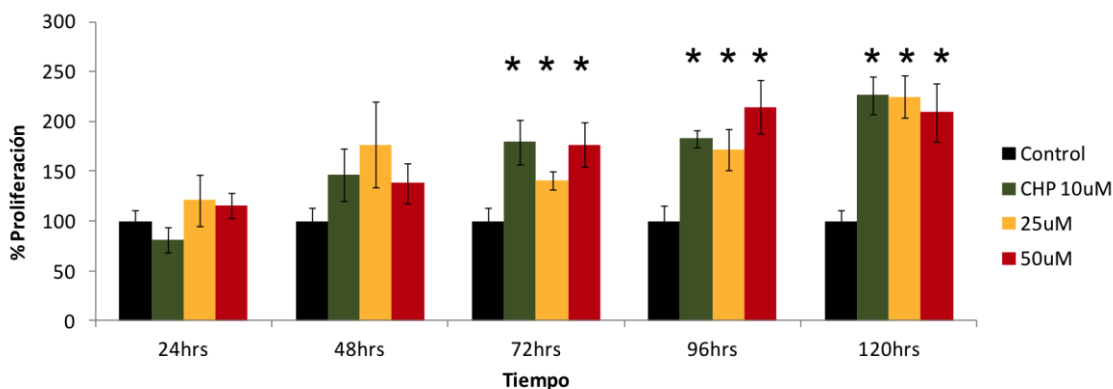
**Figura 11. Proliferación celular de la línea MCF-7 tratada con E<sub>2</sub> y E<sub>2</sub>+G15.** Las células se trataron durante 120 h con E<sub>2</sub> solo o en combinación con G15. Los resultados se presentan en porcentaje de proliferación respecto a las células no tratadas las cuales representan el 100% para cada tiempo. Los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa ( $p \leq 0.05$ ) mediante la prueba pareada no paramétrica K-W con respecto al grupo control para cada tiempo. Se muestran resultados + error estándar.

## 7.2 Curvas dosis-respuesta de CHP y en combinación con G-15

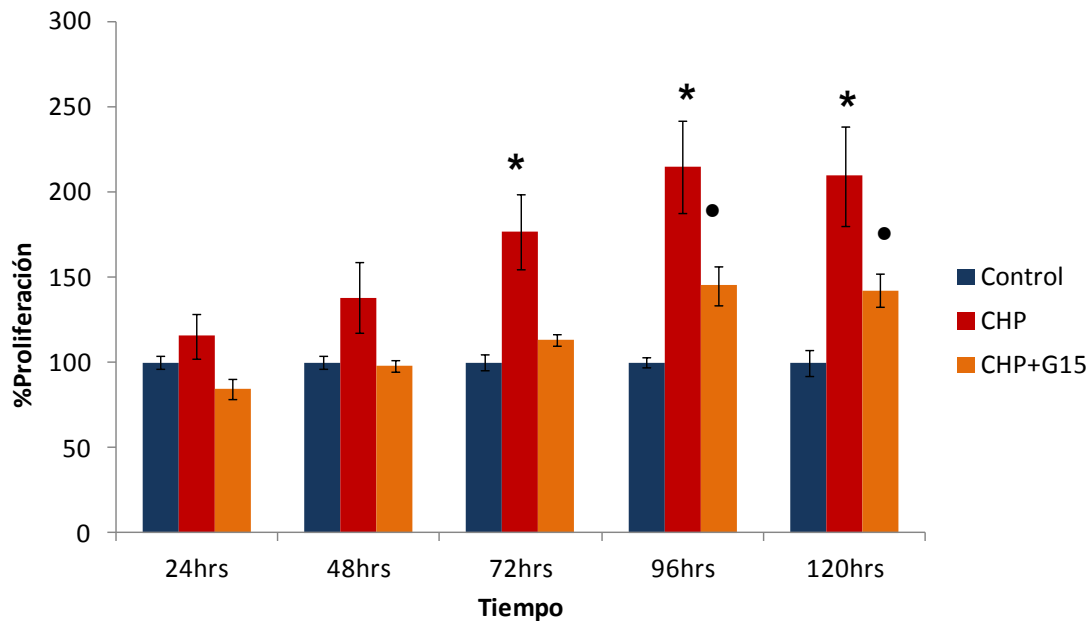
La respuesta proliferativa presentada por células MCF-7 expuestas a tres concentraciones micromolares de CHP (10, 25 y 50  $\mu\text{M}$ ) presentó en una tendencia proliferativa sin efectos citotóxicos y sin diferencia entre ellas mismas pero distintas al grupo control que sólo fue tratado con vehículo (DMSO) a partir de las 72 h de exposición [10 $\mu\text{M}$  ( $p=0.0148$ ), 25 $\mu\text{M}$  ( $p=0.0031$ ) y 50 $\mu\text{M}$  ( $p=0.0020$ )] (Figura 12). La respuesta observada aporta evidencia sobre el efecto proliferativo de CHP en células responsivas a estrógenos sin embargo, no discrimina si la respuesta observada es acerca de su capacidad xenoestrogénica vía receptores clásicos y/o membranales. Recientemente Ventura *et al* (2012) determinaron en células MCF-7 y MDA-MB-231 el porcentaje de proliferación que CHP ejerce sobre estos modelos celulares. A diferencia del presente estudio, ellos encontraron que la concentración de 0.05  $\mu\text{M}$  provocó un mejor efecto proliferativo aunque no mayor que E<sub>2</sub> mientras que 50  $\mu\text{M}$  mostró proliferación en un menor grado y concentraciones superiores a 50  $\mu\text{M}$  resultaron ser citotóxicas en ambas líneas celulares. Por otro lado, Andersen *et al.*, (2002) probaron también en un modelo de células MCF-7

BUS que es un clonado de la MCF-7 original y encontraron que la concentración mínima de efecto proliferativo fue 25  $\mu\text{M}$  y la máxima de 50  $\mu\text{M}$ , a concentraciones mayores se presentó respuesta citotóxica. Esta línea celular, en particular, ha mostrado alta respuesta proliferativa a  $\text{E}_2$  de hasta seis veces más que otras líneas de células MCF-7 (Villalobos *et al.*, 1995). Los resultados obtenidos en el presente estudio confirmaron que CHP 50  $\mu\text{M}$  presenta respuesta proliferativa positiva sin embargo, ésta se observó en un amplio intervalo de concentraciones micromolares, aunque no mayores al que se han observado con  $\text{E}_2$ .

Debido a que no se observó una respuesta diferencial entre las concentraciones utilizadas y con base a que 50  $\mu\text{M}$  es la dosis máxima sin efectos citotóxicos (Andersen *et al.*, 2002; Gore, 2002; Ventura *et al.*, 2012) esta concentración se seleccionó para los experimentos subsecuentes. Las células se trataron con CHP 50  $\mu\text{M}$  en ausencia y en presencia de G15 a concentración de 20 nM (Figura 13). Los resultados mostraron que CHP presentó efecto proliferativo a partir de las 72 h ( $p=0.0058$ ) y al ser combinado con el antagonista G15 la respuesta disminuyó significativamente respecto al tratamiento CHP ( $p=0.0012$ ) sin embargo el co-tratamiento fue distinto al control a partir de las 96 h ( $p=0.0003$ ) por lo que dicha respuesta podría atribuirse a la acción llevada a cabo a través de la ruta clásica estrogénica.



**Figura 12. Proliferación de células MCF-7 tratadas con tres concentraciones diferentes de CHP.** Diferencias significativas entre tratamientos con CHP respecto al control a partir de las 72 h mediante la prueba K-W pareada ( $p \leq 0.05$ ). Se muestran resultados + error estándar.



**Figura 13. Proliferación de células MCF-7 al ser tratadas con CHP y CHP-G15.** \*El grupo de CHP 50  $\mu$ M fue distinto al grupo no tratado a partir de las 72 ( $p=0.0058$ ) y distinto al grupo combinado de CHP+G15 ( $p=0.0012$ ). •El grupo combinado CHP+G15 fue distinto al grupo control a partir de las 96 h ( $p=0.0003$ ). Diferencias estadísticas significativas respecto al control mediante la prueba K-W ( $p<0.05$ ). Se muestran resultados + error estándar.

Los efectos observados podrían hacer pensar que CHP puede estar teniendo un efecto directo por la vía GPER-1 en periodos largos de exposición ya que el bloqueo del receptor por el antagonista permitió la disminución de la proliferación celular. Sin embargo, el efecto antagónico de G15 no fue suficiente para mantener la proliferación en niveles basales, como en el caso de  $E_2$  por lo que probablemente CHP estimule también la vía de  $ER\alpha$  membranal. Ventura *et al.* (2012) describieron que CHP induce proliferación mediante la vía de  $ER\alpha$  membranal a concentraciones micromolares. Lo anterior sugiere que CHP participa como xenoestrógeno e incluso podría participar en la tumorigénesis de cáncer mamario, aunque el efecto cancerígeno mediado por estrógenos se había asociado exclusivamente a la presencia del receptor  $ER\alpha$  (Renoir *et al.*, 2008). Hasta ahora la capacidad disruptiva de CHP sobre ER clásicos se ha encontrado asociada a  $ER\alpha$  en células MDA-MB-231 en dosis menores. Dicha respuesta se debe a la transactivación del receptor por parte de la proteína Src a la fosforilación específica de la Tyr<sup>537</sup> del  $ER\alpha$  membranal (Ventura *et al.*, 2012). El hecho de que la combinación de CHP+G15 haya superado el nivel proliferativo basal puede estar relacionado dicho efecto por lo que el efecto proliferativo es el resultado de la suma de las diferentes vías estrogénicas.

Otra vía interesante y probablemente involucrada es la vía aril hidrocarbano (AhR), la cual se ha observado en múltiples líneas de cáncer epitelial mamario entre ellas la MCF-7. Dicho receptor es blanco de algunas dioxinas, derivados del petróleo y plaguicidas, así mismo éste presenta una correlación positiva entre su sobreexpresión y el estado incrementado en la transformación celular (Wong *et al.*, 2009) e incluso a este receptor se le atribuye la acción teratogénica de CHP (Song *et al.*, 1997) ya que actúa directamente sobre el ADN y la transcripción de monoxigenasas tales como la del citocromo P450 involucrada en la biotransformación de compuestos endógenos y exógenos (Denslow *et al.*, 2007).

Las diferencias entre los resultados observados y los que han sido publicados hasta el momento se pueden atribuir a las condiciones experimentales y líneas celulares utilizadas. La línea celular MCF-7 presenta gran diversidad en sus características proliferativas o citogenéticas inducidas por distintos tratamientos (Cosser *et al.*, 2009) así como una alta heterogeneidad con variaciones fenotípicas y genotípicas remarcables (Nugoli *et al.*, 2003). Además, la acumulación de mutaciones entre pasajes celulares e, incluso, el manejo por parte del experimentador puede influenciar sobre el comportamiento proliferativo celular.

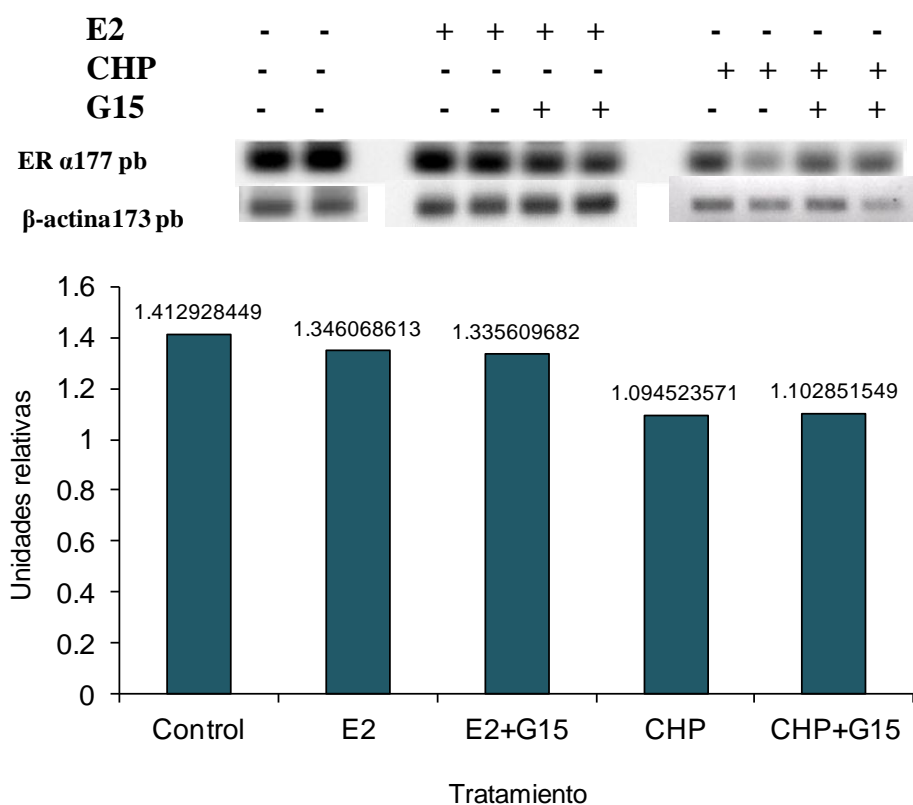
La observación directa de la proliferación celular muestra, por si misma, la interacción de CHP sobre rutas estrogénicas sin embargo, resulta importante determinar otras respuestas a nivel de expresión génica y actividad proteica asociada a las vía alterna en la que participa el receptor GPER-1.

### **7.3 Efecto de CHP sobre la expresión de ER $\alpha$ , ER $\beta$ y CTGF**

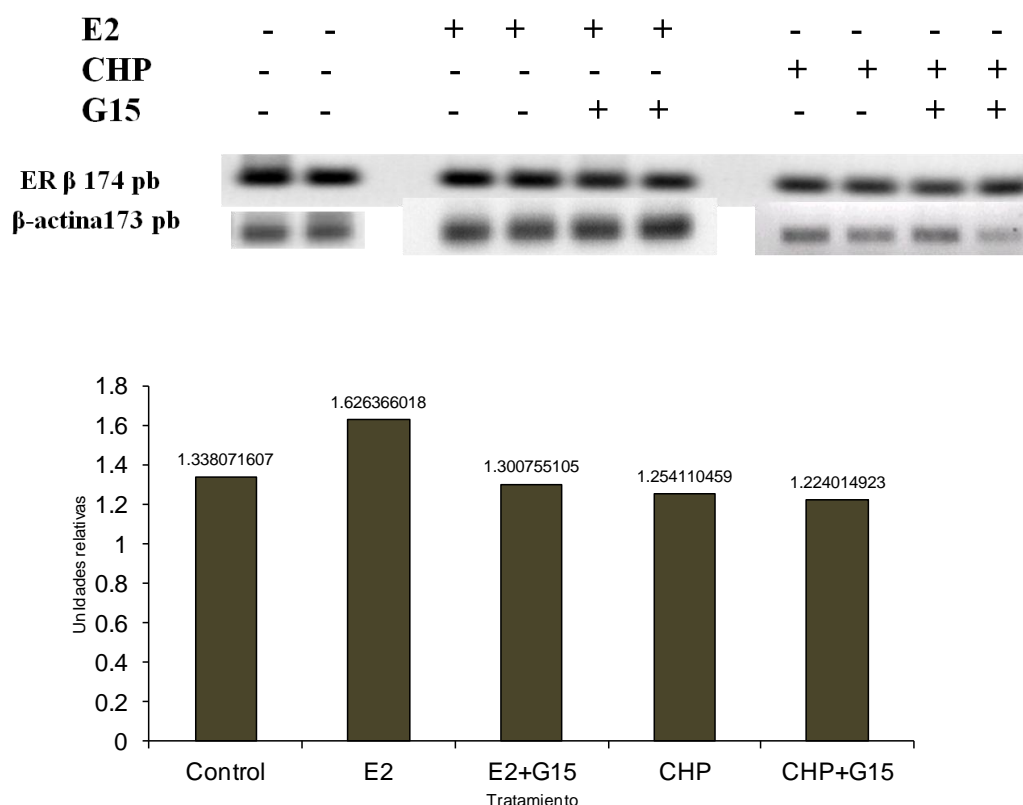
La expresión de genes asociados a las vías clásica y no clásica permitió de manera semicuantitativa determinar la interacción de CHP sobre ambas rutas respecto a E<sub>2</sub>. Considerando el hecho de que el gen CTGF es prioritariamente expresado cuando la ruta GPER-1 está activa (Pandey *et al.*, 2009) y que CHP ha mostrado la capacidad de unirse a los ERs clásicos  $\alpha$  y  $\beta$  (Carroll y Brown, 2006) se decidió considerar la expresión de estos tres genes. Para llevar a cabo estos experimentos se tomó como referencia la expresión del gen  $\beta$ -actina (173 pb) ya que se considera un gen de expresión constitutiva porque se encuentra formando parte del citoesqueleto celular y no tiene interacción influenciada a señales estrogénicas (Bunnell *et al.*, 2011).



En la Figura 14 se observa que la expresión del gen ER $\alpha$  muestra un valor densitométrico relativo que se encuentra alrededor de 1.41 para el grupo control en donde el tratamiento con E<sub>2</sub> no mostró cambios, sin embargo el tratamiento con CHP disminuyó en un 23% la expresión. Como era de esperar, el tratamiento con G15 no afectó la respuesta de E<sub>2</sub> o CHP. Por su parte, la expresión de ER $\beta$  aumentó en un 22% respecto al control con el tratamiento E<sub>2</sub> mientras que el tratamiento con CHP disminuyó 7% con respecto al control (Figura 15). En este caso el co-tratamiento con G15 no provocó efectos sobre la expresión respecto al control encontrándose una disminución entre el tratamiento con E<sub>2</sub> y E<sub>2</sub>/G15, aunque aparentemente no existe relación entre la vía alterna y la expresión de ERs (Ventura *et al.*, 2012).



**Figura 14. Expresión del gen ER $\alpha$  (177 pb).** Arriba Bandas obtenidas por los productos de PCR punto final y corridas por electroforesis en gel de agarosa de 1.2 %. C control, E<sub>2</sub> 10 nM, E<sub>2</sub>+G15 (20 nM), CHP 50  $\mu$ M y CHP+G15 (20 nM). Abajo Gráfico de barras que representa los valores densitométricos obtenidos para cada una de las bandas y estandarizadas al gen constitutivo  $\beta$  actina.

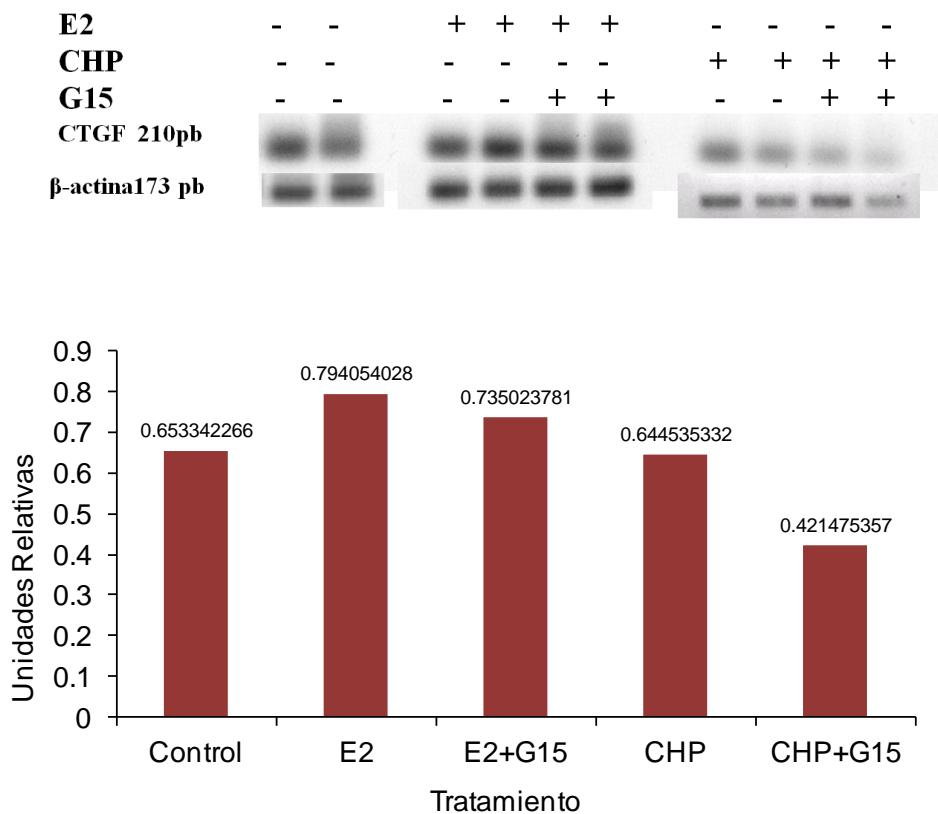


**Figura 15. Expresión del gen ER $\beta$  (174 pb).** Arriba Bandas obtenidas por los productos de PCR punto final y corridas por electroforesis en gel de agarosa de 1.2 %. C control, E2 10 nM, E2+G15 (20 nM), CHP 50  $\mu$ M y CHP+G15 (20 nM). Abajo Gráfico de barras que representa los valores densitométricos obtenidos para cada una de las bandas y estandarizadas al gen constitutivo  $\beta$  actina.

En 2004, Grünfel *et al.*, encontraron un débil efecto sobre la expresión de ER en células MCF-7 tratadas con CHP sin embargo, determinaron que puede interferir con las respuestas asociadas tanto al receptor ER $\alpha$  como al ER $\beta$  de una forma basal. Canesi *et al.* (2011) determinaron que CHP actúa como un disruptor endocrino en la glándula digestiva del mejillón (*Mytilus galloprovincialis*), tejido blanco específico de hormonas en donde CHP, sólo o en combinación con E<sub>2</sub>, después de 72 h de exposición interfirió con la respuesta estrogénica mediante desestabilización lisosomal lo que involucra el desbalance de múltiples enzimas y proteínas encargadas de la síntesis hormonal.

Dadas estas evidencias, aumenta la posibilidad de considerar a CHP como un riesgo agudo y/o crónico para muchos de los organismos silvestres que estén en contacto con él ya sea en medio terrestre o acuático, ya que múltiples organismos son receptáculo de múltiples plaguicidas y sus acciones disruptivas pueden afectar a distintos niveles.

Para conocer el efecto de CHP sobre la vía no clásica se evaluó la expresión del gen CTGF (Figura 16). El tratamiento con E<sub>2</sub> provocó un aumento del 21% en la expresión del gen mientras que el co-tratamiento con G15 provocó sólo el 13% de aumento con respecto al control. Por su parte, el tratamiento con CHP no mostró cambios respecto al control pero el co-tratamiento con G15 disminuyó la expresión en un 35%. Este resultado, junto con lo observado sobre el efecto proliferativo, sugiere que CHP puede presentar la capacidad de interactuar con el receptor GPER-1 y participar como un disruptor endocrino o como un xenoestrógeno específico sin embargo, dado que los resultados obtenidos son semicuantitativos por la medición densitométrica de las bandas obtenidas en los geles de agarosa de los PCRs punto final corridos, es arriesgado considerarlo totalmente como un disruptor endocrino, por lo que la observación aquí presentada sólo queda como sugerencia probable ante esta acción.



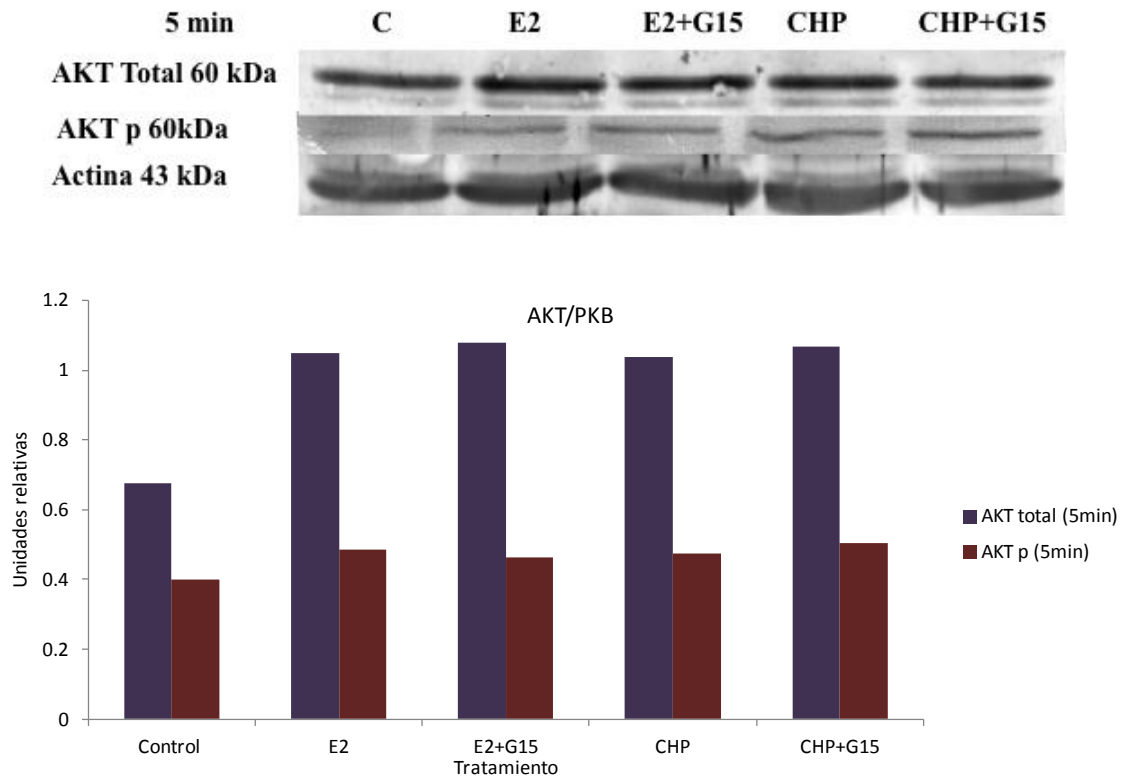
**Figura 16. Expresión del gen CTGF (210pb).** Arriba Bandas obtenidas por los productos de PCR punto final y corridas por electroforesis en gel de agarosa de 1.2 %. C control, E<sub>2</sub> 10 nM, E<sub>2</sub>+G15 (20 nM), CHP 50 μM y CHP+G15 (20 nM). Abajo Gráfico de barras que representa los valores densitométricos obtenidos para cada una de las bandas y estandarizadas al gen constitutivo β actina.

En los estudios celulares *in vitro* o *in vivo*, las respuestas provocadas por las vías de señalización desencadenadas por la unión de ligandos específicos a sus receptores responden de una manera variable sobre la activación de proteínas y la expresión de múltiples genes. Estos últimos se determinan por intervalos de tiempo mucho más largos a la activación de la vía que van desde horas hasta días. Así mismo, resulta difícil determinar con precisión cuál de ellas es responsable de una sola ruta en particular. En este sentido, existen alternativas metodológicas como el análisis de la expresión génica con mayor sensibilidad llevando a cabo PCR en tiempo real de los genes propuestos, principalmente CTGF, por ser el que mayoritariamente se expresa a la acción del encendido del receptor GPER-1 células MCF-7 (Pandey *et al.*, 2009), dicha propuesta metodológica ayuda a para poder determinar de manera cuantitativa el nivel de la transcripción al tratamiento con CHP y así poder discriminar si este posee efecto disruptivo estrogénico directo a esta acción. Por otro lado, mediante microarreglos se ha encontrado que, en un modelo *in vitro* de *Caenorhabditis elegans*, el porcentaje de genes predominantemente expresados al ser tratados con CHP son los que corresponden a los asociados con proceso metabólicos, seguidos a los de unión y en menor porcentaje los de actividad en el transporte lipídico (Viñuela *et al.*, 2010). Esta técnica es otra alternativa para el rastreo de transcripción génica llevada a cabo por CHP en modelos celulares *in vitro* como el utilizado en el presente estudio y, así, poder determinar de manera específica la acción que el compuesto organofosforado puede estar llevando si es que posee la capacidad disruptiva.

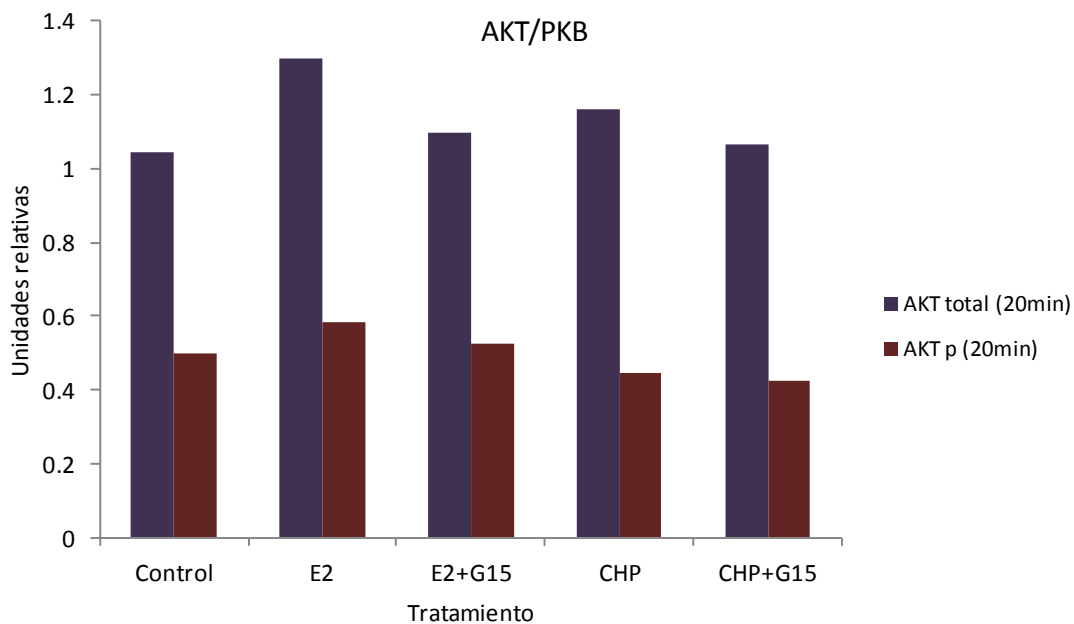
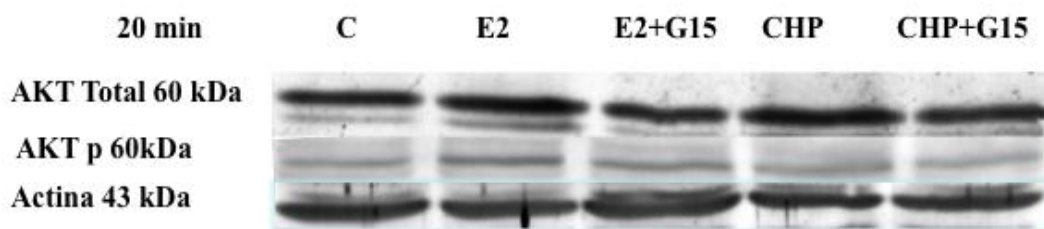
#### **7.4 Evaluación del efecto de CHP sobre la activación de la proteína AKT/PKB**

AKT/PKB es una proteína que se enciende por la acción de receptores acoplados a proteínas G, involucrada en procesos de proliferación celular (Tabb y Blumberg, 2006). Por esta razón, se determinó mediante Western Blot la participación de AKT/PKB como blanco de la acción de CHP sobre el receptor GPER-1, aunque cabe mencionar que la acción de esta proteína no es exclusiva de la activación del receptor GPER-1. Se determinó su efecto de activación a los 5 min (Figura 17) y 20 min (Figura 18) de exposición por medio de la diferencia entre el nivel proteico fosforilado y el total. Los datos se analizaron de forma semicuantitativa por densitometría respecto a  $\beta$ -actina. AKT/PKB en su forma total se presenta de manera constitutiva dado que es blanco de múltiples rutas celulares, incluso las que no están asociadas a GPER-1 (Guan *et al.*, 2000; Filardo., 2002; Sousa *et al.*, 2010).

En general, la actividad de AKT/PKB total se mostró un nivel muy similar entre tratamientos aunque aumentados respecto al control tanto a los 5 como a los 20 min, mientras que la actividad de AKT/PKBp Ser<sup>473</sup>, mostró mayor variabilidad a los 20 min de exposición para cada condición en comparación los 5 min.



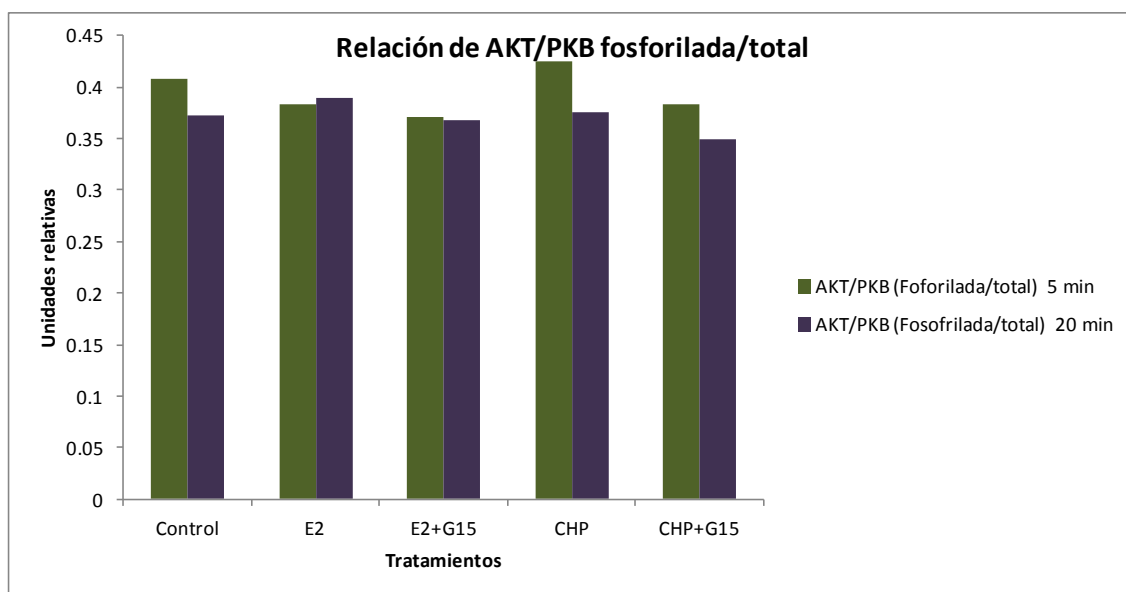
**Figura 17. Actividad de AKT/PKB total y fosforilada a los 5 min de tratamiento.** Arriba Se muestran resultados por Western Blot para AKT total y AKT fosforilada a los 5 minutos de exposición.  $\beta$ -actina se muestra como control. Abajo Gráfico de barras que representa los valores densitométricos estandarizados con  $\beta$  actina.



**Figura 18. Actividad de AKT/PKB total y fosforilada a los 20 min de tratamiento.** Arriba Se muestran resultados por Western Blot para AKT/PKB total y AKT/PKBp Ser<sup>473</sup> fosforilada a los 20 minutos de exposición.  $\beta$ -actina se muestra como control. Abajo Gráfico de barras que representa los valores densitométricos estandarizados con  $\beta$  actina.

Llevando a cabo una relación semicuantitativa entre el nivel de AKT/PKB fosforilada y el nivel de la proteína total (Figura 19) se observó que a los dos tiempos probados todos los grupos tratados presentaron un nivel basal en valores relativos de 0.4, aunque a los 5 min los tratamientos que contenían CHP se mostraron un tanto mas elevados,. Sin embargo, es difícil determinar con precisión el significado de este resultado dado que los valores densitométricos medidos corresponden sólo a un par de pruebas. Estas observaciones se puede interpretar como la abundancia de la proteína AKT/PKB en las células que fueron tratadas. Dado que las respuestas muestran gran similitud entre los intervalos de tiempo probados es probable que dicho intervalo se encuentre fuera del alcance resolutivo con que se llevan a cabo estas respuestas en las células, dado que las

vías de transducción de señales se pueden llevar a cabo a tiempos menores que van desde segundos a minutos. Tal es el caso de la fosforilación de Erk por la transducción de E<sub>2</sub> ya que se ha observado un mayor nivel de fosforilación tiempos cortos (60 seg) minimizándose a tiempos un poco más largos después de 5 min (Maggiolini *et al.*, 2004). Sin embargo, esta respuesta puede diferir dependiendo de la vía específica y la interacción con otras proteínas citosólicas.



**Figura 19.** Relación de la actividad de AKT/PKB Total/Fosforilada a los 5 y 20 min.

Esta disparidad de actividad proteica resulta no ser del todo clara, en principio por la carencia de más réplicas sobre los experimentos hechos, el tiempo evaluado y el dinamismo por el cual AKT/PKB puede ser activada de manera intracelular en respuesta a la transducción de señal iniciada por distintos receptores. Específicamente sobre la señalización estrogénica, AKT/PKB se puede activar por receptores de tipo RTK, GPCRs y ER $\alpha$  membranal. Estos dos últimos participan a través de la transactivación y formando parte del entrecruzamiento de rutas donde participa Ras/Raf/Mek/Erk y Src/PI3K (Kandel y Hay, 1999). Esta señalización río abajo de Ras, que es una proteína conocida como factor directo activador de cambio de nucleótido, regula distintas respuestas celulares aparentemente conflictivas dado que son contrarias, entre las que se encuentran proliferación, apoptosis, arresto celular, diferenciación y senescencia la cuales dependerán de la duración y la fuerza del estímulo externo e incluso del tipo celular (Zimmerman y Moelling 1999). Por otro lado, donde participa PI3K río abajo, Ras regula estas respuestas celulares actuando de manera sinérgica o contraria a la vía de las proteínas

Raf. La coordinación de estas dos vías en una sola célula dependerá del tipo celular y el estado de diferenciación o fase mitogénica celular (Manning y Cantley 2007).

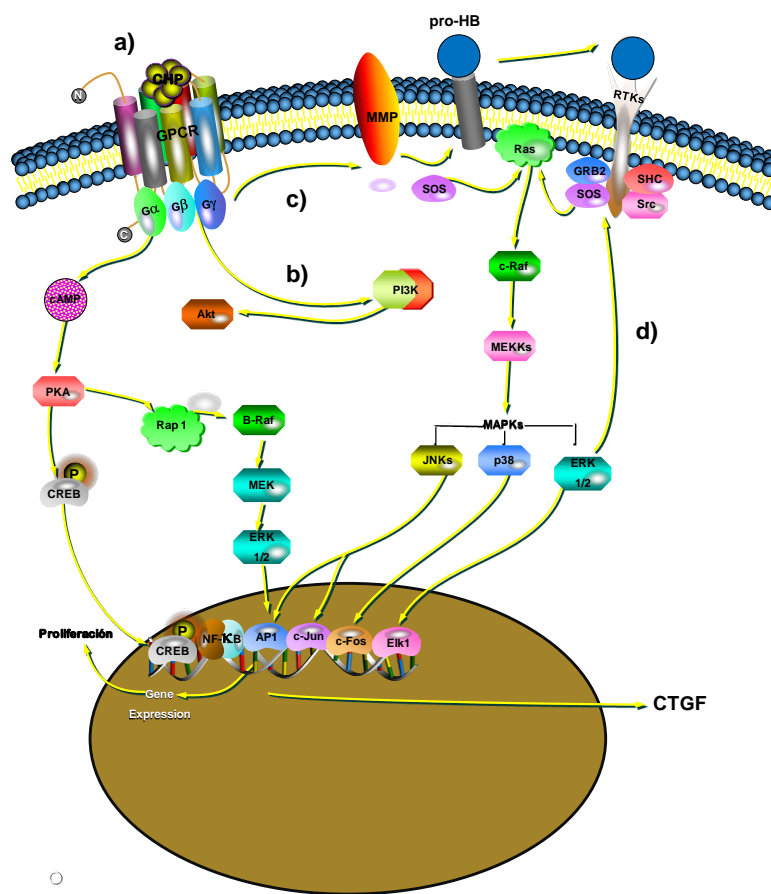
A pesar de que el nivel de actividad de AKT/PKB no mostró claridad sobre la acción de CHP directamente sobre GPER-1 debido a su participación en distintas rutas de señalización, las observaciones en el presente estudio sobre el nivel de proliferación celular y la aparente disminución en un 35% del gen CTGF, indican una posible acción estrogénica a través de GPER-1.

Bajo esta perspectiva, será necesario el seguimiento del rastreo específico de moléculas de señalización y los posibles blancos directos que ayuden a determinar de forma contundente la acción xenoestrogénica de CHP, ya que en la actualidad CHP se ha convertido en un blanco de estudio sobre efectos estrogénicos (Ventura *et al.*, 2012; Canesi *et al.*, 2011; Rauh *et al.*, 2011; Egeghy *et al.*, 2011) que sugieren su acción disruptora. Este hecho aun no es del todo claro, principalmente por la disparidad de respuestas que se presentan sobre modelos celulares responsivos a hormonas, así como las respuestas fisiológicas presentadas en distintos grupos de animales silvestres que están en contacto directo con el compuesto CHP. Así mismo, parte de ello deriva de la multivariedad de posibilidades coordinadas en distintos tipos celulares además de que las mismas vías pueden llevar a cabo acciones contrarias como el caso de AKT/PKB que, al estar fosforilada, es capaz de inhibir la ruta proliferativa Ras/Raf/Mek/Erk a nivel de proteínas Raf río abajo de cualquiera de los tres tipos de receptores mencionados y no exclusivos de estrógenos, ya que algunos factores de crecimiento o citocinas son capaces de activar la misma vía.

Particularmente la ruta Raf posee una serie de características específicas que detonan señalización celular, la más relevante hasta ahora se encuentra en el sitio específico de fosforilación en el amino terminal de c-Raf o B-Raf, ambos compartiendo la Ser<sup>364</sup> conservada y punto directo de fosforilación por parte de AKT/PKB. Al mismo tiempo, B-Raf forma parte de la de la señalización que se lleva a cabo por la acción de la subunidad  $\alpha$  de GPCRs (que bien podría ser GPER-1) y que no forma parte del entrecruzamiento de rutas ni la trasactivación de receptor, pero se encuentra río abajo de la AC y es hasta ahora la prueba pública de que CHP es capaz de aumentar sus niveles.



Por otro lado c-Raf es blanco de tanto del RTK, GPCR y ER $\alpha$  membranaral por la consecuente trasactivación y entrecruzamiento de rutas y, dada la evidencia de que CHP influye (aunque no de manera clara) sobre la actividad de AKT/PKB, en el presente trabajo se propone un modelo de transducción de señal por parte de CHP unido a GPER-1 dando como puntos clave la acción de las proteínas Raf y Erk como blancos más específicos de la respuesta celular disruptora que CHP. Los niveles de Erk detonan la retroalimentación negativa de la inhibición de la ruta por la activación otras proteínas como Sos, quien participa en la activación de Ras y sus intreracciones determinaran la respuesta celular especifica.



**Fig. 20. Ruta de señalización hipotética llevada a cabo por el compuesto organofosforado CHP.** Si clorpirifos tuviese la capacidad unirse al sitio de unión del receptor GPER-1, al igual como lo hace E<sub>2</sub>, entonces este podría desencadenar las señales que se llevan a cabo por parte de la subunidad  $\alpha$  **a)** teniendo efecto sobre el aumento de AMPc y subsecuente activación de AC que río abajo dará lugar a la fosforilación de CREB y transcripción génica de AP1, c-fos o c-jun involucradas en proliferación y subsecuente expresión de CTGF. Por otro lado, la subunidad  $\beta\gamma$  **b)** lleva a cabo la activación directa de PI3K y la fosforilación de AKT. Así mismo, esta ruta puede dar lugar a la **c)** transactivación del receptor y activar proteínas Src/Ras/Raf y vías MAPK que activan genes específicos como ERK 1/2 involucrados también con proliferación. Así mismo los niveles de ERK1/2 retroalimentan la actividad de **d)** SOS y de esta manera regular el momento de dicha respuesta.

## 9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos muestran que  $E_2$  está involucrado sobre respuesta proliferativa por la vía del receptor GPER-1 ya que el co-tratamiento con el antagonista G15 inhibió la proliferación de las células MCF-7 tratadas, pero no abatió el efecto proliferativo, lo que sugiere también que parte de la respuesta basal se lleva a cabo por la vía clásica esteroidea donde participan  $ER\alpha$  y  $ER\beta$  y es la ruta clásicamente conocida como preferencial a  $E_2$ .

CHP en tres concentraciones micromolares distintas (10, 25 y 50) mostró a partir de las 72 hrs un efecto proliferativo distinto al grupo no tratado. Así mismo, estas se comportaron de manera indistinta entre ellas.

La combinación del agonista G15 co-tratado con la máxima dosis propuesta de CHP resultó ser distinto al grupo control a partir de las 96 h. Así mismo, este mismo grupo mostró disminución al tratamiento sólo con CHP sin embargo, no resultó ser significativamente distinto. Por lo anterior, se sugiere que probablemente CHP puede llevar a cabo una interacción directa con el receptor GPER-1.

De manera semicuantitativa, tanto  $E_2$  como CHP, en ausencia o presencia de G15, no mostraron efectos sobre el nivel de expresión de los genes  $ER\alpha$  y  $ER\beta$  después de 24 h de tratamiento. Posiblemente el efecto sobre la expresión pueda observarse a tiempos mayores y se recomienda utilizar qPCR para su determinación.

La expresión de CTGF se vio disminuida en un 35% al tratar a las células con CHP+G15 respecto al tratamiento con CHP. Lo anterior sugiere que esta respuesta puede estar mediada por la unión directa de CHP al receptor GPER-1.

No se observaron cambios en la activación de la proteína AKT/PKB con ninguno de los tratamientos probados. Será necesario continuar con estudios sobre la vía de señalización a través del estudio de proteínas río arriba o río abajo, dado que AKT/PKB es una proteína blanco de distintas rutas de señalización, donde participan receptores distintos al GPER-1.

## 10. EPÍLOGO

Los plaguicidas son productos químicos empleados por el hombre para el control de plagas agrícolas y su aplicación correcta hasta el momento es la medida más aceptada y efectiva para lograr la máxima producción y mejor calidad de los cultivos (Ferrer y Cabral 1993). Lo anterior ha propiciado el progreso de la industria del agroquímico derivando a su vez en un aumento en la cantidad de compuestos con una alta agresividad para el hombre y los efectos nocivos que desequilibran el ecosistema. En mayor o menor grado, la población humana está inevitablemente expuesta a los plaguicidas que contribuyen a la contaminación ambiental por medio de los productos degradados en suelo, agua, aire y alimentos (CICOPLAFEST, 2004). CHP es uno de la miríada variedad compuestos que en la actualidad son utilizados en la agricultura, incluso existe evidencia de que puede hacer sinergia con algunos otros compuesto organofosforados como el diazinon sobre la expresión de genes relacionados con detoxificación, estrés o inmunidad inhata (Viñuela *et al.*, 2010). Es una realidad que muchos de ellos no tienen una reglamentación rigurosa y estricta sobre su venta y uso en nuestro país (México) o alrededor del mundo. De manera personal, puedo dar testimonio real de dicha aseveración dado que he visitado expendios de agroquímicos en el estado de Querétaro preguntando por este compuesto y, aunque no se vende de manera pura, no cuenta con restricción o permiso especial para su uso, compra y/o aplicación. Incluso no existe un manejo adecuado sobre la información de su uso ya que las hojas técnicas de manejo no son proporcionadas por los proveedores.

Las consecuencias de un mal uso de este tipo de compuestos no sólo afecta a las personas y organismos vivos que estén en contacto directo con ellos, sino también a quienes consumen alimentos tratados con ellos y a los propios ecosistemas ya que las interacciones bióticas resultarán en fenómenos complejos de bioabsorción, biacumulación y biomagnificación. Debido a lo anterior, es de muy importante considerar que tanto la industria química productora de los compuestos químicos, los agrónomos y campesinos así como instituciones de salud, OMS, FAO, SAGARPA, SEDESU y SEMARNAT deben de poner un énfasis especial y detallado sobre su uso y aplicación. Mientras CHP y los múltiples compuestos químicos que estén presentes en la naturaleza dada su aplicación desmesurada y poca regulación, las afecciones a nivel de la salud de los ecosistemas y los organismos seguirán en aumento. Tal es el caso del

cáncer mamario y todos aquellos que estén relacionados con las hormonas de tipo esteroide.

Por otro lado, a pesar del daño que se ha hecho durante mucho tiempo a los ecosistemas, actualmente existen estudios para la bioremediación y degradación de compuestos tóxicos químicos. Tal es un estudio realizado por Lee *et al.* (2012) en el que se descubrieron especies de árboles riparios como el alamo *Salix* y el sauce *Populus* los cuales sirven como una buena herramienta de fitorremediación ya que tienen la capacidad de acumular y degradar CHP en algunos de sus tejidos. Así mismo, los esfuerzos naturales al combate y remediación de la contaminación también se hace presente en microorganismos tales como bacterias del género *Pseudomonas*, las cuales a pH de 6.7 y ambientes mineralizados tienen la capacidad de utilizar a CHP como fuente de carbono y así metabolizarlo desapareciéndolo del suelo (Singh *et al.*, 2003), Sin embargo, las acciones remediales, tanto artificiales como naturales, están sujetas a otros elementos de los suelos y algunas interacciones entre consorcios bacterianos y hongos.

Particularmente, los seres humanos podemos contribuir aplicando algunas otras alternativas de restricción al uso de agroquímicos como CHP. Por ejemplo, el uso de tecnologías de traspatio sobre el biocultivo de los propios alimentos, el uso de plaguicidas no químicos o bioplaguicidas hechos a base de los mismos extractos de plantas, el manejo de plagas como control biológico mediante uso de insectos y, por último, la agroecología que fomenta y apoya al desarrollo sustentable de los recursos bióticos.

## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acconcia F, Marino M. 2003. Synergism between genomic and non genomic estrogen action mechanisms. *International Union Biochemistry Molecular Biology life*. 55(3):145-150.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry. (ATSDR) Division of Toxicology and Environmental Medicine, 1997). <http://www.atsdr.cdc.gov/dtem/index.html>. Consultado por última vez Diciembre 2012.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) Toxicological profile for chlorpyrifos. 1997. Atlanta (GA): U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp84.html>. Fecha de consulta, Mayo 2011.

Albert LA. 1996. Persistent pesticides in México. *Reviews of Environmental Contamination Toxicology* 147:1-44

Alexaki VI, Charalampopoulos I, Kampa M, Vassalou H, Theodoropoulos P, Stathopoulos EN, Hatzoglou A, Gravanis A, Castanas E. 2004. Estrogen exerts neuroprotective effects via membrane estrogen receptor and rapid AKT/NOS activation. *FASEB J*. 18:1594-1596.

Andersen RH, Vinggaard AM, Rasmussen TH, Gjermansen MI, Bonfeld-Jorgensen CE. 2002. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity and aromatase activity in vitro. *Toxicology and applied Pharmacology* 179:1-12.

Andrei NT, Mena MA. 2006. Efectos diferidos de contaminantes ambientales y otros agentes en salud reproductiva y sexualidad: Un desafío pendiente de la toxicología de la reproducción para la salud de las futuras generaciones. *Cuadernos Médicos* 46(3):176-194.

Anguiano OL y Pechen de D'Angelo AM. 2007. La problemática de los agroquímicos y sus envases, la evidencia en la salud de los trabajadores, la población expuesta y el ambiente. Ministerio de salud secretaria de ambiente y desarrollo sustentable. OPS. AAMMA, Buenos Aires Argentina. pp.181-210.

Argemi F, Cianni N, Porta A. 2005. Disrupción endocrina: Perspectivas ambientales y salud pública. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamérica* 39(3):291-300.

Aronica SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS. 1994. Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91:8517-8521.

- Ascenzi P, Boced A, Marino M. 2006. Structure relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Molecular Aspects Medical*. 27(4):299-402.
- Bellacosa AB, Testa JR, Staal S, Tschlis PN. 1991. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* 254:274-277.
- Benachour N, Moslemi S, Sipahutar H, Seralini G. 2007. Cytotoxic effects and aromatase inhibition by xenobiotic endocrine disrupters alone and in combination. *Toxicology and Applied Pharmacology* 222:129-140.
- Berge-Santibañez ND. 2004. Estimación del destino de los pesticidas empleados en sistemas agroforestales de la cuenca del estero Peupeu en la comunidad de Lautaro IX región. Tesis de Maestría de la Facultad de Ciencias. Universidad Católica de Temuco. Chile. p 57.
- Blom A, Ekman E, Johannisson A, Norrgren L, Pesonen M. 1998. Effects of xenoestrogenic environmental pollutants on the proliferation of a human breast cancer cell line MCF-7. *Archives of Environmental Toxicology*. 34:306-310
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. 1991. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349:117-127.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analysis Biochemistry* 72:248-254.
- Bunnell TM, Burbach BJ, Shimizu Y, Ervasti JM.  $\beta$ -actin specifically controls cell growth, migration and G actin pool. *Molecular Biology Cell* 22(21): 4047-58.
- Canesi L, Negri A, Barmo C, Banni M, Gallo G, Viarengo A, Dondero F. 2011. The organophosphate Chlorpyrifos interferes with the responses to 17  $\beta$ -estradiol in the digestive gland of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *PLOS ONE*. 6(5):19803.
- Carabias J. 1988. Deterioro ambiental en México. *Revista de difusión. Ciencias* 13-19.
- Carroll JS, Brown M. 2006 Estrogen receptor target gene: an evolving concept. *Molecular Endocrinology* 20:1707-1714
- Carvalho FP, Fowler SW, González-Farías F, Mee LD, Readman JW. 1996. Agrochemical residues in the Altata-Ensenada del Pabellón Coastal Lagoon (Sinaloa, Mexico): a need for integral coastal zone management. *Environmental Research Perspectives Journal* 6: 209-220.

Ceballos C, Hernández-Rodríguez NR. 2008. Moduladores de progresión en cáncer de mama. *Cancerología* 3:41-49.

Chen PS, Wang MY, Wu SN, Su JL, Hong CC, Chuang SE, Chen MW, Hua KT, Wu YL, Cha ST, Babu MS, Chen CN, Lee PH, Chang KJ, Kuo ML. 2007. CTGF enhances the motility of breast cancer cells via an integrin- $\alpha$ 3-ERK1/2-dependent S100A4-up-regulated pathway. *Journal of Cellular Science* 120:2053-2065.

Cheng L, Zhihong Y, Wang X, Jiao Y, X Xie, Lin J, Zhang H, Han J, Jiang K, Ye Q. 2011. Suppression of estrogen receptor transcriptional activity connective tissue growth factor. *PLOS ONE* 6(5):e20028.

Chiou C, Freed V, Schimmedding D, Khoenert R. 1977. Partition and bioaccumulation factor. *Environmental ScienceTechnology* 11: 475-478.

CICOPLAFEST. 2004. Catálogo oficial de plaguicidas. Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. SEMARNAP, SECOFI, SAGAR y SSA, México D.F. pp. 55-64.

Cocker J, Manson HJ, Garfh SJ, Jones K. 2002. Biological monitoring of exposure to organophosphate pesticides. *Toxicology Letters* 134:97-103.

Colborn T, Saal ES, Vom, Soto AM. 1993. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives* 101:378-384.

Coser KR, Witnner BS, Rosenthal NF, Collins SC, Melas A, Smith SM, Mohoney CJ, Shioda K, Isselbacher HJ, Ramaswamy S, Shioda T. 2009. Antiestrogen-resistant subclones of MCF-7 human breast cancer cell are derived from a common monoclonal drug resistant progenitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106(34):14536-14541.

Crupton TL, Seidler FJ, Slotkin TA. 2000. Developmental neurotoxicity of CHP in vivo e in vitro: effects on nuclear transcription factor involved in cell replication and differentiation. *Brain Research*. 28:857(1-2):87-98.

Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. 1999. Cellular survival: a play in three Acts. *Genes* 13:2905-2927.

De la Fuente EB, Suarez AS. 2008. Problemas ambientales asociados a la actividad humana: la agricultura. *Ecología Austral Asociación Argentina de Ecología*. pp 239-252.

Dennis MK, Burai R, Ramesh C, Petrie WK, Alcon SN, Nayak TK, Bologna CG, Leitao A, Brailoiu E, Deliu E, Dun JN, Sklar LA, Hathaway HJ, Arterburn JB, Oprea TI, Prossnitz ER. 2009 In vivo effects of a GPR30 antagonist. *Nature Chemical Biology* 5:421-427.

Denslow N, Sepúlveda M. 2007. Capítulo 10. Ecotoxicology effects of endocrine disrupting compounds on fish reproduction. *The Fish Oocyte: From Basic Studies to Biotechnological Applications*. Springer Link. pp 255-322.

Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon JP, Giudice LC, Haurse R, Prins GS, Soto AM, Zoeller T, Gore AC. 2009. Endocrine-disrupting chemicals: An endocrine society scientific statement. *Endocrine Reviews* 30(4):293-342.

Dinham B. 1994. Review of the global pesticide market, interim report. Presenting the evidence. The Pesticide Trust., London. pp 19-29.

Domagalski JL, Kuivila KM. 1993. Distributions of pesticides and organic contaminants between water and suspended sediment, San Francisco Bay, California. *Estuaries* 16 (3A): 416-426.

Dong S, Teresak S, Kyama R. 2010. Bisphenol A induces a rapid activation on ERK1/2, through GPR30 in human cancer cells. *Environmental Pollution* 159:212-218.

Downward, J. 1998. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Current Opinion in Cell Biology* 10:262-267.

Duax WL, Griffin JF, Weeks CM, Wawrzak 1988. The mechanism of action of steroids antagonist: insights from crystallographic studies. *Journal Steroid Biochemistry* 31(4B):481-492.

Eaton DL, Daroff RB, Autrup H, Bridges J, Bunffles P, Costa LG, Coyle J, McK-Hann G, Mobley WC, Nadel L, NeubertD, Schulte-Hermann R, Spencer PS. 2008. Review of toxicology of Chlorpyrifos with emphasis on human exposure and neurodevelopment. *Critical Reviews in toxicology* 38(2):1-125.

Egeghy, P. P., Cohen Hubal, E. a, Tulve, N. S., Melnyk, L. J., Morgan, M. K., Fortmann, R. C., & Sheldon, L. S. 2011. Review of pesticide urinary biomarker measurements from selected US EPA children's observational exposure studies. *International journal of environmental research and public health*, 8(5), 1727–54.



Falkenstein, E., Tillmann, H.C., Christ, M., Feuring, M., Wehling, M., 2000. Multiple actions of steroid hormones: a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacology Reviews*. 52, 513–556.

Ferrer A, Cabral R. 1993. Collective poisoning caused by pesticides: mechanism of production, mechanism of prevention. *Reviews of Environmental Toxicology* 5:161-201.

Filardo EJ. 2002. Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 80(2):231-8.

Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR Jr. 2000. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via transactivation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Molecular Endocrinology* 14:1649-1660.

Filardo EJ, Quinn JA, Frackelton AR Jr, Bland KI. 2002. Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Molecular Endocrinology* 16:70-84.

Gore AC. 2002. Organochlorine pesticides directly regulate gonadotropin-releasing hormone gene expression and biosynthesis in the GT1-7 hypothalamic cell line. *Molecular and cellular Endocrinology*. 192:157-170.

Guan KL, Figueroa C, Brtva RT, Zhu T, Taylor J, Barber TD, Vojtek AB. 2000. Negative regulation of the serine/Threonine kinase B-raf by AKT. *The Journal of Biological Chemistry* 275:27354-27359.

Grunfeld, H.T., and Bonfeld-Jorgensen, E.C. 2004. Effect of in vitro estrogenic pesticides on human oestrogen receptor alpha and beta mRNA levels, *Toxicol. Lett.* 151, 467-480.

Hutchinson TH, Pickford DB. 2002. Ecological risk assessment and testing for endocrine disruption in the aquatic environment. *Toxicology* 181-182:383-387.

Improta-Brears T, Whorton AR, Codazzi F, York JD, Meyer T, McDonnell DP. 1999. Estrogen induced activation of mitogen activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS) USA* 96:4686-4691.

- Jacobi JS, Martin C, Nava G, Jeziorski MC, Clapp C, Martínez de la Escalera G. 2007. 17-Beta-estradiol directly regulates the expression of adrenergic receptors and kisspeptin/GPR54 system in GT1-7 GnRH neurons. *Neuroendocrinology* 86(4):260-269
- Jacobs MN, Lewis DF. 2002. Steroid hormone receptors and dietary ligands: a selected review. *Proceedings of the Nutrition Society* 61(1):105-122.
- Jiang Y, Wang XT, Wu M, Sheng GY, Fu-Ji M. 2011. Contamination source identification and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in agricultural soil of Shanghai China. *Environmental Monitoring Assessment*. Springer doi 10.1007/s10661-011-1913-1.
- Kandel ES, Hay N. 1999. The Regulation and Activities of the Multifunctional Serine/Threonine Kinase Akt/PKB. *Experimental Cell Research* 229:210-229.
- Kard BM, McDaniel CA. 1993. En: Pesticides in Urban environment: Fate and significance. Ed. K. Dr Racke y Liensi ASC. *Symposium series 5222 American Society, Washington DC*. pp 46-61.
- Kennedy AM, Shogren KL, Zhang M, Turner RT, Spelsberg TC, Maran A. 2005. 17beta-estradiol-dependent activation of signal transducer and activation of transcription-1 in human fetal osteoblast is dependent on Src kinase activity. *Endocrinology* 146:201-207.
- Kidd HJ. 1991. *The Agrochemicals Handbook*, 3rd ed. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, UK. pp. 1791–1800.
- Laemmli UK. 1970. Standard Laemmli Gel Solutions: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lagrange AH, Ronnekleiv OK, Kelly MJ. 1997. Modulation of G protein-coupled receptors by an estrogen receptor that activates protein kinase A. *Molecular Pharmacology* 51:605-612.
- Lappano R, Rosano C, De Marco P, De Franco EM, Pezzi V, Maggiolini M. 2009. Molecular and Cellular Endocrinology Estriol acts as a GPR30 antagonist in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 320(1-2):162-170.
- Le Maire A, Bourguet W, Balaguer P. 2010. A structural view of nuclear hormone receptor: endocrine disruptor interactions. *Cellular Molecular Life Science* 67:1219-1237.
- Lee KY, Strand SE, Doty SL. 2012. Phytoremediation of chlorpyrifos by *Populus* and *Salix*. *International Journal of Phytoremediation* 14 (1):48-61.

Lee YR, Park J, Yu HN, Kim JS, Youn HJ, Jung SH. 2005. Up-regulation of PI3K/Akt signaling by 17beta-estradiol through activation of estrogen receptor-alpha, but not estrogen receptor-beta, and stimulates cell growth in breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 336(4):1221-6.

Leyva-Morales JB. 2009. Identificación de plaguicidas en agua del río Culiacán. Tesis de Maestría. Unidad Culiacán en Ciencia y Tecnología de Productos Agrícolas para Zonas tropicales y Subtropicales. Universidad Autónoma de Nayarit. pp 13, 26.

Li Y, Birnbaumer L, Teng T. 2010 Regulation of ERR gene expression by estrogen receptor agonist an antagonist in SKBR3 breast cancer cells: Differential molecular mechanism mediated by G Protein Coupled receptor GPR30/GPER-1. *Molecular Endocrinology* 24:969-980.

Li DM, Sun H. 1998. PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *Proceedings of National Academy Sciences. USA* 95:15406-15411.

Maggiolini M, Picard D. 2010. The unfolding stories of GPR30, a new membrane bound estrogen receptor. *Journal of Endocrinology* 204:105-114.

Maggiolini M, Vivacqua A, Fasanella G, Recchia AG, Sisci D, Pezzi V, Montanaro D, Musti AM, Picard D, Andó S. 2004. The G protein coupled receptor GPR30 mediates c-fos up-regulation by 17 $\beta$ -estradiol and phytoestrogens in breast cancer cells. *Journal Biology and Chemistry*. 279: 27008-27016.

Manning BD, Cantley LC. 2007. AKT/PKB signaling navigating downstream. *Cell* 129:1261–1274.

Martínez-Valenzuela C, Gómez-Arroyo S. 2007. Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores Agrícolas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 23(4):185-200.

Matozzo V, Gagné F, Gabriella M, Ricciardi F, Blaise, C. 2008. Vitellogenin as a biomarker of exposure to estrogenic compounds in aquatic invertebrates. *Environment International* 34:531-545.

Mee LD, Readman JW, Carranza-Frazer J, Gonzalez-Farias E. 1991. Fate of agrochemicals in tropical coastal lagoon ecosystems, International Scientific Cooperation. In Consolidated Report of Activities 1986-90, EEC-Mexico (DG for Science, Research and Development, Publication EUR 13970), EEC, Brussels. pp 113-117.

Mei FC, Qiao J, Tsygankova OM, Meinkoth JL, Quilliam LA, Cheng X. 2002 Differential signaling of cyclic AMP: opposing effects of exchange protein directly activated by cyclic AMP and cAMP-dependent protein kinase on protein kinase B activation. *Journal of Biological Chemistry* 277:11497-11504.

Mekebri A, Crane DB, Blondina GJ, Oros DR, Rocca JL. 2008. Extraction and analysis methods for the determination on piretroid insecticides in surface water, sediments and biological tissues at environmentally relevant concentration. *Bulletin Environmental Contaminant Toxicology*. 80:455-460.

Newman MC, Unger MA. 2003. *Fundamentals of ecotoxicology*. 2ed. Lewis publishers EUA. p 41.

Nugoli M, Chuchana P, Vendrell J, Orsetti B, Ursule L, Nguyen C, Birnbaum D. 2003. Genetic variability in MCF-7 sublines: evidence of rapid genomic and RNA expression profile modifications. *BioMed Central Cancer* 3:13.

OMS Organización Mundial de la Salud 2003. *Boletín Epidemiológico/OPS*, Vol. 23, No. 3. [http://www.paho.org/spanish/sha/EB\\_v23n3.pdf](http://www.paho.org/spanish/sha/EB_v23n3.pdf). Consultado por última vez Enero 2012.

Orlando EF, Guillette Jr LJ. 2002. Developmental and reproductive abnormalities associated with endocrine disruptors in wildlife. *Endocrine Disruptors Part II. The Handbook of Environmental Chemistry Vol. 3M* p 263.

Osuna-López JI, Frías Espericueta MG, Zazueta-Padilla HM, López López G. 1998. Plaguicidas organofosforados en sedimentos del pacifico subtropical Mexicano. *Informe Técnico Académico. Proyecto CONACyT 0185PT*. pp 193-205.

Pandey DP, Albanito L, Maggiolini M, Picard D. 2009. Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF. *EMBO Journal* 28(5): 523-532.

Payne JF, Mathieu A, Melvin W, Fancey L. 1996. Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Marine Pollution Bolletin*. 32:225-231

Plimmer J. 1992. Dissipation of pesticides in the environment, Cap. 4:79-90, En: J. Schnoor (Ed) *Fate of Pesticides and Chemicals in the Environment*. Environmental Science Technology. Wiley-Interscience Series. p 436

- Porte C, Escartín E, García de la Parra LM, Biosca X, Albaigés J. 2002. Assessment of coastal pollution by combined determination of chemical and biochemical markers in *Mullus barbatus*. *Marine Ecology* 235:205-216.
- Prossnitz ER, Maggiolini M. 2009 Mechanisms of estrogen signaling and gene expression via GPR30. *Molecular Cell Endocrinology* 308:32-38.
- Prossnitz ER, Oprea TI, Sklar LA, Arterburn JB. 2008. The ins and outs of GPR30: A transmembrane estrogen receptor. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 109:350-353.
- Qiu J, Bosch MA, Tobias SC, Grandy DK, Scalan TS, Ronnekleiv OK, Kelly MJ. 2003. Rapid signaling of estrogen in hypothalamic neurons involves a novel G-protein estrogen receptor that activates protein kinase C. *Journal of Neuroscience* 307:1625-1630.
- Rasmussen TH y Nielsen JB. 2002. Critical parameters in the MCF-7 proliferation bioassays (E-screen). *Biomarkers*. Vol 7, 4:322-336.
- Rauh, V., Arunajadai, S., Horton, M., Perera, F., Hoepner, L., Barr, D. B., & Whyatt, R. 2011. Seven-year neurodevelopmental scores and prenatal exposure to chlorpyrifos, a common agricultural pesticide. *Environmental health perspectives*, 119(8), 1196–201.
- Ramamoorthy, K., Chen, I., Norris, J. D., Gaido, K. W., y Bocchinfuso, W. P. 2011. Potency of Combined Estrogenic Pesticides. *Science*, 405:1997.
- Readman JW, Wee Kwong L, Mee LD, Bartocci J, Nilve GJ, Rodriguez JA, González Farías. 1992. Persistent organophosphorus pesticides in tropical environments. *Marine Pollution Bulletin*. 24(8):389-402.
- Renoir JM, Boucleir C, Seguin A, Marsaud V, Sola B. 2008. Antiestrogen-mediated cell cycle arrest and apoptosis induction in breast cancer and multiple myeloma cells. *Journal of Molecular Endocrinology* 40:101-112.
- Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. 2005. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 307:1625-1630.
- Richards J, Imaga W, Balakrishnan A, Edey M, Nandy S. 1988. The lack of effect of phenol red on estradiol on the growth response of human and mouse mammary cells in primary culture. *Endocrinology*. 123(3):1335-1340.

Schimmel SC, Garnas RL, Patrick JM, Moore JC. 1983. Acute toxicity, bioconcentration and persistence of AC-222. 70s. Benthocarb, Chlorpyrifos, Fenvalerate, Methyl Parathion and Permethrin in the estuarine environment. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 31:104-113.

Shanle EK, Xu W. 2010. Endocrine Disrupting Chemicals Targeting Estrogen Receptor Signaling: Identification and Mechanisms of Action. *Chemical Research in Toxicology* 76:1234-1247.

Silva E, Kabil A, Kortenkamp A. 2010. Cross-talk between non-genomic and genomic signalling pathways-distinct effect profiles of environmental estrogens. *Toxicology and Applied Pharmacology* 245(2): 160-70.

Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK. 2000. Interaction of estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the rat pituitary, gonad and reproductive tract. *Steroids* 63:498-504.

Singh KB, Walker AJ, Morgan W, Duright JD. 2003. Effects of soil pH on the biodegradation of Chlorpyrifos and isolation of Chlorpyrifos degrading bacterium. *Applied and environmental microbiology* 69(9):5198-5206.

Slotkin TA, Seidler FJ, Ryde IT, Yanai J. 2008. Developmental neurotoxic effects of chlorpyrifos on acetylcholine and serotonin pathways in an avian model. *Neurotoxicology and Teratology* 30, 433-439.

Song X, Seidler FJ, Saleh JI, Zhang J, Padilla S, Slotkin TA. 1997. Cellular mechanism for developmental toxicity of Chlorpyrifos: Targeting the Adenyl Cyclase Signaling cascade. *Toxicology Applied Pharmacology* 145:158-174.

Soto AM, Justicia H, Wray JW, Sonnenschein C. 1991 Para-nonyl-phenol an estrogenic xenobiotic released from modified polystyrene. *Environmental Health Perspective* 92:167-173.

Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Serrano FO. 1995. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants, *Environmental Health Perspective* 103:113-122

Sousa LP, Lopes F, Silva DM, Tavares LP, Vieira AT, Rezende BM, Carmo AF, Russo RC, Garcia CC, Bonjardim CA, Alessandri AL, Rossi AG, Pinho V, Teixeira MM. 2010. PDE4 inhibition drives resolution of neutrophilic inflammation by inducing apoptosis in a PKA-

PI3K/Akt-dependent and NF-kappaB-independent manner. *Journal of Leukocyte Biology* 87(5):895-904.

Stahlschmidt-Allner P, Allner B, Rombke J, Knacke T. 1997. Endocrine Disrupter in the Aquatic Environment. *Environ Science & Pollution Research*. 4(3):155-162.

Starek A. 2003. Estrogens and organochlorine xenoestrogens and breast cancer risk. *Journal Occupational Medicine Environmental Health* 16:113-124.

Tabb MM, Blumberg B. 2006 New Models of action for endocrine-disrupting chemicals. *Molecular Endocrinology* 20(3):475-482.

Thomas P y Dong J. 2006 Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 102:175-179.

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

Torrence B, Fosbraey A. 1982. Determination of the vapour pressure of pesticides. *Pesticides Science* 13:269-278.

Tsai MJ, O'Malley BW. 1994. Molecular mechanism of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annual Reviews Biochemistry* 63:451-486.

USEPA. 2001. U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) Human health risk assessment: Chlorpyrifos. Office of Pesticide Programs, Health Effects Division 7509C. [http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2008/september/hed\\_ra.pdf](http://www.epa.gov/scipoly/sap/meetings/2008/september/hed_ra.pdf). Consultado por ultima vez. Diciembre 2012.

US EPA. 2000. US EPA, 2001 Removal of Endocrine Disruptor Chemicals Using Drinking Water Treatment Processes, Technology Transfer Report No. EPA/625/R-00/015, The National Risk Management Research Laboratory, Office of Research and Development, US Environmental Protection Agency. <http://nepis.epa.gov>. Consultado por última vez Diciembre 2012.

US EPA. 2001. U.S. Environmental Protection Agency (USEPA) Interim reregistration eligibility decision for chlorpyrifos. Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7508C), EPA

738-R-01-007. [http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/chlorpyrifos\\_red.pdf](http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/chlorpyrifos_red.pdf). Consultado por última vez. Diciembre 2012.

Ventura C, Núñez M, Miret N, Lamas DM, Randi A, Venturino A, Rivera E. 2012. Differential mechanisms of action are involved in chlorpyrifos effects in estrogen-dependent or -independent breast cancer cells exposed to low or high concentrations of the pesticide. *Toxicology Letters* 75: 1-10.

Villalobos M, Olea N, Brotons JA, Serrano O, FM, Almodovar JMR, Pedraza V. 1995. The E-screen assay: A comparison of different MCF7 cell stocks. *Environm Health Perspective* 103:844-850.

Viñuela A, Snoek LB, Riksen JAG, Kammenga JE. 2010. Genome-Wide Gene Expression Analysis in Response to Organophosphorus Pesticide Chlorpyrifos and Diazinon in *C. elegans*. *PLOS ONE* 5(8):e12145.

Vivacqua A, Bonofiglio D, Recchia AG, Musti AM, Picard D, Andò S, Maggiolini M. 2006. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17 $\beta$ -estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells. *Mollecular Endocrinology* 20:631-646

Vizcaino Murray F. 1986 *La contaminación en México*. Fondo de Cultura Económica. México 1ra Ed. p 499

Vojtek AB, Hollenberg SM, Cooper JA. 1993. Mammalian ras interacts directly with the serine/threonine kinase raf. *Cell* 74:205-214.

Wang D, Hu L, Zhang L, Chen C. 2010. G protein-coupled receptor 30 in tumor development. *Endocrine* 38:29-37.

Waters JJ, Campell JS, Cunningham MJ, Krebs EG, Dorsa DM. 1997. Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells, effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signaling cascade and c-fos immediate early gene transcription. *Endocrinology*. 138:4030-4033.

Watson CS, Yow-Jun J, Guptarak KJ. 2011. Endocrine disruption via estrogen receptor that participant in nongenomic signaling pathways. *Journal of Steroid Biochemistry* 127(1-2):44-50.

Wong PS, Li W, Vogel CF, Matsumura F. 2009. The Arylhydrocarbon receptor (AhR). *BioMed Central Cancer* 15:1–15.



Zazueta Padilla HM. 2003. Tesis de Maestría. Distribución de plaguicidas organofosforados en sedimentos y suelos adyacentes del sistema laguna Altata-Ensenada de Pabellón. Posgrado Interinstitucional de Ciencias Pecuarias. Universidad Autónoma de Nayarit.

Zhang D, Trudeau VL. 2006. Integration of membrane and nuclear estrogen receptor signaling. *Comparative Biochemistry and Physiology* 144:306-315.

Zimmerman S, Moelling K. 1999. Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (Protein Kinase B). *Science* 286:1741-1744.

## 12. ANEXOS

### 12.1 Glosario:

**Acetilcolina:** Ester del ácido acético de la base orgánica colina, secretada normalmente en las terminaciones de muchas neuronas, de ella depende la transmisión del impulso nervioso en la sinapsis.

**Agonista:** Sustancia que es capaz de unirse a un receptor celular y provocar una respuesta en la célula con el fin de estimular una función, ya sea específica o adversa, en el caso de reacciones que no se quieren observar

**Agricultura:** La agricultura es la labranza o cultivo de la tierra e incluye todos los trabajos relacionados al tratamiento del suelo y a la plantación de vegetales. Las actividades agrícolas suelen estar destinadas a la producción de alimentos y a la obtención de verduras, frutas, hortalizas y cereales.

**Antagonista:** tipo de fármaco que al unirse a un receptor celular no provoca una respuesta biológica, pero bloquea o detiene respuestas mediadas por agonistas.

**ARN:** (Ácido ribonucleico), ácido nucleico que contiene un azúcar ribosa, se encuentra en el núcleo y citoplasma y tiene importancia primordial en la síntesis de proteínas.

**Bioacumulación:** Aumento progresivo, en función del tiempo, de la concentración en un organismo de una sustancia que procede de su ambiente.

**Biomagnificación:** Tendencia de algunos productos químicos a acumularse a lo largo de la cadena trófica, exhibiendo concentraciones sucesivamente mayores al ascender el nivel trófico. La concentración del producto en el organismo consumidor es mayor que la concentración del mismo producto en el organismo consumido

**Cadena Trófica:** proceso de transferencia de sustancias nutritivas a través de las diferentes especies de una comunidad biológica, en el que cada uno se alimenta del precedente y es alimento del siguiente. También conocida como cadena alimentaria, es la corriente de energía y nutrientes que se establece entre las distintas especies de un ecosistema en relación con su nutrición.

**Carbamatos:** Carbamatos son compuestos orgánicos derivados del ácido carbámico (NH<sub>2</sub>COOH). Tanto los carbamatos, como los ésteres de carbamato, y los ácidos carbámicos son grupos funcionales que se encuentran interrelacionados estructuralmente y pueden ser interconvertidos químicamente. Los ésteres de carbamato son también llamados uretanos.

**Esconterria:** Retorno de las aguas pluviales al mar. Esguerrimiento del agua de lluvia sobre la corteza terrestre.

**Estrogénico:** Todo compuesto, de la naturaleza química, sintético o no, que sea capaz de generar el estro en un animal hembra.

**Estrógeno:** Calquiera de las hormonas sexuales femeninas producidas por el folículo ovarico que estimula el desarrollo de caracteres sexuales secundarios.

**Fosforilación:** Introducción de un grupo fosfato en una molécula orgánica.

**Hormonas:** Substancias que son transportadas por el torrente sanguíneo a células en otra parte donde regulan y coordinan sus actividades.

**Lixiviación:** o extracción sólido-líquido, es un proceso en el que un disolvente líquido pasa a través de un sólido pulverizado para que se produzca la elución de uno o más de los componentes solubles del sólido.

**Metabolismo:** Suma de procesos físico-químicos de la célula o de un organismo que realiza para el mantenimiento óptimo de su vida.

**Organoclorado:** compuesto por un esqueleto de átomos de carbono, en el cual, algunos de los átomos de hidrógeno unidos al carbono han sido reemplazados por átomos de cloro, unidos por enlaces covalentes al carbono.

**Organofosforado:** Es un un grupo de químicos usados como plaguicidas artificiales aplicados para controlar las poblaciones de plagas de insectos.

**Piretroides:** Los piretroides son moléculas con actividad insecticida que se aplican a cosechas, plantas de jardines, animales domésticos y también directamente a seres humanos. Son sustancias químicas que se obtienen por síntesis y poseen una estructura

muy parecida a las piretrinas. Generalmente son compuesto más tóxicos para los insectos y también para los peces. Permanecen durante más tiempo en el medio ambiente que las piretrinas ya que la modificación química en su fórmula los hace más estables a la luz solar y el calor. Se hidrolizan por álcalis (en las formulaciones se utilizan derivados de petróleo como disolventes).

**Receptor acoplado a proteína G:** También conocidos como receptores transmembrana de siete dominios, receptores 7TM, receptores heptahelicoidales, receptor serpentina, y receptores ligados a proteínas G (GPLR, del inglés: *G protein-linked receptors*), comprenden una gran familia de proteínas de receptores transmembrana que perciben moléculas afuera de la célula y activan las vías de transducción de señales y finalmente, las respuestas celulares.

**Receptor de estrógeno:** grupo de receptores celulares que son activados por la hormona denominada  $17\beta$ -estradiol o estrógeno. Se han descrito dos tipos de receptores de estrógeno: ER, que es un miembro de la familia de los receptores nucleares, y el receptor de estrógeno acoplado a proteínas G GPR30 (GPER), que pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G.

**Sinergia:** Acción conjunta de dos o más agentes, por la cual se obtiene un resultado que no sería alcanzado por la acción se separada de los mismos. Cuando se habla de contaminación se emplea para indicar los casos en que dos o varios contaminantes, al estar unos en presencia de otros, se vuelven más tóxicos o logran una acción más severa que la de uno por separado.

**Teratogénico:** Capacidad de un agente físico o químico para causar malformaciones estructurales permanentes o alteraciones en el desarrollo del feto, es decir, defectos congénitos.

**Volatilización:** Capacidad de las sustancias disueltas en un medio líquido de transferirse hacia un medio gaseoso

**Xenobiótico:** Producto sintético u orgánico que no es utilizable en los ciclos biogeoquímicos naturales ni en el metabolismo de los seres vivos y que, sin embargo, puede ser objeto de transformaciones por parte de los mecanismos metabólicos de éstos (biotransformaciones).

## 12.2 Abreviaturas y Acrónimos:

AC, Adenilato Ciclasa  
AhR, Recepto Arhylhidrocarbon o  
AKT/PKB, Serine/Threonine Protein Kinase  
AMPc, Adenosin Monofosfato Cíclico  
AR, Receptor de andrógenos  
ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry  
CTGF, Factor de crecimiento tejido conectivo  
DEQ, Disruptores Endocrinos Químicos  
E2, Estradiol, 17 $\beta$ -estradiol  
E3, Estriol, Forma irreversible de E2  
EGFR, Epidermal Growth Factor Receptor/Receptor de factor de crecimiento epidermal  
EPA, Environmental Protection Agency  
ER, Receptor de Estrógenos  
ER $\alpha$  y Er $\beta$ , Receptores estrogénicos clásicos nucleares  
ERK, Extracelullar signal regulated kinase  
FAO, Food and Agriculture Organization  
G $\alpha$ , Subunidad de la proteina G  
G $\beta\gamma$ , Subunidad de la proteina G  
G1, Agonista de GPR30  
G15, Antagonista de GPR30  
GnRH, Hormona Liberadora de gonadotropinas  
GPER-1, Receptor Humano de GPR30  
GPR30/GPCR, Receptor transmembranal acoplado a proteina G.  
HB-EGF, Epidemal Growth Factor receptor- Heparan Bound  
ICI 182,780, Antagonista de GPR30  
INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía  
MAPK, Mitogen-activated protein kinase  
MCF-7, Línea celular epitelial de cáncer de mama  
OMS, Organización Mundial de la Salud  
PI3K, Phosphoinositide 3-kinase  
PKA, Proteina Cinase A  
PLC, Fosfolipasa C  
SKBR3, Línea celular de cáncer de mama