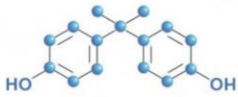


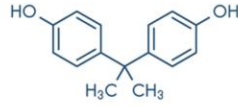


Bisphenol A impaired cell adhesion by altering the expression of adhesion and cytoskeleton proteins on human podocytes


Rafael Moreno-Gómez-Toledano, María I. Arenas, Clara González-Martínez, Nuria Olea-Herrero, Paula Reventún, Michele Di Nunzio, Sandra Sánchez-Esteban, Eduardo Arilla-Ferreiro, Marta Saura, Ricardo J. Bosch




Bisphenol A (BPA)




PVC pipes




Dentistry material




Internal coating of cans




Food packaging




Medical equipment




Bottles



Clothing

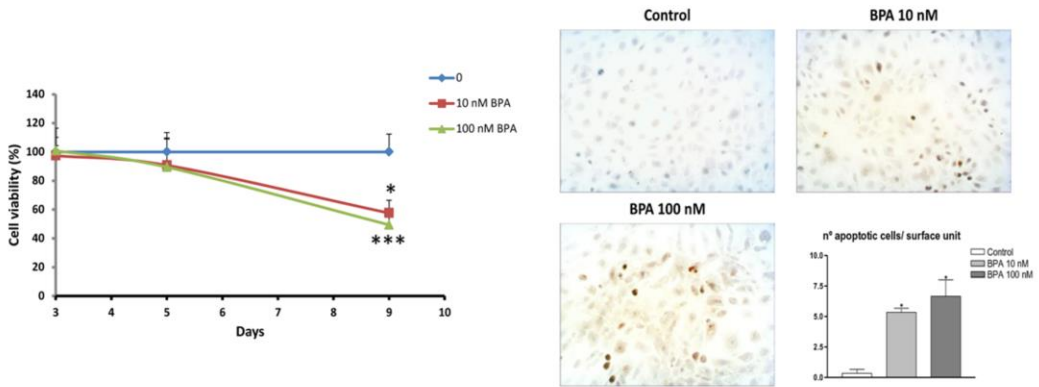


Styrofoam cups for hot drinks

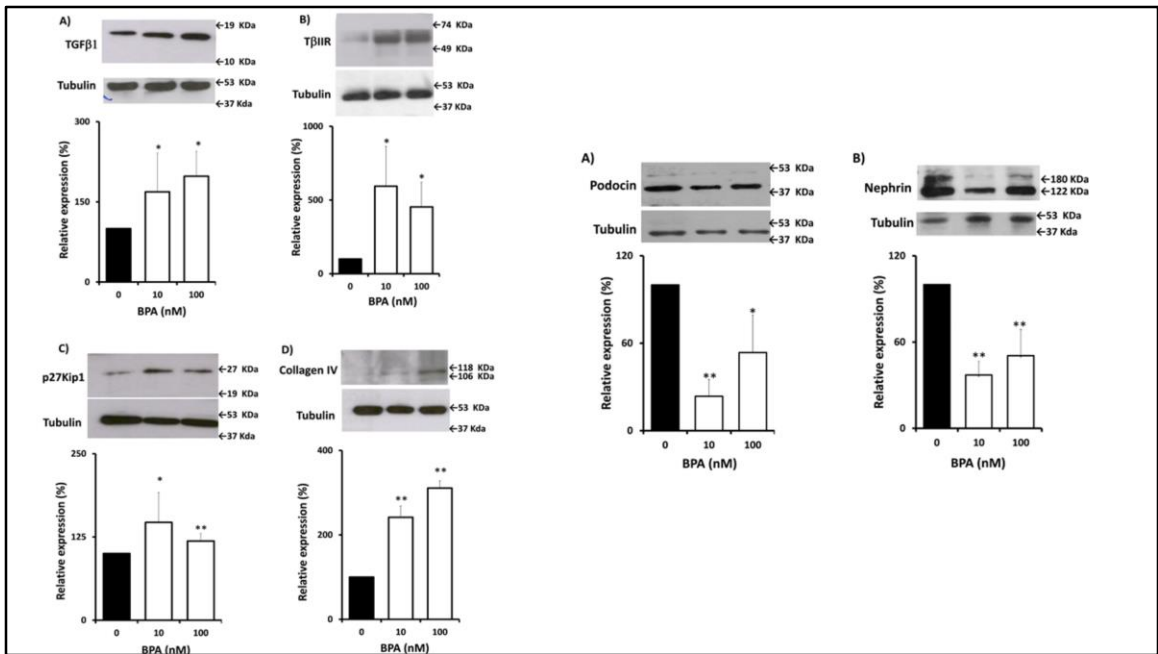


Nuestro objeto de estudio, conocido como Bisfenol-A (BFA), es un compuesto de tipo fenólico ampliamente distribuido en infinidad de objetos de uso cotidiano. Debido a sus conocidas propiedades como disruptor estrogénico y a su cada vez mayor producción, es uno de los principales compuestos xenobióticos que se encuentra hoy en día en el punto de mira de la comunidad científica. La principal preocupación se debe a su heterogénea utilización dentro de la industria alimentaria, así como en materiales médicos, llegando incluso a utilizarse en la industria textil.

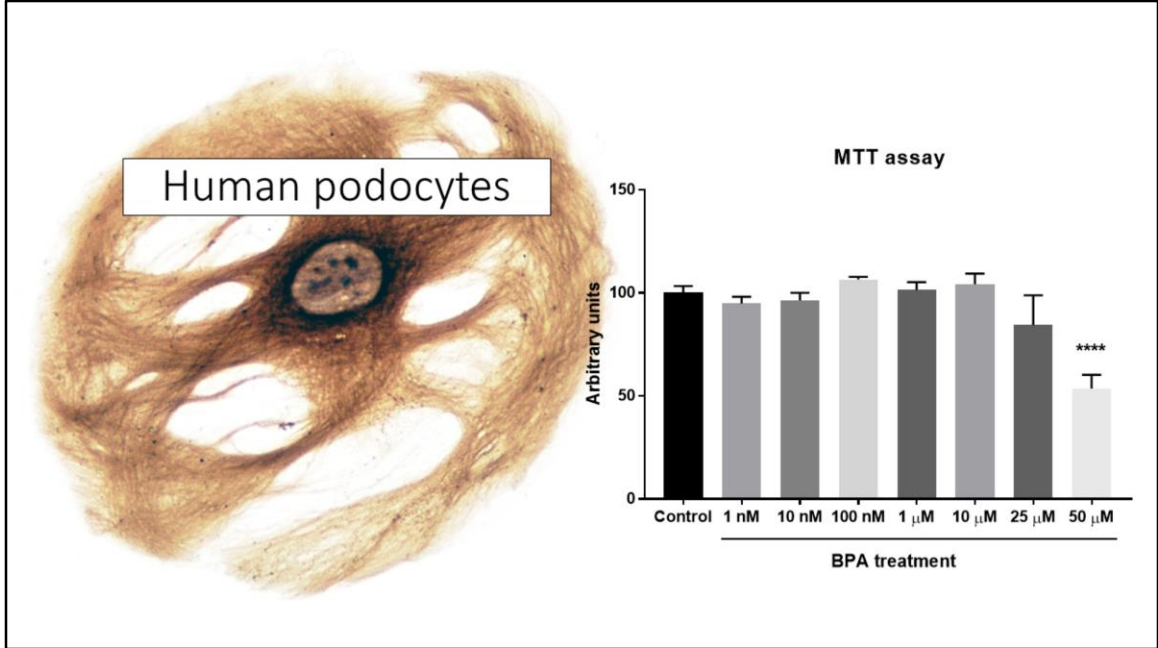
Previous studies (mouse podocytes)



Trabajos previos de nuestro equipo determinaron que el BPA es capaz de reducir significativamente la viabilidad celular (MTT) en cultivos celulares de podocitos de ratón. Del mismo modo se confirmó por la técnica TUNEL que el número de células apoptóticas se incrementaba tras el tratamiento con BPA

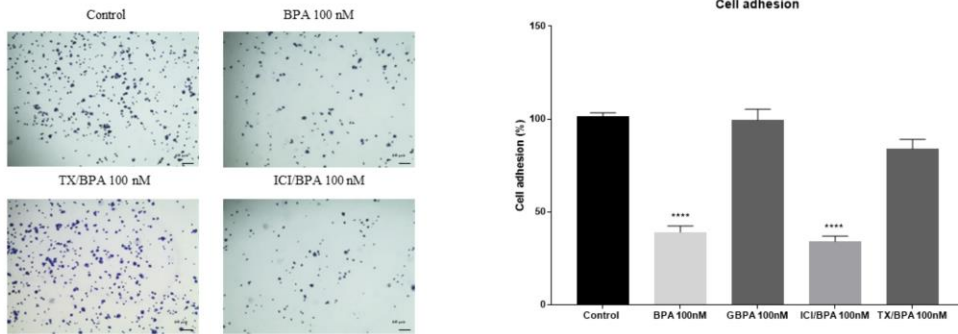


El análisis de expresión relativa por Western blot mostró que se modificaban proteínas relacionadas con los mecanismos de hipertrofia celular, como TGF- β , colágeno-IV, así como la proteína p27kip1, implicada en mecanismos de quiescencia. Por otro lado, además, se observaron alteraciones de proteínas esenciales en el podocito diferenciado, como son podocina y nefrina, encargadas del mantenimiento estructural y de uniones intercelulares.



Una vez explorados los posibles efectos del BPA sobre células murinas, los posteriores pasos lógicos serían el desarrollo de un modelo animal (pendiente de publicación) y la realización de nuevos experimentos *in vitro* en células humanas. El presente trabajo se realizó en un modelo *in vitro* de podocitos inmortalizados humanos. La capacidad de replicación es sensible a la temperatura, por lo que se utiliza una temperatura “permissiva” de 33°C para que se repliquen, y una vez alcanzan la confluencia deseada, se utiliza la temperatura de 37°C para que pierdan su capacidad replicativa y entren en un estado de quiescencia y diferenciación celular. De este modo, se asemejan más a la situación real en la que se encuentra el podocito en el glomérulo renal. Interesantemente, y al contrario de lo que se observó en podocitos de ratón, el podocito humano no sufre pérdida de viabilidad celular tras el tratamiento con BPA hasta alcanzar la concentración de 50 μM.

Adhesion assay



No obstante, al emplear dosis bajas en ensayos de adhesión celular, se observó que la capacidad de adhesión celular puede alterarse en presencia de BPA. En contrapartida, al utilizar GBPA (la principal forma metabolizada a nivel hepático), no se observaron cambios significativos. Por otro lado, el uso de inhibidores estrogénicos no mostró cambios en el caso del ICI (también conocido como Fulvestrant), pero sí pudo revertir la acción del BFA en el caso del Tamoxifeno (TX).

Transcriptomic and proteomic assays

Tabla 1. Análisis transcriptómico por agrupaciones (o clusters). Para el procesamiento de datos primarios, el análisis de imágenes y la asignación de puntuación de calidad se utilizó el software Illumina Real-Time Analysis (<https://www.illumina.com>).

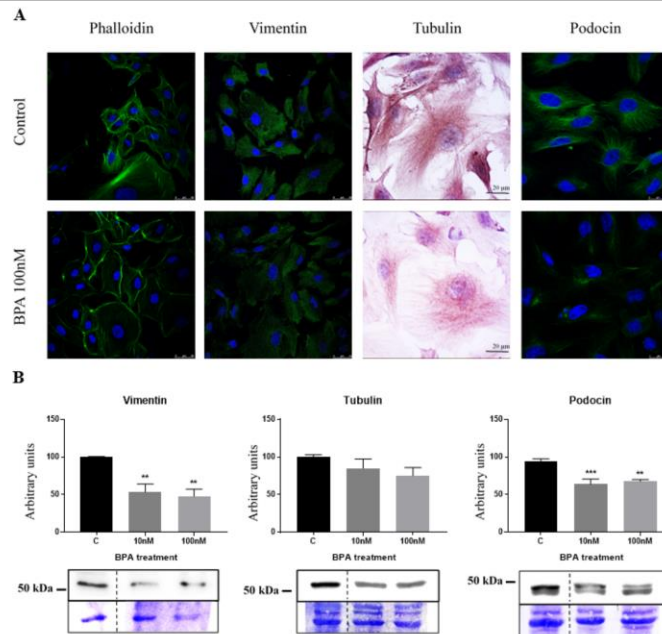
GS	SIZE	ES	NES	NOM p val	FDR q val	FWER p val	RANK AT MAX	LEADING EDGE
Reactome Nephria interactions	19	-0.38	-2.03	0.004	0.030	0.661	10941	tags=74%list=35% signal= 114%
Reactome formation of tubulin folding intermediates	19	0.40	2.07	0.004	0.011	0.571	7222	tags=63%list=23% signal= 82%

Tabla2. Análisis proteómico de proteínas relacionadas con la adhesión celular, citoesqueleto y estrés oxidativo

Protein	fold-change	p value	q value
Nesprin	-0.958	0.00004	0.004
FRAS1-related extracellular matrix protein 3	-0.736	0.000709993	0.026
Transgelin	-0.519	0.00001	0.002
Collagen alpha-1(I) chain	-0.385	0.00004	0.004
Tropomyosin beta chain	-0.298	0.001379986	0.041
Cell surface glycoprotein MUC18	-0.251	0.000419996	0.02
Cofilin-1	-0.241	0.000559994	0.024
Annexin A1	-0.223	0.00002	0.002
Elongation factor 2	-0.217	0.00001	0.001
Vimentin	-0.215	0.00001	0.004
Profilin-1	-0.199	0.000199998	0.011
Galectin-1	-0.196	0.000549995	0.024
Ezrin	-0.185	0.00097999	0.032
Annexin 2	-0.183	0.00001	0.001
Elongation factor 1-gamma	-0.174	0.001779982	0.048
T-complex protein 1 subunit gamma	-0.173	0.000679993	0.026
L-lactate dehydrogenase A chain	-0.17	0.000889991	0.03
Glucosylated 3-phosphate dehydrogenase	-0.159	0.000859991	0.03
AHNAK	-0.152	0.00001	0.002
Vinculin	-0.144	0.000149999	0.009
Ehlnin-C	-0.134	0.000489995	0.023
Microtubule-associated protein 4	0.154	0.000499995	0.023
Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3	0.193	0.000659993	0.025
Glutathione synthetase	0.197	0.00064999	0.025
Src substrate cactactin	0.206	0.00009	0.007
Fibronectin	0.302	0.00001	0.005
Lactadherin	0.307	0.00009	0.007
Tenascin-C	0.314	0.00001	0.002
NADPH adenodoxin oxidoreductase, mitochondrial	0.451	0.00001	0.003
Superoxide dismutase	0.546	0.00001	0.001

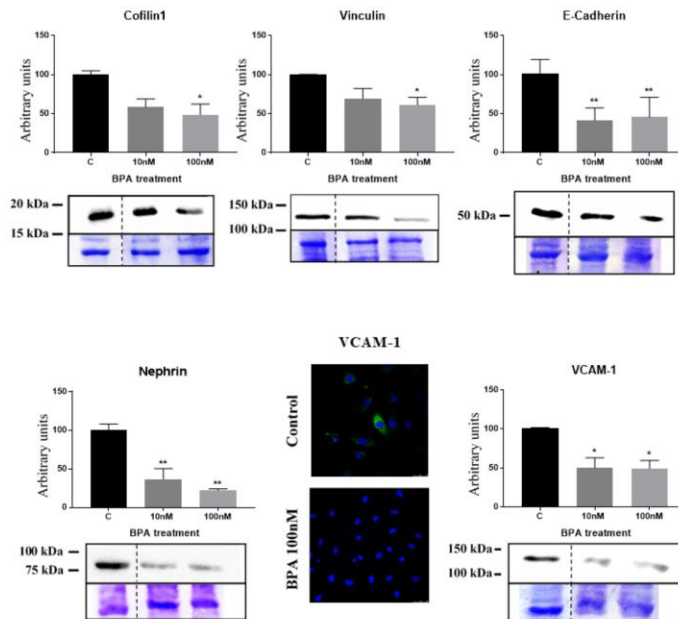
Para profundizar en las alteraciones producidas por BPA (100 nM) en los mecanismos de adhesión celular, se realizaron ensayos transcriptómicos y proteómicos. En ambos se obtuvieron pruebas que señalaban a que el BPA puede afectar significativamente tanto a proteínas estructurales como de adhesión intra- e intercelular.

Structural proteins



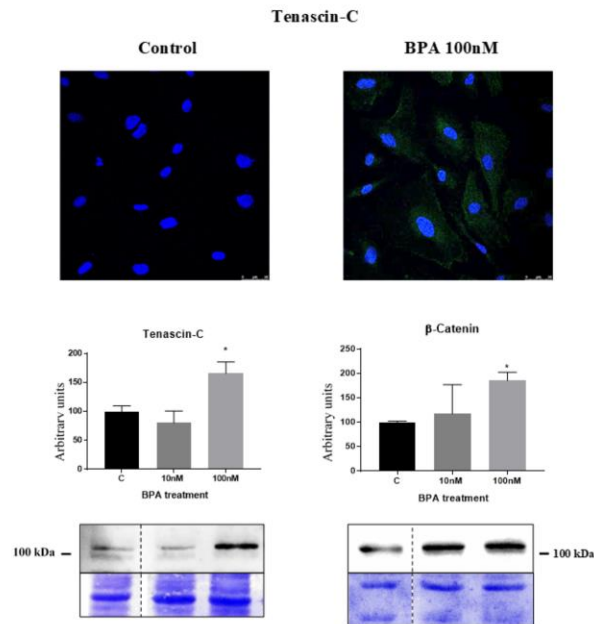
Una vez analizados los resultados obtenidos mediante los ensayos transcriptómicos y proteómicos, se confirmaron los resultados mediante el análisis de proteínas específicas mediante Western blot e inmunocitoquímica. En primer lugar, observamos que el BPA, dentro del rango de concentraciones nanomolar, induce reducciones significativas en la expresión de proteínas del citoesqueleto, tales como F-actina, vimentina, tubulina y podocina. De este modo, se pudo observar que el tratamiento con BPA indujo una reducción significativa del número de filamentos de actina (estudiada mediante inmunocitoquímica de faloidina), que se ubicaron principalmente en los bordes de las células. Por otro lado, la vimentina se localizó fundamentalmente alrededor de los núcleos. Por su parte, la tubulina también manifestó reducciones significativas tras el tratamiento con BPA. Finalmente, la podocina, una proteína de especial relevancia en el podocito diferenciado, tanto a nivel estructural como de adhesión, mostró reducciones significativas de su expresión tras el tratamiento con BPA.

Adhesion proteins



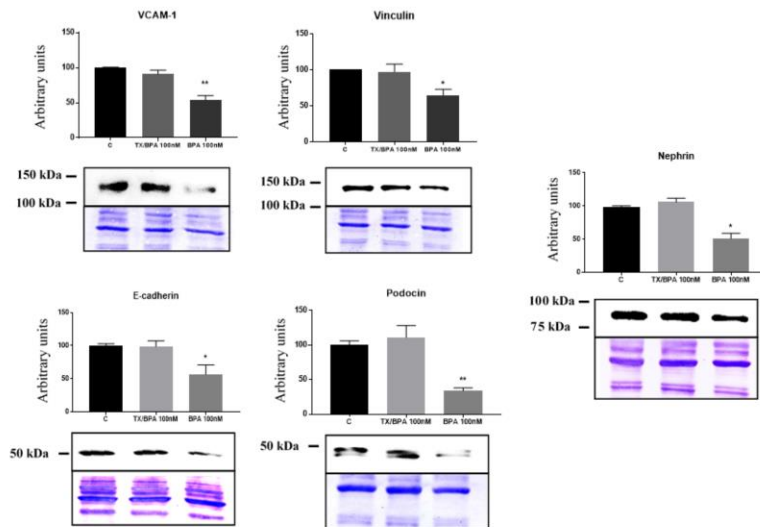
En segundo lugar, también se observó una reducción significativa en la expresión de proteínas implicadas en la estabilización del citoesqueleto, como la cofilina-1 y vinculina. Del mismo modo, al estudiar el grado de expresión relativa en proteínas relacionadas con la adhesión celular, como E-cadherina, nefrina y VCAM-1 también se observaron reducciones significativas.

Adhesion proteins (II)



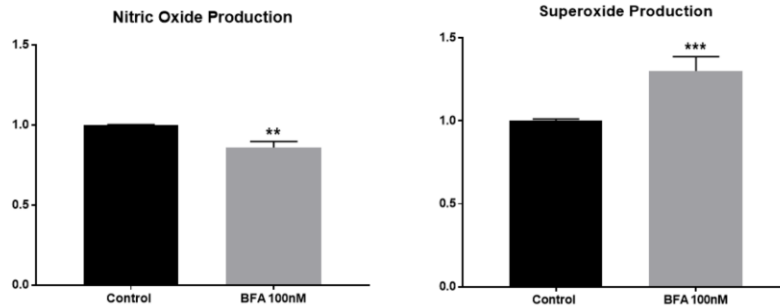
En tercer lugar, también se observó un incremento significativo en la expresión de proteínas relacionadas con la pérdida de adhesión, tales como tenascina-C y β -catenina.

Tamoxifen



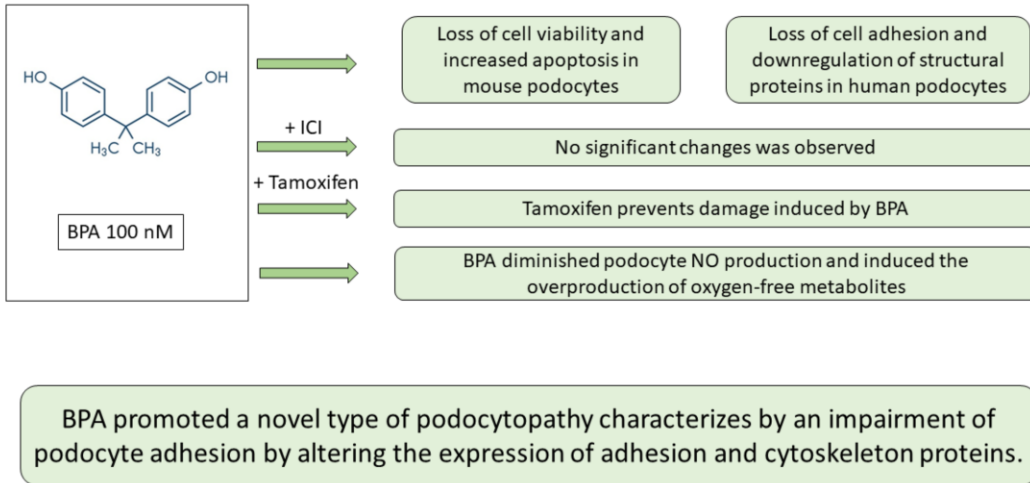
Por último, para confirmar que el tamoxifeno es capaz de revertir (o impedir) los cambios inducidos por BPA, se analizaron por Western blot las proteínas VCAM-1, vinculina, E-cadherina, nefrina y podocina, observando que la expresión de ninguna de ellas llegó a modificarse significativamente al combinar tamoxifeno y BPA.

Superoxide and nitric oxide production



Se cuantificó la producción de óxido nítrico por citometría de flujo para explorar si el BPA activaba genes vasorreguladores en podocitos humanos, observando que el tratamiento con BPA disminuía su producción. Posteriormente también se analizó por citometría de flujo la producción de radicales libres, observando que la exposición a BPA induce un aumento significativo del anión superóxido.

Conclusions



Para concluir, con este modelo experimental se ha evidenciado que existen sustanciales diferencias entre los efectos provocados por el BPA sobre cultivos celulares de diferentes especies, como son el ratón y el humano. Este fenómeno podría ser un claro indicador de alerta ante los cálculos utilizados para determinar la seguridad de este tipo de compuestos, pues se basan en modelos experimentales murinos. Por otro lado, que el tamoxifeno impida el daño sobre la adhesión celular mediado por BPA podría indicar que el mecanismo de acción se encuentre regulado por los receptores estrogénicos. Las diferencias observadas en los diferentes inhibidores estrogénicos empleados presenta un interesante punto de partida para futuras líneas de investigación. También es interesante que el BPA desregula la producción de óxido nítrico, lo cual está íntimamente relacionado con la desregulación de radicales libres como el anión superóxido.

En definitiva, el BPA promueve un nuevo tipo de podocitopatía caracterizada por un daño en la adhesión del podocito, desregulando la expresión de proteínas estructurales y de unión intra- e intercelular.