

**Figura 45. Área (A) y densidad (B) vascular.** El tratamiento *in utero* con 250 BPA produjo un incremento significativo en ambos parámetros tanto en DPN 50 como en DPN 110. Sin embargo, el grupo 25 BPA sólo mostró un aumento en el área vascular en animales de DPN 110. Las barras representan la media  $\pm$  SEM. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (\*  $p < 0,05$  y \*\* $p < 0,01$ ).

## ETAPA II

### 1. Susceptibilidad de la glándula mamaria frente al carcinógeno NMU

#### 1.1. Incidencia y latencia de tumores mamarios en animales tratados con NMU en la pre-pubertad

De los animales inyectados en DPN 21 (pre-púberes) con 50 NMU, los primeros tumores palpables aparecieron en dos animales (2/6; incidencia: 33,3%) sacrificados a los 133 y 161 días posteriores a la administración del carcinógeno. Un animal (1/6, incidencia: 16,7%) fue sacrificado a 280 días post-NMU y los tres animales restantes (3/6, incidencia: 50%) fueron sacrificados a los 347 días posteriores a la inyección. En estos últimos, no se detectaron tumores palpables, pero en el momento de la cirugía, detectamos la presencia de tumores aplanados, lo cual dificultaba su palpación.

#### 1.2. Selección de una dosis subcarcinogénica de NMU

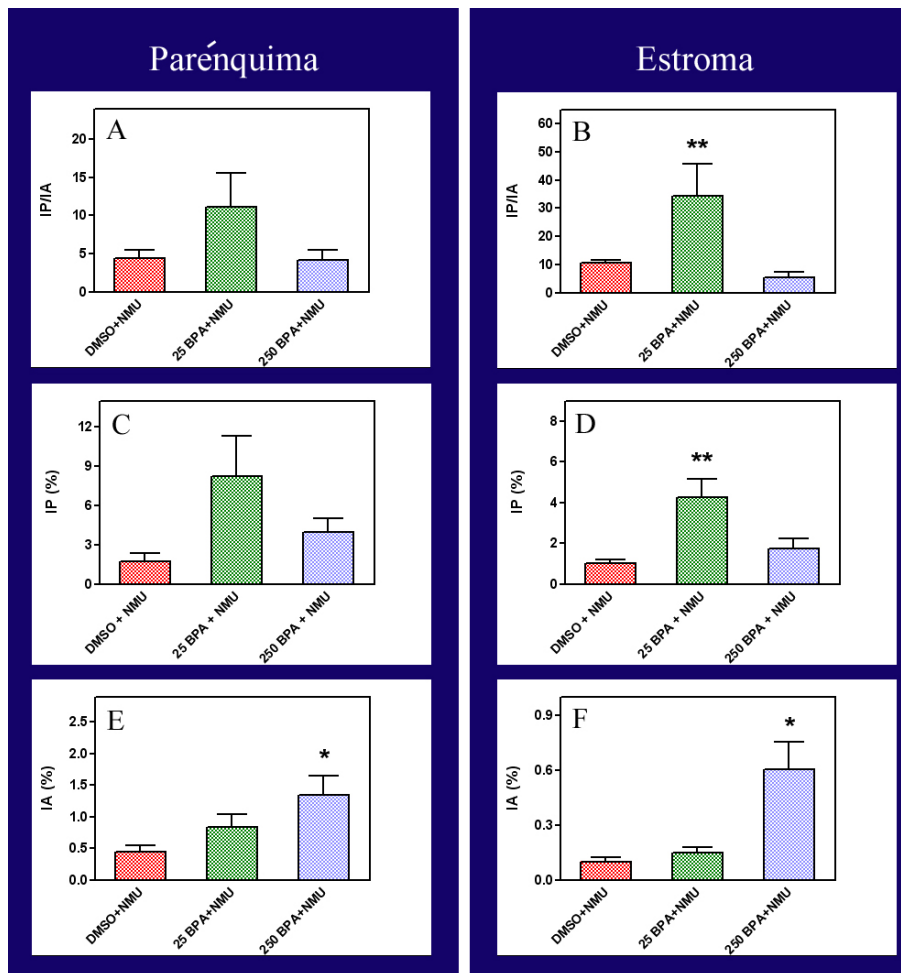
Los resultados del experimento piloto muestran que ninguno de los animales tratados con la dosis 25 NMU desarrolló tumores mamarios (incidencia 0%) al momento del sacrificio (DPN 180); mientras que 5 de 6 animales (incidencia 83,3%) inyectados con 50 NMU presentaron neoplasias mamarias.

En conjunto, los resultados de ambos experimentos pilotos nos permitieron establecer al DPN 50 como el momento de mayor susceptibilidad al carcinógeno NMU, puesto que la latencia fue inferior a la de los animales inyectados en DPN 21. Y establecer como subcarcinogénica a la dosis 25 NMU, que fue la utilizada para probar nuestra hipótesis.

## 2. Respuesta de la glándula mamaria a NMU luego de la exposición a *in utero* a BPA.

### 2.1. Proliferación y apoptosis

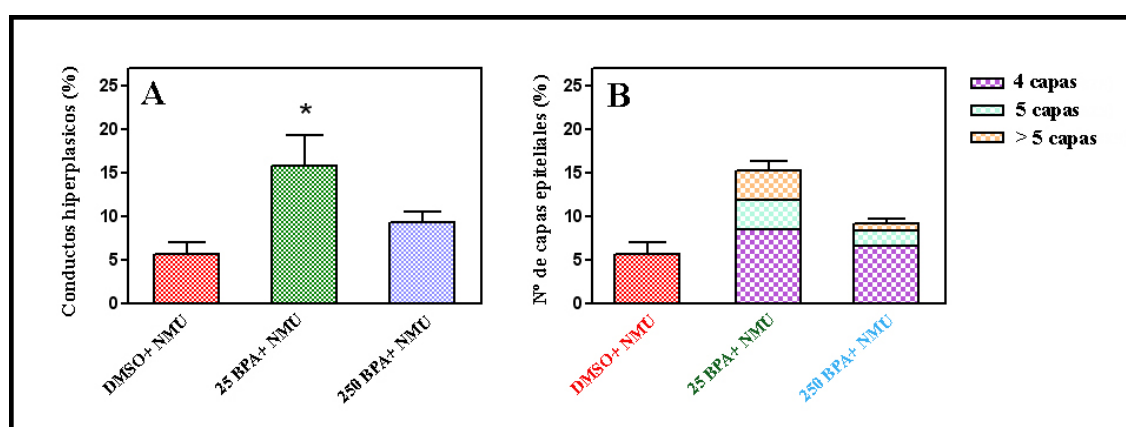
En animales de DPN 110 la exposición a 25 BPA + NMU provocó un incremento significativo en el cociente proliferación/apoptosis (IP/IA) en el compartimento estromal, comparado con el grupo control (Fig. 46 B). Esta desregulación en el equilibrio proliferación/apoptosis, ocurrió principalmente a expensas de un aumento del IP (Fig. 46 D). En los animales expuestos a 250 BPA + NMU, el IA fue mayor que para el grupo control, tanto en el parénquima (Fig. 46 E) como en el estroma (Fig. 46 F); aunque no se modificó la relación IP/IA (Fig. 46 A-B).



**Figura 46. Proliferación, apoptosis y turnover celular en animales expuestos posnatalmente a NMU.** Los índices de proliferación (IP), de apoptosis (IA) y el turnover (IP/IA) celular fueron cuantificados en DPN 110 tanto en el parénquima (A, C, E) como en el estroma (B, D, F) de la glándula mamaria, según se describió en M&M. Las barras representan la media  $\pm$  SEM. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (\* p < 0,05 y \*\* p < 0,01).

## 2.2. Conductos hiperplásicos

El porcentaje de conductos hiperplásicos en animales de DPN 110 fue significativamente mayor en el grupo 25 BPA + NMU (Fig. 47 A; Tabla 14). En DPN 110, todos los animales expuestos a BPA + NMU presentan un incremento en el porcentaje de conductos con hiperplasia leve (4 capas de células epiteliales) independientemente de la dosis de BPA utilizada (Fig. 47 B; Tabla 14). Estructuras similares a conductos hiperplásicos se observaron en los animales del grupo DMSO + NMU. Este tipo de estructuras representaron siempre menos del 10 % de los conductos y podrían considerarse artefactos del corte debido a la tortuosidad de los ductos.



**Figura 47. Conductos hiperplásicos (A) y distribución de los mismos según la magnitud de la hiperplasia (B).** La cuantificación se realizó en hembras de DPN 110 expuestas *in utero* a DMSO o BPA y posnatalmente a NMU, según se describió en M&M. Las barras representan la media  $\pm$  SEM. El asterisco indican diferencia estadísticamente significativas (\*  $p < 0,05$ ). En (B), los distintos colores representan el porcentaje de cada tipo de hiperplasia (con 4, 5 o más de 5 capas de células epiteliales) respecto del porcentaje total de conductos hiperplásicos.

En DPN 180, los animales expuestos a 25 BPA + NMU mostraron un incremento en el porcentaje de conductos hiperplásicos, respecto de su grupo control. Este incremento se debió principalmente a un aumento en la proporción de conductos con hiperplasia leve (Tabla 14).

**Tabla 14.** Efecto de la exposición *in utero* a BPA y posnatal a NMU sobre la incidencia de conductos hiperplásicos. Distribución de conductos hiperplásicos según el número de capas de células epiteliales.

Tratamiento			Conductos hiperplásicos (%)	Conductos hiperplásicos (%) clasificados según el número de capas de células epiteliales		
<i>In utero</i>	Posnatal	Edad		Hiperplasia leve (4 capas)	Hiperplasia moderada (5 capas)	Hiperplasia florida (> 5 capas)
DMSO	25 NMU	DPN 110	5,9 ± 1,20	NC	NC	NC
25 BPA	25 NMU	DPN 110	15,3 ± 2,60**	8,6 ± 1,70	3,3 ± 1,04	3,4 ± 1,10
250 BPA	25 NMU	DPN 110	9,3 ± 1,35	6,7 ± 0,86	1,7 ± 0,41	0,8 ± 0,48
DMSO	25 NMU	DPN 180	17,8 ± 1,86	9,2 ± 1,3	4,1 ± 0,5	2,6 ± 0,7
25 BPA	25 NMU	DPN 180	35,5 ± 3,74 ** <sup>a</sup>	21,6 ± 2,6* <sup>a</sup>	9,1 ± 1,8	4,3 ± 1,3

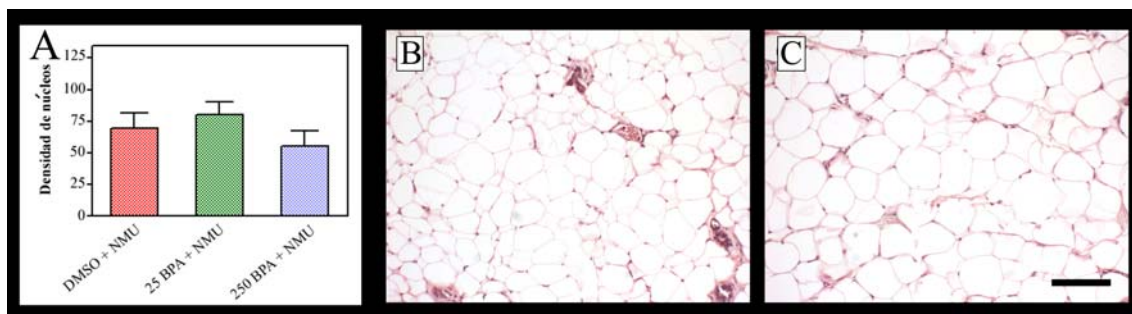
NC: no corresponde.

Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas: \* p<0,05; \*\* p<0,01.

<sup>a</sup>: comparado con su grupo control (DMSO + NMU; DPN 180).

### 2.3. Densidad de núcleos del estroma

En DPN 110, no se observaron cambios en el estroma compatibles con una reacción desmoplásica, en ninguno de los grupos evaluados (Fig. 48 B-C). La densidad de núcleos del estroma no se modificó por el tratamiento administrado (Fig. 48 A).



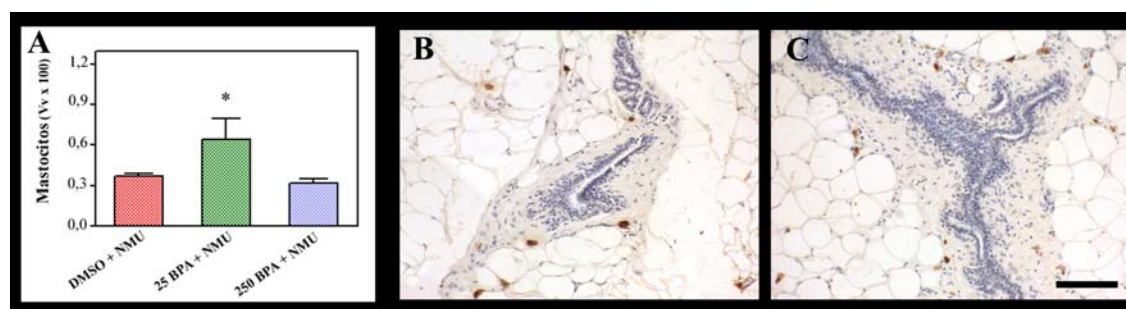
**Figura 48.** Densidad de núcleos del estroma en DPN 110. **A.** El tratamiento con BPA + NMU no modificó la densidad de núcleos en el estroma. Las barras representan la media ± SEM. **B** y **C.** Imágenes representativas de tejido adiposo de los DMSO + NMU y BPA + NMU, respectivamente. Coloración: H-E. La barra representa 100 µm.

En los animales de DPN 180 expuestos a 25 BPA + NMU, el estroma tampoco mostró signos compatibles con reacción desmoplásica y la densidad de núcleos del estroma no fue diferente de la del grupo control (25 BPA + NMU: 48,3 ± 3,79 vs DMSO + NMU: 43,1 ± 5,60).

## 2.4. Infiltración de mastocitos

La densidad de volumen de mastocitos evaluada en DPN 110, fue significativamente mayor en el grupo 25 BPA + NMU (Fig. 49 A). En la mayoría de las muestras evaluadas observamos un elevado número de mastocitos rodeando a los conductos hiperplásicos (Fig. 49 B y C). En el grupo 250 BPA + NMU, la infiltración de mastocitos no fue diferente de la del grupo control.

En DPN 180, la densidad de volumen de mastocitos fue menor en los animales expuestos a 25 BPA + NMU ( $V_v: 0,24 \pm 0,024$  vs  $V_v: 0,30 \pm 0,030$ , para DMSO + NMU;  $p < 0,05$ ).



**Figura 49. Infiltración de mastocitos en DPN 110.** (A) El tratamiento *in utero* con 25 BPA y posnatal con NMU indujo un aumento significativo en la densidad de volumen ( $V_v$ ) de mastocitos. Las barras representan la media  $\pm$  SEM. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). En B y C se muestran mastocitos rodeando a conductos hiperplásicos de los grupos DMSO + NMU y 25 BPA + NMU, respectivamente. La barra representa 100  $\mu$ m.

## 2.5. Incidencia y multiplicidad tumoral

En las mamas de animales de DPN 110 no se observaron tumores macro ni microscópicos (Tabla 15).

En DPN 180, el 13,3 % (2/15) de los animales expuestos a 25 BPA + NMU desarrollaron tumores de mama (Tabla 15).

Todos los tumores fueron encapsulados, de consistencia sólida (Fig. 50, panel superior) y acompañados por una respuesta estromal típica caracterizada por fibrosis e infiltración mononuclear (principalmente linfocitos y eosinófilos) (Fig. 50 A y B). Los tumores generados fueron clasificados como carcinomas ductales *in situ* con patrón cribiforme (Fig. 50 B), papilar o mixto (cribiforme y papilar) (Fig. 50 C; Fig. 51 A).

**Tabla 15.** Efecto del tratamiento *in utero* con BPA y posnatal con NMU sobre la incidencia y multiplicidad tumoral

Tratamiento			Resultados	
<i>In utero</i>	DPN 50	Sacrificio	Incidencia tumoral	Multiplicidad tumoral*
DMSO	25 NMU	DPN 110	0/9	NE
25 BPA	25 NMU	DPN 110	0/9	NE
250 BPA	25 NMU	DPN 110	0/9	NE
DMSO	25 NMU	DPN 180	0/10	0
25 BPA	25 NMU	DPN 180	2/15	2,5 ± 2,1

\*NE: no evaluado.

Los resultados están expresados como la media ± SEM

La inmunotinción para CK8 (Fig. 51 B) permitió confirmar el fenotipo epitelial de las neoplasias y excluir invasión estromal por parte de las células epiteliales, lo cual coincide con la descripción de tumor encapsulado *in situ*.

La expresión de RE $\alpha$  y RP fue detectada principalmente en las células epiteliales tumorales, revelando la dependencia hormonal de los tumores. En la Figura 51 C y D se muestran dos imágenes de cortes consecutivos con inmunodetección de RE $\alpha$  y RP, respectivamente. El estroma peritumoral es negativo tanto para RE $\alpha$  como para RP.

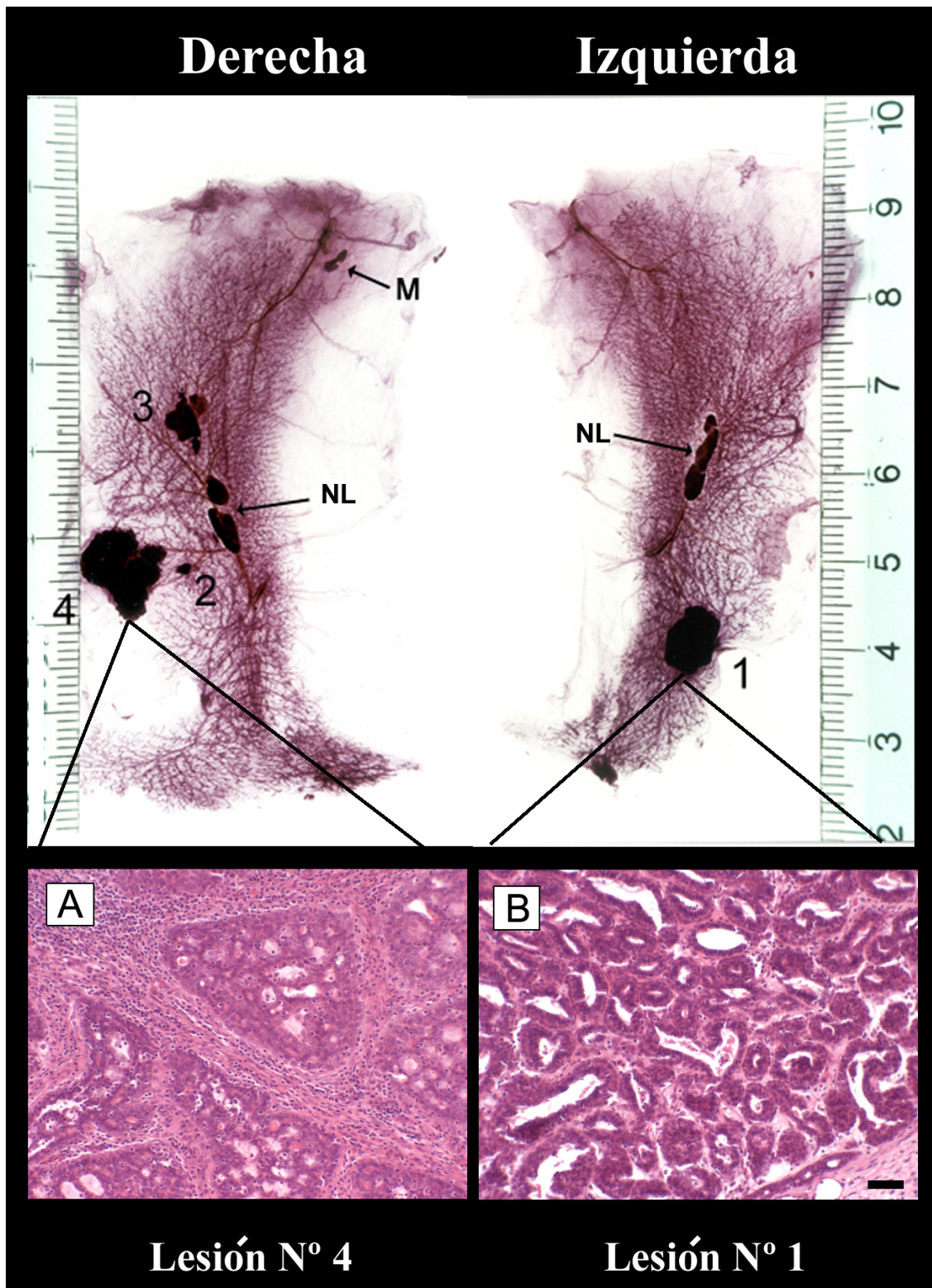
Todos los tumores expresaron VEGF, en todos los casos la intensidad de la expresión fue mayor en el parénquima que en el estroma (Fig. 51 E). A diferencia de la elevada infiltración de mastocitos observada en la periferia de los conductos hiperplásicos, en el estroma intratumoral, observamos un escaso número de mastocitos y ocasionalmente pueden observarse gránulos sueltos, producto de la ruptura de dicha célula (Fig. 51 F).

En los animales tratados con la dosis subcarcinogénica de NMU, además de neoplasias mamarias, observamos un tumor de glándula salival y una citoesteatonecrosis en la región axilar, definida como una gran gota lipídica rodeada por tejido conectivo con abundante infiltración eosinofílica.

En los animales pertenecientes al grupo control positivo de actividad carcinogénica (DMSO + 50 NMU), la incidencia tumoral del 70% (7/10). Los tumores fueron clasificados como adenocarcinomas, con patrón papilar, cribiforme o mixto. En estos animales el porcentaje de conductos hiperplásicos fue de  $19,48 \pm 2,19$  %, comparado con  $17,8 \pm 1,86$  % del grupo DMSO + NMU y  $35,5 \pm 3,74$ % del grupo 25 BPA + NMU,

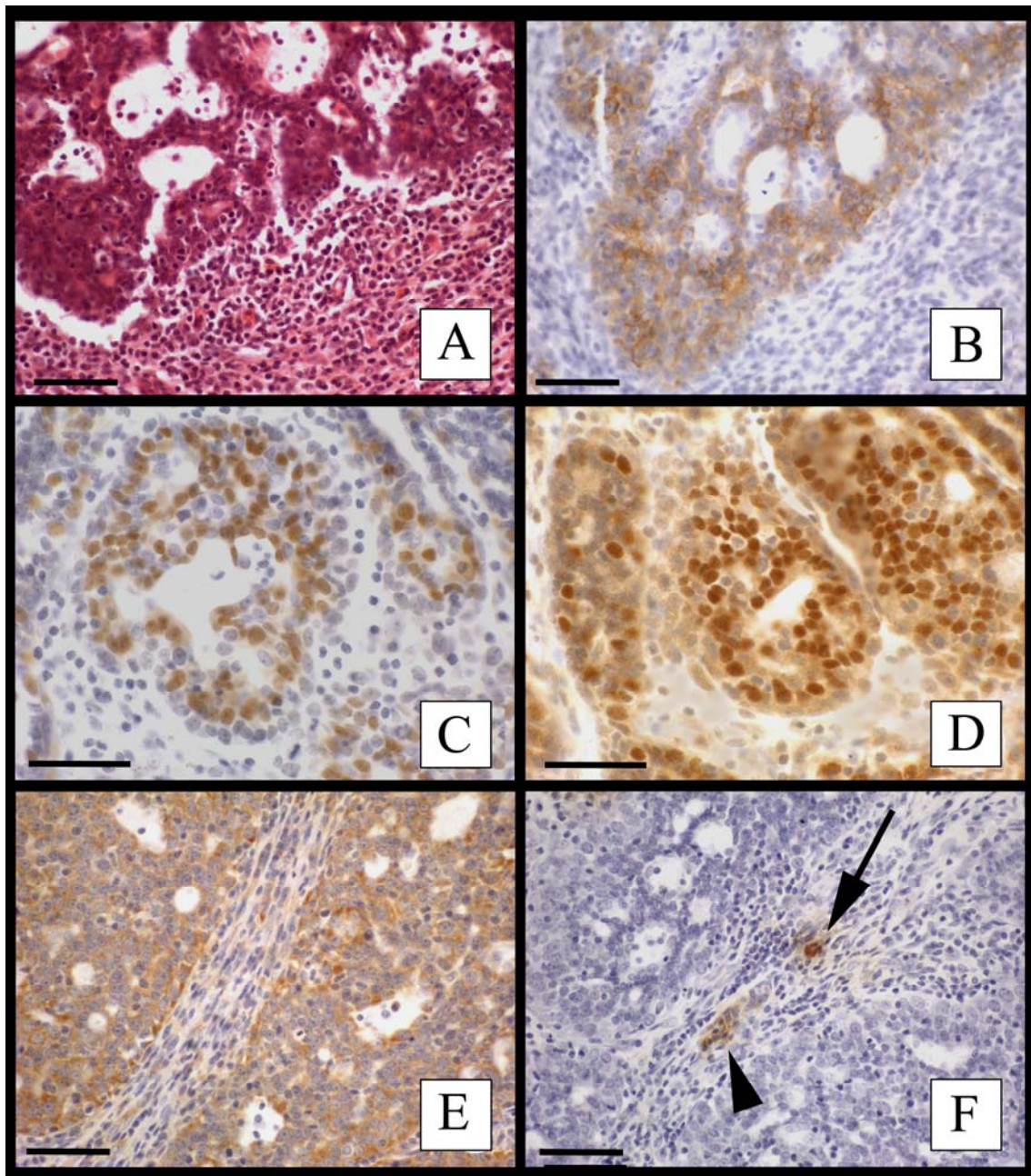


también de DPN 180. Detectamos además la presencia de dos tumores tiroideos de origen folicular.



**Figura 50. Whole-mounts y cortes histológicos de tumores mamarios.** En el panel superior se observan *whole-mounts* de glándulas mamarias en las cuales es posible apreciar macroscópicamente cuatro tumores generados por el tratamiento *in utero* con 25 BPA y posnatal con NMU. En (A) y (B), se muestran cortes coloreados con H-E de los tumores indicados. (A) muestra un patrón cribiforme y (B), un patrón mixto (papilar y cribiforme). NL: nódulos linfáticos; M: músculo. La barra negra representa 70  $\mu\text{m}$ .





**Figura 51. Caracterización de los tumores mamarios generados por exposición a BPA + NMU.** La tinción con H-E (A) permitió apreciar la desorganización tisular del tumor con un patrón mixto (papilar y cribiforme); la inmunotinción para CK8 (B) confirmó el fenotipo epitelial de la neoplasia. En todos los tumores evaluados se observó una nítida marcación positiva tanto para RE $\alpha$  (C) como para RP (D). Como se observa en (E) la expresión de VEGF en el parénquima del tumor fue elevada. El número de mastocitos presentes fue escaso (flecha) y en algunos casos se observaron mastocitos degranulados y gránulos de collagenasa dispersos en el estroma (cabeza de flecha) (F). Las barras negras representan: 50  $\mu$ m.