

V-Discusión

Múltiples evidencias, tanto en humanos como en modelos animales, sugieren que la exposición *in utero* a un ambiente estrogénico aumenta el riesgo de cáncer de mama en el adulto (Birnbaum y Fenton, 2003; Hilakivi-Clarke y col., 2001). Los compuestos estrogénicos pueden modular diferencialmente la susceptibilidad frente al cáncer según el momento del desarrollo en que haya ocurrido la exposición (Fenton, 2006). En general, la exposición *in utero* o posnatal temprana a PEs con actividad estrogénica puede tener efectos adversos debido a la mayor sensibilidad del organismo en desarrollo (Bern, 1992). El desarrollo posnatal de la glándula mamaria está regulado por eventos hormonales claves que tienen lugar, principalmente, en la pubertad y la preñez. La proliferación y la coordinación de las interacciones estroma-epitelio durante la ramificación (*branching*), la invasión ductal y el desarrollo alveolar están reguladas hormonalmente (Russo y Russo, 1998; Robinson y col., 1999). Por esta razón, los cambios hormonales y/o las modificaciones en la respuesta de la glándula mamaria a las hormonas pueden jugar un rol en su futura susceptibilidad a desarrollar cáncer (Russo y Russo, 1998, Muñoz-de-Toro y col. 2005).

El BPA es un PE que actúa como xenoestrógeno. Debido a que el BPA se utiliza en la manufactura de una amplia variedad de productos las posibilidades de exposición son muy altas, así lo demuestran los datos aportados por Calafat y colaboradores (2005) quienes encontraron niveles detectables de BPA en el 95% de las muestras de orina de una población sana y no expuesta laboralmente. Si bien los resultados respecto a los efectos de la exposición a BPA son controvertidos, un gran número de estudios *in vivo* muestran efectos adversos aún luego de la exposición a dosis bajas y sólo algunos señalan que no existe riesgo para la salud humana (NTP-CERHR, 2008).

En esta tesis investigamos la influencia de la exposición prenatal a BPA sobre el desarrollo posnatal de la glándula mamaria y sobre la respuesta de la glándula mamaria a un carcinógeno químico. La exposición prenatal a BPA modificó la histoarquitectura mamaria e indujo el desarrollo de lesiones preneoplásicas involucrando cambios en el compartimento epitelial y en el estroma. Además, aumentó la sensibilidad de la glándula mamaria a la acción de un carcinógeno químico, NMU.

ETAPA I

1. Selección del modelo animal

Cepa. La mayoría de los trabajos que evalúan el efecto de los PEs en modelos animales, utilizan cepas de ratas y ratones que fueron seleccionados por su excelente *performance* reproductiva, siendo las más utilizadas las cepas Sprague-Dawley y CD-1, respectivamente. Sin embargo, las ratas Sprague-Dawley están consideradas como altamente resistentes a la acción de los Eg, comparadas con las ratas Fisher 344, altamente sensibles. En este trabajo utilizamos ratas Wistar. La sensibilidad de la cepa Wistar a Eg y xenoestrógenos resultó mayor que la de la cepa Sprague-Dawley, considerándose a las ratas Wistar con una sensibilidad a Eg intermedia entre la de Fisher 344 y la de Sprague-Dawley (Spearow y Barkley; 2001; Diel y col., 2004; NTP-CERHR, 2008).

Dosis. Existe un paradigma en los estudios clásicos de toxicología que asume que luego de la exposición a un químico, el organismo responderá en un sentido monotónico. Esto es “a mayor dosis, mayor efecto” (APM, 2005). Sin embargo, en experimentos con hormonas, drogas y otros químicos que actúan a través de la vía hormonal, mediada por receptores (como los PEs), es muy común encontrar curvas dosis-respuesta que tienen forma de U o de U invertida, conocidas como “no monotónicas” (Welshons y col., 2006). Numerosos PEs presentan curvas dosis-respuesta no monotónicas. Por ejemplo, en ratones machos la exposición fetal a: a) dosis bajas de DES produjo un agrandamiento en el tamaño de la próstata, mientras que una dosis hasta 10.000 veces mayor, provocó una disminución en el tamaño del mismo órgano, el efecto se detectó posnatalmente mucho después que la exposición hubiera finalizado (vom Saal y col., 1997). b) Aroclor y DES en dosis bajas produjeron un aumento de la distancia ano-genital, del tamaño de la próstata y disminución del peso del epidídimo; y una dosis de DES 2000 veces superior produjo un efecto opuesto (disminución del tamaño de la próstata y de la distancia ano-genital) (Gupta, 2000).

Con estos conceptos en mente decidimos evaluar el comportamiento del BPA en tres dosis: 25 µg/kg/d; 250 µg/kg/d y 25 mg/kg/d. Seleccionamos estas dosis ya que 25 y 250 µg/kg/d representan la mitad y cinco veces más, respectivamente que la dosis diaria tolerable (*TDI*: 50 µg/kg/d; Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food, 2006); mientras que la dosis de 25 mg/kg/d equivale a cinco veces la dosis *NOAEL* (5 mg/kg/d; Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food, 2006).

Momento de la exposición y vía de administración. La toxicocinética del BPA fue estudiada principalmente en ratas (Snyder y col., 2000) y es sabido que la absorción desde el tracto gastrointestinal es rápida, sin embargo, la disponibilidad sistémica del BPA y sus metabolitos es más baja cuando se administra por vía oral que por vía subcutánea (sc) o intraperitoneal (ip) (Scientific Committee for Food, European Commission, 2002). Esta disponibilidad menor se debe a que el BPA sufre una metabolización inicial en el hígado y es transformado en monoglucurónido de BPA (Yokota y col., 1999). La administración por vía sc o ip, evita este primer paso de metabolización. En animales expuestos durante los primeros días de la vida posnatal, la vía de administración es irrelevante, ya que no hubo diferencias en la concentración sérica de BPA, independientemente de que éste se administrara oralmente o por inyecciones sc en ratones hembras de 3 días de edad y esta conclusión podría extenderse a los animales preñados (Taylor y col., 2008). En nuestro caso, administramos BPA mediante mini-bombas osmóticas implantadas sc a ratas preñadas que garantizan una liberación durante 14 días (<http://www.alzet.com/>), un modelo que ya hemos validado previamente y en el cual demostramos efectos del BPA en las crías (Markey y col., 2001; Ramos y col., 2001, 2003; Muñoz-de-Toro y col., 2005).

En las secciones siguientes se discute la selección de los *end points* y el momento en que fueron evaluados, que también son elementos esenciales cuando se selecciona el modelo y diseña un estudio de perturbación endocrina.

2. Efecto de la exposición prenatal a BPA

2.1. La exposición *in utero* a BPA adelantó el inicio de la pubertad

Las dosis de BPA utilizadas no produjeron efectos visibles de toxicidad ni en las madres ni en las crías. El desarrollo posnatal de las crías no se vio afectado en ningún momento. Leves alteraciones en la concentración de las hormonas esteroideas durante el período prenatal pueden acelerar el desarrollo del tracto reproductor y el crecimiento (vom Saal, 1989). Este fenómeno sugiere que la exposición a químicos con actividad estrogénica, aún en dosis muy bajas, también puede tener influencias sobre los órganos y parámetros reproductores. Nosotros investigamos si dosis muy bajas de BPA pueden afectar parámetros como: peso corporal, distancia ano-genital y edad de apertura vaginal en crías hembras que fueron expuestas *in utero*.

La distancia ano-genital no se vio afectada por el tratamiento administrado, coincidiendo con trabajos previos realizados en machos y/o hembras con dosis semejantes o mayores de BPA (Kobayashi y col., 2002; Tinwell y col., 2002).

La exposición a BPA, ya sea prenatal o pre-puberal, puede afectar el peso corporal, sin embargo no existe consenso respecto de este parámetro. Distintos estudios demostraron un aumento en la ganancia de peso corporal en ratones hembras (Howdeshell y col., 1999; Nikaido y col., 2004) mientras que otros autores, no observaron cambios en este parámetro (Kato y col., 2003; Tinwell y col., 2002). En nuestro caso, no vimos modificaciones en el peso corporal en ninguno de los grupos experimentales. A diferencia de los datos reportados recientemente (Miyawaki y col., 2007) en el cual se administró BPA en el agua de bebida y por un período de tiempo superior.

Está demostrado que la administración neonatal de Eg o andrógenos puede adelantar la edad en la cual ocurre la apertura vaginal, es decir, adelantar la pubertad (Harris y Levine, 1965). Trabajos previos demostraron que la exposición prenatal de ratones a 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de BPA (Honma y col., 2002) o 10 mg/kg (Nikaido y col., 2004) o de ratas a dosis muy elevadas (105 y 427 $\text{mg}/\text{kg}/\text{d}$; Kato y col., 2003) indujo apertura vaginal a una edad más temprana. Aún a pesar de que utilizamos dosis de BPA considerablemente menores, nuestros resultados son consistentes con estos trabajos, ya que la exposición *in utero* a ambas dosis de BPA adelantó significativamente la edad de la apertura vaginal en las crías hembras.

2.2. La exposición *in utero* a BPA indujo cambios histomorfológicos en la glándula mamaria que se evidenciaron sólo después de la pubertad

Diversos modelos en roedores demostraron efectos diferentes sobre la proliferación celular de tejidos hormonodependientes como consecuencia de la exposición a BPA. En ratones hembras la administración prenatal de BPA no modificó el índice de proliferación en la glándula mamaria (Muñoz-de-Toro y col., 2005). En ratones machos expuestos *in utero* a BPA, se observó mayor proliferación en el epitelio prostático (Timms y col., 2005); aunque en ratas machos, este parámetro no se vio modificado (Ramos y col., 2001). En ratas Fisher 344 ovariectomizadas, la administración de BPA resultó en un aumento de la proliferación de células epiteliales de útero y vagina (Steinmetz y col., 1998).

Respecto al efecto del BPA sobre la inducción o inhibición de la apoptosis, también existen distintos antecedentes. Ratones hembras expuestos *in utero* a BPA mostraron una

disminución en el índice de apoptosis en el parénquima mamario (Muñoz-de-Toro y col., 2005). Aunque en otro tejido (epitelio glandular y luminal uterino) la tasa de apoptosis no se vio modificada por un tratamiento similar (Markey y col., 2005). Mientras que en ensayos *in vitro*, la administración de BPA en dosis muy bajas (100 fM a 100 μ M durante 24 hs a 72 hs) incrementó la apoptosis en células de la granulosa ovárica de rata (Xu y col., 2002). Como es posible deducir, no existe un resultado fácilmente predecible respecto al efecto que la exposición a BPA puede tener sobre estos dos eventos, proliferación y apoptosis, que regulan el crecimiento de un tejido.

En nuestro caso, la evaluación de la relación entre proliferación y apoptosis (IP/IA) nos permitió conocer si el tratamiento administrado afectó el desarrollo de la glándula mamaria. En DPN 30 (animales pre-púberes) no hubo cambios en esta relación ni en el parénquima ni en el estroma. En DPN 50, inmediatamente después del inicio de la pubertad, en los grupos expuestos a 25 y 250 BPA observamos un incremento significativo del IP/IA en ambos compartimientos evaluados. Si bien no hubo diferencias significativas entre los animales del grupo control y los expuestos a estas dosis de BPA cuando se analizó cada evento (proliferación y apoptosis) por separado, el cambio en la relación IP/IA parecería ser la consecuencia de dos tendencias: un aumento en la tasa de proliferación y una disminución en el índice de apoptosis.

Los cambios en estos dos procesos modificaron el *turnover* celular y aunque esta modificación fue transitoria, ya que no se mantuvo en animales de DPN 110, es de gran importancia puesto que un fenómeno similar fue descrito durante los estadios más tempranos de la carcinogénesis mamaria (Shilkaitis y col., 2000).

Las consecuencias del aumento en la relación IP/IA observada en DPN 50 se manifestaron en la glándula mamaria de DPN 110 y DPN 180. En el parénquima mamario se incrementó significativamente el porcentaje de conductos hiperplásicos (hiperplasias ductales) en los animales expuestos a 25 y 250 BPA. En el estroma, el cambio se observó como un aumento en la densidad de núcleos del estroma y la presencia de una marcada reacción desmoplásica en la cercanía de dichos conductos hiperplásicos. El rol del estroma en la carcinogénesis mamaria es crucial y se sabe que la presencia de reacción desmoplásica podría derivar en una rigidez progresiva del estroma proveyendo un soporte tanto estructural como hormonal para un epitelio modificado, alterando la arquitectura tisular, lo cual derivaría en lesiones neoplásicas (Meng y col., 2001; Akiri y col., 2003; Deb y col., 2004; Paszek y col., 2005; Kass y col., 2007). Respecto a la incidencia de conductos hiperplásicos, la acción de BPA es consistente con una acción reportada

recientemente para el E₂ en ratas ACI, donde la administración de 20 mg de E₂ durante 90 días, condujo al desarrollo de hiperplasias lobulares (Kovalchuk y col., 2007).

Además de la reacción desmoplásica, observamos un aumento significativo en la infiltración de mastocitos tanto en DPN 110 como DPN 180, de ambos grupos expuestos a BPA. Como es sabido, los mastocitos son células efectoras del sistema inmune que producen y liberan una amplia variedad de mediadores químicos. También se los estudió como promotores del proceso de angiogénesis en tejidos del tracto reproductor (Varayoud y col., 2004). En nuestro caso, observamos una distribución particular de estas células puesto que las detectamos en número más abundante en el estroma circundante a los conductos hiperplásicos. Esta última observación, coincide con resultados reportados por Russo y Russo (1996), quienes describieron a los mastocitos asociados con las proliferaciones intraductales que podrían progresar a carcinoma *in situ* o carcinoma invasivo.

Previamente demostramos que la exposición *in utero* a BPA aumenta la susceptibilidad de la glándula mamaria a los Eg endógenos (Muñoz-de-Toro y col., 2005). Los resultados presentados en esta tesis coinciden con aquellos y sugieren que los cambios descritos podrían crear un entorno permisivo que derive en la transformación maligna de las células.

Debido a que los cambios en la glándula mamaria fueron observados una vez que los animales alcanzaron la madurez sexual (es decir, no hubo cambios en animales pre-púberes de DPN 30), es interesante evaluar la relación que existe entre las modificaciones de la glándula mamaria y la condición hormonal.

2.3. La exposición *in utero* a BPA modificó el ambiente endocrino de la glándula mamaria de ratas púberes y adultas

E₂ y Pg. A lo largo del desarrollo, la glándula mamaria sufre cambios funcionales y morfológicos, regulados principalmente por Eg, Pg y PRL. Como los PEs tienen actividad semejante a las hormonas, la glándula mamaria es considerada un importante blanco de los PEs. Los esteroides ováricos (E₂ y Pg) son reguladores claves del crecimiento, diferenciación y funcionalidad de la glándula mamaria que ejercen sus efectos biológicos por unión a receptores (Beato y Sánchez-Pacheco, 1996). Nos interesó evaluar si la exposición *in utero* a BPA modifica la esteroideogénesis ovárica y/o la expresión de RE y RP en la glándula mamaria.

Los niveles circulantes de E_2 y Pg en nuestros animales controles fueron similares a los documentados en la literatura para ratas en diestro (Smith y col., 1975; Freeman, 1988; Strange y col., 2007). En relación al efecto de la exposición a BPA sobre la producción de E_2 y Pg, estudios *in vitro* con células de la granulosa provenientes de ovarios de cerdos y ratas indicaron que la exposición a una dosis de BPA de 0,1mM disminuyó significativamente la producción tanto de E_2 como de Pg (Mlynarcikova y col., 2005; Zhou y col., 2008). A diferencia de los resultados descritos con modelos *in vitro*, en este estudio no describimos diferencias en los niveles de E_2 de los animales expuestos a BPA respecto de los controles. Estos resultados coinciden con los obtenidos previamente en otros modelos *in vivo* donde evaluamos el efecto de la exposición perinatal a BPA en ratones púberes (Muñoz-de-Toro y col., 2005) y en ratas pre-púberes (Monje y col., 2007). En cuanto a los niveles séricos de Pg se observó una disminución significativa en las hembras de DPN 50 de ambos grupos tratados *in utero* con BPA respecto del grupo control. Este cambio fue transitorio puesto que en DPN 110 los niveles de Pg no fueron diferentes entre los grupos experimentales. La disminución en la concentración de Pg podría deberse a diferencias en los cuerpos lúteos productos de las primeras ovulaciones, fenómeno que se regularizaría en los sucesivos ciclos estrales.

Siendo que no hubo cambios en los niveles de esteroides ováricos o estos fueron mínimos podríamos esperar cambios en la expresión de RE y/o RP que justifique una respuesta alterada de la glándula mamaria.

RE α . Durante el desarrollo posnatal de la glándula mamaria, la proliferación celular y la morfogénesis ductal están mediadas por el RE α . Los primeros trabajos con ratones α ERKO establecieron que el RE α era necesario en el estroma mamario para inducir respuestas en el epitelio, y concluyeron que la expresión del RE α en el parénquima no era indispensable (Korach y col., 1996; Bocchinfuso y col., 2000). Sin embargo, recientemente, utilizando un nuevo modelo de α ERKO se comprobó que las células epiteliales mamarias carentes del RE α , no crecen en un *fat pad* de ratones *wild-type*, es decir, en un estroma que expresa el RE α (Mallepell y col., 2006). Estos resultados refuerzan el concepto de la necesidad del RE α para que el parénquima mamario se desarrolle normalmente, frente a la exposición estrogénica. Utilizando un anticuerpo monoclonal, detectamos la marcación específica nuclear del RE α en el parénquima mamario que coincidió con el tipo de marcación descrito previamente (Saji y col., 2000; Cheng y col., 2005). La expresión del RE α (evaluada como una combinación entre el

número de células que expresan el receptor y la intensidad de la marcación) fue significativamente mayor en el grupo 250 BPA (DPN 50 y DPN 110) que en el grupo control (DMSO). El significado de este aumento es complejo. La expresión del RE α no presenta un patrón uniforme en los distintos modelos y dosis de BPA evaluados. En la glándula mamaria de ratones hembras, ya sea embriones (Vandenberg y col., 2007) como peripuberales (Muñoz-de Toro y col., 2005) expuestos prenatalmente a 25 y/o 250 ng/kg/d de BPA, el porcentaje de células que expresan RE α no se modificó.

RP. En la glándula mamaria de la rata virgen, la Pg induce ramificación lateral y la elongación de los conductos. Utilizando ratones *PRKO* (que carecen del gen que codifica para el RP), se demostró que ambos eventos están mediados por el RP (Haslam, 1988; Lydon y col., 1995; Shi y col., 2004). Siendo el gen del RP inducido por Eg y PRL, actuando a través de sus respectivos receptores (Dix y col., 1980; Viononen y col., 2002). Debido a que el BPA es un químico con actividad estrogénica, el estudio de la expresión del RP cobra mayor importancia. La expresión de la proteína del RP, evaluada utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce las dos isoformas del receptor (RP-A y RP-B), presentó un patrón de expresión nuclear y fue detectado en el parénquima de la glándula mamaria al igual que lo descrito previamente utilizando el mismo anticuerpo (Muñoz-de-Toro y col., 2005; Kariagina y col., 2007). El tratamiento *in utero* con BPA no indujo cambios en la expresión de este receptor en ninguna de las edades evaluadas.

Tanto el aumento del RE α (en ambas edades de 250 BPA) como la disminución de los niveles séricos de Pg en DPN 50 (los receptores hormonales pueden verse regulados hacia abajo (*down-regulated*) por su propia hormona-Yuri y col., 2006-) hubieran justificado un aumento en la expresión del RP; sin embargo la complejidad de los mecanismos reguladores generalmente invalida las justificaciones simples.

Tal como ocurre con la expresión del RE α , no existe un consenso respecto del efecto del BPA sobre la expresión del RP en distintos órganos y especies. En ratones la exposición perinatal a BPA indujo un aumento en el porcentaje de células RP positivas en el útero (Markey y col., 2005) y en la glándula mamaria (Muñoz-de-Toro y col., 2005). Las diferencias entre los resultados presentados en esta tesis y los comentados previamente podrían deberse a diferencias en la respuesta entre especies (rata vs ratón), diferencias en los métodos de evaluación (DOI vs porcentaje, respectivamente), dosis, etc.

Co-reguladores. La actividad transcripcional de los RE y RP está regulada por una variedad de proteínas celulares, entre las que se encuentran los co-reguladores, que a su

vez pueden ser regulados por hormonas (Molenda y col., 2003). SRC-3 es uno de los co-activadores más estudiados en la última década. Utilizando un anticuerpo policlonal obtenido y validado en nuestro laboratorio, estudiamos la expresión de SRC-3 en animales expuestos *in utero* a BPA. Nuestros resultados muestran que en DPN 50, el tratamiento con 250 BPA disminuyó significativamente la expresión de SRC-3 en el parénquima, respecto del grupo control. Esta expresión menor de SRC-3 ocurre simultáneamente con una caída en los niveles séricos de Pg y un incremento en la expresión del RE α , también en el parénquima. Hay evidencias de que la delección del gen SRC-3 comprometió el desarrollo de la glándula mamaria de ratones hembras, que mostraron un fenotipo similar al reportado en animales α ERKO y PRKO (Lydon y col., 1995; Bocchinfuso y Korach, 1997). En nuestro caso, podríamos sugerir que frente a la disminución de SRC-3, el aumento en la expresión del RE α actuaría como un mecanismo compensador, para garantizar el desarrollo normal de la glándula. No obstante, teniendo en cuenta que es menor la cantidad de Pg circulante y que la expresión de RP, no se vio modificada, podríamos preguntarnos si la glándula mamaria de los animales expuestos a 250 BPA, no está frente a un menor estímulo de Pg, durante esta etapa del desarrollo (DPN 50). En DPN 110, aún co-existe la menor expresión de SRC-3 con el incremento del RE α en el grupo 250 BPA, lo cual avalaría la idea de un mecanismo de compensación mediado por RE α . En las hembras expuestas a 25 BPA, no hubo cambios ni en la expresión de SRC-3 ni en el RE α , demostrando que la respuesta de la glándula mamaria es diferente, según la dosis de BPA utilizada.

El rol del co-represor SMRT (o NCoR 2) fue ampliamente investigado en modelos *in vitro* mientras que los estudios *in vivo* continúan siendo escasos. Los mecanismos moleculares por los cuales SMRT reprime la expresión génica parecen bastante complejos. Actuaría como co-activador del RE α (en presencia de un agonista de Eg), pero como co-represor de otros miembros de la superfamilia de receptores nucleares (Peterson y col., 2007). Utilizando un anticuerpo obtenido y validado en nuestro laboratorio evaluamos la expresión mamaria de SMRT. En el grupo control (DMSO) la expresión de SMRT aumentó con la edad (DPN 50 vs DPN 110), lo mismo ocurrió en el grupo 25BPA. A diferencia de lo observado en el grupo control y en 25BPA, en 250 BPA la expresión de SMRT no experimentó un aumento en DPN 110 respecto de DPN 50. Debido a que no está claramente establecido si SMRT actúa como un co-represor o como un co-activador, es difícil predecir si los cambios mencionados se traducirán en una represión o activación del

RE α . Sin embargo, si suponemos que en nuestro modelo, SMRT actúa como un co-represor, podemos especular que en las hembras de 250 BPA en DPN 110, su expresión no se ve incrementada (como ocurre en los grupos DMSO y 25 BPA) para “permitir” la acción compensatoria del RE α que ya hemos planteado, y no se reprimiría la respuesta de la glándula mediada por el RE α .

Como ya mencionamos, la complejidad de los mecanismos reguladores dificulta muchas veces nuestras interpretaciones. No podemos descartar que las diferencias en los niveles de expresión de co-reguladores entre las distintas dosis de BPA y las edades evaluadas, se deban a un reclutamiento diferencial de cofactores y co-reguladores de la transcripción mediada por los RE y/o RP. Otras vías probables son la metilación o el *splicing* de genes críticos que modificarían la expresión de proteínas implicadas en los eventos estudiados. Sin embargo, para confirmar estas hipótesis, deberíamos hacer ensayos más específicos (como inmunoprecipitación de cromatina –*ChIP: chromatin immunoprecipitation*-, interferencia de ARN –*interference RNA*- o metilación específica por PCR- *MSP*-) para poder establecer cómo la exposición a BPA modifica el reclutamiento o la transcripción de las mencionadas moléculas y así comprender el efecto final sobre el órgano *target*.

2.4. La exposición *in utero* a BPA indujo mayor angiogénesis

Área y densidad vascular. Utilizamos un anticuerpo anti-FvW para reconocer vasos sanguíneos en el estroma mamario. Demostramos que el tratamiento *in utero* con 250 BPA indujo un incremento del área vascular en DPN 50 y DPN 110; mientras que 25 BPA incrementó el área vascular solamente en animales de DPN 110. Para responder si estos cambios son debidos a un mayor número de vasos o a que cada vaso tiene un área mayor, calculamos la densidad vascular. La densidad vascular representa una medida de angiogénesis y también es utilizada como un indicador de agresividad neoplásica (Viacava y col., 2003). Comprobamos que para el grupo 250 BPA, el incremento en el área vascular se debió a un aumento en la densidad vascular. En cambio, para el grupo 25 BPA, no hubo diferencias en la densidad vascular, respecto del grupo control (DMSO), lo cual sugiere que en 25 BPA el aumento en el área vascular se debió a la existencia de vasos de mayor calibre. Es importante destacar que en este estudio existió una asociación temporal entre el aumento en la angiogénesis y la infiltración de mastocitos considerados promotores del proceso de angiogénesis en tejidos del tracto reproductor (Varayoud y col., 2004) y que el

aumento en la angiogénesis acompañó el desarrollo de las lesiones pre-neoplásicas. El papel fundamental de la angiogénesis para mantener niveles adecuados de oxígeno y nutrientes en las proliferaciones neoplásicas llevó a preguntarnos, qué otras vías pro-angiogénicas podrían activarse como consecuencia de la exposición al xenoestrógeno, BPA.

Uno de los mediadores de angiogénesis más conocidos y estudiados es el VEGF. El VEGF es una proteína inducida por los Eg, tanto *in vivo* (Stoner y col., 2000, 2004; Kazi y col., 2005; Koduri y col., 2006) como *in vitro* (Ruohola y col., 1999; Takei y col., 2002). Si bien VEGF estimula la angiogénesis, no siempre existe una asociación/correlación lineal entre desarrollo vascular (área o densidad vascular) y expresión de VEGF. En nuestro caso, mientras que en DPN 50 en animales de 250 BPA un aumento en la expresión de la proteína del VEGF acompañó al incremento del área y densidad vascular, esto no sucedió en DPN 110, donde la mayor angiogénesis no se asoció temporalmente a un aumento en la expresión de VEGF. Es posible que en DPN 110, cuando como consecuencia de la exposición prenatal a BPA se evidencia el desarrollo de lesiones mamarias preneoplásicas, no sea VEGF el mediador angiogénico predominante, cobrando importancia otras vías como la mediada por mastocitos o las activadas por hipoxia (Fox y col., 2007).

ETAPA II

1. Las ratas de la cepa Wistar son susceptibles a la acción de NMU

Varios factores contribuyen a la inducción de tumores mamarios en ratas, entre ellos, la edad de los animales al momento de la administración del carcinógeno, el carcinógeno en sí mismo y la susceptibilidad de la cepa de ratas utilizada. En el modelo empleado en esta tesis, cada uno de estos factores fue tenido en cuenta.

Respecto del carcinógeno, seleccionamos NMU porque: 1) tiene una vida media corta (menor a 30 min) y no necesita ser metabolizado para ser activo; 2) los tumores generados son principalmente Eg-dependientes, al igual que los carcinomas de mama humanos (Rose y col., 1980) y; 3) los carcinomas inducidos por lo general son agresivos y localmente invasivos (Thompson y Adlakha, 1991).

Utilizamos ratas de la cepa Wistar que es considerada como de susceptibilidad media/alta a NMU; a diferencia de las cepas Sprague-Dawley (de alta susceptibilidad) o Copenhagen (de baja susceptibilidad) (Isaacs, 1986).

En relación al momento de la administración, teniendo en cuenta los resultados de Thompson y colaboradores (1995) quienes utilizando ratas de la cepa Sprague-Dawley demostraron que la administración de NMU en DPN 21 resultaba en una mayor incidencia de tumores respecto a la de los animales inyectados en DPN 50 realizamos un experimento piloto con nuestras ratas Wistar. Comparamos la respuesta de la glándula mamaria a NMU, inyectando 50 NMU a animales pre-púberes (DPN 21) ó post-puberales (DPN 50) y demostramos que si bien el número de lesiones no difería, la latencia fue significativamente mayor en los animales inyectados en DPN 21 respecto a los inyectados en DPN 50. Además, considerando que este experimento fue diseñado para probar si la exposición *in utero* a BPA modifica la sensibilidad de la glándula a NMU, decidimos inyectar NMU en DPN 50 por dos razones adicionales: 1) el período comprendido entre DPN 50 y DPN 55 está caracterizado por una densidad muy alta de estructuras con elevado índice de proliferación (*TEBs*) (Russo y Russo, 1996); 2) según los resultados que obtuvimos en la ETAPA I, éste es el período en el cual los animales expuestos a BPA mostraron los índices más elevados en la relación IP/IA, considerado un factor de vulnerabilidad que favorece el desarrollo de lesiones neoplásicas (Shilkaitis y col., 2000).

Respecto a la dosis, la administración de una dosis carcinogénica de NMU (50 NMU) en DPN 50, resultó en una incidencia de tumores mamarios del 83,3%, mientras que con una dosis de 25 NMU, no detectamos tumores mamarios aún 18 semanas después de la inyección (DPN 180). Estos resultados justifican la elección de la dosis 25 NMU como sub-carcinogénica y de utilidad para evaluar posibles sinergismos y/o potenciación de los efectos debido a la administración *in utero* de BPA.

2. La asociación entre la exposición prenatal a BPA y posnatal a una dosis sub-carcinogénica de NMU promovió la progresión de lesiones pre-neoplásicas a neoplasias

Las interacciones estroma-epitelio, mediadas por la matriz extracelular, juegan un rol clave en la función de la glándula mamaria normal. Un estroma “anormal” o modificado puede ser entendido como un promotor clásico en la terminología de la carcinogénesis. La disfunción de las interacciones mesénquima-epitelio aumenta la probabilidad de que las lesiones pre-neoplásicas progresen a la malignidad (Cukierman, 2004). Así, un ambiente estromal modificado, tal como el que en esta tesis describimos en los animales expuestos a BPA, puede ser considerado “permisivo” para la tumorigénesis,

ya que conduce a la selección de células con características de supervivencia alteradas (Barcellos-Hoff y Medina, 2005).

En DPN 110, el tratamiento con BPA + NMU produjo cambios similares a los observados en animales expuestos sólo al xenoestrógeno BPA. Observamos un incremento significativo en el porcentaje de conductos hiperplásicos en el grupo 25 BPA + NMU. Los conductos hiperplásicos son considerados precursores de lesiones neoplásicas (Singh y col., 2000) que pueden progresar a la malignidad en un entorno apropiado (Russo y Russo, 1996; Thompson y col., 1998). Dado que en DPN 110 la relación IP/IA en el parénquima mamario de los animales del grupo 25 BPA + NMU no fue diferente de la del grupo control, podemos sugerir que los conductos hiperplásicos presentes a esta edad son una consecuencia de la relación IP/IA que ya se encontraba modificada en DPN 50. El tratamiento posnatal con NMU sólo habría contribuido con mantener un cambio ya iniciado por el BPA administrado prenatalmente. En cambio, en el estroma mamario, sí es mayor la relación IP/IA, aunque este cambio no se tradujo en un aumento en la densidad de núcleos del estroma, ni en una marcada reacción desmoplásica. En nuestro caso, no observamos modificaciones estructurales del estroma y supusimos que debería existir otro factor implicado en la progresión de las lesiones pre-neoplásicas. Detectamos que en los mismos animales que tienen un incremento significativo en el porcentaje de conductos hiperplásicos (25 BPA + NMU) hay mayor infiltración de mastocitos en el estroma y que la acumulación de estas células es mayor en el estroma alrededor de los conductos hiperplásicos. Estos resultados apoyan la hipótesis propuesta por Russo y Russo (1996), quienes postularon que los mastocitos liberarían factores angiogénicos y enzimas (como triptasa), que favorecerían la progresión de los conductos hiperplásicos a carcinomas ductales *in situ* y adenocarcinomas y están en concordancia con los trabajos que asocian a los mastocitos con aumento de la proliferación de células tumorales, promoción de angiogénesis necesaria para responder a los requerimientos de la neoplasia e invasión tumoral (Dabbous y col., 1986; 1995; Aoki y col., 2003).

En animales de DPN 180, tratados con 25 BPA + NMU, los cambios más significativos respecto del grupo control (DMSO + NMU) fueron: el aumento en el porcentaje de conductos hiperplásicos y la inducción de tumores. El aumento en el porcentaje de conductos hiperplásicos podría ser una consecuencia del crecimiento de las mismas lesiones observadas en los animales de DPN 110. Este resultado demuestra que en la cepa Wistar, a diferencia de lo que ocurre con otras cepas, por ejemplo Copenhagen (Korkola y Archer, 1999), los conductos hiperplásicos no son estructuras que regresen a

medida que transcurre el tiempo. En nuestro modelo, el porcentaje de conductos hiperplásicos, no sólo no disminuyó, sino que las lesiones presentes progresaron a carcinoma ductal *in situ*, de tipo papilar, cribiforme y mixto. El 13,3% (2/15) de los animales expuestos a 25 BPA + NMU desarrollaron tumores, con $2,5 \pm 2,1$ tumores/animal (multiplicidad). Es aún desconocido el mecanismo involucrado en el origen y progresión de las lesiones neoplásicas luego de la exposición a Eg sintéticos o xenoestrógenos. Se postula que cualquier agente que interfiera con la regulación de la división y muerte celular, aumenta la vulnerabilidad del órgano *target*. Otra teoría propone un origen fetal para las enfermedades adultas y sugiere que los cambios epigenéticos juegan un rol central en la carcinogénesis (Li y colaboradores, 2003). La teoría de la organización tisular propone que la perturbación de las interacciones mesénquima-epitelio aumenta la probabilidad de que las lesiones pre-neoplásicas progresen a la malignidad.

Observamos una disminución en la infiltración de mastocitos en el grupo 25 BPA + NMU, respecto del grupo control (DMSO + NMU). Este resultado refuerza la idea de que los mastocitos contribuirían a la progresión de los conductos hiperplásicos (Russo y Russo, 1996), ya que en DPN 180, algunos animales ya desarrollaron tumores, y es posible que la mayoría de los conductos hiperplásicos ya se encuentren “activados”, en un estadio más avanzado hacia la tumorigénesis, por lo cual la colaboración de los mastocitos (mediante la liberación de factores angiogénicos y/o colagenolíticos) se torna menos necesaria.

En el grupo que denominamos “control de actividad carcinogénica” (50 NMU), el porcentaje de conductos hiperplásicos no fue diferente del grupo DMSO + NMU, pero menor que el de los animales del grupo 25 BPA + NMU, lo cual aporta evidencia de que la generación de conductos hiperplásicos está estrecha y directamente vinculada con la acción del BPA (Murray y col., 2007).

3. Los tumores generados por la administración de NMU son hormonodependientes

Conocer el patrón de expresión de receptores hormonales de los tumores de mama, es una de las principales herramientas con que cuenta la medicina para establecer el pronóstico y tratamiento de la enfermedad (Hayes y col., 2001). Esto nos da una idea de la importancia de caracterizar a los tumores de mama, aún cuando éstos se generen en animales de experimentación (ratones y ratas), puesto que serán los primeros en los cuales se realizarán las pruebas de respuesta a determinados tratamientos. Los tumores generados

en animales expuestos *in utero* a 25 BPA y posnatalmente a una dosis subcarcinogénica de NMU, fueron clasificados como carcinomas ductales *in situ* con patrón papilar, cribiforme o mixto (papilar con áreas cribiformes o viceversa), coincidiendo con publicaciones previas (Thompson y col., 2000; Singh y col., 2000).

En relación a la hormonodependencia, todos los tumores fueron positivos para el RE α y para el RP. La expresión de RP (proteína inducida por Eg) indicaría que la vía Eg-RE α está biológicamente activa. El patrón de expresión de los receptores para esteroides ováricos fue idéntico en los tumores generados con la dosis carcinogénica de NMU (50 mg/kg) y sin exposición a BPA, lo que sugiere que la exposición previa al xenoestrógeno no modificó la respuesta del tejido mamario en cuanto a la expresión de los receptores hormonales evaluados.

Otra forma de estudiar el comportamiento tumoral es mediante la evaluación de factores pro-angiogénicos. Medir la neovascularización, ya sea directamente (contando nuevos vasos) o indirectamente (monitoreando factores angiogénicos y sus receptores) permite aportar datos que permitan pronosticar el curso de la enfermedad (Hayes y col., 2001). Todos los tumores generados en nuestro modelo, expresaron la proteína del VEGF y dicha expresión fue mayor en el parénquima que en el estroma circundante (evaluación cualitativa de la expresión de VEGF). Cada vez se torna más clara la importancia de la caracterización de los tumores para la correcta aplicación terapéutica. Así, en un intento por disminuir el desarrollo tumoral, desde hace un tiempo, se están buscando agentes o drogas que permitan detener o impedir la angiogénesis tumoral, con el objetivo de evitar la recidiva del tumor y prolongar el período libre de enfermedad. En tumores mamarios de ratones y perros hembras, se demostró que la administración de un derivado sintético de la vasopresina (la desmopresina, con propiedades fibrinolíticas y hemostáticas) redujo significativamente la metástasis en pulmón y nódulos linfáticos, si la droga es administrada en el período peri-operatorio (Girón y col., 2002; Hermo y col., 2008). Lo cual demuestra que el proceso de angiogénesis es fundamental para permitir el desarrollo y diseminación tumoral.

Si bien hemos delineado algunas explicaciones para los resultados que presentamos, creemos que este campo de investigación se encuentra aún poco explorado. Nuevos experimentos ayudarían a comprender, por ejemplo, el rol que juega el estroma

mamario en la iniciación, promoción o progresión de la enfermedad y cómo este compartimiento se ve influenciado por diversos PEs.

Si bien la EPA y la Comisión Europea establecieron una dosis de 50 µg/kg pc/d como “dosis segura” e “ingesta diaria tolerable”, respectivamente; los resultados presentados en esta tesis y otros ya reportados por nuestro laboratorio (Markey y col., 2001; Ramos y col., 2001, 2003; Stoker y col., 2003, 2008; Muñoz-de-Toro y col., 2005; Monje y col., 2007; Varayoud y col., 2008) indicarían que es necesario replantear la discusión de las dosis consideradas “seguras” como medida preventiva según lo establece el principio de precaución redactado en la Conferencia de Wingspread en 1998. (<http://www.sehn.org/wing.html>).

Tampoco podemos perder de vista que muchos de los efectos provocados por los PEs permanecen “silentes” y recién se activan frente a estímulos endocrinos como la pubertad, la madurez sexual, la gestación.

Desde nuestro lugar, estamos interesados en generar conciencia acerca de los efectos adversos de los PEs, de modo tal de cuidar nuestra salud, la de nuestros hijos y la del medio ambiente. Creemos que es necesario desarrollar políticas orientadas a prevenir la exposición innecesaria a sustancias nocivas, estamos convencidos de que “preservar la salud”, no debe ser simplemente un mensaje más.