

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctora en Ciencias Biológicas

**FITOSANITARIOS Y SU INFLUENCIA EN EL
DESARROLLO MAMARIO MASCULINO EN
LA RATA**

Ayelen L. Gomez

Director de Tesis: Dra. Laura Kass

Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (CONICET-UNL) - Facultad de
Bioquímica y Ciencias Biológica - Universidad Nacional del Litoral

-2022-

A mis padres, Andrea y Alejandro, por su amor incondicional y por brindarme su apoyo en cada paso

A mi hermana, Ivana, por acompañarme siempre

A mis abuelas, siempre presentes

A Migue, por incentivarme cada día y elegirme para recorrer esta vida juntos

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, por ofrecerme la posibilidad de realizar tanto la carrera de grado como de posgrado, y hacer posible la realización de este trabajo.

Al CONICET, por haberme otorgado la beca interna de posgrado que permitió la realización de esta tesis doctoral.

A las directoras del ISAL, la Dra. Mónica Muñoz-de-Toro y la Dra. Laura Kass por permitirme formar parte de este grupo de trabajo y apoyarme durante el desarrollo de mi trabajo de investigación a lo largo de todos estos años.

A mi querida directora, la Dra. Laura Kass, por brindarme el apoyo y la confianza necesarios para cumplir esta meta, por su paciencia, sus consejos y por todas las enseñanzas a lo largo de esta etapa.

A mis compañeros y amigos del ISAL y de Patología Humana, quienes estuvieron presentes y me brindaron su apoyo durante esta etapa, por su amistad y por cada momento compartido. Especialmente a Gabi, por ayudarme en todo momento, por la motivación y buena predisposición siempre.

A mis amigas de la vida y de la facultad por su apoyo incondicional, por sus consejos y por incentivarne a cumplir todas las metas que me propongo.

A mi familia, mis padres, abuelas, tía y hermana, por su amor incondicional y por alentarme para alcanzar todos mis anhelos. Muchos de los logros se los debo a ustedes.

A mi amor, Migue, por ser la mejor compañía a lo largo de estos años, por aconsejarme y compartir mis alegrías y tristezas. Porque sin su apoyo todos estos logros no hubiesen sido posibles.

A todas aquellas personas que formaron parte de esta etapa e hicieron posible la realización de esta tesis doctoral.

PUBLICACIONES

Los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis forman parte de las siguientes publicaciones:

- **Gomez, A. L.**, Altamirano, G. A., Leturia, J., Bosquiazzo, V.L., Muñoz-de-Toro, M., Kass, L. (2019). Male mammary gland development and methylation status of estrogen receptor alpha in Wistar rats are modified by the developmental exposure to a glyphosate-based herbicide. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 481, 14-25.
- **Gomez, A.L.**, Altamirano, G.A., Tschopp, M.V., Bosquiazzo, V.L., Muñoz-de-Toro, M., Kass, L. (2020). Exposure to a glyphosate-based herbicide alters the expression of key regulators of mammary gland development on pre-pubertal male rats. *Toxicology*, 439, 152477.

Además, he participado en otros trabajos que dieron origen a las siguientes publicaciones:

- Altamirano, G.A., Delconte, M.B., **Gomez, A.L.**, Alarcón, R., Bosquiazzo, V.L., Luque, E.H., Muñoz-de-Toro, M., Kass, L. (2017). Early postnatal exposure to endosulfan interferes with the normal development of the male rat mammary gland. *Toxicology Letters*, 281, 102-109.
- Altamirano, G.A., Delconte, M.B., **Gomez, A.L.**, Ingaramo, P., Bosquiazzo, V.L., Luque, E.H., Muñoz-de-Toro, M., Kass, L. (2018). Postnatal exposure to a glyphosate-based herbicide modifies mammary gland growth and development in Wistar male rats. *Food and Chemical Toxicology*, 118, 111-118.
- Rossetti, M.F., Schumacher, R., Lazzarino, G.P., **Gomez, A.L.**, Varayoud, J., Ramos, J.G. (2019). The impact of sensory and motor enrichment on the epigenetic control of steroidogenic-related genes in rat hippocampus. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 485, 44-53.
- Altamirano, G.A., **Gomez, A.L.**, Schierano-Marotti, G., Muñoz-de-Toro, M., Rodriguez, H.A., Kass, L. (2020). Bisphenol A and benzophenone-3 exposure alters milk protein expression and its transcriptional regulation during functional differentiation of the mammary gland *in vitro*. *Environmental Research*, 191, 110185.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	9
RESUMEN.....	12
ABSTRACT.....	16
INTRODUCCIÓN.....	20
1 Morfología e histología de la glándula mamaria de la rata.....	21
1.1 Generalidades.....	21
1.2 Estructura histológica de la glándula mamaria.....	22
1.2.1 Dimorfismo sexual de la glándula mamaria de la rata.....	24
2 Desarrollo de la glándula mamaria.....	26
3 Regulación del desarrollo de la glándula mamaria.....	29
3.1 Desarrollo fetal.....	29
3.2 Desarrollo puberal.....	29
3.3 Desarrollo post-puberal.....	31
3.3.1 Estrógenos.....	32
3.3.2 Progesterona.....	32
3.3.3 Andrógenos.....	33
3.3.4 Prolactina.....	34
4 Perturbadores endócrinos.....	35
4.1 Efecto de los perturbadores endócrinos sobre la epigenética.....	37
4.2 La glándula mamaria de ratas macho en el estudio de perturbadores endócrinos.....	38
4.3 Glifosato.....	39
4.3.1 Propiedades químicas y metabolismo.....	39
4.3.2 Exposición ambiental y aspectos regulatorios.....	40
4.3.3 Efectos de la exposición a glifosato y HBG.....	41
4.4 Propiconazole.....	43
4.4.1 Propiedades químicas y metabolismo.....	44
4.4.2 Exposición ambiental y aspectos regulatorios.....	44

4.4.3 Efectos de la exposición a propiconazole.....	46
OBJETIVOS.....	48
1 Objetivo general	49
2 Objetivos específicos.....	49
MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
1 Animales.....	51
2 Diseño experimental.....	51
2.1 Desarrollo mamario en ratas macho y hembra de la cepa Wistar.....	51
2.2 Efectos de fitosanitarios sobre el desarrollo mamario en machos.....	51
2.2.1 Preparación del alimento suplementado con glifosato	53
2.2.2 Preparación de la solución de propiconazole.....	53
2.2.3 Dosis utilizadas.....	54
3 Obtención de muestras.....	54
3.1 Muestras de suero.....	54
3.2 Mastectomía	54
4 Procesamiento de muestras	55
4.1 Estudios a partir del montaje completo de la glándula (<i>whole-mount</i>)	55
4.2 Estudios por microscopía óptica.....	55
4.3 Estudios por PCR en tiempo real.....	56
4.3.1 Extracción de ARN total.....	56
4.3.2 Extracción de ADN genómico.....	57
5 Determinaciones séricas.....	57
5.1 Determinación de glifosato y AMPA	57
5.2 Determinación de E2 y T.....	57
5.3 Determinación de PRL	57
6 Evaluación del desarrollo de la glándula mamaria en WMs.....	58
7 Evaluación de la histología de la glándula mamaria.....	59
8 Evaluación de la expresión de proteínas en la glándula mamaria.....	60

8.1 Generación de anticuerpos anti-Ki67	60
8.2 Inmunohistoquímica	60
8.3 Inmunofluorescencia	61
9 Análisis de la expresión de ARNm mediante RT-PCR en tiempo real.....	62
9.1 Transcripción reversa (RT).....	62
9.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real	62
9.3 Electroforesis en gel de agarosa	65
10 Análisis de metilación del ADN	65
10.1 Bioinformática.....	65
10.2 Análisis del estado de metilación del ADN mediante MSRE-PCR	66
11 Análisis estadístico.....	67
CAPÍTULO 1. SIMILITUDES Y DIFERENCIAS EN EL DESARROLLO MAMARIO DE RATAS HEMBRA Y MACHO.....	68
1 Introducción.....	69
2 Objetivos específicos.....	69
3 Materiales y métodos.....	69
3.1 Análisis estadístico	69
4 Resultados	70
5 Discusión	72
CAPÍTULO 2. DOSIS DIARIAS DE FITOSANITARIOS RECIBIDAS POR LAS MADRES F0 Y PARÁMETROS GENERALES DEL MODELO EXPERIMENTAL	74
1 Introducción.....	75
2 Objetivos específicos.....	75
3 Materiales y métodos.....	75
3.1 Análisis estadístico	76
4 Resultados	76
4.1 Exposición a HBG y GLI	76
4.2 Exposición a PRO y PROGLI	78
5 Discusión	80

CAPÍTULO 3. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN PERINATAL AL HERBICIDA A BASE DE GLIFOSATO SOBRE EL DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMARIA 83

1 Introducción.....	84
1.1 Efectos de glifosato o HBG sobre la glándula mamaria.....	84
1.1.1 Mecanismos de regulación transcripcional de ESR1.....	84
1.2 Modificaciones epigenéticas ocasionadas por glifosato o HBG.....	85
2 Objetivos específicos.....	86
3 Materiales y métodos.....	86
3.1 Evaluación de la histología de la glándula mamaria	87
3.2 Cuantificación de proteínas evaluadas por inmunohistoquímica	88
3.3 Análisis de proteínas evaluadas por inmunofluorescencia.....	90
3.4 Análisis estadístico.....	90
4 Resultados	90
4.1 Evaluación del crecimiento de la glándula mamaria a partir de WMs en machos expuestos a HBG3.5 y HBG350	90
4.2 Análisis del desarrollo mamario en machos post-puberales expuestos a HBG3.5 y HBG350	92
4.2.1 Morfología de la glándula mamaria de machos post-puberales	92
4.2.2 Proliferación y expresión de los receptores de hormonas esteroides en animales post-puberales.....	93
4.2.3 Abundancia relativa de las variantes transcripcionales de ESR1 en la glándula mamaria de los machos post-puberales	94
4.2.4 Estado de metilación de los promotores de ESR1 en los animales post-puberales	95
4.3 Análisis del desarrollo mamario en machos pre-puberales expuestos a HBG3.5 y HBG350	97
4.3.1 Análisis histológico de la glándula mamaria de machos pre-puberales	97
4.3.2 Proliferación de células epiteliales y adipocitos en la glándula mamaria de los machos en DPN21	98

4.3.3 Expresión de genes que regulan el desarrollo mamario en animales expuestos a HBG3.5 y HBG350 en DPN21	99
5 Discusión	100
CAPÍTULO 4. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN AL PRINCIPIO ACTIVO GLIFOSATO SOBRE LA GLÁNDULA MAMARIA Y SU COMPARACIÓN CON LOS EFECTOS GENERADOS POR EL HERBICIDA DE USO COMERCIAL.....	107
1 Introducción.....	108
2 Objetivos específicos.....	108
3 Materiales y métodos.....	109
3.1 Cuantificación de proteínas evaluadas por inmunohistoquímica	109
3.2 Análisis estadístico.....	109
4 Resultados	110
4.1 Evaluación del desarrollo de la glándula mamaria en DPN60 en machos expuestos a HBG y GLI.....	110
4.2 Proliferación y expresión de receptores de hormonas esteroides en machos expuestos a HBG y GLI en DPN60.....	111
4.3 Abundancia relativa de las variantes transcripcionales de ESR1 y estado de metilación del promotor ESR1-OS en animales tratados con HBG y GLI en DPN60	112
4.4 Expresión de genes implicados en el desarrollo mamario en animales expuestos a HBG y GLI en DPN60.....	113
5 Discusión	114
CAPÍTULO 5. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN PERINATAL A GLIFOSATO, PROPICONAZOLE Y LA MEZCLA DE AMBOS FITOSANITARIOS SOBRE EL DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMARIA	116
1 Introducción.....	117
1.1 Exposición a mezclas de compuestos	117
1.1.1 Efectos de compuestos químicos en una mezcla	117
1.2 Exposición a propiconazole.....	118
2 Objetivos específicos.....	118
3 Materiales y métodos.....	119

3.1 Evaluación de la histología de la glándula mamaria	120
3.2 Cuantificación de proteínas evaluadas por inmunohistoquímica	120
3.3 Análisis estadístico	121
4 Resultados	121
4.1 Evaluación del desarrollo y crecimiento de la glándula mamaria de machos pre- y post-puberales pertenecientes a los grupos experimentales GLI, PRO y PROGLI.....	121
4.2 Análisis del desarrollo mamario de machos post-puberales expuestos a GLI, PRO y PROGLI	123
4.2.1 Análisis histológico de la glándula mamaria en DPN60	123
4.2.2 Expresión de genes implicados en la regulación del desarrollo mamario y el ciclo celular en animales post-puberales.....	125
4.2.3 Expresión de aromatasa en la glándula mamaria en DPN60	126
4.3 Análisis del desarrollo mamario en machos pre-puberales expuestos a GLI, PRO y PROGLI	127
4.3.1 Análisis histológico de la glándula mamaria en machos pre-puberales	127
4.3.2 Proliferación y expresión de ESR1 en DPN21	128
4.3.3 Fosforilación de Erk1/2 en machos pre-puberales.....	129
5 Discusión	129
CONCLUSIONES.....	136
BIBLIOGRAFÍA.....	139
ANEXO	167

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

%	Por ciento
°C	Grados centígrados
α-SMA	Alfa actina de músculo liso
μg	Microgramo
μm	Micrómetro
AB	<i>Alveolar buds</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
AhR	Receptor de aril-hidrocarburo
AMPA	Ácido aminometilfosfónico
Areg	Anfirregulina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BPA	Bisfenol A
Ccnd1	Ciclina D1
col.	colaboradores
cPAD	Dosis crónica ajustada a la población
Ct	Ciclo umbral
DAB	Diaminobencidina
DAPI	4,6-diamidina-2-fenilindol
DES	Dietilestilbestrol
DG	Día de gestación
DL	Día de lactancia
DOI	Densidad óptica integrada
DPN	Día postnatal
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato
E2	17 β -estradiol
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
ESR1	Receptor de estrógenos alfa
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FGFR	Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos

g	Gramo
GH	Hormona de crecimiento
H&E	Hematoxilina y eosina
HBG	herbicida a base de glifosato
h	Horas
IDA	Ingesta diaria admisible
IGF1	factor de crecimiento similar a la insulina 1
IGF1R	receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1
ISAL	Instituto de Salud y Ambiente del Litoral
JMPR	<i>Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues</i>
Kg	Kilógramo
LMR	Límite máximo de residuos
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
MMP	Metaloproteinasas de la matriz
MSRE-PCR	<i>Methylation-Sensitive Restriction Enzymes-PCR</i>
N°	Número
ng	Nanogramos
NL	Nódulo linfático
NOAEL	<i>No observed adverse effect level</i>
OECD	Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo
P&H	Picrosirius y hematoxilina
pb	Pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Perturbadores endocrinos
p-Erk1/2	Quinasa regulada por señales extracelulares 1/2 fosforilada
pg	Picogramos
PPARα	Receptor activado por proliferadores peroxisomales alfa
PR	Receptor de progesterona
PRL	Prolactina
RA	Receptor de andrógenos
RT	Transcripción reversa

Seg	Segundos
SEM	Error estándar medio
SERM	Modulador selectivo del receptor de estrógenos
T	Testosterona
TA	Tejido adiposo
TC	Tejido conectivo
TEB	<i>Terminal end buds</i>
V	Voltaje
WHO	Organización Mundial de la Salud
WMs	<i>Whole-mounts</i>
Wnt	<i>Wingless-related MMTV integration site</i>
5'UTR	Región 5' no traducible

RESUMEN

La glándula mamaria es un tejido sensible a los efectos de químicos exógenos capaces de interferir con la acción hormonal. La exposición a este tipo de compuestos en diferentes momentos de la vida puede conllevar importantes consecuencias para la salud, como pueden ser un aumento del riesgo a desarrollar ciertos tipos de cáncer de mama o una lactancia inadecuada en hembras. En las últimas décadas, como resultado de la acción antropogénica, se ha evidenciado la presencia masiva de compuestos químicos en el medio ambiente que presentan una inesperada acción de perturbación endócrina. En este sentido, la glándula mamaria de ratas macho se ha propuesto como un modelo apropiado para el estudio de los efectos de perturbadores endócrinos (PE); algunos PE han mostrado efectos sobre el desarrollo mamario en los machos más tempranamente que en las hembras, mientras que otros solo han modificado la glándula mamaria de los machos.

El glifosato es el principio activo de numerosas formulaciones de herbicidas (herbicidas a base de glifosato – HBG) de amplio espectro que se utilizan ampliamente a nivel mundial para erradicar las malezas en áreas agrícolas y para la desecación química post-cosecha. Numerosos estudios han demostrado que la exposición a glifosato o HBG durante períodos críticos del desarrollo puede alterar el sistema reproductor femenino y masculino, mientras que estudios *in vitro* sugieren que este compuesto podría presentar una acción de perturbación endócrina. Sin embargo, los efectos de la exposición a glifosato o sus formulaciones sobre la glándula mamaria han sido poco estudiados. Estudios previos han reportado que una exposición subcutánea en una etapa postnatal temprana a un HBG provoca un mayor desarrollo de la glándula mamaria y un incremento en la proliferación celular en ratas macho, mientras que en ratas hembra de edad avanzada aumenta la presencia de conductos hiperplásicos. Por otro lado, el propiconazole es un fungicida sistémico del grupo de los triazoles que posee una acción de amplio espectro para el control de hongos en una variedad de cultivos. Los datos acerca de los niveles de utilización de este compuesto son limitados, si bien su uso no se encuentra aprobado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, éste se encuentra permitido en Argentina. Numerosos estudios *in vitro* han demostrado que el propiconazole es capaz de alterar distintos aspectos de la esteroidogénesis y afectar a la actividad de ciertos receptores hormonales, mientras que estudios *in vivo* han reportado alteraciones sobre el sistema reproductor masculino. A pesar de estos antecedentes, los efectos de este compuesto sobre la glándula mamaria no han sido estudiados. En base a lo descripto anteriormente, en esta tesis nos propusimos evaluar las diferencias en el desarrollo mamario entre ratas macho y hembra para luego analizar si la exposición perinatal (gestación + lactancia) a un HBG, glifosato o propiconazole altera el desarrollo en la glándula mamaria de animales macho en la pre- y post-pubertad. Para analizar diferencias en el desarrollo mamario de hembras y machos se obtuvieron muestras de glándulas mamarias de ambos sexos al destete (día postnatal - DPN21) y en DPN60. Por otro lado, para evaluar los efectos de los fitosanitarios sobre

el desarrollo mamario en machos, ratas hembra preñadas de la cepa Wistar (F0) fueron expuestas a una formulación comercial de glifosato (HBG3.5: 3.7 mg/kg/día y HBG350: 352 mg/kg/día), a glifosato puro (GLI: 3.9 mg/kg/día), a propiconazole (PRO: 4 mg/kg/día) y a la mezcla de fitosanitarios (PROGLI: 4 mg de propiconazole/kg/día y 3.7 mg de glifosato/kg/día). Las dosis mencionadas corresponden a las dosis reales de fitosanitarios a las que estuvieron expuestas las hembras F0; la exposición a HBG y glifosato fue realizada a través de la dieta desde el día de gestación 9 (DG9) hasta el destete, mientras que el tratamiento con propiconazole se administró por vía intragástrica desde el DG10 hasta el destete, cada 48 h. Los machos F1 fueron sacrificados en DPN21 y DPN60 y se obtuvieron muestras de glándulas mamarias y suero.

Primeramente, se evaluaron las diferencias de la glándula mamaria de hembras y machos. En DPN21 y DPN60 se evaluó el desarrollo y crecimiento de la glándula mamaria a través de *whole-mounts* (WMs) y la histología de la misma. En DPN21, la glándula mamaria de las ratas macho presentó menor área, perímetro, n° de TEBs y área epitelial relativa, en comparación con las hembras, mientras que la histología fue similar entre ambos sexos. Por otro lado, en DPN60, en los machos se observó un menor crecimiento longitudinal y n° de TEBs comparado con las hembras. En cuanto a la histología los machos presentaron mayor desarrollo lobuloalveolar, mientras que en las hembras se observaron principalmente conductos y una mayor proporción de tejido adiposo. Estos resultados concuerdan con las características de la glándula mamaria de ratas descritas previamente.

En una segunda etapa evaluamos los efectos de la exposición perinatal a HBG sobre la glándula mamaria de ratas macho. Se evaluaron los niveles séricos de estradiol (E2), testosterona (T) y prolactina (PRL) y el desarrollo mamario a partir de WMs y secciones histológicas. Además, en DPN60 se determinó el área ocupada por las estructuras epiteliales (área epitelial relativa) y el área de los adipocitos. Se determinó la proliferación celular (células positivas para Ki67) y la expresión de los receptores de estrógenos alfa (ESR1) y andrógenos (RA), de Ciclina D1 (Cnd1) y de moléculas involucradas en la morfogénesis ductal [i.e.: Anfirregulina (Areg), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1), receptor de IGF1 (IGF1R), quinasa regulada por señales extracelulares 1/2 fosforilada (p-Erk1/2)]. Finalmente, se analizó la expresión de las variantes transcripcionales de ESR1 y se realizó un análisis de metilación de ADN genómico (ADNg) de sus promotores. La exposición a HBG no modificó los niveles séricos de E2 ni T, pero HBG350 aumentó los niveles de PRL en DPN60, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. En DPN60 el tratamiento con HBG3.5 redujo el área y el perímetro de la glándula mamaria y aumentó el número de TEBs, pero no modificó la histología de la misma, mientras que la exposición a HBG350 generó un mayor crecimiento longitudinal y menor desarrollo del árbol mamario comparado con el grupo control. La glándula mamaria de estos animales presentó un menor desarrollo de las estructuras

lobuloalveolares, menor área epitelial relativa y mayor área de los adipocitos. En cuanto a la proliferación celular y la expresión de receptores de hormonas esteroides, los machos expuestos a HBG3.5 presentaron una menor expresión proteica y del ARNm de ESR1, un incremento en la expresión proteica de RA y una disminución en sus niveles de ARNm. Por otro lado, en los machos HBG350 la proliferación disminuyó y la expresión de ESR1 (proteína y ARNm) se redujo. Al evaluar la expresión de las variantes transcripcionales de ESR1 se observó que HBG3.5 redujo la expresión de la variante ESR1-OS, mientras que HBG350 disminuyó la expresión de ESR1-O, OT y E1; en todos los casos, la reducción de la expresión de las variantes transcripcionales estuvo asociada con una hipermetilación de sus promotores. En DPN21, por otro lado, la exposición a HBG no modificó el crecimiento y desarrollo de la glándula mamaria, pero la menor dosis redujo la proliferación celular. Ambas dosis de HBG disminuyeron la expresión de los ARNMs de ESR1, Ccnd1, EGFR e IGF1R, mientras que solo HBG3.5 disminuyó la expresión de Areg e IGF1 y la marcación de p-Erk1/2 en los TEBs. Los resultados hallados en DPN21 en los animales expuestos a HBG3.5 podrían explicar la reducción del crecimiento de la glándula observado en los animales post-puberales. Otros mecanismos de acción deberían evaluarse para explicar las modificaciones halladas en DPN60 en el caso de HBG350, aunque el aumento de los niveles de PRL podría influir en estas alteraciones.

Dado que los efectos generados por HBG pueden diferir de los ocasionados por glifosato puro, seguidamente nos propusimos analizar la acción de GLI sobre la glándula mamaria de ratas macho post-puberales y evaluar si ésta difería de la acción de HBG. Se evaluó el desarrollo mamario a partir de WMs y secciones histológicas y se determinó la proliferación celular y la expresión de ESR1, RA, Ccnd1, EGFR, el receptor de PRL (PRLR) y de las variantes transcripcionales de ESR1. Además, se analizó la metilación del ADN del promotor de ESR1-OS. En los animales expuestos a GLI, el área y el perímetro de la glándula mamaria no fueron diferentes a los animales tratados con HBG, aunque tampoco difirieron del grupo control. Al igual que HBG, GLI no modificó la histología de la glándula ni la proliferación celular, pero si disminuyó la expresión proteica y del ARNm de ESR1 y de los ARNMs de RA, EGFR y PRLR. Sin embargo, la expresión proteica de RA y del ARNm de Ccnd1 en los machos expuestos a GLI no fue diferente al control ni a HBG. Finalmente, ambos grupos experimentales presentaron una reducción en la expresión de ESR1-OS y un aumento en la metilación de su promotor, pero en los machos expuestos a GLI éste fue menos pronunciado que en HBG. En base a estos resultados, los efectos observados en los animales expuestos a HBG podrían deberse principalmente al compuesto activo, aunque serían potenciados por los adyuvantes presentes en la formulación comercial.

En la última etapa de esta tesis, nos propusimos evaluar los efectos de la exposición perinatal a GLI, PRO y la mezcla de fitosanitarios (PROGLI) sobre la glándula mamaria de ratas macho. Se evaluó el desarrollo mamario a partir de WMs y secciones histológicas y la presencia de lesiones

mamarias. Además, en DPN60 se determinó la proliferación celular, la expresión de ESR1, p27, Ccnd1, RA, Wnt5a y aromataasa, mientras que en DPN21 se evaluó la proliferación celular, la expresión de ESR1 y la marcación de p-Erk1/2. En DPN60, la exposición a GLI disminuyó el área de la glándula mamaria en comparación con el grupo control, y no se observaron diferencias entre los demás grupos experimentales. En cuanto a la histología de la glándula, los machos expuestos a PRO presentaron un mayor *score* de desarrollo lobuloalveolar, mientras que los expuestos a PROGLI no fueron diferentes al control ni a PRO. Además, se evidenció la presencia de hiperplasias lobuloalveolares en los animales expuestos a PRO (3 de 11 animales) y PROGLI (1 de 11 animales), sin observarse este tipo de estructuras en los grupos control y GLI. Los animales expuestos a GLI presentaron una menor expresión de ESR1, mientras que en los machos PROGLI ésta no fue diferente al control ni a GLI. No se observaron diferencias en la proliferación celular ni en la expresión de p27, Ccnd1, RA y Wnt5a entre los distintos grupos experimentales, pero la exposición a GLI aumentó la expresión de aromataasa. Por otro lado, en DPN21, los machos expuestos a PROGLI presentaron una reducción transitoria en el área de la glándula mamaria, mientras que la histología de la glándula fue similar entre los grupos experimentales. La expresión de ESR1 no fue modificada por la exposición a los fitosanitarios, mientras que GLI disminuyó la proliferación celular y PRO aumentó la marcación nuclear de p-Erk1/2 en los conductos mamarios. A partir de estos resultados puede concluirse que ambos agroquímicos alteran el desarrollo de la glándula mamaria; sin embargo, estos efectos no se observan cuando los animales son expuestos a la mezcla de los mismos, evidenciándose un efecto antagónico.

En conjunto, nuestros resultados muestran que la exposición a HBG, GLI o PRO durante la preñez y la lactancia altera el desarrollo de la glándula mamaria de ratas macho. En general los efectos más notorios se observan en la etapa post-puberal, como alteraciones en el crecimiento y la morfología, mientras que en la etapa pre-puberal los efectos son sutiles, como modificaciones en la proliferación y expresión de genes implicados en el desarrollo mamario. Esto destaca la importancia de evaluar los efectos generados por los PE en distintas edades, ya que tanto los efectos sobre la glándula mamaria como el momento en el cual éstos se evidencian pueden variar. Además, el efecto antagónico generado por la exposición a la mezcla demuestra la posibilidad de interacción entre pesticidas, lo que enfatiza la necesidad de evaluar los efectos de la exposición a mezclas de los mismos.

En conclusión, los resultados de esta tesis aportan nuevas evidencias a favor del potencial de PE de glifosato, sus formulaciones comerciales y propiconazole, como así también conocimiento acerca de los mecanismos moleculares afectados. Además, enfatizan la elevada sensibilidad de la glándula mamaria de ratas macho a compuestos con acción hormonal, durante períodos críticos del desarrollo.

ABSTRACT

The mammary gland is an organ sensitive to the effects of exogenous chemicals capable of interfering with hormonal action. Exposure to this type of compound at different times in life can lead to significant health consequences, such as an increased risk of developing certain types of breast cancer or inadequate lactation in females. In recent decades, because of human action, the massive presence of chemicals in the environment that have an unexpected action of endocrine disruption has been evidenced. In this sense, the male rat mammary gland has been established as an appropriate model to study the effects of endocrine disrupting chemicals (EDCs); some EDCs have shown earlier effects on the development of the male rat mammary gland than on the female, whereas others only have affected the male mammary gland.

Glyphosate is the active ingredient of broad-spectrum herbicide formulations (glyphosate-based herbicides – GBH) extensively used worldwide to control weeds in agricultural areas and on post-harvest desiccation. Several studies have shown that glyphosate or GBH exposure during critical periods of development could alter female and male reproductive systems, whereas *in vitro* assays suggest an endocrine disrupting action of these compounds. However, the effects of the exposure to glyphosate or its formulations on the mammary gland have not been extensively studied. In this sense, it has been reported that subcutaneous exposure to GBH during the early postnatal period increases mammary gland development and cell proliferation on male and the presence of hyperplastic ducts on elderly female rats. On the other hand, propiconazole is a systemic triazole fungicide that has a broad-spectrum action for the control of fungi in a variety of crops. The available information about the levels of use of this compound is limited; although its use is not approved by the European Food Safety Authority, it is allowed in Argentina. Numerous *in vitro* studies have shown that propiconazole could alter steroidogenesis and the activity of hormone receptors, whereas *in vivo* studies have reported that it affects the male reproductive system. Despite this information, the effects of this compound on the mammary gland have not been studied. Therefore, the aim of the present thesis was to evaluate the differences in mammary gland development between male and female rats and then analyze whether perinatal exposure (gestation + lactation) to GBH, glyphosate or propiconazole alters mammary gland development on male rats at pre- and post-puberty. Mammary gland samples of both sexes at weaning (postnatal day 21 – PND21) and PND60 were obtained to analyze the differences in mammary development between female and male rats. Also, to evaluate the effects of the agrochemicals on male mammary gland development, pregnant Wistar rats (F0) were exposed to a GBH (GBH3.5: 3.7 mg/kg/day and GBH350: 352 mg/kg/day), glyphosate alone (GLY: 3.9 mg/kg/day), propiconazole (PRO: 4 mg/kg/day) and a mixture of both agrochemicals (PROGLY: 4 mg de propiconazole/kg/day and 3.7 mg de glyphosate/kg/day). The above-mentioned doses are the real doses of agrochemicals to which F0 dams were exposed. Dams were

exposed to GBH and glyphosate orally through the diet from gestational day 9 (GD9) until weaning, and to propiconazole by gavage from GD10 until weaning, every 48 h. F1 males were euthanized at PND21 and PND60 and mammary gland and serum samples were obtained.

First, we analyzed the differences in mammary gland between males and females. The mammary gland development and growth were evaluated in whole-mounts (WMs) and histological sections on PND21 and PND60. On PND21, the mammary gland of males had a reduced area, perimeter, number of TEBs and relative epithelial area, compared to females; however, mammary histology was similar in both sexes. On PND60, the males presented lower longitudinal growth and number of TEBs than females. Regarding mammary histology, male rats had a greater lobuloalveolar development, whereas females presented mainly ducts and a higher proportion of adipose tissue. These results agree with rat mammary gland features previously described.

In a second part, we evaluated the effects of perinatal exposure to a GBH on the mammary gland of male rats. Estradiol (E2), testosterone (T) and prolactin (PRL) serum levels and mammary gland development in WMs and histological sections were evaluated. Besides, the area of epithelial structures (relative epithelial area) and adipocytes were quantified. Also, we assessed the proliferation index (Ki67 positive cells) and the expression of estrogen receptor alpha (ESR1), androgen receptor (AR), cyclin D1 (Cnd1) and molecules involved in ductal morphogenesis [i.e.: amphiregulin (Areg), epidermal growth factor receptor (EGFR), insulin-like growth factor 1 (IGF1), IGF1 receptor (IGF1R), phosphorylated extracellular-regulated kinase 1/2 (p-Erk1/2)]. Finally, we analyzed ESR1 alternative transcripts mRNA levels and DNA methylation status of their promoters. GBH exposure did not alter E2 and T serum levels, but GBH350 increased PRL levels, although the difference with the control was not significant. On PND60, GBH3.5 exposure reduced mammary gland area and perimeter and increased the number of TEBs, but mammary gland histology was similar to the control. GBH350-exposed males presented higher longitudinal growth and less mammary tree development compared to the control group, whereas the mammary gland had less lobuloalveolar development and relative epithelial area and higher adipocytes area. Regarding proliferation index and hormone receptors expression, GBH3.5 exposure reduced protein and mRNA expression of ESR1 and mRNA expression of AR, but it increased AR protein expression. As the lower dose, GBH350 reduced ESR1 protein and mRNA expression, but it also reduced the proliferation index. The mRNA expression of ESR1 alternative transcripts was altered by both doses; GBH3.5 reduced ESR1-OS expression, whereas GBH350 decreased ESR1-O, OT and E1 expression. In all cases, the lower expressions of the transcripts were associated with hypermethylation of their promoters. On the other hand, on PND21, no differences between groups were observed in mammary growth or development, but the proliferation index was lower in GBH3.5-exposed males. Both doses reduced ESR1, Cnd1, EGFR and IGF1R mRNA expression, whereas GBH3.5 also reduced Areg and IGF1 mRNA

expression and p-Erk1/2 presence in TEBs. The results obtained on PND21 could explain the lower mammary growth observed in GBH3.5-exposed animals on PND60. Although further studies are still needed to explain the changes in mammary gland induced by GBH350 exposure, the increased PRL serum levels could be involved in these alterations.

Considering that the effects induced by GBH may differ from those caused by glyphosate alone, we next evaluated the action of GLY on the mammary gland of post-pubertal male rats and whether it differs from the action of GBH. We analyzed mammary gland development in WMs and histological sections and assessed the proliferation index and the expression of ESR1, AR, Ccnd1, EGFR, PRL receptor (PRLR) and ESR1 alternative transcripts. In addition, the DNA methylation status of ESR1-OS promoter was evaluated. The mammary gland area and perimeter of GLY-exposed animals were not different from GBH males or controls. As GBH exposure, GLY treatment did not modify mammary gland histology or the proliferation index and reduced protein and mRNA expression of ESR1 and mRNA expression of RA, EGFR and PRLR. However, the expression of RA protein and Ccnd1 mRNA on GLY-exposed males did not differ from GBH-exposed males or controls. Finally, both experimental groups reduced ESR1-OS expression and increased the methylation status of its promoter, but the difference was less marked with GLY exposure. Based on these results, the effects induced by GBH exposure could be mainly mediated by the active ingredient, although they would be enhanced by the adjuvants present in the commercial formulation.

In the last part of this thesis, we analyzed the effects of perinatal exposure to GLY, PRO and the agrochemicals mixture (PROGLY) on the mammary gland of male rats. We evaluated the mammary gland development in WMs and histological sections and the occurrence of mammary lesions. On PND60, the proliferation index and the expression of ESR1, p27, Ccnd1, AR, Wnt5a and aromatase were assessed, whereas on PND21 we evaluated the proliferation index, ESR1 expression and p-Erk1/2 presence. On PND60, GLY exposure reduced mammary gland area compared to the control group and no differences were observed between the other experimental groups. Regarding mammary gland histology, PRO-exposed males showed a higher *score* of lobuloalveolar development, whereas males exposed to PROGLY were not different from PRO or control males. Also, lobuloalveolar hyperplasias were observed on males exposed to PRO (3 out of 11 males) and PROGLY (1 out of 11 males), but these lesions were not present in control and GLY groups. ESR1 expression was reduced in GLY-exposed animals, whereas on males exposed to PROGLY it was not different from the control or GLY. No differences were observed in the proliferation index or in the expression of p27, Ccnd1, AR or Wnt5a between experimental groups, but GLY exposure increased aromatase expression. On the other hand, on PND21, PROGLY-exposed males exhibited a transient reduction in mammary gland area, whereas mammary histology was similar in all experimental groups. Agrochemicals exposure did not alter

ESR1 expression, but GLY reduced proliferation and PRO increased nuclear p-Erk1/2 in mammary ducts. These results showed that both agrochemicals alter the development of the mammary gland; however, these effects are not observed when the animals are exposed to their mixture, showing an antagonistic effect.

Overall, our results showed that exposure to GBH, GLY or PRO during gestation and lactation alter mammary gland development of male rats. In general, the most notable effects are observed in the post-pubertal stage, such as alterations in growth and morphology, while in the pre-pubertal stage the effects are subtle, such as modifications in proliferation and expression of genes involved in mammary development. This highlights the importance of evaluating the action of EDCs at different ages, since the effects on mammary gland and the moment in which they become evident can differ. In addition, the antagonistic effect caused by exposure to the mixture of agrochemicals shows the possibility of interaction between this type of compounds, which emphasizes the need to evaluate the effects of mixtures of them.

In conclusion, the results in this thesis provide new evidences about the endocrine disrupting activity of glyphosate, its commercial formulations and propiconazole, as well as knowledge about the molecular mechanisms involved. In addition, they emphasize the high sensitivity of the mammary gland of male rats to compounds with hormonal action, during critical periods of development.

INTRODUCCIÓN

“Después de todo, ¿qué es un científico entonces? Es un hombre curioso que mira a través del ojo de una cerradura, la cerradura de la naturaleza, tratando de saber qué es lo que sucede”

Jacques Yves Cousteau

La glándula mamaria es el órgano característico de la clase de los mamíferos que, en hembras, se desarrolla para producir los nutrientes esenciales para alimentar a las crías recién nacidas (Medina, 1996). En roedores, tanto en hembras como en machos, se ha probado que la glándula mamaria es un tejido sensible a los efectos de químicos exógenos capaces de interferir con la acción hormonal (Zoeller et al., 2012). La exposición a este tipo de compuestos en diferentes momentos de la vida puede conllevar importantes consecuencias para la salud, como pueden ser un aumento del riesgo a desarrollar ciertos tipos de cáncer de mama o una lactancia inadecuada en hembras (Rudel et al., 2011).

1 | Morfología e histología de la glándula mamaria de la rata

1.1 | Generalidades

La porción epitelial o parénquima de la glándula mamaria tiene su origen embriológico en el ectodermo, mientras que el estroma circundante y el tejido adiposo, derivan del mesodermo (Imagawa et al., 1990). Al igual que otros órganos, el estroma posee vasos sanguíneos, nervios, nódulos y vasos linfáticos (Masso-Welch et al., 2000). El número, tamaño y disposición de las glándulas mamarias varía entre especies; sin embargo, algunas características son compartidas, por ejemplo, son órganos pareados presentes tanto en hembras como en machos. En estos últimos suelen estar pobremente desarrolladas y carecer de pezones (Forsyth, 1999).

La glándula mamaria es una estructura subcutánea que, en la rata, se extiende desde la región cervical hasta la inguinal en forma de seis pares ventrolaterales, cada una con su pezón en el caso de las hembras. Los pares de glándula mamaria se denominan por número según su ubicación. Los pares N° 1, 2 y 3 conforman la cadena torácica y los pares N° 4, 5 y 6, la cadena abdomino-inguinal. Las glándulas torácicas, abdominales e inguinales varían en su grado de desarrollo, siendo las glándulas inguinales las más diferenciadas (Masso-Welch et al., 2000). La glándula mamaria N° 4 presenta menores dificultades para la disección, por lo que suele ser la glándula de elección para la mayoría de los estudios. Además, contiene una cadena de nódulos linfáticos que permiten un reconocimiento rápido de la misma en el momento de la cirugía.

El epitelio de la glándula mamaria forma conductos que se ramifican a partir del conducto primario y que terminan en conductos más pequeños. Estos conductos (denominados conductillos) forman diversas estructuras terminales: *terminal end buds* (TEB), *blunt end buds* o *terminal ductus*, *alveolar buds* y alvéolos (Russo et al., 1982). A su vez, los alvéolos conforman los lóbulos, que son las estructuras secretoras principales en las hembras (Imagawa et al., 1994). Además, pueden generarse puntos de ramificación a lo largo de los conductos a partir de la formación de *lateral buds* (Figura 1). El parénquima epitelial está rodeado de una delgada capa de tejido conectivo y todo ello se encuentra embebido en tejido adiposo (*fat pad*).

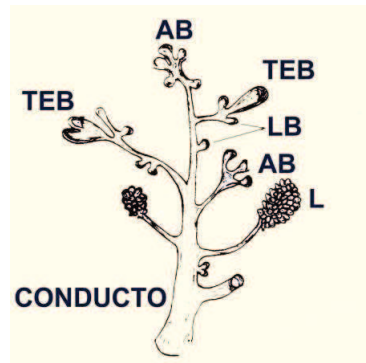


Figura 1. Representación esquemática de las estructuras epiteliales en la glándula mamaria de la rata. TEB: *terminal end bud*, AB: *alveolar buds*, LB: *lateral buds*, L: lóbulo. Figura modificada de Russo et al. (1982).

En la glándula mamaria de la rata, todos los lóbulos, conductillos y conductos convergen en un solo conducto colector primario que, en hembras, se continúa con la superficie externa del pezón. Esto último difiere de los 15-20 conductos que desembocan en el pezón de la mujer (Imagawa et al., 1994). En ratas hembra, el epitelio del pezón se continúa con el epitelio estratificado de la epidermis y la transición desde un epitelio estratificado (piel) a un epitelio de dos capas de células cubicas ocurre en un único conducto lactífero, en el interior del pezón. En ratas macho, por otro lado, se produce una regresión del pezón, por lo que el árbol mamario no presenta conexión con el medio externo (Cardy, 1991). Durante el desarrollo, en ambos sexos, los conductos crecen por ramificación del conducto primario en múltiples conductos secundarios; con el tiempo, el número y longitud de estas ramificaciones se incrementa progresivamente y se forman los lóbulos (Masso-Welch et al., 2000).

1.2 | Estructura histológica de la glándula mamaria

Debido a que múltiples tipos celulares conforman la glándula mamaria, para simplificar su estudio, ésta puede dividirse en dos compartimientos: el mesénquima y el parénquima.

El mesénquima o estroma mamario está formado por tejido conectivo y adiposo (Figura 2), en el cual se encuentran inmersos vasos sanguíneos, nervios, fibras de músculo liso, vasos linfáticos y nódulos linfáticos, que en la glándula mamaria abdominal (glándula N°4) pueden ser visualizados a simple vista (Masso-Welch et al., 2000). El estroma de tejido conectivo difiere en características de grosor, composición y densidad. Es intensamente eosinófilo, fibroso y denso alrededor de las estructuras cercanas al conducto primario, variando a más laxo y menos eosinófilo mientras más alejada del conducto primario se desarrolle la estructura epitelial (Masso-Welch et al., 2000).

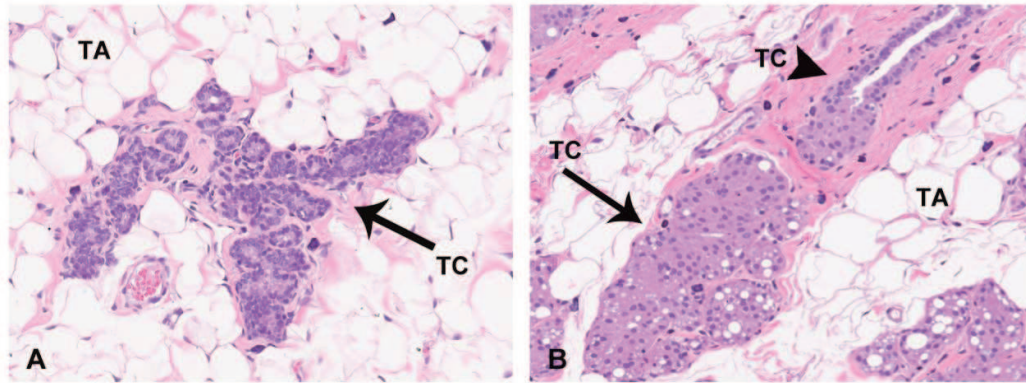


Figura 2. Estroma mamario. Es posible observar que en la glándula mamaria tanto de hembras (A) como de machos (B) las estructuras epiteliales se encuentran rodeadas por tejido conectivo (TC, flecha y punta de flecha) e inmersas en tejido adiposo (TA). Flechas: TC en lóbulos; punta de flecha: TC en conducto. Figura modificada de Staska and Pike (2016).

En la periferia del estroma graso, una cápsula de tejido conectivo altamente vascularizado marca el límite de la glándula mamaria. Este límite de tejido conectivo sirve como “zona inhibitoria” del crecimiento de las células mamarias, que la invaden durante el desarrollo de la glándula mamaria pero no crecen más allá de ella (Forsyth, 1999; Knight & Peaker, 1982).

Los adipocitos o células adiposas también componen el compartimiento estromal y, en la rata, están presentes como adipocitos monolobulados (Figura 2) (Masso-Welch et al., 2000). Están rodeados por una membrana rica en laminina, y se consideran de origen mesenquimático debido a que derivan de células estromales de la glándula mamaria de tipo fibroblastos (Ferguson et al., 1992). En la glándula mamaria se observan abundantes fibroblastos, que se encuentran inmersos en el tejido conectivo y entre los adipocitos.

El *parénquima o epitelio glandular mamario* está compuesto por diversas estructuras epiteliales que difieren tanto morfológica como funcionalmente. Dicho parénquima incluye al epitelio luminal de los distintos tipos de estructuras como también a la capa de células mioepiteliales subyacente al epitelio. Las paredes de los conductos y alvéolos están compuestas por dos tipos celulares: una capa interna de células epiteliales que revisten el lumen (epitelio luminal), y otra capa externa y discontinua de células mioepiteliales sobre la membrana basal (Russo & Russo, 1996). El mioepitelio está compuesto por células basales epiteliales que rodean al epitelio luminal de conductos y alvéolos y lo separan del estroma de tejido conectivo. La forma, el tamaño y la continuidad de las células mioepiteliales varían durante el desarrollo y entre estructuras epiteliales individuales en la glándula mamaria. Además, estas células sintetizan y secretan los constituyentes de la membrana basal (laminina) (Masso-Welch et al., 2000) (Figura 3).

Los TEBs, por otro lado, son estructuras con una forma característica de “gota” y están compuestos por dos compartimentos principales. El compartimento más externo consiste en una única capa de células *cap*, que rodean el extremo de crecimiento del TEB y se diferencian a células

mioepiteliales a medida que el conducto se elonga. En el caso del compartimento interno, éste presenta de 4 a 6 capas de células de espesor, que se conocen como células del cuerpo. Se piensa que las células del cuerpo consisten principalmente en progenitores luminales ductales y alveolares, cuya progenie se diferencia a células luminales maduras (Paine & Lewis, 2017) (Figura 3).

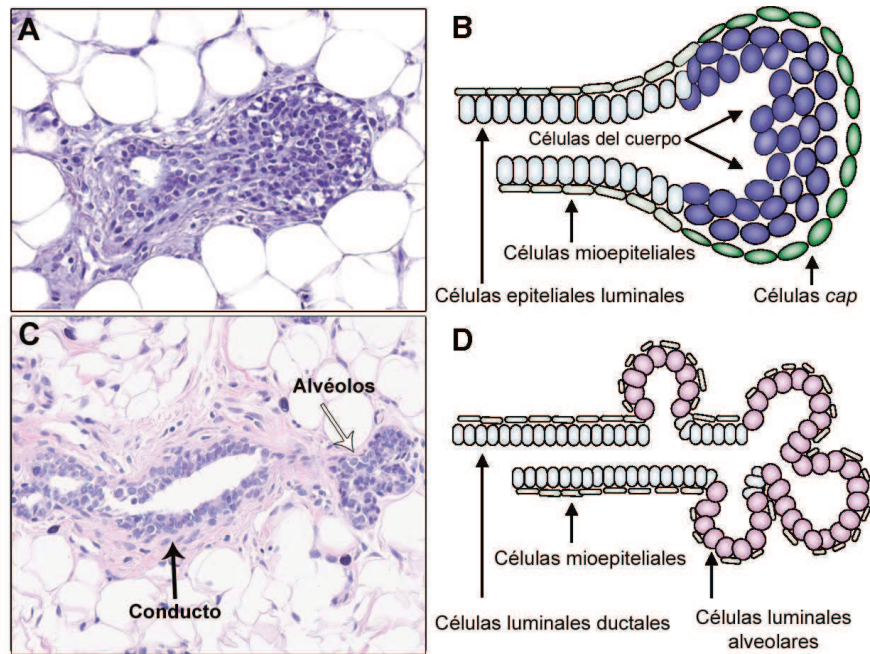


Figura 3. Estructuras epiteliales de la glándula mamaria de rata. A y C muestran imágenes representativas de secciones mamarias teñidas con hematoxilina y eosina (H&E), en (A) puede observarse un TEB, mientras que en (C) se muestra un conducto y alvéolos. B y D son ilustraciones en donde se indican las células que componen las estructuras mamarias, (B) representa un TEB y (D) un conducto y alvéolos. Figura modificada de Woodward et al. (2005) y Filgo et al. (2016).

1.2.1 | Dimorfismo sexual de la glándula mamaria de la rata

En ratas macho y hembra pre-puberales, la glándula mamaria presenta en su mayoría estructuras ductales con epitelio cúbico simple, aunque también pueden observarse pequeños *alveolar buds* (Figura 4). Las características histológicas de la glándula mamaria de ambos sexos continúan siendo semejantes hasta el momento de la pubertad, aproximadamente en el día postnatal 35 (DPN35) (Filgo et al., 2016; Lucas et al., 2007). Una vez alcanzada la pubertad, se evidencia un dimorfismo sexual notable en la glándula mamaria de las ratas, el cual persiste hasta la adultez (Cardy, 1991).

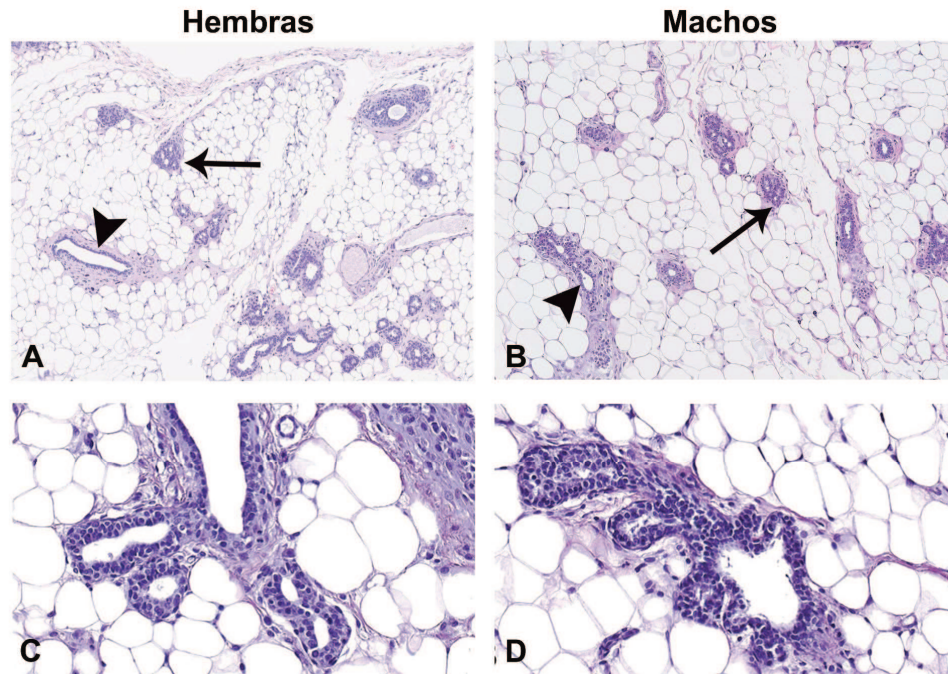


Figura 4. Glándula mamaria de ratas pre-puberales. En las imágenes pueden observarse las similitudes entre hembras (A, C) y machos (B, D) pre-puberales, la glándula mamaria se caracteriza por la presencia de conductos (punta de flecha) y pequeños *alveolar buds* (flechas). En un mayor aumento (C, D) se muestran conductos que comienzan a ramificarse y presentan un epitelio cúbico simple. Figura modificada de Filgo et al. (2016).

En la adultez, la glándula mamaria de machos y hembras presentan una marcada diferencia en su histología (Figura 5). El parénquima de la glándula mamaria de hembras vírgenes se describe como túbulo-alveolar, en el cual predominan los conductos y se observa una reducida cantidad de alvéolos. Por otro lado, en machos, la glándula mamaria presenta un desarrollo lóbulo-alveolar, compuesto principalmente por estructuras lobulares de gran tamaño y una menor cantidad de conductos (Cardy, 1991; Rudmann et al., 2005). Además de las diferencias en la frecuencia de las estructuras epiteliales, las características morfológicas de estas estructuras también difieren entre machos y hembras (Lucas et al., 2007). En hembras, los conductos y alvéolos presentan un lumen definido, rodeado por un epitelio cúbico, de una o dos capas celulares, cuyas células presentan un citoplasma escaso y basófilo. Además, no suelen observarse células apoptóticas. Por otro lado, en machos, los conductos y alvéolos presentan un epitelio pseudoestratificado, con células de gran tamaño y abundante citoplasma. El citoplasma de estas células es eosinófilo y usualmente presenta vacuolas. Las células ductales y alveolares suelen encontrarse en el lumen de las estructuras mamarias, generando un lumen indefinido, lo que dificulta la distinción entre los distintos tipos de estructuras. El lumen puede presentar secreción en su interior y, además, pueden observarse células apoptóticas tanto en el epitelio ductal como alveolar (Cardy, 1991).

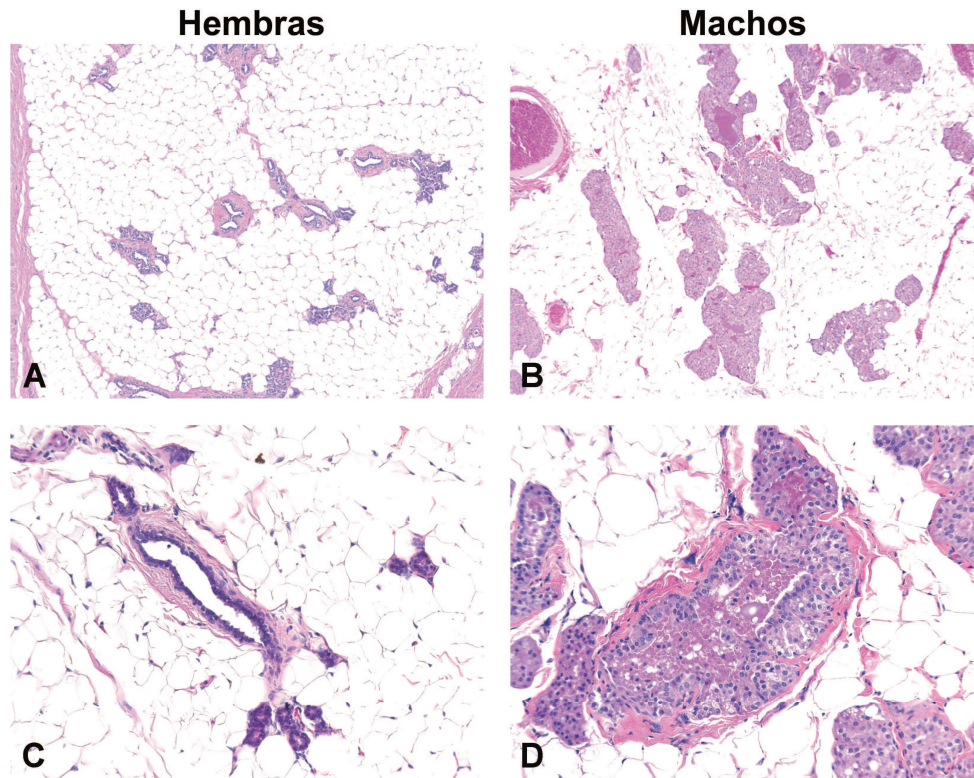


Figura 5. Dimorfismo sexual de la glándula mamaria de ratas post-puberales. En las imágenes pueden observarse las diferencias entre hembras (A, C) y machos (B, D) post-puberales. La glándula mamaria de hembras vírgenes post-puberales (A, C) se caracteriza por una estructura túbulo-alveolar, en la que predominan los conductos y se observan pequeñas estructuras lobulares. La glándula mamaria de machos post-puberales (B, C) se describe como lóbulo-alveolar, presenta principalmente estructuras lobuloalveolares de gran tamaño. En una mayor magnificación puede evidenciarse que en hembras (C) los conductos están compuestos por un epitelio cúbico simple y presentan un lumen definido, mientras que en machos (D) se observa un epitelio pseudoestratificado y vacuolado y un lumen es indefinido, lo que dificulta la distinción entre estructuras ductales y alveolares. Figura modificada de Lucas et al. (2007).

2 | Desarrollo de la glándula mamaria

La glándula mamaria experimenta un rápido desarrollo durante la embriogénesis tardía, la pubertad y, en hembras, durante la gestación y la lactancia. A diferencia de la mayoría de los órganos, la mayor parte del desarrollo mamario ocurre luego del nacimiento (Wang et al., 2006). Una ilustración del desarrollo de la glándula mamaria de hembras y machos se muestra en la Figura 6.

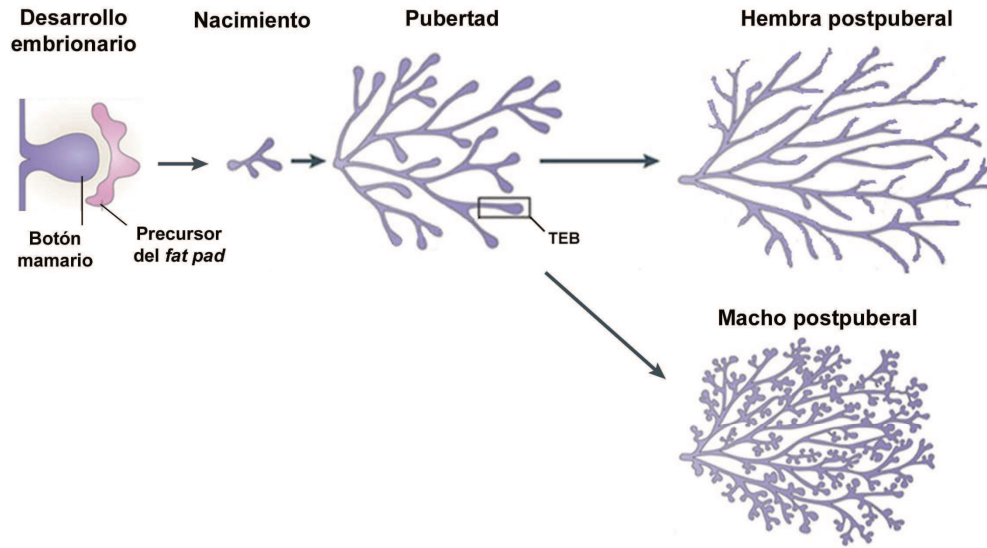


Figura 6. Ilustración del desarrollo de la glándula mamaria de hembras y machos. Figura modificada de Paine and Lewis (2017).

Durante el **desarrollo embrionario**, seis pares de botones mamarios se originan por la migración de células del ectodermo que se invaginan. En la rata, los botones de epitelio mamario se forman en el sitio del pezón entre el día de gestación (DG) 12 y 14, luego la glándula permanece relativamente inactiva hasta el DG 16-17, en donde comienza la invasión de las células epiteliales al estroma subyacente (Medina, 1996). Una vez que las células epiteliales alcanzan el *fat pad* comienza un proceso de morfogénesis ductal. En este proceso el conducto primario se ramifica, formando conductos secundarios y terciarios, y origina un árbol mamario rudimentario, que se encuentra presente al momento del nacimiento en hembras y en machos (Filgo et al., 2016; Medina, 1996). Los machos, tanto de ratas como de ratones, no poseen pezones. En los ratones, ocurre una condensación del mesénquima alrededor de los botones mamarios entre los días 13 y 15 de la etapa embrionaria, lo que resulta en la ruptura de la estructura epitelial que conectaría el rudimento mamario con la epidermis y las glándulas permanecen rudimentarias durante toda la vida del animal. En las ratas, sin embargo, la estructura mamaria se desarrolla a pesar de no poseer salida al exterior (pezón) (Filgo et al., 2016; Imagawa et al., 1994; Kass et al., 2015).

En la etapa **pre-puberal**, que comprende el período desde el nacimiento hasta la pubertad, se produce un crecimiento isométrico del parénquima mamario que involucra elongación y ramificación ductal (Medina, 1996; Richert et al., 2000). Durante los primeros días postnatales, hembras y machos presentan una glándula mamaria simple, compuesta principalmente por conductos ramificados y pocos *buds*. Los conductos de la glándula mamaria se continúan ramificando y elongando y, a partir de la segunda semana de edad, comienzan a desarrollarse los TEBs en los extremos de los mismos. Los TEBs son estructuras que presentan una elevada proliferación y que dirigen la elongación ductal. Éstos son más abundantes en las regiones más

distales del epitelio mamario y alcanzan un número máximo entre DPN21 y 28. A partir de DPN21 los TEBs comienzan a dividirse en estructuras más pequeñas y forman grupos de 3 a 5 *alveolar buds*, cada uno con un lumen central, rodeado de una capa de células epiteliales cúbicas. Además, los TEBs también pueden diferenciarse a un único conducto con un lumen de gran tamaño, llamado *blunt end bud* o *terminal ductule* (Filgo et al., 2016; Masso-Welch et al., 2000; Russo & Russo, 1996). Durante esta etapa la glándula mamaria de hembras y machos continúan siendo similares, y comienzan a diferenciarse a partir de la pubertad (Filgo et al., 2016).

La **pubertad** comienza en las ratas hembra entre los 35 y 42 días de edad, se produce la apertura vaginal y se establece el ciclo estral (Russo & Russo, 1996). En los machos, por otro lado, la edad de madurez sexual varía considerablemente entre individuos; en general el inicio de la pubertad, definido como la separación del prepucio, ocurre entre DPN38 y 48 (Ghasemi et al., 2021; Lewis et al., 2002; Lucas et al., 2007). Durante esta etapa se produce un rápido crecimiento de los conductos mamaros, como consecuencia de la división mitótica de las células de los TEBs. En la hembra, el crecimiento de los conductos continúa hasta que éstos contactan con la cápsula de tejido conectivo, en el extremo de *fat pad*, y las estructuras ductales terminales se diferencian. Contrariamente, en los machos, los TEBs comienzan a diferenciarse antes de alcanzar los extremos del *fat pad*, por lo que presentan un menor crecimiento longitudinal comparado con las hembras (Filgo et al., 2016). En esta etapa se produce un aumento en la cantidad de *alveolar buds*, los cuales pueden originarse a partir de la diferenciación de los TEBs o formarse a lo largo de los conductos a partir de los *lateral buds*. A su vez, estos *alveolar buds* se diferencian para formar los lóbulos que, en las hembras, se acumulan progresivamente a lo largo de cada ciclo estral (Masso-Welch et al., 2000). En los machos, el cambio más prominente en esta etapa es el incremento de las estructuras lobulares, que comienzan a presentar características propias de la glándula mamaria masculina, descritas previamente en la sección 1.2.1.

Luego de la pubertad, es notable el dimorfismo sexual de la glándula mamaria de la rata. Como se detalló previamente, las hembras presentan una estructura túbulo-alveolar en la que predominan los conductos, mientras que los machos se caracterizan por un desarrollo lóbulo-alveolar, con mayor presencia de estructuras lobulares (Cardy, 1991; Lucas et al., 2007). Durante la **post-pubertad** la glándula mamaria de hembras permanece como una estructura diferenciada sin mayores cambios, en la cual los TEBs están ausentes y el número de lóbulos se mantiene relativamente estable, aunque pueden producirse cambios en el tamaño y la actividad secretora de los mismos durante el ciclo estral. El desarrollo lobuloalveolar que ocurre en la rata hembra no preñada varía sustancialmente con el ciclo estral y con la cepa o variedad de rata (Masso-Welch et al., 2000). Los machos post-puberales, por otro lado, presentan una glándula mamaria sexualmente madura con características histológicas masculinas y un tejido glandular de gran volumen, organizado en complejas estructuras lobuloalveolares. Al igual que los lóbulos, los

conductos presentes en la glándula tienen múltiples capas de epitelio y un lumen indefinido, lo que dificulta la distinción de ambas estructuras. Aunque los machos post-puberales exhiben estructuras mamarias de gran tamaño, presentan un área glandular restringida, que resulta en un menor tamaño en comparación con hembras maduras (Cardy, 1991; Filgo et al., 2016).

3 | Regulación del desarrollo de la glándula mamaria

Como se describió en la sección anterior, el desarrollo mamario se produce en diferentes etapas y cada una de ellas es regulada diferencialmente. El complejo proceso de crecimiento y diferenciación mamaria es iniciado por las células madres presentes en la glándula mamaria y mediado por señales paracrinas entre el epitelio y el estroma mamario como también por las hormonas hipofisarias y sexuales (Davis & Fenton, 2013).

3.1 | Desarrollo fetal

El desarrollo embrionario de la glándula mamaria es regulado principalmente por factores de crecimiento y factores de transcripción. Miembros de la familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y de *Wingless* (WNT) gobiernan la señalización en los tejidos embrionarios mamarios y regulan factores de transcripción de la familia Homeobox, GATA3 y la familia T-box, los cuales se expresan intermitentemente en el endodermo o el mesodermo (Slepicka et al., 2021). Por otro lado, se ha documentado la importancia de los andrógenos en el desarrollo fetal de la glándula mamaria. Los andrógenos inician la diferenciación del fenotipo masculino, promoviendo la regresión del pezón y la atrofia mamaria en ratones machos. En ratones, la atrofia de la glándula es ocasionada por la condensación del estroma circundante por acción de la testosterona. Si los andrógenos son eliminados en esta etapa, la morfología de la glándula mamaria de ratas macho adquiere características de la glándula femenina, mientras que la administración de andrógenos a fetos femeninos causa una masculinización de la glándula (Lucas et al., 2007).

3.2 | Desarrollo puberal

Durante la pubertad, la morfogénesis ductal requiere de diferentes hormonas y factores de crecimiento. Dentro de estas moléculas se encuentran la hormona del crecimiento (GH) y los estrógenos, que han demostrado ser fundamentales para este proceso (Hynes & Watson, 2010; Sternlicht, 2006). Se ha observado que los estrógenos pueden restaurar el desarrollo mamario en hembras ovariectomizadas, pero no en aquellas que han sido hipofisectomizadas. En hembras que carecen de ovarios e hipófisis el desarrollo ductal y la formación de los TEBs pudo restablecerse administrando GH o el factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1) junto con estrógenos. Además, el desarrollo mamario puberal se vio afectado en hembras que carecen del receptor de GH, de IGF1 y del receptor de estrógenos alfa (ESR1), confirmando la importancia de estas hormonas y sus receptores.

En la glándula mamaria, GH induce la producción de IGF1, el cual actúa como su efector local. IGF1 es producido por las células estromales y epiteliales y su ausencia provoca alteraciones en el desarrollo de los TEBs y un crecimiento reducido de la glándula mamaria. Si bien IGF1 también es producido en gran medida por el hígado, se ha demostrado que la disminución de sus niveles circulantes no afecta el desarrollo mamario, remarcando la importancia de su síntesis local en la glándula mamaria. Estudios en trasplantes mamarios además han revelado que el receptor de GH es requerido en el estroma mamario, mientras que el receptor de IGF1 (IGF1R) es necesario en el epitelio. En resumen, GH actúa a través de su receptor en el estroma induciendo la expresión de IGF1, el cual se une a su receptor en el epitelio y estimula la formación de los TEBs y la morfogénesis ductal. Además, se ha reportado que GH estimula la expresión de ESR1 en el estroma, mientras que los estrógenos también inducen la expresión de IGF1, lo que indica que ambas hormonas actúan de manera conjunta para regular el desarrollo ductal (Figura 7) (Hynes & Watson, 2010; Sternlicht, 2006; Sternlicht et al., 2006).

Como se mencionó anteriormente, los estrógenos dirigen la elongación ductal a través de ESR1 y la deficiencia en este receptor genera una reducción del crecimiento ductal y de la ramificación mamaria (Feng et al., 2007). ESR1 se expresa tanto en el epitelio como en el estroma y el rol de éste en cada compartimento aún no ha sido completamente dilucidado. Sin embargo, estudios de trasplantes mamarios han mostrado que la expresión epitelial de ESR1 es necesaria para que se produzca el crecimiento ductal, mientras que su expresión estromal no tendría un rol limitante en el desarrollo de la glándula mamaria.

En distintos trabajos se ha demostrado que la proliferación celular inducida por los estrógenos en la pubertad es mediada por anfirregulina (Areg), un ligando del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Si bien numerosos ligandos de EGFR promueven el desarrollo mamario cuando son administrados de manera exógena, Areg es el único inducido y requerido en la pubertad. Diversos experimentos mostraron que la expresión de Areg es necesaria en el epitelio, mientras que EGFR es esencial en el estroma; la delección de cualquiera de ellos detiene el desarrollo de la glándula mamaria generando un árbol ductal rudimentario. Areg se expresa en el epitelio como un precursor transmembrana que debe ser clivado de la superficie de la célula epitelial para activar a EGFR en las células estromales cercanas. Esta acción es realizada por la proteasa extracelular ADAM17, la cual es requerida en la misma localización que Areg (Figura 7) (Briskin & Ataca, 2015; Sternlicht, 2006; Sternlicht & Sunnarborg, 2008).

En relación a la respuesta desencadenada por la activación de EGFR, que finalmente inducirá la elongación de los conductos, ésta no se encuentra completamente descripta. Se postula que esta señalización está mediada por los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) y sus receptores (FGFR) (Lu et al., 2008; Pond et al., 2013), como así también por la acción de las

metaloproteinasas de la matriz (MMP) (Kheradmand et al., 2002; Sternlicht & Sunnarborg, 2008) (Figura 7).

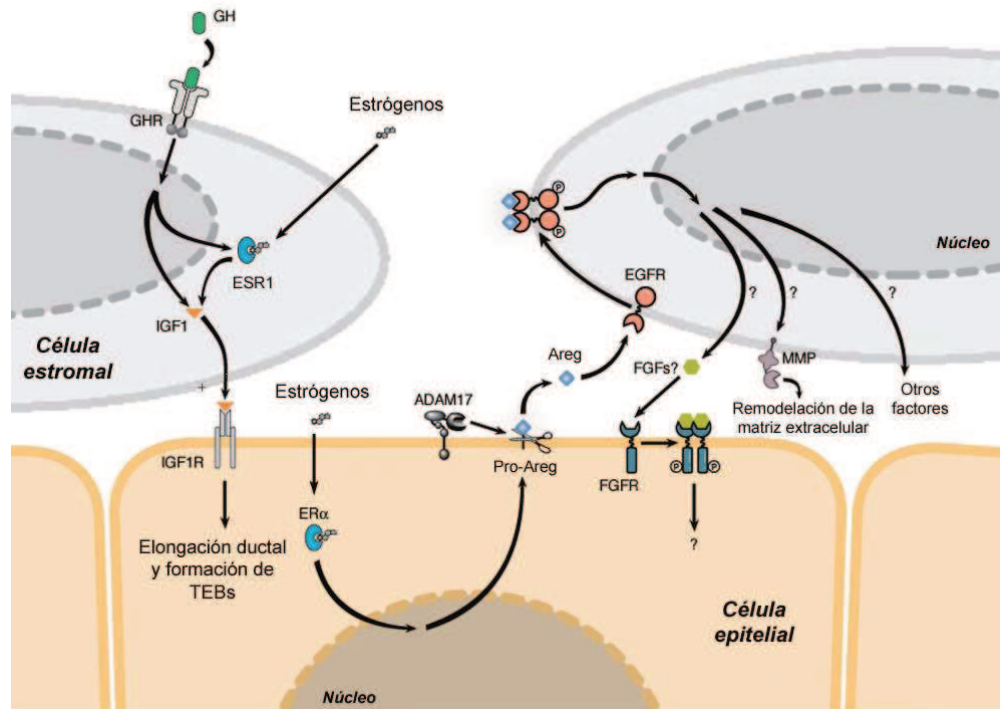


Figura 7. Vías de señalización en la glándula mamaria durante el desarrollo puberal. El crecimiento de la glándula mamaria durante la pubertad depende de la acción de GH y de los estrógenos. Éstos desencadenan una serie de señales que involucran una interacción entre las células del epitelio y del estroma, y que finalmente inducirán la elongación ductal y la formación de los TEBs. Figura modificada de Sternlicht (2006).

La regulación del desarrollo de la glándula mamaria que se presentó anteriormente fue descrita en hembras, mientras que existe poca información sobre esta regulación en machos. Sin embargo, sí se conoce que la glándula mamaria de ratas hembras y machos presentan una morfología similar hasta el inicio de la pubertad y que en ambos casos ESR1 se expresa en el epitelio en esta etapa (Altamirano, Delconte, et al., 2017; Filgo et al., 2016; Kass et al., 2015). Además, en ambos sexos se ha observado un aumento en la expresión de Areg cuando se realiza una exposición a 17β -estradiol (E2) exógeno (Miousse et al., 2013), por lo que podrían compartir algunas de las vías de señalización mencionadas.

3.3 | Desarrollo post-puberal

Como se mencionó previamente, existe un marcado dimorfismo sexual en la glándula mamaria de ratas adultas. Alteraciones de este dimorfismo, como por ejemplo una feminización o masculinización de la glándula podrían indicar una perturbación endócrina. En relación a esto, en la presente sección se describirán las acciones de distintas hormonas sobre la glándula mamaria

de ratas hembra y macho adultas (Lucas et al., 2007); un resumen de estas acciones se presenta en la Tabla 1.

3.3.1 | *Estrógenos*

Los estrógenos tienen un rol importante en el desarrollo y la función de la glándula mamaria de ratas adultas (Russo & Russo, 1996), y la expresión de su receptor (ESR1) se ha observado en hembras y machos durante esta etapa (Altamirano, Delconte, et al., 2017; Altamirano et al., 2018; Filgo et al., 2016; Gomez et al., 2017). Se ha demostrado que la administración de estrógenos a través de la dieta genera una alteración en la morfología de la glándula mamaria tanto de ratas hembra como macho (Biegel, Flaws, et al., 1998). En machos se produce una feminización de la glándula mamaria, caracterizada por la conversión de la morfología lóbulo-alveolar normal de la glándula masculina a una morfología túbulo-alveolar, característica de ratas hembra. Además, puede observarse la presencia de secreciones en conductos y alvéolos. En el caso de las hembras, la exposición a estrógeno induce hiperplasia lobuloalveolar multifocal o difusa, con un incremento en la densidad de alvéolos. En este estudio, los cambios morfológicos fueron acompañados por un aumento en la concentración sérica de prolactina (PRL) y estrógeno (Biegel, Cook, et al., 1998). Efectos similares en la morfología de la glándula fueron hallados en ratas macho expuestas a fitoestrógenos (Wang et al., 2006) y en ratas hembra y macho expuestas a agonistas de ESR1 (Gomez et al., 2017; Lucas et al., 2007). Además, la exposición al estrógeno sintético dietilestilbestrol (DES) generó una leve feminización de la glándula mamaria masculina (Filgo et al., 2016). Por otro lado, estos cambios también se observan en ratas hembra y macho cuando los animales son tratados con compuestos que solo causan hiperprolactinemia (Lucas et al., 2007). Contrariamente, Latendresse et al. (2009) observó una hiperplasia lobuloalveolar y no una feminización de la glándula mamaria de ratas macho cuando éstos fueron expuestos a etinilestradiol, sin embargo, los valores séricos de PRL no fueron determinados en este estudio.

La disminución de los niveles de estrógeno o los antagonistas de ESR1, sin otras alteraciones hormonales, causan atrofia de la glándula mamaria de hembras y machos. La atrofia en la glándula mamaria femenina afecta a los componentes ductales y alveolares y genera un tejido adiposo prominente (Greaves et al., 1993; Karlsson et al., 1996), mientras que en los machos se produce principalmente una atrofia acinar (Kennel et al., 2003).

3.3.2 | *Progesterona*

La progesterona actúa a través de su receptor nuclear (PR), que es coexpresado con ESR1 en las células epiteliales luminales. En hembras, a partir de estudios de trasplantes de epitelio mamario pudo observarse que la ausencia de PR en el epitelio reducía los puntos de ramificación en la glándula mamaria e impedía la ramificación lateral y la alveologénesis durante la preñez (Brisken & Ataca, 2015; Brisken & Scabia, 2020). Además, ratones transgénicos con un exceso de PR

desarrollaron conductos de mayor grosor y una extensa ramificación lateral (Lucas et al., 2007). Por otro lado, en machos no se ha estudiado el efecto de la administración de progesterona; sin embargo, se ha reportado que la glándula mamaria de ratas macho no expresa PR (Filgo et al., 2016; Kass et al., 2015).

3.3.3 | *Andrógenos*

La glándula mamaria de ratas hembra y macho adultas expresan el receptor de andrógenos (RA), pudiendo responder a estas hormonas (Altamirano, Delconte, et al., 2017; Altamirano et al., 2018; Filgo et al., 2016). Se ha observado que la administración de testosterona (T) a ratas hembra genera una alteración de la morfología de la glándula mamaria, produciendo un patrón lóbulo-alveolar, con dilatación alveolar y ductal y actividad secretoria (Lucas et al., 2007). Sin embargo, el tratamiento con T también induce un aumento en las concentraciones séricas de PRL en hembras y machos (O'Connor et al., 2000), lo que podría deberse a la aromatización de T a E2 y la consecuente estimulación de la secreción de PRL por acción del E2. En relación a esto, cuando ratas hembra son expuestas a andrógenos no aromatizables y no se produce hiperprolactinemia, se induce una masculinización de la glándula mamaria, observándose una morfología lobuloalveolar similar a ratas macho, sin el incremento de secreciones en conductos y alvéolos (Sourla et al., 1998). Estos cambios también se observan con un modulador selectivo del receptor de estrógenos (SERM LY2066948), que produce un aumento en los niveles séricos de E2 y T, sin cambios en PRL (Rudmann et al., 2005). En este caso los efectos generados por E2 son bloqueados por el SERM mientras que T ejerce su efecto, generando una virilización de la glándula. Además, este efecto puede ser bloqueado por flutamida, un antagonista del RA (Rudmann et al., 2005), confirmando así que las alteraciones serían producidas por acción de T a través de RA.

En relación a los efectos generados por la inhibición de los andrógenos en la glándula mamaria, en ratas macho el tratamiento con flutamida induce una atrofia lobular en la glándula mamaria (Toyoda et al., 2000). Efectos similares serían esperados por compuestos que disminuyen los niveles séricos de andrógenos (O'Connor et al., 2002a, 2002b). A pesar de lo descrito anteriormente, la acción de los andrógenos sobre la glándula mamaria de hembras aún es controversial, postulándose un efecto anti-estrogénico y de inhibición del crecimiento mediado por los andrógenos (Hickey et al., 2012). En este sentido, ratones hembra *knockout* para RA mostraron un crecimiento acelerado durante la pubertad en comparación con las hembras WT, sin embargo, no se observaron diferencias en el crecimiento de la glándula en la adultez (Gao et al., 2014). En concordancia con estos hallazgos, el tratamiento con flutamida no generó alteraciones morfológicas en ratas hembra adultas (Rudmann et al., 2005; Toyoda et al., 2000).

3.3.4 | Prolactina

La PRL es sintetizada por la hipófisis y por diversos sitios extra-hipofisarios, incluyendo la glándula mamaria. Esta hormona está implicada en la morfogénesis alveolar y la producción de leche durante la gestación y lactancia en hembras (Harris et al., 2004; Slepicka et al., 2021). Se ha observado que niveles elevados de PRL pueden generar hiperplasia lobuloalveolar en la glándula mamaria de ratas hembra (Zamani et al., 2015) y una feminización de la misma en ratas macho (Cardy, 1991; Lucas et al., 2007). Esta feminización consistió en un cambio a una morfología túbulo-alveolar, con una mayor presencia de conductos y pequeños alvéolos, que presentaron una capa de epitelio cúbico y un lumen definido (Figura 8) (Lucas et al., 2007). Estos trabajos sugieren que la hiperprolactinemia por si misma puede ser suficiente para producir feminización de la glándula mamaria de ratas macho e hiperplasia lobuloalveolar en hembras.

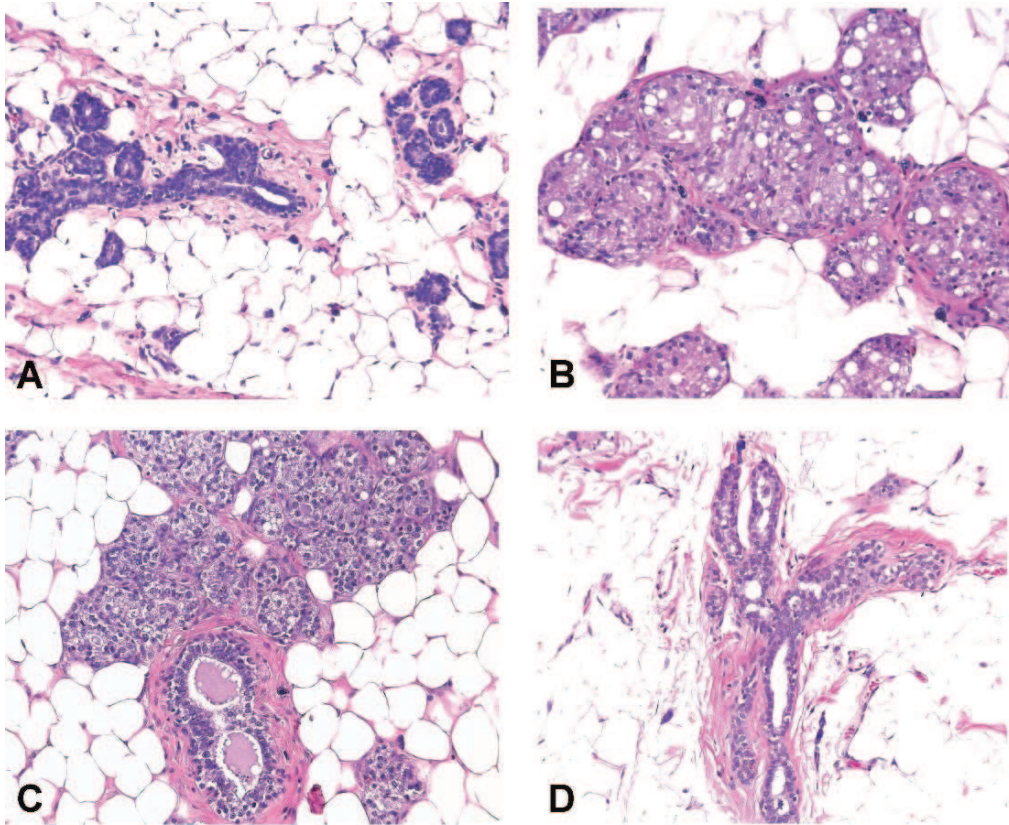


Figura 8. Efectos de la hiperprolactinemia sobre la glándula mamaria. (A, B) Glándula mamaria normal de ratas hembra (A) y macho (B) adultas. (C, D) Glándula mamaria de ratas hembra (C) y macho (D) con hiperprolactinemia; en las hembras se observa una hiperplasia lobuloalveolar mientras que los machos presentan una feminización de la glándula. Figura modificada de Lucas et al. (2007).

Tabla 1. Efectos de compuestos con actividad hormonal sobre la glándula mamaria de ratas macho y hembra.

Compuesto	Cambios hormonales		Cambios morfológicos en la glándula mamaria		Referencias
	Macho	Hembra	Macho	Hembra	
Agonista ESR1 (17 β -estradiol)	↑PRL, E2 ↓T	↑PRL, E2	Feminización	Hiperplasia LA ↑secreción	Biegel, Flaws, et al. (1998)
Antagonista ESR1 (Tamoxifeno)	_____	_____	Atrofia	Atrofia	Kennel et al. (2003) Karlsson et al. (1996)
Antagonista ESR1 (LY2066948)	_____	↑T, E2	_____	Masculinización	Rudmann et al. (2005)
Agonista RA (Testosterona)	_____	↑T, PRL	_____	Masculinización ↑secreción	O'Connor et al. (2000)
Antagonista RA (Flutamida)	↑T, E2	_____	Atrofia	_____	Toyoda et al. (2000)
Antagonista del receptor de dopamina	↑PRL	↑PRL	Feminización	Hiperplasia LA ↑secreción	Cardy (1991) Lucas et al. (2007)

E2: 17 β -estradiol, ESR1: receptor de estrógenos alfa, LA: lobuloadveolar, PRL: prolactina, RA: receptor de andrógenos, T: testosterona. Tabla modificada de Lucas et al. (2007).

En resumen, se ha observado que el tratamiento de ratas macho con flutamida genera un aumento en los niveles de séricos de E2, mientras que inhibe la actividad de T debido al antagonismo de RA, sin embargo, no se producen alteraciones en los niveles de PRL y la glándula mamaria es atrófica (Toyoda et al., 2000). Por el contrario, cuando se produce un aumento en los niveles séricos de PRL en las ratas macho se observa una feminización de la glándula, independientemente de que existan cambios en las concentraciones de E2. En base a esto, es probable que la atrofia de la glándula mamaria masculina sea ocasionada por antagonismo de RA o disminución de T, mientras que la feminización sea causada por un aumento de PRL y no por aumento de E2 o disminución de T (Lucas et al., 2007).

4 | *Perturbadores endócrinos*

En las últimas décadas se ha evidenciado la presencia masiva de diversos compuestos químicos en el medio ambiente como resultado de la acción antropogénica, los cuales presentan una inesperada acción de perturbación endócrina. El uso indiscriminado y descontrolado de estas sustancias ha sido asociado con el incremento de patologías reproductivas en humanos y animales silvestres, induciendo desequilibrios poblacionales en diversos ecosistemas (Darbre, 2015; Demeneix & Slama, 2019; Fenton, 2006). Estos compuestos, que generalmente se caracterizan por ser persistentes y bioacumulables, tienen usos muy diversos, como fungicidas, herbicidas, químicos industriales [Ej.: bifenilos policlorados, Bisfenol A (BPA)], compuestos vegetales naturales (Ej.: genisteína) o sustancias de uso farmacéutico [dietilestilbestrol (DES), etinilestradiol] (McLachlan, 2001); y se los ha denominado conjuntamente como *Perturbadores Endócrinos (PE)*.

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA - del inglés: *Environmental Protection Agency*) define a los PE como: “agentes exógenos que interfieren con la síntesis, secreción, transporte, unión a receptores, acción o degradación de las hormonas endógenas responsables de mantener la homeostasis, reproducción, desarrollo y/o conducta” (<http://www.epa.gov>). Más recientemente, en 2012, la *Endocrine Society* definió a los PE como químicos exógenos o mezclas de químicos que interfieren con cualquier aspecto de la acción hormonal (Zoeller et al., 2012). El mecanismo por el cual los PEs actúan sobre el organismo es complejo debido a que éstos, a diferencia de las hormonas endógenas, no son ligandos naturales y no interaccionan con los receptores hormonales con la misma especificidad y afinidad (Gore et al., 2015). Algunos PE se unen a receptores hormonales, pudiendo actuar como agonistas o antagonistas y por lo tanto aumentando, disminuyendo o bloqueando la acción de las hormonas. Además, también pueden alterar la cantidad de receptores hormonales en distintos tipos celulares y la concentración de hormonas circulantes (Gore et al., 2015). Existen evidencias que postulan que ciertos PE se unen a los receptores de estrógeno con diferentes afinidades y alteran su capacidad de activar la transcripción de genes dependientes de estrógeno (Delfosse et al., 2012; Delfosse et al., 2014). Asimismo, se ha evidenciado que también pueden interactuar con otros receptores, como RA, el receptor de aril-hidrocarburo (AhR), el receptor activado por proliferadores peroxisomales alfa (PPAR α) y el receptor de hormona tiroidea (Gore et al., 2015). Estos efectos, dependiendo del tiempo y la dosis de exposición, pueden dar lugar a una desregulación permanente en las vías de señalización hormonal, con consecuencias adversas para la salud.

Como las hormonas, los PE exhiben curvas de dosis-respuesta complejas, y pueden actuar a concentraciones extremadamente bajas, llegando a producir respuestas no monotónicas en las que la pendiente de la curva cambia en el transcurso de la relación dosis-respuesta (Figura 9). Estas curvas dosis-respuesta son referidas frecuentemente como curvas en forma de U (con respuestas máximas observadas a dosis bajas y altas) o de U invertida (con respuestas máximas observadas a dosis intermedias). Este tipo de respuestas no monotónicas se ha demostrado en hormonas naturales y numerosos PE, tanto en cultivo de células animales como en experimentos *in vivo* (Darbre, 2015; Montevil et al., 2020; Vandenberg et al., 2012).

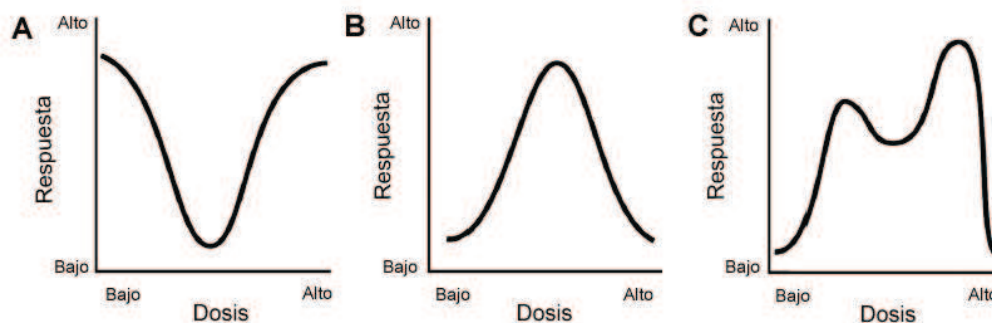


Figura 9. Respuestas no monotónicas o bifásicas. Dado que las hormonas interactúan con sus receptores de una manera no lineal, las curvas dosis-respuesta pueden ser no monotónicas. Dentro de éstas las más frecuentes son: (A) las que adoptan forma de U (con respuestas máximas observadas a dosis bajas y altas), (B) en forma de U invertida (con respuestas máxima observada a dosis intermedias) o (C) una curva multifacética. Todas estas son consideradas no monotónica debido a que la pendiente de la curva cambia una o más veces. Figura modificada de Vandenberg et al. (2012).

4.1 | Efecto de los perturbadores endócrinos sobre la epigenética

Como se mencionó anteriormente, los PE pueden presentar distintos mecanismos de acción. En este sentido, se ha demostrado que estos compuestos son capaces de inducir modificaciones epigenéticas en regiones regulatorias de genes clave, pudiendo alterar sus niveles de expresión (Gore et al., 2015). En relación a esto, el epigenoma es particularmente vulnerable a desregulación durante la embriogénesis debido a que los patrones de metilación o modificación de histonas, necesarios para el normal desarrollo de los tejidos, se programan durante el desarrollo temprano (Dolinoy, 2007).

Una modificación epigenética de la cromatina involucra cambios heredables en la expresión génica, sin cambios en la secuencia de ADN. Estas modificaciones pueden producir alteraciones en la conformación de la cromatina mediante la metilación del ADN, modificaciones post-traduccionales de histonas y ARNs no-codificantes, que se asocian con una cromatina activa/abierta o inactiva/cerrada (Li, 2002). Dentro de las modificaciones mencionadas, la metilación del ADN es de gran importancia en el desarrollo de los mamíferos (Smith & Meissner, 2013), ya que se encuentra implicada en diversos procesos biológicos, como la embriogénesis, la diferenciación celular y la inactivación del cromosoma X. Sin embargo, la metilación del ADN también puede ser modificada por la exposición a diversos estímulos ambientales y se ha observado que modificaciones en el patrón de metilación pueden estar relacionadas con el desarrollo y progresión de enfermedades, como distintos tipos de cáncer (Takeshima & Ushijima, 2019).

La metilación del ADN consiste en la unión covalente de un grupo metilo a un residuo de citosina en dinucleótidos CpG (denominado sitio CpG) y es realizada por las enzimas ADN metiltransferasas. Los sitios CpG se encuentran comúnmente metilados a lo largo de todo el genoma, pero normalmente no lo están en las denominadas islas CpG. Estas islas son regiones

que contienen gran cantidad de dinucleótidos CpG y que suelen encontrarse en regiones regulatorias 5' o promotoras de genes (Jung & Pfeifer, 2013). La metilación del ADN altera la interacción entre el ADN y las proteínas de unión a ADN, como factores de transcripción y ARN polimerasas, por lo que puede regular la expresión génica. En general, la metilación del ADN en las regiones promotoras está asociada con una represión de la transcripción, mientras que la ausencia de metilación se encuentra asociada a la activación de la transcripción (Jacobs et al., 2017).

La exposición a compuestos ambientales durante el desarrollo puede alterar el patrón epigenético normal, producir cambios en la expresión génica e incrementar la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades durante la vida adulta (Jacobs et al., 2017). En este sentido, modificaciones en el patrón de metilación del ADN en regiones regulatorias de ciertos genes se han observado en diferentes órganos debido a la exposición a DES, BPA, endosulfán e hidrocarburos aromáticos policíclicos (Bromer et al., 2010; Jacobs et al., 2017; Milesi et al., 2017; Prusinski et al., 2016). Específicamente, en la glándula mamaria también se han hallado alteraciones en la metilación del ADN por acción de PE (Awada et al., 2019; Knowler et al., 2014), por ejemplo, en las regiones reguladoras de los genes de proteínas de la leche en ratas expuestas a BPA (Altamirano, Ramos, et al., 2017), en el promotor del gen BRCA-1 en ratas expuestas a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) (Papoutsis et al., 2015) y en el promotor de ESR1 en células MCF7 expuestas a ftalatos (Kang & Lee, 2005).

4.2 | La glándula mamaria de ratas macho en el estudio de perturbadores endócrinos

Recientemente, la glándula mamaria de ratas macho se ha propuesto como un modelo apropiado para el estudio de los efectos de PE (Filgo et al., 2016; Kass et al., 2015; Mandrup et al., 2015). A pesar de que la glándula mamaria de hembras es la más estudiada, el estudio de la glándula masculina también ha adquirido importancia debido a que la incidencia de cáncer de mama en los hombres se ha incrementado en las últimas décadas (Chen et al., 2020; Speirs & Shaaban, 2009; Yalaza et al., 2016) y a que se ha descrito la presencia de este tipo de cáncer en hombres en nuestra región Litoral (Muñoz-de-Toro & Luque, 1997). Además, dado que la glándula mamaria de ratas post-puberales presenta un marcado dimorfismo sexual, es interesante analizar las modificaciones inducidas en este dimorfismo debida a la exposición a PE (Filgo et al., 2016; Lucas et al., 2007).

Se ha observado que ciertos PE alteran el desarrollo de la glándula mamaria de ratas machos (Filgo et al., 2016; Kass et al., 2015; Kass et al., 2020; Mandrup et al., 2015). Algunos de estos compuestos mostraron efectos sobre el desarrollo mamario en los machos más tempranamente que en las hembras (Mandrups et al., 2012), mientras que otros solo modificaron la glándula mamaria de los machos (You et al., 2002). Por lo tanto, los efectos de compuestos con actividad

hormonal sobre el desarrollo de la glándula mamaria masculina podrían utilizarse como marcadores de perturbación endocrina. En este sentido, la evaluación de la glándula mamaria de ratas macho es utilizada por la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (*Organization for Economic Cooperation and Development*, OECD) como un *endpoint* en sus guías para analizar toxicidad oral subcrónica de nuevas sustancias (OECD, 2008; Rudel et al., 2011). La glándula mamaria de ratas machos se encontró entre los *endpoints* más sensibles cuando se evaluaron los compuestos metoxicloro (Okazaki et al., 2001) y etinilestradiol (Andrews et al., 2002), siguiendo los lineamientos de la OECD.

4.3 | Glifosato

El glifosato (N-fosfometil glicina) es el principio activo de numerosas formulaciones de herbicidas disponibles en nuestro país, que representan aproximadamente el 70% del total de los herbicidas comercializados (CASAFE, 2014). Estas formulaciones presentan un amplio espectro de acción (no selectivo) y se utilizan para erradicar las malezas en áreas agrícolas y para la desecación química post-cosecha. Además de los usos tradicionales en la agricultura, los herbicidas a base de glifosato (HBG) también se han empleado en los hogares y en el mantenimiento de espacios públicos (Benbrook, 2016; Vandenberg et al., 2017). Este tipo de herbicidas se utilizan ampliamente a nivel mundial y se estima que su aplicación se ha incrementado ~100 veces desde la década del 70, produciéndose un aumento abrupto a partir de 1996 con la introducción de cultivos genéticamente modificados tolerantes al herbicida (como soja, maíz y algodón), y la consecuente expansión de las áreas sembradas tanto en nuestro país como en el resto del mundo. Además, el uso masivo de los HBG condujo a la aparición de malezas resistentes a los mismos, lo que derivó en el aumento de las dosis y el número de aplicaciones del producto (Benbrook, 2016; Vandenberg et al., 2017).

4.3.1 | Propiedades químicas y metabolismo

El glifosato es un compuesto polar, altamente soluble en agua e insoluble en solventes orgánicos. La absorción del mismo a través de la vía oral es incompleta, absorbiéndose aproximadamente en un 30 – 36%. El glifosato incorporado oralmente es pobremente metabolizado y excretado rápidamente a través de la orina y las heces. Debido a la reducida absorción de este compuesto en el sistema digestivo, las heces son la mayor ruta de eliminación del mismo, mientras que el glifosato absorbido es excretado a través de la orina (Joint FAO/WHO Meeting on Pesticide Residues [JMPR], 2006; Williams et al., 2000). Prácticamente la totalidad del compuesto (97%) se excreta sin modificaciones, aunque se han hallado pequeñas cantidades de ácido aminometilfosfónico (AMPA, principal metabolito del glifosato) en los intestinos de animales de experimentación (JMPR, 2006; Williams et al., 2000) o en la orina de trabajadores

ocupacionalmente expuestos, y se hipotetiza que puede ser generado por la metabolización del glifosato por parte de la microbiota intestinal (Conrad et al., 2017; F. Zhang et al., 2020).

Aunque el glifosato es considerado un herbicida de baja persistencia, la magnitud del impacto ambiental depende de la velocidad y la frecuencia de aplicación del mismo (Mamy et al., 2010). Las condiciones climáticas y la composición del suelo pueden influir en la persistencia del glifosato, reportándose una vida media del mismo en el suelo de entre 2 y 197 días y sugiriéndose una vida media típica en el campo de 47 días. En el agua, por otro lado, la vida media varía de pocos días hasta 91 días (Henderson et al., 2010; Vereecken, 2005).

4.3.2 | Exposición ambiental y aspectos regulatorios

En Argentina, las concentraciones medioambientales de glifosato han sido evaluadas en diferentes matrices que rodean las principales áreas de producción de cereales y oleaginosas. Los datos revelaron la presencia de glifosato en el agua y sedimentos de ríos, arroyos y lagunas de áreas rurales y suburbanas en las provincias de Buenos Aires (Aparicio et al., 2013; Mac Loughlin et al., 2017; Mac Loughlin et al., 2022; Peruzzo et al., 2008), Santa Fe (Ronco et al., 2016), Córdoba (Bonansea et al., 2018) y Entre Ríos (Primost et al., 2017; Ronco et al., 2016). Las áreas más contaminadas presentaron concentraciones de glifosato en agua de 700 µg/l en la provincia de Buenos Aires (Peruzzo et al., 2008), y de 2.15 y 3.29 mg/kg en sedimentos de ríos de las provincias de Córdoba y Entre Ríos, respectivamente (Bonansea et al., 2018; Primost et al., 2017; Ronco et al., 2016). Además, se halló la presencia de glifosato en agua de lluvia (Alonso et al., 2018; Lupi et al., 2019) y en fuentes de agua utilizadas para consumo humano, en concentraciones que variaron entre 0.1 y 35 µg/l (Mas et al., 2020). También se detectaron niveles elevados de glifosato en muestras de suelo de pueblos rurales y de campos destinados a la agricultura, prácticamente en forma ubicua y en concentraciones de glifosato de hasta 3.89 y 5.0 mg/kg (Avila-Vazquez et al., 2017; Peruzzo et al., 2008; Primost et al., 2017). Otra matriz en donde se detectaron niveles de glifosato fue en el polvo derivado de la erosión del suelo (Aparicio et al., 2018; Mendez et al., 2017), siendo las concentraciones de glifosato 60 veces mayores a las halladas en el suelo original (Aparicio et al., 2018). Esto pone de manifiesto que el polvo que proviene de campos donde se aplica el herbicida podría constituir una fuente importante de contaminación aérea.

A su vez, residuos de glifosato han sido detectados en una serie de alimentos para consumo humano y animal, en fórmulas alimenticias a base de soja para niños e incluso en agua envasada (Rendon-von Osten & Dzul-Caamal, 2017; Rodrigues & de Souza, 2018; Xu et al., 2019; Zoller et al., 2018). En Argentina, se encontraron niveles de glifosato elevados, por encima del orden de los mg/kg, en semillas y plantas de soja en campos de las provincias de Santa Fe y Salta. Algunas

de estas muestras superaron el límite máximo de residuos permitidos para alimentos de 20 mg/kg establecido por la Unión Europea (Arregui et al., 2004; Test-Biotech, 2013).

Estudios de biomonitorio realizados en muestras humanas detectaron la presencia de glifosato en la orina de individuos que habitan en áreas tanto urbanas como rurales (Gillezeau et al., 2019), hallándose concentraciones de glifosato desde 0.26 a 73.5 µg/l en sujetos ocupacionalmente expuestos y entre 0.16 y 7.6 µg/l en individuos expuestos ambientalmente. En Estados Unidos, un estudio reciente realizado en mujeres embarazadas encontró una correlación positiva entre los niveles de glifosato en orina y la residencia en zonas rurales (Parvez et al., 2018). Otro estudio realizado en Tailandia detectó glifosato en el suero de mujeres embarazadas y en sangre de cordón umbilical en concentraciones que estuvieron en el rango de 0.2 – 189.1 µg/l y 0.2 – 94.9 µg/l, respectivamente. La presencia de glifosato en las madres al momento del parto estuvo asociada a factores como su ocupación laboral como agricultoras, y la residencia próxima a zonas de cultivos o con familiares que realizaban tareas agrícolas (Kongtip et al., 2017). Por otro lado, resultados contradictorios se han reportado en cuanto a la presencia de glifosato en la leche materna; McGuire et al. (2016) y Steinborn et al. (2016) no detectaron glifosato en muestras de leche materna, mientras que Abdel-Halim et al. (2019) halló una concentración promedio de 7.32 ± 3.61 µg/ml. En conjunto, estas evidencias sugieren que existe un riesgo de exposición ambiental y ocupacional a glifosato tanto a nivel local como mundial, lo que ha despertado el interés y la preocupación por conocer sus efectos sobre la salud humana.

En cuanto a los aspectos regulatorios, distintas agencias internacionales han establecido niveles aceptables de exposición a glifosato. La EPA estableció una dosis crónica ajustada a la población (cPAD) de 1 mg/kg de peso corporal/día (EPA, 2017a). En el caso de la Organización Mundial de la Salud (WHO), ésta determinó una ingesta diaria admisible (IDA) de 1 mg/kg de peso corporal/día (JMPPR, 2016), mientras que la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) recomendó una IDA de 0.5 mg/kg/día, y un nivel de exposición ocupacional admisible de 0.1 mg/kg/día (EFSA, 2015).

4.3.3 | Efectos de la exposición a glifosato y HBG

Numerosos estudios han demostrado que la exposición a glifosato o HBG durante períodos críticos del desarrollo puede generar efectos adversos en diversos órganos, aún en dosis por debajo de los límites regulatorios (Mesnage, Defarge, et al., 2015; Myers et al., 2016). Dentro de estos efectos, se ha observado que el glifosato o sus formulaciones comerciales son capaces de alterar el sistema reproductor femenino y masculino (Ingaramo et al., 2020; Jarrell et al., 2020; Milesi et al., 2021; Serra et al., 2021). Los estudios que evalúan los efectos del glifosato sobre la salud reproductiva en humanos son escasos. Un estudio retrospectivo realizado en una población rural de Ontario (Canadá) mostró que la exposición a glifosato previa a la concepción se asoció con un

mayor riesgo de abortos espontáneos (Arbuckle et al., 2001), mientras que en un estudio realizado en Indiana (Estados Unidos) mayores niveles de glifosato en orina fueron correlacionados con una reducción en el tiempo de gestación (Parvez et al., 2018). Por otro lado, en estudios realizados en animales se ha reportado que HBG altera el útero de ratas hembra (Guerrero Schimpf et al., 2017; Guerrero Schimpf et al., 2022; Lorenz et al., 2020; Varayoud et al., 2017) y la *performance* reproductiva (Ingaramo et al., 2017; Ingaramo et al., 2016), y genera anomalías congénitas estructurales en las crías F2 (Milesi et al., 2018).

En roedores macho, una revisión ha mostrado que la exposición a glifosato o HBG disminuye la concentración de espermatozoides (Cai et al., 2017). En ratas, la exposición perinatal y durante la adultez a HBG disminuye las concentraciones séricas de T, aumenta la expresión de aromatasa en los testículos e incrementa los espermatozoides con morfología anormal (Cassault-Meyer et al., 2014; Dallegrave et al., 2007; Owagboriaye et al., 2017). Sin embargo, Romano et al. (2010) y Romano et al. (2012) reportaron que los efectos en los niveles séricos de hormonas esteroides difieren dependiendo del período de exposición. La exposición a HBG durante la gestación y la etapa posnatal temprana aumentó las concentraciones séricas de T y E2 (Romano et al., 2012), mientras que la exposición peri-puberal disminuyó los niveles séricos de T y no afectó a los niveles de E2 (Romano et al., 2010). Además, se ha observado que el glifosato aumenta la distancia anogenital en crías de ratas macho (Manservigi et al., 2019) y modifica la morfología de los testículos y disminuye el número de espermatozoides en ratones (Pham et al., 2019).

En cuanto a los estudios realizados *in vitro*, se ha reportado que el glifosato o sus formulaciones comerciales son capaces de disminuir la viabilidad y motilidad de los espermatozoides (Nerozzi et al., 2020), aumentar la mortalidad de células de Sertoli (Vanlaeys et al., 2018) e inducir la proliferación de células MCF-7, línea celular de cáncer de mama que expresa ESR1 (Mesnage et al., 2017). Los datos experimentales mencionados anteriormente sugieren que el glifosato podría presentar una acción de perturbación endócrina y, en concordancia con esto, Muñoz et al. (2021) publicó recientemente que el glifosato cumple con al menos 8 características clave de un PE. A pesar de los antecedentes reportados en la literatura científica, aún existe controversia sobre el potencial de perturbación endócrina del glifosato y la EPA y la EFSA han expresado que no se han detectado evidencias de una posible interacción del glifosato con las vías de señalización del sistema endócrino (EFSA, 2017; EPA, 2015a).

Por otro lado, los efectos de la exposición a glifosato o sus formulaciones sobre la glándula mamaria han sido poco estudiados. En estudios realizados previamente en nuestro laboratorio hemos observado que la exposición subcutánea durante la etapa postnatal temprana a un HBG provocó un mayor desarrollo de la glándula mamaria de ratas macho pre- y post-puberales, que estuvo acompañado por un aumento en el n° de TEBs (Figura 10) (Altamirano et al., 2018). Además, en los animales post-puberales expuestos a HBG se halló un incremento en la infiltración

de mastocitos, en la proliferación celular y en la expresión ESR1. También se utilizó este mismo tipo de exposición para evaluar los efectos a largo plazo de HBG sobre la glándula mamaria de ratas hembra de edad avanzada (20 meses). En este caso se observó un aumento en el porcentaje de conductos hiperplásicos y la aparición un estroma fibroblástico, con un aumento de la densidad nuclear y de las células positivas para vimentina (Zanardi et al., 2020).

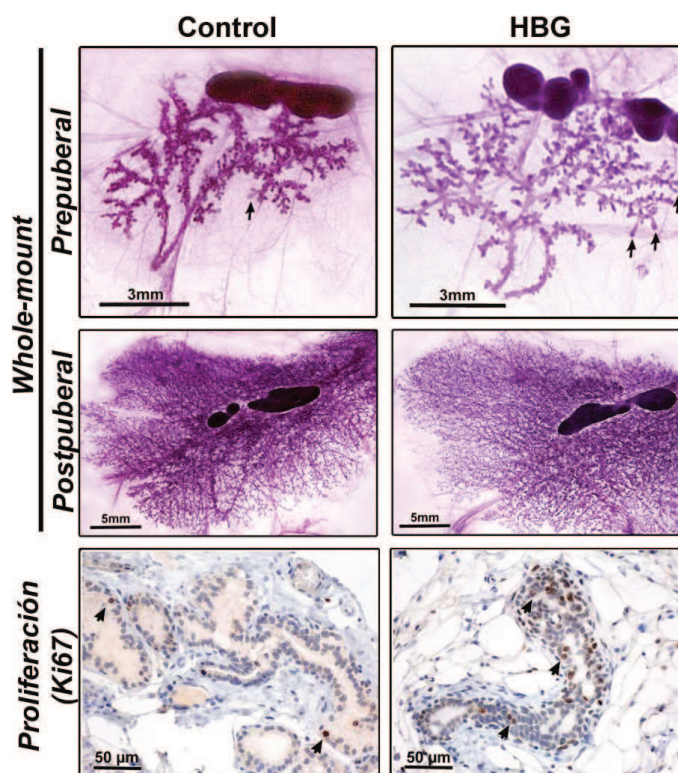


Figura 10. Efectos de la exposición a HBG sobre la glándula mamaria de ratas macho. La exposición subcutánea durante la etapa postnatal temprana a un HBG provocó un mayor desarrollo de la glándula mamaria de ratas macho pre y post-puberales, que puede observarse en las imágenes de *whole-mounts*. Además, se observó un aumento en el n° de TEBs, indicados por flechas en las imágenes de *whole-mount* de los animales pre-puberales. Los animales post-puberales expuestos a HBG también presentaron un aumento en la proliferación celular, determinada por la expresión de Ki67; las flechas indican células positivas. Figura modificada de Altamirano et al. (2018).

4.4 | Propiconazole

El propiconazole (IUPAC: *cis-trans-1-[2-(2,4-diclorofenil)-4-propil-1,3-dioxolan-2-ilmetil]-1H-1,2,4-triazol*) es un fungicida sistémico del grupo de los triazoles que posee una acción de amplio espectro para el control de enfermedades causadas por hongos en una variedad de cultivos alimentarios y no alimentarios. El mecanismo de acción del propiconazole consiste en inhibir la enzima CYP51 (lanosterol-14- α -demetilasa) involucrada en la síntesis de ergosterol. El ergosterol es esencial para la formación de la pared celular de los hongos, por lo que la alteración de su síntesis entelentece o detiene el crecimiento de los hongos (EFSA et al., 2017; EPA, 2015c). Dentro de los cultivos alimentarios en los que se utiliza este compuesto se encuentran el trigo, la cebada,

el maíz, el arroz, los cítricos, entre otros. También puede utilizarse en combinación con otros triazoles para el tratamiento de la roya de la soja. En cuanto a los cultivos no alimentarios, se incluyen las plantas ornamentales y el césped. Además, es utilizado como antimicrobiano en adhesivos y preservantes de madera (EPA, 2006; Juliatti et al., 2017).

Los datos acerca de los niveles de utilización de este compuesto son limitados. Sin embargo, se ha reportado que el uso de fungicidas se ha incrementado a nivel mundial desde comienzos de este siglo, probablemente por su más reciente difusión en cultivos extensivos de cereales y oleaginosas (FAOSTAT, 2019; March, 2014), y que en el año 2012 en Argentina se comercializaron 10.57 millones de Kg/l de estos productos (CASAFE, 2012). En cuanto al uso de fungicidas del grupo de los triazoles, una revisión reciente realizada en Estados Unidos señaló un notable incremento en el uso de los mismos a partir de 2006, siendo el propiconazole uno de los compuestos más utilizados (Toda et al., 2021).

4.4.1 | Propiedades químicas y metabolismo

El propiconazole es una mezcla racémica de cuatro estereoisómeros, los cuales se separan en cis- y trans-diastereoisómeros. Todos los estereoisómeros presentan actividad biológica y esto contribuye al amplio espectro de acción que presenta el propiconazole. La solubilidad de este compuesto en agua es moderada (100 mg/l) y es completamente miscible en solventes orgánicos (JMPR, 2007).

En estudios de toxicocinética se observó que el propiconazole es extensa y rápidamente absorbido, siendo su biodisponibilidad de aproximadamente 91%. Éste es excretado a través de la orina y las heces, mientras que menos de un 1% del compuesto permanece en los tejidos, encontrándose las mayores concentraciones en el hígado y los riñones. Además, en experimentos en animales lactantes se halló que un pequeño porcentaje de la dosis administrada se encontraba en la leche (0.18%). En cuanto al metabolismo del propiconazole, se ha observado que éste es altamente metabolizado y menos del 5% de la dosis permanece como el compuesto original. Los principales mecanismos de metabolización identificados fueron oxidación, hidroxilación, conjugación y clivado (EFSA et al., 2017; JMPR, 2007). Por otro lado, este compuesto presenta una persistencia y movilidad moderadas en la mayoría de los suelos y matrices acuosas, observándose vidas medias en un rango de 30 a 112 días (EPA, 2015b), mientras que estudios recientes han reportado su persistencia en suelos hasta 300 días post-aplicación (Edwards et al., 2016).

4.4.2 | Exposición ambiental y aspectos regulatorios

La información acerca de los niveles ambientales de propiconazole en Argentina es escasa. Corcoran et al. (2020) no encontró niveles detectables de propiconazole en cursos de agua de Córdoba y Buenos Aires; sin embargo, Williman et al. (2017) detectó la presencia del mismo en

distintas zonas de muestreo en el río Uruguay, hallando una concentración máxima de 0.199 µg/l en muestras de agua y de 0.914 µg/l en sólidos suspendidos. En relación a la ocurrencia de este compuesto a nivel mundial diversos estudios han reportado la presencia del mismo en cursos de agua. En arroyos de Estados Unidos se encontró en un 17% de las muestras analizadas, en una concentración máxima de 1.15 µg/l (Battaglin et al., 2011), y se detectó en ríos en Barcelona (España) en el rango de los µg/l (Quintana et al., 2019) y en Grecia, aunque en menores concentraciones (máximo 0.307 µg/l) (Papadakis et al., 2018). Además, en un estudio realizado en Malasia, el propiconazole fue el pesticida que se encontró en mayor concentración (media 4.49 µg/l) en muestras de aguas superficiales y se observó que los tratamientos de potabilización del agua no fueron capaces de eliminar el 100% de este compuesto (Elfikrie et al., 2020).

Por otro lado, existen pocos estudios de biomonitorio de propiconazole; una revisión, publicada en 2015, indicó que no se habían realizado estudios de biomonitorio de este compuesto hasta ese momento (Choi et al., 2015). Más recientemente estudios realizados en Luxemburgo, Francia y China detectaron la presencia de propiconazole en muestras de cabello, hallándose en un 2, 71 y 25% de los sujetos analizados, respectivamente (Beranger et al., 2018; Peng et al., 2021; Peng et al., 2020). En cuanto a los niveles de exposición a este compuesto, la EPA realizó una estimación de la exposición crónica a través de la dieta, teniendo en cuenta los usos y límites de residuos que se encuentran permitidos para el mismo. El mayor riesgo de exposición crónica estimado correspondió a los niños de 1-2 años y fue de 0.025 mg/kg/día (EPA, 2019).

En relación a los aspectos regulatorios, el propiconazole se encuentra dentro del grupo III (ligeramente peligroso) en la clasificación de la EPA y dentro del grupo C, como posible carcinógeno humano (EPA, 2006). Además, la EPA estableció una cPAD para este compuesto de 0.1 mg/kg/día, determinada a partir de una dosis NOAEL (nivel sin efecto adverso observable) de 10 mg/kg/día obtenida en un estudio de carcinogenicidad en ratones (EPA, 2019). Sin embargo, la EFSA en el año 2018 determina la no renovación de la aprobación de propiconazole, dado que los criterios de aprobación no eran cumplimentados por esta sustancia. Este compuesto fue clasificado como tóxico para la reproducción categoría 1B por la Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas y no se pudo demostrar que la exposición al mismo sea despreciable para los usos propuestos. Luego de esta decisión los productos que contenían propiconazole debían ser retirados del mercado, con un plazo máximo hasta marzo de 2020. Como consecuencia de esto el límite máximo de residuos (LMR) permitido se redujo al límite de detección (0.01 mg/kg) (EFSA et al., 2021). En Argentina aún se encuentra permitido el uso de propiconazole, encontrándose los LMR en el rango de 0.05 y 1.5 mg/kg (SENASA, 2020, 2021).

4.4.3 | Efectos de la exposición a propiconazole

Según lo publicado en la evaluación de riesgo realizada por la (EPA, 2019), el hígado es el principal órgano afectado por la toxicidad de propiconazole en animales. Dentro de los efectos producidos por este compuesto se ha observado un aumento en el peso del hígado, regiones de hipertrofia y necrosis y vacuolización de los hepatocitos. Por otro lado, en un estudio realizado en ratas durante el desarrollo, se hallaron efectos en los fetos (alteración en la formación de las costillas y el paladar) en dosis menores a la dosis de toxicidad materna, indicando una mayor susceptibilidad de los fetos a la exposición *in utero* (EPA, 2019). En este sentido, estudios recientes han reportado la presencia de propiconazole en líquido amniótico en ratas expuestas (Bossi et al., 2013) y la capacidad de transporte transplacentario del mismo en modelos de perfusión placentaria (Mathiesen et al., 2020), evidenciando la posibilidad de exposición de los fetos al compuesto.

Numerosos estudios *in vitro* han demostrado que el propiconazole es capaz de alterar distintos aspectos de la esteroidogénesis y afectar a la actividad de ciertos receptores hormonales. Se ha observado que este compuesto produce un efecto antagónico sobre RA (Ait-Aissa et al., 2010; Kjaerstad, Taxvig, Andersen, et al., 2010; Kjeldsen et al., 2013), una acción anti-estrogénica en la línea celular MCF7 y una inhibición de la síntesis de E2 y T en la línea celular H295R (Kjaerstad, Taxvig, Andersen, et al., 2010; Kjaerstad, Taxvig, Nellemann, et al., 2010; Taxvig et al., 2013). Además, se ha reportado que el propiconazole inhibe la enzima aromatasa en distintas líneas celulares (Laville et al., 2006; Sanderson et al., 2002; Trosken et al., 2006). Por otro lado, unos pocos estudios han analizado los efectos de propiconazole sobre la función reproductora *in vivo*. En trabajos realizados en ratas expuestas a propiconazole durante la gestación no se hallaron signos de toxicidad materna o fetal, ni modificaciones en la distancia anogenital de las crías (Rockett et al., 2006; Taxvig et al., 2008), aunque sí se observaron alteraciones en el ciclo estral de las hembras F1 (Rockett et al., 2006). En relación al sistema reproductor masculino, ratas macho adultas expuestas a propiconazole presentaron un aumento de espermatozoides con morfología anormal, una disminución en los niveles séricos de E2 y un aumento en el peso de la vesícula seminal (Costa et al., 2015), mientras que en machos expuestos *in utero* hasta la peripubertad se observó un aumento en el peso de los testículos y en los niveles de T (Goetz et al., 2007). Además, en un estudio realizado en machos castrados y tratados con T, el propiconazole no mostró el efecto anti-androgénico esperado, ya que no modificó los niveles séricos de T, el peso de la próstata ventral ni de la vesícula seminal y no afectó la expresión de genes inducibles por T (Taxvig et al., 2008). Por el contrario, al analizar los efectos generados por propiconazole en animales expuestos desde la gestación hasta la adultez (F1) y en la siguiente generación (F2), se observó una disminución en los niveles de T y en el peso de los conductos deferentes, aunque sin hallarse cambios funcionales en los órganos reproductivos (Vieira et al., 2017). En general,

los resultados hallados en los experimentos *in vivo* son contradictorios y algunos de ellos fallan en demostrar el efecto anti-androgénico que se observa en los estudios *in vitro*. En relación a la glándula mamaria, hasta la fecha no se han publicado estudios que evalúen el efecto de la exposición a propiconazole sobre la glándula. Dado que la glándula mamaria es un órgano sensible a compuestos con acción hormonal y que numerosos estudios postulan una acción endócrina de propiconazole (Costa et al., 2015; Goetz et al., 2007; Kjaerstad, Taxvig, Andersen, et al., 2010; Kjeldsen et al., 2013; Taxvig et al., 2013; Vieira et al., 2017), sería de interés analizar los efectos de este compuesto sobre la glándula.

Considerando que, como se expuso anteriormente, la glándula mamaria de ratas macho constituye un modelo apropiado para evaluar los efectos de perturbación endócrina y que la información sobre la acción de glifosato, HBG y propiconazole sobre la glándula mamaria es limitada, nos propusimos evaluar los efectos de la exposición perinatal a estos compuestos sobre la glándula mamaria de ratas macho, en dos momentos endócrinos diferentes, la pre- y post-pubertad. Es necesario considerar que tanto el momento como la vía de exposición a un determinado compuesto pueden generar un impacto diferente sobre el sistema endócrino (Bergman et al., 2013; Yang et al., 2015). En este caso decidimos evaluar la exposición a los agroquímicos mencionados durante la etapa perinatal (gestación y lactancia), éste es un período crítico para el desarrollo de la glándula mamaria, que puede ser alterado por la exposición a sustancias con actividad hormonal. Dado que durante esta etapa se forman y comienzan a elongarse y ramificarse los conductos primarios y secundarios, cualquier interferencia en estos eventos podría ocasionar alteraciones en el desarrollo mamario, que pueden persistir en la edad adulta (Fenton, 2006).

Como se señaló previamente, tanto el glifosato como el propiconazole son utilizados en Argentina y han sido hallados en el medio ambiente. En el caso de glifosato, se han detectado residuos del mismo en cursos de agua (Ronco et al., 2016), en fuentes de agua utilizadas para consumo humano (Mas et al., 2020), en cultivos y en alimentos (Myers et al., 2016), al igual que en el suero materno y de cordón umbilical (Kongtip et al., 2017). Por otro lado, si bien la información acerca de la ocurrencia de propiconazole en el medio ambiente es limitada, en Argentina se encuentra aprobado para su uso sobre diversos cultivos alimentarios (SENASA, 2020) y se ha detectado en cursos de agua (Williman et al., 2017). Además, se ha hallado en líquido amniótico en ratas expuestas y es capaz de transportarse a través de la placenta (Bossi et al., 2013; Mathiesen et al., 2020). Lo mencionado anteriormente demuestra que existe el riesgo de exposición oral e *in utero* a estos compuestos.

OBJETIVOS

*“El arte y la ciencia de hacer preguntas
es la fuente de todo conocimiento”*

Thomas Berger

En base a los antecedentes citados, nuestra hipótesis propone que la exposición a bajas concentraciones de PE durante períodos críticos de la organogénesis mamaria modifica su desarrollo e incrementa el riesgo de desarrollar lesiones. En función de esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

1 | *Objetivo general*

Evaluar las diferencias y similitudes en el desarrollo mamario entre ratas macho y hembra para luego analizar si la exposición perinatal (gestación + lactancia) a fitosanitarios altera el desarrollo en la glándula mamaria de animales macho en dos períodos endocrinológicos distintos: pre- y post-pubertad.

2 | *Objetivos específicos*

Objetivo 1. Analizar las similitudes y diferencias existentes en el desarrollo mamario de hembras y machos.

Objetivo 2. Analizar si la exposición perinatal a glifosato ó propiconazole resulta en alteraciones histológicas de la glándula mamaria de ratas macho.

Objetivo 3. Evaluar si la exposición *in utero* y durante la lactancia a glifosato ó propiconazole modifica el microambiente endócrino de la glándula mamaria en las etapas pre- y post-puberal.

Objetivo 4. Investigar si la exposición a la mezcla de fitosanitarios potencia los efectos producidos por los compuestos individuales analizando el desarrollo morfológico de la glándula mamaria y su microambiente hormonal.

Objetivo 5. Analizar los potenciales mecanismos de acción del glifosato, propiconazole o su mezcla sobre el desarrollo mamario en ratas macho.

MATERIALES Y MÉTODOS

*“Nada en la vida es para ser temido, es sólo para ser
comprendido. Ahora es el momento de entender más,
de modo que podamos temer menos”*

Marie Curie

1 | *Animales*

El protocolo experimental fue diseñado de acuerdo a la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio de la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos y aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL. Se utilizaron ratas hembra adultas de cepa Wistar pertenecientes a la Cátedra de Fisiología Humana de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL. Los animales fueron mantenidos en condiciones controladas ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$ y 14 h de luz) y tuvieron libre acceso a agua y comida (Nutrición Animal, Rafaela, Argentina). Para mayor información sobre la composición del alimento ver Tabla A1 en el Anexo (Andreoli et al., 2015; Kass et al., 2012). Para reducir al mínimo la exposición a otros productos químicos con actividad estrogénica, los animales fueron alojados en jaulas de acero inoxidable con camas de viruta de madera previamente esterilizada (Centro de Medicina Comparada, Instituto de Ciencias Veterinarias -ICIVET, UNL-CONICET); y el agua fue provista en mamaderas de vidrio con tetinas de acero inoxidable.

2 | *Diseño experimental*

2.1 | *Desarrollo mamario en ratas macho y hembra de la cepa Wistar*

Para analizar el desarrollo mamario se obtuvieron muestras de glándulas mamarias de crías macho y hembra al destete (DPN21) y a los 60 días de edad. En DPN60 se determinó la pubertad en las hembras a través de la observación de apertura vaginal y se sacrificaron en diestro 1 (controlado por la realización de extendidos vaginales).

2.2 | *Efectos de fitosanitarios sobre el desarrollo mamario en machos*

Ratas hembra que se encontraban en la fase de proestro del ciclo estral (Montes & Luque, 1988) fueron colocadas con machos de fertilidad comprobada. El día en el cual se encontraron espermatozoides en el extendido vaginal fue considerado como DG1. En DG9, correspondiente al comienzo de la organogénesis del feto, las hembras preñadas F0 fueron distribuidas al azar en los siguientes experimentos (Figura 11):

A) Exposición perinatal a glifosato:

- *Control:* dieta control
- *HBG:* dieta suplementada con formulación comercial de glifosato (66.2 g% sal potásica de N-fosfonometil glicina, equivalente a 54% de glifosato ácido, Magnum Super II, Grupo Agros, Argentina) en una dosis teórica de 4 mg y 400 mg glifosato/kg peso corporal/día.
- *GLI:* dieta suplementada con glifosato (Sigma-Aldrich, Argentina) en una dosis teórica de 4 mg/kg peso corporal/día.

B) Exposición perinatal a propiconazole:

- *Control:* Aceite de sésamo (vehículo), vía intragástrica.
- *PRO:* propiconazole (Pestanal®, Sigma-Aldrich) en una dosis teórica de 4 mg/kg peso corporal/día vía intragástrica.

C) Exposición perinatal a la mezcla de fitosanitarios:

- *Control:* dieta control y aceite de sésamo por vía intragástrica.
- *PROGLI:* dieta suplementada con 4 mg/kg peso corporal/día de glifosato (Sigma) + 4 mg/kg peso corporal/día de propiconazole (Sigma) por vía intragástrica.

En las madres F0, la exposición a glifosato fue realizada a través de la dieta desde el DG9 hasta el destete, mientras que el tratamiento con propiconazole se administró por vía intragástrica desde el DG10 hasta el destete, cada 48 h. Luego del parto (DG23), las crías fueron pesadas y sexadas de acuerdo a la distancia anogenital y se mantuvieron camadas de 8 crías (4 hembras y 4 machos) por madre hasta el destete en DPN21. Se registró el consumo de alimento y peso de las madres durante todo el tratamiento de manera de calcular las dosis reales de fitosanitarios a las que estuvieron expuestos los animales. Por otro lado, se evaluó si las dosis de los fitosanitarios seleccionadas produjeron toxicidad materna y/o fetal analizando el peso de las madres durante la gestación y lactancia, el número de crías nacidas vivas, la presencia de malformaciones macroscópicas en las crías nacidas y peso de éstas al nacer.

Muestras de glándulas mamarias y suero fueron obtenidas en las crías macho F1 en DPN21 y DPN60 (Figura 11). Además, se obtuvieron muestras de suero de las madres F0 el día del destete (día de lactancia 21 – DL21). En cada caso se analizó una cría macho por camada y día experimental; entre 8 y 10 camadas fueron utilizadas por grupo experimental. Las hembras y el resto de los machos F1 fueron destinados a otros experimentos en desarrollo en el laboratorio.

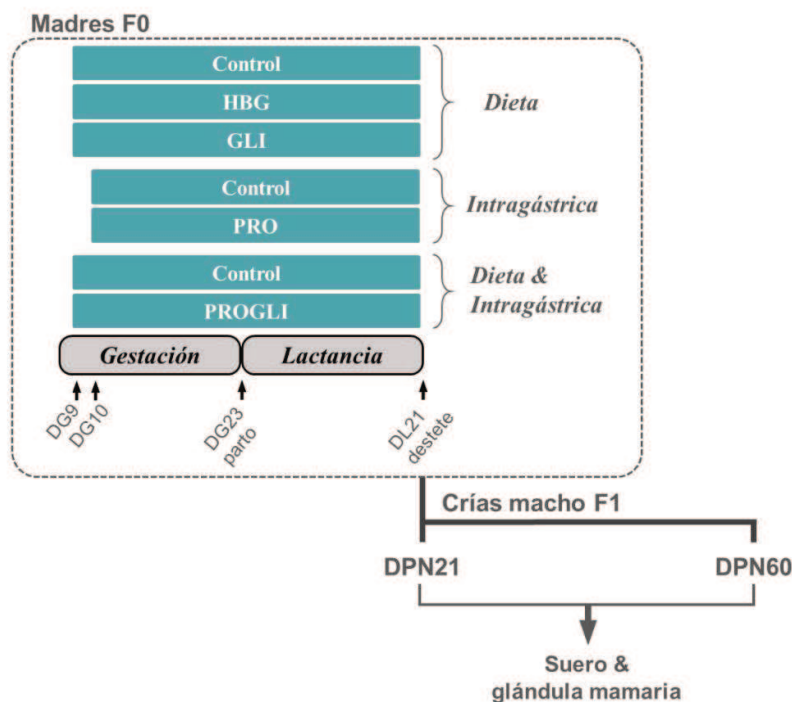


Figura 11. Esquema de los tratamientos experimentales utilizados para estudiar los efectos de la exposición a fitosanitarios sobre la glándula mamaria de ratas macho. Las madres F0 fueron expuestas oralmente a glifosato a través de la dieta desde el DG9 hasta el DL21, y a propiconazole por vía intragástrica desde el DG10 hasta el DL21, cada 48h. HBG: exposición al herbicida a base de glifosato, GLI: exposición a glifosato puro, PRO: exposición a propiconazole, PROGLI: exposición a glifosato puro y propiconazole. F0 y F1 indican las distintas generaciones de animales utilizados en el desarrollo del trabajo. DG: día de gestación; DL: día de lactancia; DPN: día postnatal.

2.2.1 | Preparación del alimento suplementado con glifosato

La exposición a glifosato se realizó a través del alimento, con este propósito se preparó una pasta a base del alimento comercial, mezclando cantidades adecuadas de pellet y agua. HBG o glifosato puro fueron añadidos al agua de preparación según correspondía en cada grupo experimental, sin realizarse agregados en el grupo control. Las cantidades de glifosato necesarias para alcanzar las dosis establecidas para cada grupo experimental se calcularon teniendo en cuenta el peso (250 g) y consumo de alimento (30 g) promedio de las hembras preñadas de la colonia durante la gestación y lactancia. La mezcla preparada se dejó reposar durante la noche y al día siguiente fue homogeneizada hasta formar una pasta, con la cual se realizaron “bolos” de alimento. Los bolos de alimento fueron preparados el día previo a su utilización y se reemplazaron tres veces por semana.

2.2.2 | Preparación de la solución de propiconazole

El propiconazole fue diluido en aceite de sésamo para obtener una solución de 10 mg de propiconazole/ml, que fue administrada a los animales por vía intragástrica. La concentración de la solución de tratamiento fue calculada con el objetivo de administrar alrededor de 0.1 ml de

solución en cada exposición, teniendo en cuenta el peso promedio de las hembras preñadas de la colonia durante la gestación y lactancia. La solución de trabajo fue preparada semanalmente.

2.2.3 | *Dosis utilizadas*

Las dosis de glifosato evaluadas en el presente trabajo se encuentran por debajo de la dosis NOAEL de toxicidad materna y fetal de 1000 mg/kg/día (Williams et al., 2000). Por otro lado, la dosis de 4 mg/kg/día se encuentra en el orden de magnitud de la dosis IDA de 1 mg/kg/día establecida por la (EPA, 2017a) y por la JMPR (2016), mientras que la dosis de 400 mg/kg/día es cien veces mayor. Además, en un informe reciente, la (EPA, 2017b) realizó una estimación de la exposición residencial y ocupacional a glifosato, hallando que el máximo potencial de exposición era de 0.47 mg/kg/día y 7 mg/kg/día respectivamente. La dosis de 4 mg/kg/día se encuentra entre estos valores.

La dosis de propiconazole seleccionada (4 mg/kg/día) es menor a las dosis NOAEL de toxicidad fetal (30 mg/kg/día) y materna (90 mg/kg/día) (EPA, 2019). Por otro lado, si bien es mayor a la cPAD determinada por la EPA (0.1 mg/kg/día), se encuentra por debajo de la dosis NOAEL (10 mg/kg/día) utilizada para establecer esta cPAD (EPA, 2019).

3 | *Obtención de muestras*

3.1 | *Muestras de suero*

Se obtuvieron muestras de sangre de las madres F0 el día del destete (DL21) y de las crías machos en DPN21 y DPN60. Las muestras se recolectaron en tubos de vidrio y se incubaron por 15 min en estufa a 37°C, para facilitar la retracción del coágulo. Luego se realizó una centrifugación de las mismas y se separó el suero, que fue conservado a -80°C hasta el momento de las determinaciones séricas.

3.2 | *Mastectomía*

Los animales se sacrificaron por decapitación, luego se colocaron sobre una tabla de disección con el abdomen hacia arriba y se desinfectó con alcohol 70° el campo quirúrgico. Se realizó una incisión en la línea media del abdomen y dos cortes perpendiculares al anterior: uno en la zona inguinal y el otro a la altura del diafragma (estos cortes permiten extraer las glándulas mamarias y separarlas tanto de la piel como del músculo abdominal). Luego, se separó la glándula mamaria del músculo subyacente, quedando expuesta la cadena abdomino-inguinal (N° 4, 5 y 6) (Figura 12). Finalmente se fijó la piel a la tabla de disección y se separó la glándula mamaria de la piel del animal. Se diseccionaron ambas cadenas mamarias inguinales, la cadena izquierda fue procesada para *whole-mount* (montaje completo de la glándula), mientras que en la cadena contralateral (derecha), la glándula mamaria N° 4 fue fijada en formol buffer al 10% (v/v) e incluida en parafina y las glándulas mamarias N° 5 y 6 fueron congeladas en nitrógeno líquido y

almacenadas a -80°C para su posterior análisis mediante diferentes técnicas de biología molecular.

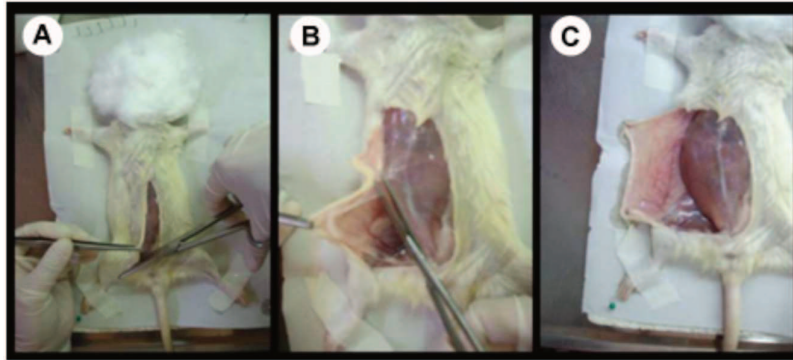


Figura 12. Mastectomía. (A) Luego del corte ventro-medial inicial, se realiza un nuevo corte oblicuo al primero. (B) La cadena mamaria dispuesta subcutáneamente es desprendida del músculo abdominal y (C) queda expuesta para su disección completa.

4 | *Procesamiento de muestras*

Las muestras de glándula mamaria obtenidas fueron procesadas de diferentes maneras de acuerdo a los siguientes propósitos:

- Estudios a partir del montaje completo de la glándula (*whole-mount*)
- Estudios por microscopía óptica
- Estudios por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real

4.1 | *Estudios a partir del montaje completo de la glándula (whole-mount)*

Las glándulas mamarias fueron estiradas sobre portaobjetos limpios y desengrasados de 5.5 x 7.5 cm (Fisher Scientific, USA) y se fijaron en una solución de formol buffer durante 18 h a temperatura ambiente. A continuación, se eliminó la grasa de las muestras de glándula utilizando tolueno y éstas fueron teñidas con carmín alúmina (Rasmussen et al., 2000). Luego de un proceso de deshidratación, las *whole-mounts* (WMs) se colocaron en bolsas plásticas que se sellaron por calor (10 x 15 cm; Kapak Seal PAK pouches, KAPAK Corporation, USA) con salicilato de metilo (Sigma-Aldrich, Argentina). El salicilato de metilo presenta un índice de refracción muy cercano al del tejido, garantizando de este modo una resolución fotográfica de gran calidad, razón por la cual fue elegido como agente de conservación. El procesamiento detallado de las muestras para la obtención de WM se describe en la Tabla A2 (Anexo).

4.2 | *Estudios por microscopía óptica*

Las glándulas mamarias se fijaron durante 6 h en formol buffer para mantener de forma definitiva las estructuras histológicas y citológicas de los tejidos. Luego se realizaron dos lavados con PBS (pH: 7.5) de 10 min cada uno y se mantuvieron los tejidos en una solución de alcohol 70°.

Finalmente, se procesaron por técnicas histológicas de rutina hasta su inclusión en parafina (Junqueira & Junqueira, 1983). Durante el protocolo de procesado, las muestras fueron deshidratadas en alcoholes de graduación creciente, debido a que la parafina (sustancia donde finalmente es incluido el tejido) es inmisible en agua. El alcohol presente en los tejidos fue sustituido por un solvente (no acuoso) miscible en parafina fundida, en nuestro caso BioClear (Biopack, Argentina). La inclusión en parafina consistió en colocar la muestra dentro de un frasco que contenía parafina fundida, en estufa a 60°C. El calor provocó la evaporación de los restos del solvente (BioClear) y de esta forma, los espacios ocupados por éste fueron impregnados por la parafina. Finalmente, se colocó la muestra en un recipiente con parafina fundida y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Este proceso permitió obtener un bloque de parafina denominado “taco” con el tejido en su interior. Una vez obtenido el taco, se realizaron cortes histológicos seriados de 5 µm de espesor en micrótopo (Leica Jung RM2025, Leica Instruments GMT, Alemania) que se montaron en portaobjetos pretratados con adhesivo tisular (3-aminopropil trietoxysilano, Sigma-Aldrich) y se secaron en estufa a 37°C durante 24 h. Estos cortes histológicos fueron utilizados para analizar la histomorfología mamaria y para ensayos de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia.

4.3 | Estudios por PCR en tiempo real

Las glándulas mamarias N° 5 y 6 fueron disecadas en condiciones estériles, congeladas rápidamente en nitrógeno líquido y conservadas a -80°C. Estas muestras fueron utilizadas para la extracción de ARN total y ADN genómico.

4.3.1 | Extracción de ARN total

La extracción de ARN total se realizó utilizando el reactivo comercial “TRIZol Reagent” (Invitrogen, Argentina), que se fundamenta en el método de isotiocianato de guanidina-fenol-cloroformo (Chomczynski & Sacchi, 1987). Básicamente, en el contenedor del homogeneizador Ultra Turrax® T25 Basic (IKA - Werke GMBH & Co.KG, Alemania) se agregaron 800 µl del reactivo TRIZol por cada 50-100 mg de tejido congelado, y se homogeneizó suavemente. Durante la homogeneización de la muestra el reactivo preservó la integridad del ARN. El agregado de cloroformo y la posterior centrifugación separó la solución en una fase acuosa y otra fase orgánica. El ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa, de donde fue recuperado por precipitación con alcohol isopropílico, lavado con etanol al 80% y solubilizado en agua libre de ribonucleasas. La concentración de ARN total en las muestras procesadas se determinó mediante la lectura en espectrofotómetro (NanoDrop Lite, Thermo Scientific, USA) a una longitud de onda de 260 nm. Se usó como referencia de la pureza del ARN extraído, la relación entre las absorbancias obtenidas a 260 nm (punto de máxima absorción de ácidos nucleicos) y 280 nm (punto de máxima absorción de proteínas), utilizándose solamente aquellas muestras con una

relación de absorbancia 260/280 mayor a 1.9. Los ARN obtenidos fueron conservados a -80°C hasta su utilización. A partir de cada ARN extraído se realizó una retrotranscripción (RT) con el fin de obtener el correspondiente ADN copia (ADNc).

4.3.2 | Extracción de ADN genómico

Para la extracción de ADN genómico (ADNg) a partir de muestras de glándula mamaria se utilizó el método fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (Sambrook & Russell, 2001). Brevemente, el tejido fue homogeneizado junto a un buffer de digestión con el homogeneizador Ultra Turrax® T25 Basic (IKA) y tratado con ARNasa (Sigma-Aldrich). Luego se agregó una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, se centrifugó y se recuperó el ADN en la fase acuosa. Finalmente se precipitó el ADN con acetato de amonio y etanol al 100%, se lavó con etanol al 70% y se solubilizó en agua libre de ribonucleasas. La concentración total de ADN fue determinada por medición de absorbancia a 260 nm y el ADN fue almacenado entre 2-8°C.

5 | Determinaciones séricas

5.1 | Determinación de glifosato y AMPA

Las concentraciones séricas de glifosato y AMPA fueron determinadas por cromatografía líquida de ultra-alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem (UHPLCMS/MS) (Milesi et al., 2018). Estos ensayos fueron realizados en el PRINARC (Programa de Investigación y Análisis de Residuos y Contaminantes Químicos, Facultad de Ingeniería Química, UNL, Santa Fe, Argentina) y los límites de detección para glifosato y AMPA fueron 1 y 2 µg/l, respectivamente.

5.2 | Determinación de E2 y T

Los niveles de E2 y T fueron determinados por un ensayo de quimioluminiscencia, utilizando un Immulite® 2000 system (Siemens Healthcare SA, Argentina) y siguiendo las especificaciones del fabricante. El ensayo presentó un límite de detección de 15 pg/ml para E2 y de 0.15 ng/ml para T. Además, el coeficiente de variación intra-ensayo para E2 fue 6.7%, mientras que para T fue 10.1%.

5.3 | Determinación de PRL

La determinación de PRL circulante fue realizada por radioinmunoensayo (Lacau-Mengido et al., 1996). El límite de detección del ensayo fue de 0.3 ng/ml y el coeficiente de variación intra-ensayo de 7.8%. Este procedimiento fue realizado por el grupo de investigación de la Dra. Damasia Becu-Villalobo en el Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), CONICET, Buenos Aires, Argentina.

6 | Evaluación del desarrollo de la glándula mamaria en WMs

Se tomaron imágenes de las WMs de la glándula mamaria de los machos F1, utilizando una cámara color Spot Insight V3.5 acoplada a un estereomicroscopio Stemi 305 (ZEISS, Argentina) en el caso de las muestras en DPN21 y una cámara Sony Alpha a58 DSLR (Sony Latin America, Inc.) para las muestras en DPN60. Todas las imágenes fueron analizadas con el *software* Image J (NIH, USA; <https://imagej.nih.gov/ij>). El sistema de medida fue calibrado con un portaobjeto de referencia y todas las determinaciones se realizaron sobre la glándula mamaria N° 4.

Se analizaron distintos parámetros en la glándula mamaria de los animales (Figura 13) (Altamirano, Delconte, et al., 2017; Kass et al., 2015), el área total ocupada por la glándula, el perímetro y el n° de TEBs fueron evaluados en ambas edades. En el caso del n° de TEBs, éstos fueron identificados por su forma característica de “gota” y sólo se consideraron aquellas estructuras con un diámetro igual o mayor a 100 μm (Russo & Russo, 1978). Además, en DPN21 se determinó la distancia entre la glándula mamaria N° 4 y 5; para esta determinación se dibujaron dos líneas paralelas, una en el extremo derecho de la glándula N° 4 y otra en el extremo izquierdo de la glándula N° 5, y se midió la distancia perpendicular entre estas líneas. Por otro lado, para evaluar el crecimiento longitudinal de la glándula mamaria en DPN60, se determinó la distancia que se extendían los conductos más allá del nódulo linfático (NL). En este caso se dibujaron dos líneas paralelas tangentes al extremo superior del NL y al extremo de crecimiento de la glándula N° 4 y se determinó la distancia perpendicular entre ambas líneas.

Finalmente, se evaluó el desarrollo de la glándula mamaria a partir del área epitelial relativa en DPN21 y un *score* triple ciego en DPN60. El área epitelial relativa se definió como el área ocupada por el árbol epitelial dividida por el área total de la glándula. Brevemente, se redujo el tamaño de la imagen al mínimo extrayendo la región de la imagen que rodea el epitelio de la glándula mamaria, se separaron los canales de colores y se eliminó el ruido a partir de distintas opciones proporcionadas por el *software*. Por último, se determinó del área ocupada por el árbol epitelial (Stanko et al., 2015). En DPN60, se asignó a cada una de las WMs un *score* cualitativo, en una escala subjetiva del 1 al 3, en la cual el valor 1 representó un mínimo desarrollo del árbol mamario y el 3, el mayor nivel de desarrollo. El criterio utilizado para el *score* cualitativo se basó en la densidad de ramificación de la glándula y en el desarrollo lobuloalveolar. Cada glándula fue evaluada por tres individuos, sin conocimiento del tratamiento, y se realizó un promedio para obtener el *score* final.

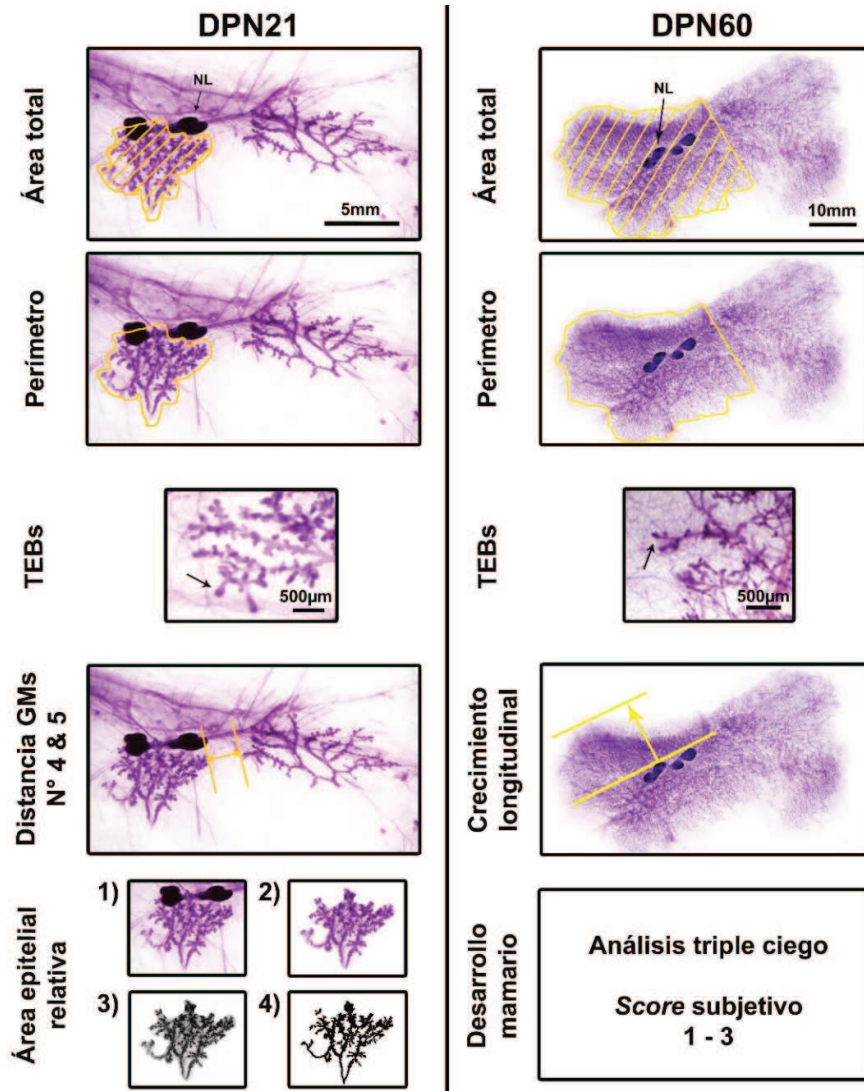


Figura 13. Parámetros evaluados en las WMs de las glándulas mamarias de las crías macho F1 en DPN21 y DPN60. LN: nódulo linfático, GMs: glándulas mamarias. Flechas: TEBs.

7 | Evaluación de la histología de la glándula mamaria

Para el estudio histológico, secciones de 5 µm de espesor de glándula mamaria embebidas en parafina se colorearon con Picrosirius - Hematoxilina (P&H) para el análisis por microscopía óptica (microscopio Olympus BH2. Iluminación: lámpara halógena de 12 voltios, 100 W, equipado con una fuente de luz estable; Olympus Optical Co., Ltd, Japón). Para la coloración con P&H los cortes histológicos se desparafinaron e hidrataron en soluciones de alcoholes de graduación decreciente, se colorearon con Picrosirius (1 h) y Hematoxilina de Harris (6 min) y posteriormente se deshidrataron. Las secciones de tejido coloreadas se montaron usando un líquido de montaje permanente (Bálsamo de Canadá, Biopack). En todos los casos se evaluó el desarrollo ductal y lobuloalveolar y la presencia de lesiones mamarias (Durando et al., 2007; Mandrup et al., 2015).

8 | Evaluación de la expresión de proteínas en la glándula mamaria

8.1 | Generación de anticuerpos anti-Ki67

Para la determinación de Ki67 se generaron anticuerpos policlonales de conejo, purificados por cromatografía de afinidad, siguiendo protocolos descritos previamente (Vigezzi et al., 2016). El antígeno fue expresado en *Escherichia coli* BL21 (GE Healthcare, Argentina) como una proteína de fusión a glutatión-S-transferasa (GST) utilizando el vector pGEX4T-3 (GE healthcare). Se amplificó la región correspondiente a los aminoácidos 1193-1418 de la secuencia de Ki67 de la rata (número de acceso NP_001258295.1). Esta región incluye una sub-región con una secuencia corta de 22 aminoácidos (ASKNRAQPLEDLDFQELFQTP) que se repite numerosas veces y podría ser la responsable de la antigenicidad de la molécula. Los anticuerpos generados fueron purificados por cromatografía de afinidad con el antígeno (Hi-Trap NHS activated HP column, GE Healthcare). Para evaluar la especificidad de los anticuerpos anti-Ki67 obtenidos, se realizó una preabsorción de los mismos incubando 1 µg de anticuerpos con 10-20 µg del péptido antigénico por 24 h a 4°C. Luego, se realizaron ensayos de inmunohistoquímica con los anticuerpos, con y sin preabsorción, en un control positivo como el intestino de la rata (Figura 14).

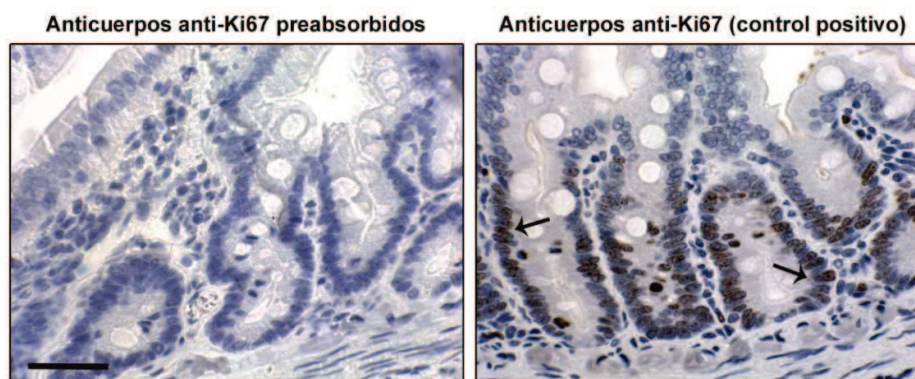


Figura 14. Imágenes representativas de la inmunomarcación de Ki67 en las criptas del intestino de rata. No se observa marcación con los anticuerpos preabsorbidos con el antígeno (control negativo), mientras que se observan células positivas para Ki67 en las criptas del intestino en el control positivo. Las células positivas se indican con flechas. Ambas imágenes presentan la misma magnificación, barra: 50 µm.

8.2 | Inmunohistoquímica

La técnica de inmunohistoquímica se realizó siguiendo un protocolo previamente publicado (Muñoz-de-Toro et al., 1998), con pequeñas modificaciones para cada marcador evaluado. Secciones de glándula mamaria de 5 µm de espesor fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios. Para el sistema de revelado se utilizaron anticuerpos secundarios biotinilados y el método de extravidina-biotina peroxidasa, con diaminobencidina (DAB; Sigma-Aldrich) como sustrato cromogénico. El protocolo seguido se detalla en la Tabla A3 (Anexo). En todos los casos se realizaron controles negativos sustituyendo el anticuerpo primario con un suero

no inmune. Los controles positivos consistieron en tejidos cuya reacción positiva fue comprobada con anterioridad. En la Tabla 2 se detallan los anticuerpos y diluciones utilizados en cada ensayo. Como anticuerpos secundarios se utilizaron los anticuerpos biotinilados anti-ratón o anti-conejo generados en el Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL, Argentina), a excepción de la detección de RA, en la que se utilizó el anticuerpo secundario anti-conejo de Zymed Laboratories Inc., USA.

En las cuantificaciones de Ki67, ESR1 y RA se determinó el porcentaje de células positivas, para lo cual se utilizó un microscopio óptico (Olympus BH2, Japón) y una objetiva plana de inmersión Dplan 100X (apertura numérica = 1.25, 160/0.17).

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunohistoquímica.

Anticuerpo primario utilizado	Dilución empleada	Anticuerpo secundario biotinilado	Extravidina-peroxidasa	Proveedor
Anti-Ki67	1/1500	Anti-conejo 1/400	1/300	ISAL
Anti-Ki67 (clon MIB-5)	1/25	Anti-ratón 1/100	1/150	Dako Corp. (USA)
Anti-RE α (clon 6F11)	1/100	Anti-ratón 1/100	1/150	Novocastra (UK)
Anti-RA (N-20)	1/600	Anti-conejo 1/400	1/300	Santa Cruz Biotechnology Inc. (USA)
Anti-p-Erk1/2 (197G2)	1/400	Anti-conejo 1/200	1/150	Cell Signaling Technology (USA)
Anti-p27 (C-19)	1/400	Anti-conejo 1/400	1/300	Santa Cruz Biotechnology Inc. (USA)
Anti-aromatasa	1/300	Anti-conejo 1/400	1/300	ISAL*

*El anticuerpo anti-aromatasa fue generado y testeado en nuestro laboratorio por Rossetti et al. (2019).

8.3 | Inmunofluorescencia

Para la técnica de inmunofluorescencia se utilizó un protocolo previamente publicado (Altamirano, Ramos, et al., 2017), con ciertas modificaciones para cada marcador evaluado. El protocolo seguido se detalla en la Tabla A4 (Anexo). Brevemente, secciones de glándula mamaria desparafinadas fueron tratadas con borohidruro de sodio para bloquear la autofluorescencia y se realizó la incubación con los anticuerpos primarios durante la noche a 4°C. Luego, se incubaron las muestras con los anticuerpos secundarios y con 4,6-diamidina-2-fenilindol (DAPI, Sigma-Aldrich) y finalmente fueron montadas con ProLong Gold (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Argentina). Las muestras fueron conservadas en oscuridad a 4°C hasta el momento de la evaluación.

En todos los casos se realizaron controles negativos sustituyendo el anticuerpo primario con un suero no inmune. Los controles positivos consistieron en tejidos cuya reacción positiva fue comprobada con anterioridad. En la Tabla 3 se detallan los anticuerpos y diluciones utilizados en cada ensayo.

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en los ensayos de inmunofluorescencia.

Anticuerpo primario	Proveedor	Dilución empleada	Anticuerpo secundario	Dilución empleada	Proveedor
Anti-p-Erk1/2 (197G2)	Cell Signaling Technology (USA)	1/400	Anti-Conejo Alexa Fluor 488	1/200	Invitrogen (Argentina)
Anti- α -SMA (clon ASM-1)	Novocastra (UK)	1/50	Anti-Ratón Alexa Fluor 546	1/100	Invitrogen (Argentina)

9 | Análisis de la expresión de ARNm mediante RT-PCR en tiempo real

9.1 | Transcripción reversa (RT)

A partir de los ARN extraídos se realizaron transcripciones reversas con el fin de obtener los correspondientes ADNc. La RT se llevó a cabo empleando cantidades iguales (1 μ g) del ARN total y utilizando la enzima *M-MLV* transcriptasa reversa (*Moloney Murine Leukemia Virus*, 300 U, Promega, USA). Se emplearon oligonucleótidos hexaméricos (1 μ g/ μ l, Promega) como cebadores. Al tubo de reacción se le adicionaron 20 U de inhibidor de ARNasa (RNAout, Invitrogen) y 10 nmol de una mezcla de dNTP's (desoxinucleótidos trifosfatos) y se alcanzó un volumen final de 30 μ l con la solución amortiguadora de la reacción provista por el fabricante de la enzima. La reacción de RT se realizó a 70°C por 5 min y 30 seg con la mezcla de los ARN y oligonucleótidos, luego se agregaron el resto de los reactivos y se continuó la reacción a 37°C por 90 min y 42°C por 15 min. La reacción finalizó calentando a 80°C por 5 min y a 94°C por 30 seg para posteriormente efectuar un enfriamiento a 25°C. Las reacciones de RT se llevaron a cabo en el termociclador T18 (IVEMA, Argentina). Seguidamente se diluyó el ADNc generado llevándolo a un volumen final de 60 μ l con agua libre de ARNasa. Como control negativo de la reacción se utilizó el ARN incubado en condiciones idénticas, pero sin transcriptasa reversa.

9.2 | Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real

Luego de realizar la extracción del ARN total y posterior RT, se determinó la expresión del ARN mensajero (ARNm) de diversos genes mediante ensayos de PCR en tiempo real utilizando el termociclador Applied Biosystems StepOne™ (Thermo Fisher Scientific). Esta metodología se basa en la detección y cuantificación ciclo a ciclo de una molécula fluorescente (en este caso se empleó EvaGreen) que se intercala en las hebras de ADN doble cadena. La fluorescencia es

detectada y leída por un fluorómetro acoplado al termociclador a medida que transcurre la reacción de PCR.

Los oligonucleótidos fueron diseñados utilizando el *software* Vector NTI Suite Versión 6.0 (Infomax Inc., USA). Como control interno (gen de referencia) se utilizó la determinación de ARNm del gen ribosomal L19. La temperatura de hibridación para cada amplicón se obtuvo a partir del análisis *in silico* usando el *software* Vector NTI. La especificidad de los oligonucleótidos fue cotejada por comparación directa de su secuencia contra el genoma completo de *Rattus norvegicus* mediante el uso de la herramienta BLAST disponible en la página web del *National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov). Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados junto con las temperaturas de hibridación se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en los ensayos de PCR en tiempo real.

Gen	Secuencia de oligonucleótidos (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)	Temperatura de hibridación (°C)
Areg	Sentido: TGCTGTCGCTGCTGGTCTTA	123	60
	Antisentido: CAGAAACCACAAGTCCACCAGC		
Aromatasa	Sentido: TGGCAGATTCTTGTGGATGG	118	54
	Antisentido: CGAGGACTTGCTGATGATGAGT		
Ccnd1	Sentido: GTGCGTGCAGAGGGAGATTG	171	59
	Antisentido: GGCTCCAGAGACAAGAAACGG		
EGFR	Sentido: TCATCAGGGGAAATGCTCTC	145	55
	Antisentido: GGGTTGTTGCTAAATCGCAC		
ESR1	Sentido: ACTACCTGGAGAACGAGCCC	153	60
	Antisentido: CCTTGGCAGACTCCATGATC		
ESR1-OS	Sentido: CCCTCCTCTGCCATTGICTA	166	58
ESR1-ON	Sentido: TCTGGGGCATCTCCTTCAA	193	57
ESR1-O	Sentido: AGCACATTCCTTCCTCCG	196	58
ESR1-OT	Sentido: TCCAGCAGGTTGCGATGT	164	59
ESR1-E1	Sentido: TAACCTCGGGCTCTACTCTT	133	57
	Antisentido: ATTCCCGAGGCTTTGGTGT		
IGF1	Sentido: ACTTCAACAAGCCCACAGG	121	57
	Antisentido: AGCGGAGCACAGTACATCTC		
IGF1R	Sentido: CTCAAGGATGGCGTCTTCAC	115	58
	Antisentido: GAACTTGCTCGTTGGACAGG		
L19	Sentido: GAAATCGCCAATGCCAACTC	290	60
	Antisentido: ACCTTCAGGTACAGGCTGTC		
PRLR	Sentido: AAAGTATCTTGTCCAGACTCGCTG	150	55
	Antisentido: AAACAGATGACAGCAGAGAGAATG		

Gen	Secuencia de oligonucleótidos (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)	Temperatura de hibridación (°C)
RA	Sentido: AGGGAGGTTACGCCAAAG Antisentido: AGACAGTGAGGACGGGAT	101	57
Wnt5a	Sentido: CCTGTAGCCTCAAGACATGCTGG Antisentido: AGTTGAAGCGGCTGTTGACCT	142	60

Areg: Anfirregulina, Ccnd1: Ciclina D1, EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico, ESR1: Receptor de estrógenos alfa, IGF1: Factor de crecimiento similar a la insulina 1, IGF1R: Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1, L19: proteína ribosomal L19, PRLR: Receptor de prolactina, RA: Receptor de andrógenos. ESR1-OS, -ON, -O, -OT y -E1 son exones de ESR1 y comparten el oligonucleótido antisentido Exón 1.

Todas las muestras retro-transcriptas a ADNc fueron amplificadas por duplicado. Los tubos de reacción para la PCR en tiempo real se constituyeron con 2.5 µl de ADNc que se combinaron con HOT-FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Biocientífica, Argentina) y 5 pmoles de cada oligonucleótido en un volumen final de 10 µl. El protocolo general de ciclado utilizado se muestra en la Tabla 5. La pureza de los productos obtenidos fue confirmada mediante curvas de disociación y electroforesis en geles de agarosa de muestras elegidas al azar en cada corrida. Controles sin ADNc fueron incluidos en todos los ensayos.

Tabla 5. Protocolo general de ciclado de PCR en tiempo real.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	95	15 min	1
Desnaturalización	95	15 seg	40
Hibridación	Específica para cada amplicón	15 seg	
Extensión	72	15 seg	
Lectura	81	10 seg	

El cálculo de los niveles de expresión relativa de cada muestra se realizó utilizando el método del ciclo umbral (Ct) (Higuchi et al., 1993). El valor de Ct para cada muestra se calculó utilizando el *software* StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems Inc., USA) con un umbral de ajuste de fluorescencia automática. La eficiencia (Ef) de la reacción de PCR para cada gen estudiado y para el gen de referencia (L19) fue calculada mediante curvas estándar. Estas curvas se construyen a partir de la amplificación de cada gen en diluciones seriadas de los ADNc. Luego, graficando el logaritmo de las diluciones de los ADNc vs. su correspondiente Ct, se obtiene la fórmula de la recta por regresión lineal a partir de la cual se calcula la Ef ($Ef = 10^{(-1/pendiente)-1}$). Dependiendo de las condiciones específicas de PCR, la Ef varió entre 98% y 102%. La expresión relativa de cada gen en los distintos experimentos se determinó utilizando el método de la curva estándar relativa (Cikos et al., 2007). Para todas las muestras experimentales, la cantidad relativa del gen de interés y del gen L19 fue determinada a partir de la curva estándar previamente realizada para

cada gen. La cantidad obtenida correspondiente al gen de interés fue normalizada con la cantidad relativa del gen L19 en cada muestra experimental.

9.3 | Electroforesis en gel de agarosa

Las electroforesis horizontales en geles de agarosa (concentraciones de agarosa entre 1% p/v y 3% p/v) se realizaron utilizando buffer Tris-acetato-EDTA (TAE) 1X como solución reguladora de electroforesis y patrones de ADN de peso molecular de entre 100 y 1000 pb (CienMarker, Biodynamics, Argentina). El agente de revelado utilizado fue Gelred® (Biotium, USA), el cual se agregó al gel en una relación de 1µl de Gelred 1000x por cada ml de solución de gel. Las corridas se realizaron en una cuba de electroforesis horizontal Bio-Rad Power Pac® 300 (Bio-Rad, USA) manteniendo el voltaje constante a 70V hasta que todo el frente de corrida ingresara al gel, para luego subir el voltaje hasta 80V. Los geles fueron revelados en un transiluminador Fotodyne® Foto/UV® 1 (Fotodyne Inc., USA).

10 | Análisis de metilación del ADN

10.1 | Bioinformática

El promotor del gen de ESR1 de rata (números de acceso: ESR1-OS NW_047550, ESR1-O NM_012689, ESR1-OT y -E1 X98236) fue analizado para detectar la presencia de islas CpG utilizando el *software* Methyl Primer Express Software v1.0 (Applied Biosystems). Una isla CpG fue definida como una secuencia de ADN igual o superior a 200 pb, con un porcentaje de GC mayor al 50% y un promedio de CpG observado/esperado mayor a 0,6 (Missaghian et al., 2009). Luego se determinó si estas secuencias contenían sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción sensibles a metilación *MaeII* y *BstUI* (Vector NTI Suite). Teniendo en cuenta estos análisis bioinformáticos, se diseñaron oligonucleótidos (Vector NTI Suite) de forma tal que cada par se encuentre flanqueando los sitios de restricción encontrados (Tabla 6). Además, a manera de control interno, se diseñaron oligonucleótidos en una región de ADN cercana a la zona de análisis pero que no contenía sitios *BstUI* o *MaeII*.

Tabla 6. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en los estudios epigenéticos.

Región del gen	Secuencia de oligonucleótidos (5' -3')	Tamaño del amplicón (pb)
CI Promotor OS	Sentido: TGTTC AATCGTGACATGCGG	167
	Antisentido: CAACATCCGTCCTCTCTGCATACA	
<i>BstUI</i> Promotor OS	Sentido: CTGTTTCGTAGTGCAGCACTGACA	145
	Antisentido: GTACAGAGGGAAGTCTGAGCAGGA	
CI Promotor O	Sentido: TGGCTAGAGCAGTGGGGTTG	184
	Antisentido: GGGGACTTTGGCTCTGGAGA	

Región del gen	Secuencia de oligonucleótidos (5'-3')	Tamaño del amplicón (pb)
<i>MaeII</i> Promotor O	Sentido: AGAAGGCAAAGGAGTGTCTCAG Antisentido: CCATCTTCATTCTCTCTCCG	111
<i>BstUI</i> a Promotor O	Sentido: GGAATGCTGATTCTAGTGGT Antisentido: TGTGTTTGTATGTGGAGTGG	182
<i>BstUI</i> b Promotor O	Sentido: GAGAGTCCCTGCCACTCCACAT Antisentido: CCGATCCTACCCTGCTGGTT	180
CI Promotor OT	Sentido: GTTTGAGAAAGCAACTTACC Antisentido: GAATCCTACAAGTCCAGAAA	142
<i>BstUI</i> Promotor OT	Sentido: CCAGGAAAGTTAAGTTCAGG Antisentido: GTTCTTAGACATCGCAAACC	127
CI Promotor E1	Sentido: TTCACACCAAAGCCTCGGGA Antisentido: ATCTTGAGCTGCGGGCGATT	85
<i>BstUI</i> Promotor E1	Sentido: CTCTTTTAAACCTCGGGCTCT Antisentido: GAGGTACAGATTGGCTTCCC	87

CI: control interno

10.2 | Análisis del estado de metilación del ADN mediante MSRE-PCR

Para evaluar el estado de metilación del ADN en las regiones potencialmente regulatorias del gen ESR1 se utilizaron las muestras de ADN_g obtenidas a partir de las glándulas mamarias de los machos F1 y se aplicó la técnica combinada de digestión con enzimas de restricción sensibles a metilación seguida de PCR en tiempo real (MSRE-PCR, del inglés: *Methylation-Sensitive Restriction Enzymes-PCR*) (Altamirano, Ramos, et al., 2017). Para reducir el tamaño de los fragmentos de ADN, 1 µg del ADN_g total fue digerido con 5 unidades de *HindIII* (Promega, USA) y el producto de digestión fue purificado mediante una extracción con fenol/cloroformo. Luego, 1 µg de ADN clivado con *HindIII* fue incubado en baño de agua (Tecno Dalvo, Argentina) durante 1 h con 10 unidades de *BstUI* (New England BioLabs, USA) o 1 unidad de *MaeII* (Roche Applied Science, USA) en buffer enzimático 1x a 60 °C o 50 °C, respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante. Nuevamente, los productos de digestión fueron purificados mediante el método fenol/cloroformo. Para evaluar el nivel de metilación relativo de las diferentes regiones del ADN se realizó un *pool* de 4 muestras por cada grupo experimental y éste luego fue analizado por triplicado mediante PCR en tiempo real, utilizando las secuencias de los oligonucleótidos descriptos en la Tabla 6, tal como se describió en la sección 9.2.

Como control interno se amplificó una región del gen que no contenía sitios de restricción para *BstUI* o *MaeII* (control normalizador) (Tabla 6). Cuando un sitio CpG se encuentra metilado, no es posible su digestión con las enzimas sensibles a metilación, lo que permite que el producto sea amplificado. Contrariamente, si el mismo sitio no se encuentra metilado, la enzima genera un

corte en la secuencia y no es posible la amplificación del fragmento. Los niveles de metilación relativos se calcularon utilizando el método de curva estándar relativa previamente descrito en la sección 9.2.

11 | Análisis estadístico

Todos los valores se expresaron como la media \pm SEM. Se realizó un análisis exploratorio de los datos para evaluar si se distribuían normalmente (prueba de normalidad de Shapiro-Wilk) y sus varianzas eran homogéneas (prueba de Levene), de manera de seleccionar los análisis estadísticos adecuados. Dependiendo de la distribución de los datos se utilizaron *tests* paramétricos y no paramétricos, como ANOVA, Kruskal Wallis, *test* t y Mann Whitney *U*. Valores de $p < 0.05$ fueron aceptados como significativos. Los análisis estadísticos fueron realizados con el *software* R (The R Foundation for Statistical Computing, <http://www.r-project.org/>).

CAPÍTULO 1

SIMILITUDES Y DIFERENCIAS EN EL DESARROLLO

MAMARIO DE RATAS HEMBRA Y MACHO

*“En algún lugar, algo increíble está
esperando ser descubierto”*

Carl Sagan

1 | Introducción

En los últimos años, se han comenzado a evaluar los efectos de PE sobre la glándula mamaria de ratas macho (Kass et al., 2015; Mandrup et al., 2016). Como se mencionó previamente, se ha observado que la glándula mamaria de ratas macho es sensible a compuestos con actividad hormonal, por lo que constituye un modelo adecuado para el estudio de los mismos (Filgo et al., 2016; Kass et al., 2020; Mandrup et al., 2016; Mandrup et al., 2012). Sin embargo, pocos trabajos han realizado una descripción de la glándula masculina y su comparación con la glándula mamaria de ratas hembra (Filgo et al., 2016; Lucas et al., 2007). Estos estudios describen que la glándula mamaria de la rata es similar entre machos y hembras hasta el momento de la pubertad, mientras que luego de la pubertad se evidencia un dimorfismo sexual que persiste hasta edades avanzadas. En la adultez la glándula femenina se caracteriza por presentar un desarrollo túbulo-alveolar, mientras que los machos presentan un desarrollo lóbulo-alveolar (Cardy, 1991; Filgo et al., 2016; Gouda et al., 2015; Lucas et al., 2007; Miyamoto et al., 2018). Los trabajos mencionados han evaluado el desarrollo mamario en distintas cepas de ratas, como por ejemplo Sprague-Dawley y Fischer 344. Dado que se han reportado diferencias en el desarrollo de la glándula mamaria entre distintas cepas de ratas (Stanko et al., 2016), en este capítulo nos propusimos evaluar el desarrollo y la histología de la glándula mamaria de ratas hembra y macho pertenecientes a la cepa Wistar (utilizada en este trabajo), en la pre- (DPN21) y post-pubertad (DPN60).

2 | Objetivos específicos

Analizar las similitudes y diferencias existentes en el desarrollo mamario de hembras y machos.

En muestras de hembras y machos pre- y post-puberales, se evaluó el desarrollo de la glándula mamaria a través de la evaluación de WM y del análisis histológico.

3 | Materiales y métodos

En este capítulo se evaluó el desarrollo de la glándula mamaria de ratas hembra y macho a partir del análisis de WM y su histología, en DPN21 y DPN60. Las metodologías que se utilizaron para realizar estos análisis fueron descritas en la sección de materiales y métodos (WMs: sección 6, Análisis histológico: sección 7). En relación al análisis histológico, en las muestras teñidas con P&H se evaluó el tipo de estructuras epiteliales presentes en la glándula mamaria (TEBs, conductos y alvéolos), como así también la composición del estroma mamario (tejido conectivo y adiposo).

3.1 | Análisis estadístico

Los parámetros determinados en las WMs, área total, perímetro, distancia entre la glándula mamaria N°4 y 5, área epitelial relativa y crecimiento longitudinal, fueron evaluados utilizando

un *test t*, mientras que para el n° de TEBs y el *score* de desarrollo mamario se utilizó el *test* de Mann Whitney.

4 | Resultados

En DPN21, la glándula mamaria de las ratas macho presentó menor área, perímetro, n° de TEBs y área epitelial relativa, en comparación con las hembras. Por otro lado, en DPN60, se observó un menor crecimiento longitudinal y n° de TEBs y un mayor desarrollo mamario en los machos. El área de la glándula mamaria de los machos también fue menor con respecto a las hembras, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Tabla 7, Figura 15).

Tabla 7. Análisis de WMs de ratas hembra y macho.

	Hembras	Machos
DPN21		
Área total (mm ²)	38.41 ± 3.67	26.71 ± 1.69*
Perímetro (mm)	32.00 ± 0.79	27.24 ± 1.04*
Distancia entre la glándula mamaria	0.72 ± 0.21	1.78 ± 0.33
TEBs (N°)	21.33 ± 7.17	1.80 ± 0.74#
Área epitelial relativa (%)	45.32 ± 2.05	29.85 ± 1.23*
DPN60		
Área total (mm ²)	576.5 ± 36.8	493.2 ± 25.3
Perímetro (mm)	109.0 ± 2.8	94.1 ± 3.1
Crecimiento longitudinal (mm)	11.0 ± 1.7	7.1 ± 0.4*
TEBs (N°)	3.7 ± 0.3	0.5 ± 0.2#
Desarrollo mamario (<i>score</i>)	1.3 ± 0.3	2.6 ± 0.1#

Los valores se expresaron como la media ± SEM.

TEBs: estructuras terminales (*terminal end buds*).

*p<0.05 (*test t*)

#p<0.05 (*Mann Whitney U test*)

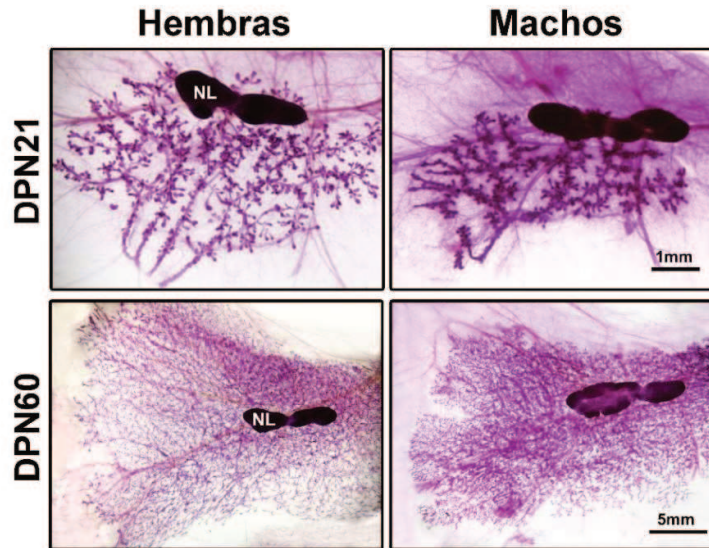


Figura 15. WMs de glándulas mamarias de ratas hembra y macho pre- y post-puberales. Imágenes representativas de WM de hembras y machos en DPN21 y DPN60. En DPN21 la glándula mamaria de los machos presentó menor área, perímetro, n° de TEBs y área epitelial relativa, en comparación con las hembras. En DPN60, el crecimiento longitudinal y el n° de TEBs fueron menores en los machos, mientras que desarrollo mamario fue mayor, en comparación con las hembras. NL: nódulo linfático. Las barras representan la magnificación correspondiente a las imágenes en cada fila.

En cuanto a la histología de la glándula mamaria, en DPN21 hembras y machos fueron similares, ambos presentaron TEBs, conductos y pequeños alveolos. Las estructuras epiteliales se encontraron rodeadas por tejido conectivo e inmersas en el *fat pad* (tejido adiposo). Por otro lado, en DPN60 se observó dimorfismo sexual en la glándula mamaria. Los machos presentaron mayor desarrollo de las estructuras epiteliales, principalmente de estructuras lobuloalveolares (desarrollo lóbulo-alveolar), mientras que en las hembras se observaron estructuras epiteliales más pequeñas, principalmente conductos (desarrollo túbulo-alveolar), y una mayor proporción de tejido adiposo (Figura 16). Además, las hembras presentaron un epitelio cúbico, de una o dos capas celulares, con células con un citoplasma escaso, mientras que los machos presentaron zonas de epitelio pseudoestratificado, con células con abundante citoplasma y la presencia de vacuolas (Figura 16).

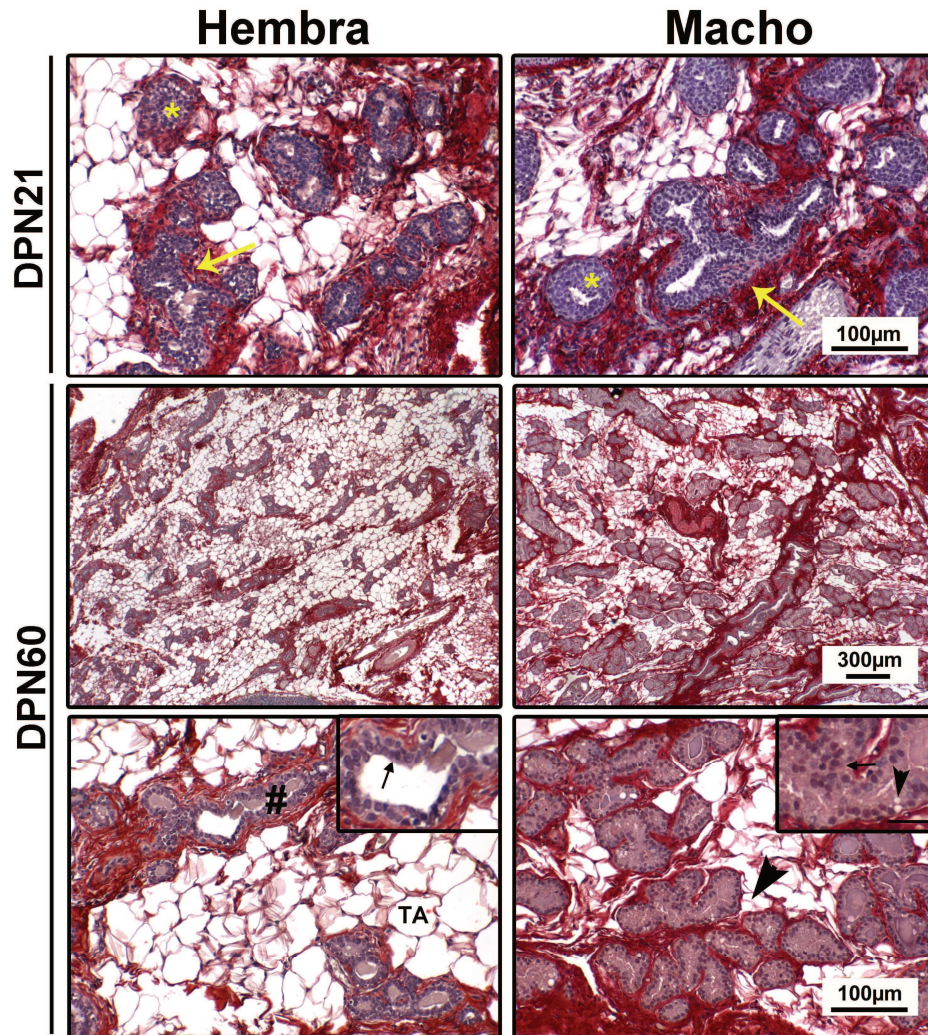


Figura 16. Imágenes de P&H de la glándula mamaria de ratas hembra y macho. En DPN21 la glándula mamaria de hembras y machos fue similar, ambos presentaron TEBs (*), conductos (flechas) y pequeños alveolos. En DPN60 los machos presentaron mayor desarrollo de las estructuras epiteliales, principalmente de estructuras lobuloalveolares (punta de flecha), mientras que en las hembras se observaron estructuras epiteliales más pequeñas, principalmente conductos (#), y una mayor proporción de tejido adiposo (TA). Además, las hembras presentaron un epitelio cúbico de una o dos capas celulares (*inset*, flecha) y los machos presentaron un epitelio pseudoestratificado (*inset*, flecha), con la presencia de vacuolas (*inset*, punta de flecha). Las imágenes en cada fila presentan el mismo aumento. Barra *inset* = 30 µm.

5 | *Discusión*

Los resultados hallados en este capítulo concuerdan con las características de la glándula mamaria de ratas descritas en publicaciones anteriores. Al igual que lo observado en este trabajo en los animales pre-puberales, previamente se describió que la histología de la glándula mamaria de ambos sexos continúa siendo semejante hasta el momento de la pubertad (Filgo et al., 2016; Lucas et al., 2007). Sin embargo, se observaron ciertas diferencias entre hembras y machos en el desarrollo de la glándula evaluado a través de las WMs. En concordancia con lo reportado por Filgo et al. (2016), los machos presentaron un menor crecimiento (perímetro y área) y n° de TEBs.

Por otro lado, en los animales post-puberales se evidenció un dimorfismo sexual notable en la glándula mamaria de las ratas. En estos animales, la histología de la glándula fue similar a lo reportado en trabajos anteriores; el parénquima de la glándula mamaria de hembras presenta un desarrollo túbulo-alveolar, en el cual predominan los conductos y se observa una reducida cantidad de alvéolos, mientras que en machos, el desarrollo es de tipo lóbulo-alveolar, compuesto principalmente por estructuras lobulares de gran tamaño y una menor cantidad de conductos (Lucas et al., 2007). En cuanto al desarrollo analizado en las WMs, al igual que lo observado por Filgo et al. (2016) y Gouda et al. (2015), la glándula mamaria de los machos presentó un menor crecimiento longitudinal comparado con las hembras, sin llegar a alcanzar los límites del *fat pad* y un mayor desarrollo de las estructuras epiteliales. A partir de estas observaciones, puede concluirse que la cepa Wistar evaluada en este trabajo presentó características similares a las reportadas en trabajos realizados en otras cepas (Cardy, 1991; Filgo et al., 2016; Miyamoto et al., 2018).

CAPÍTULO 2

DOSIS DIARIAS DE FITOSANITARIOS RECIBIDAS POR LAS MADRES F0 Y PARÁMETROS GENERALES DEL MODELO EXPERIMENTAL

*“La ciencia es la progresiva aproximación
del hombre al mundo real”*

Max Planck

1 | *Introducción*

Como se describió en la introducción, tanto el glifosato como el propiconazole pueden ser capaces de afectar ciertos aspectos de la reproducción (Costa et al., 2015; Ingaramo et al., 2020; Milesi et al., 2021; Serra et al., 2021; Vieira et al., 2017). Sin embargo, no se han observado signos de toxicidad materna o fetal en las madres F0 y crías F1 en la mayoría de los estudios en los que se realizó una exposición a estos compuestos durante la gestación (Manservisi et al., 2019; Rockett et al., 2006; Taxvig et al., 2008). Por otro lado, como se mencionó previamente, existen resultados contradictorios acerca de los cambios hormonales que puede producir la exposición a glifosato o propiconazole. En el caso de glifosato, se han observado distintas alteraciones dependiendo del momento en que se produzca la exposición, generando un aumento, una disminución o ningún efecto sobre los niveles de E2 y T (Altamirano et al., 2018; Manservisi et al., 2019; Romano et al., 2012; Romano et al., 2010). Resultados similares han sido reportados para el caso de propiconazole (Costa et al., 2015; Goetz et al., 2007; Taxvig et al., 2013; Taxvig et al., 2008; Vieira et al., 2017). También se ha descrito que ciertas hormonas son capaces de afectar el desarrollo de la glándula mamaria (Hynes & Watson, 2010; Lucas et al., 2007), razón por la cual resulta de interés conocer los valores séricos de hormonas esteroides en los animales expuestos.

En base a lo expuesto anteriormente, en el presente capítulo se evaluaron distintos indicadores de toxicidad materna y fetal y se determinaron los niveles séricos de T, E2 y PRL en los machos expuestos a los diferentes agroquímicos. Además, en este capítulo se presenta información acerca de la exposición de los animales a los agroquímicos durante la gestación y lactancia, como las dosis reales que fueron administradas a las madres F0 y las concentraciones séricas de glifosato y AMPA en las mismas.

2 | *Objetivos específicos*

Establecer los parámetros generales relacionados con el modelo experimental de exposición a fitosanitarios. Se determinaron las dosis reales que recibieron las madres F0 y sus concentraciones séricas de glifosato y AMPA. También se evaluaron los niveles séricos de E2 y T en los machos F1 pre- y post-puberales, y de PRL en los animales post-puberales expuestos a HBG y GLI.

3 | *Materiales y métodos*

En este capítulo se evaluaron los parámetros relacionados con las madres F0 expuestas a fitosanitarios, como el consumo de alimento de las mismas, las dosis de fitosanitarios que recibieron, las concentraciones séricas de glifosato y AMPA y la presencia de toxicidad materna (peso promedio de las mismas durante la gestación y lactancia y duración de la gestación). Además, se evaluó si las dosis de los fitosanitarios seleccionadas produjeron toxicidad fetal,

analizando el número de crías nacidas vivas, la presencia de malformaciones macroscópicas en las crías y peso de las mismas al nacer. También se determinó el peso de los machos F1 en los días estudiados, DPN21 y DPN60, y las concentraciones de E2 y T en suero. Además, en los animales expuestos a HBG y GLI se determinaron los niveles séricos de PRL en DPN60. Las metodologías utilizadas para las distintas determinaciones séricas se describen en la sección de materiales y métodos, sección 5.

3.1 | *Análisis estadístico*

En el caso de la exposición perinatal a HBG y GLI, el consumo de alimento de las madres F0, los pesos de las madres F0 y machos F1 y el número de crías por camada fueron analizados con una prueba ANOVA, seguida del *post-test* de Dunnett. Por otro lado, los valores séricos de E2, T y PRL fueron evaluados con Kruskal Wallis, seguido del *post-test* de Dunn. Para el caso de la exposición perinatal a PRO y PROGLI, el consumo de alimento de las madres F0, los pesos de las madres F0 y machos F1 y el número de crías por camada fueron analizados con un *test t*, mientras que los valores séricos de E2 y T se evaluaron con Mann Whitney *U test*.

4 | *Resultados*

4.1 | *Exposición a HBG y GLI*

Las dosis reales de glifosato a las que estuvieron expuestas las madres F0 fueron calculadas en base al peso y al consumo de alimento promedio de las mismas durante la preñez y la lactancia y se detallan en la Tabla 8. Considerando las dosis de glifosato que recibieron las hembras F0 expuestas a HBG, y de manera de distinguir ambas dosis utilizadas, estos grupos experimentales se denominaron como HBG3.5 (menor dosis, 3.7 mg/kg/día) y HBG350 (mayor dosis, 352.2 mg/kg/día).

Se observó un aumento del consumo de alimento en las madres F0 expuestas a GLI con respecto a las madres controles, sin hallarse diferencias con los demás grupos experimentales. A pesar de esta diferencia en el consumo de alimento, no se observaron modificaciones del peso promedio de las madres entre los distintos grupos experimentales. Además, las dosis reales de glifosato a las que estuvieron expuestas las madres HBG3.5 y GLI fueron similares. Las concentraciones séricas de glifosato se mantuvieron en una relación aproximada de 1 a 100 entre los grupos experimentales de HBG y se encontraron por debajo del límite de detección en las madres pertenecientes al grupo control (Tabla 8). Por otro lado, aunque las madres F0 expuestas a GLI presentaron niveles de glifosato sérico menores a las expuestas a HBG3.5, estas concentraciones fueron del mismo orden de magnitud. En ninguno de los grupos experimentales se hallaron niveles detectables del principal metabolito, AMPA.

La exposición perinatal a HBG o GLI no produjo signos evidentes de toxicidad en las madres F0 ni en las crías F1 a corto y mediano plazo. No se hallaron diferencias en el número de crías nacidas vivas por camada, la duración de la gestación no fue alterada y no se observaron malformaciones en las crías F1. Además, no existieron diferencias en el peso de las crías macho F1 expuestas a HBG o GLI al momento del nacimiento o el destete (DPN21) con respecto al grupo control; sin embargo, en DPN60 se observó una disminución del mismo en los animales expuestos a HBG3.5 (Tabla 8).

Tabla 8. Dosis diarias de glifosato recibidas por las madres F0 y parámetros generales del modelo experimental de exposición a HBG y GLI.

	Control	HBG3.5	HBG350	GLI
Madres F0				
Concentración de glifosato en pellet (mg/g pellet seco)	0.00	0.03	3.00	0.03
Consumo de alimento (g/día)	29.14 ± 0.61	29.39 ± 0.69	29.65 ± 0.42	32.74 ± 0.75*
Peso promedio (g)	259.00 ± 3.48	257.90 ± 3.10	252.70 ± 4.60	269.90 ± 7.95
Dosis recibida (mg/kg/día)	0.00	3.69 ± 0.07	352.20 ± 4.78	3.94 ± 0.11
Concentración de glifosato en suero (mg/L)	ND	0.039 ± 0.006	3.800 ± 1.200	0.013 ± 0.002
Concentración de AMPA en suero (mg/L)	ND	ND	ND	ND
N° de crías / camada	9.9 ± 0.9	10.8 ± 0.6	9.2 ± 0.5	10.8 ± 1.2
Machos F1				
Peso al nacimiento (g)	5.89 ± 0.09	5.59 ± 0.09	5.87 ± 0.13	5.31 ± 0.29
Peso en DPN21 (g)	33.18 ± 1.22	32.08 ± 1.33	34.4 ± 2.04	35.88 ± 1.72
Peso en DPN60 (g)	219.90 ± 4.34	200.00 ± 5.81*	232.00 ± 4.40	215.7 ± 4.7

Los valores se expresaron como la media ± SEM de 8-10 madres F0 o machos F1/grupo.

*p<0.05 (ANOVA test, seguido del *post-test* de Dunnett)

Los niveles séricos de E2 y T fueron similares entre los grupos experimentales en ambos días estudiados (Tabla 9), mientras que la concentración sérica de PRL fue levemente mayor en los animales expuestos a HBG350, comparado con los animales control en DPN60. Además, como era esperado, los niveles de T y E2 fueron mayores en los animales post-puberales comparados con los pre-puberales.

Tabla 9. Concentraciones séricas de E2, T y PRL en ratas macho F1 expuestas a HBG y GLI.

	Control	HBG3.5	HBG350	GLI
DPN21				
E2 (pg/ml)	24.9 ± 0.8	24.9 ± 0.9	28.6 ± 1.4	25.9 ± 1.2
T (ng/ml)	0.62 ± 0.25	0.59 ± 0.06	0.65 ± 0.26	0.26 ± 0.04
DPN60				
E2 (pg/ml)	57.6 ± 3.9	48.5 ± 2.6	47.5 ± 3.4	43.8 ± 2.9
T (ng/ml)	3.11 ± 1.13	3.24 ± 1.00	3.60 ± 0.92	4.51 ± 1.20
PRL (ng/ml)	3.3 ± 1.3	3.8 ± 1.7	8.0 ± 2.9	3.4 ± 1.4

Los valores se expresaron como la media ± SEM de 5 machos/grupo/día

4.2 | Exposición a PRO y PROGLI

Para alcanzar las dosis de propiconazole establecidas se determinó el volumen de la solución de propiconazole adecuado para dispensar a las madres F0 en función de su peso, siendo la dosis final de 4 mg/kg/día para ambos grupos experimentales expuestos a propiconazole (PRO y PROGLI). Al igual que se describió en la sección anterior, las dosis reales de glifosato a las que estuvieron expuestas las hembras F0 pertenecientes al grupo experimental PROGLI fueron calculadas en base al peso y al consumo de alimento promedio de las madres durante la preñez y la lactancia. Además, la dosis promedio de glifosato que recibieron las madres del grupo experimental PROGLI fue similar a la dosis administrada al grupo experimental GLI (GLI: 3.94 ± 0.11 mg/kg/día, PROGLI: 3.71 ± 0.15 mg/kg/día).

El tratamiento con PRO o PROGLI no modificó el número de crías nacidas vivas por camada ni el peso corporal de las madres directamente expuestas (Tablas 10 y 11). La duración de la gestación no fue alterada y no se observaron malformaciones en las crías F1. No existieron diferencias entre los grupos experimentales en el peso de los machos F1 al momento del nacimiento o en DPN60 (Tablas 10 y 11), mientras que en ambos grupos expuestos los machos F1 presentaron un peso disminuido al momento del destete (DPN21).

Tabla 10. Dosis de propiconazole recibida por las madres F0 y parámetros generales del modelo experimental de exposición a PRO.

	Control	PRO
Madres F0		
Peso promedio (g)	244.30 ± 0.31	234.8 ± 3.61
Dosis de propiconazole (mg/kg/día)	0.00	4.00
N° de crías / camada	10.0 ± 0.6	8.4 ± 0.7
Machos F1		
Peso al nacimiento (g)	5.94 ± 0.09	6.05 ± 0.07
Peso en DPN21 (g)	33.20 ± 0.80	29.82 ± 0.61*
Peso en DPN60 (g)	219.5 ± 5.5	208.6 ± 4.0

Los valores se expresaron como la media ± SEM de 8-10 madres F0 o machos F1/grupo.

*p<0.05 (*test t*).

Tabla 11. Dosis de propiconazole y glifosato recibidas por las madres F0 y parámetros generales del modelo experimental de exposición a PROGLI.

	Control	PROGLI
Madres F0		
Concentración de glifosato en pellet (mg/g pellet seco)	0.00	0.03
Consumo de alimento (g/día)	30.79 ± 0.04	30.11 ± 0.62
Peso promedio (g)	244.1 ± 0.05	244.4 ± 5.89
Dosis de glifosato (mg/kg/día)	0.00	3.71 ± 0.15
Dosis de propiconazole (mg/kg/día)	0.00	4.00
N° de crías / camada	10.0 ± 1.0	10.8 ± 0.6
Machos F1		
Peso al nacimiento (g)	5.95 ± 0.15	5.88 ± 0.11
Peso en DPN21 (g)	33.18 ± 0.50	29.24 ± 0.82*
Peso en DPN60 (g)	221.4 ± 3.1	216.2 ± 4.1

Los valores se expresaron como la media ± SEM de 8-10 madres F0 o machos F1/grupo.

*p<0.05 (*test t*)

No existieron modificaciones en los niveles séricos de E2 y T en los animales expuestos a PRO en ninguno de los días estudiados (Tabla 12), ni en las concentraciones séricas de T en los animales expuestos a PROGLI pre- y post-puberales (Tabla 12).

Tabla 12. Concentraciones séricas de E2 y T en ratas macho F1 expuestas a PRO y PROGLI.

	Control	PRO
DPN21		
E2 (pg/ml)	25.0 ± 0.7	27.0 ± 0.3
T (ng/ml)	0.68 ± 0.22	0.22 ± 0.02
DPN60		
E2 (pg/ml)	57.6 ± 3.9	50.5 ± 2.6
T (ng/ml)	2.69 ± 1.02	1.23 ± 0.3
	Control	PROGLI
DPN21		
T (ng/ml)	0.63 ± 0.18	0.98 ± 0.30
DPN60		
T (ng/ml)	3.37 ± 0.72	1.89 ± 0.51

Los valores se expresaron como la media ± SEM de 5 machos/grupo/día.

5 | *Discusión*

Las concentraciones séricas de glifosato alcanzadas por las hembras F0 expuestas a HBG350 fueron similares a aquellas reportadas por Anadon et al. (2009) en un estudio de toxicocinética con una única dosis oral de glifosato, siendo la dosis administrada de 400 mg/kg y los valores séricos de 4.62 mg/l. Además, los valores de glifosato en el suero de las madres expuestas a HBG3.5 (0.039 ± 0.006 mg/l) y GLI (0.013 ± 0.002 mg/l) se encontraron dentro del rango hallado en mujeres embarazadas al momento del parto en Tailandia (Kongtip et al., 2017) ($0.0002 - 0.1891$ mg/l), mientras que la concentración en las madres tratadas con HBG350 (3.80 ± 1.20 mg/l) fue 20 veces mayor que el máximo obtenido por Kongtip et al. (2017).

Por otro lado, aunque las dosis reales de glifosato administradas a las madres F0 tratadas con HBG3.5 y GLI fueron similares y sus concentraciones séricas de glifosato se encontraron en el mismo orden de magnitud, la concentración en suero en hembras F0 tratadas con GLI fue 3 veces menor comparada con las expuestas a HBG3.5. De acuerdo con estos resultados, en madres F0 expuestas a glifosato o a una formulación de HBG a través del agua de bebida, se observó una tendencia a mayores niveles de glifosato en las hembras expuestas a HBG comparadas con aquellas expuestas a glifosato puro (Panzacchi et al., 2018). Estos resultados podrían deberse a diferencias en la absorción y/o excreción de glifosato en la presencia de los coformulantes del herbicida. Se ha reportado que el glifosato puro es moderadamente soluble en agua (10-12 g/l), mientras que las formulaciones de HBG, que contienen una sal de glifosato, presentan una mayor solubilidad (1050 g/l) (INRS, 2019). Estas diferencias en la solubilidad podrían ocasionar

variaciones en la toxicocinética de estos compuestos y explicar las diferencias halladas en los niveles séricos de glifosatos entre las madres expuestas a HBG3.5 y GLI.

Como se reportó previamente por Anadon et al. (2009), el glifosato es pobremente metabolizado a AMPA en ratas; sin embargo, en el presente estudio no se detectó AMPA en el suero de las hembras F0. En relación con esto, Panzacchi et al. (2018) halló niveles detectables de AMPA en la orina de ratas expuestas a glifosato pero en concentraciones cercanas al límite de detección y 100 veces menores que los niveles de glifosato, sugiriendo que el glifosato es un biomarcador de exposición mas relevante que su metabolito.

El tratamiento con GLI o HBG no generó signos de toxicidad materna, al igual que lo reportado en estudios previos en los que se evaluaron los efectos de la exposición a glifosato o HBG durante la gestación y lactancia, utilizando dosis en el mismo orden de magnitud que HBG3.5 y GLI (Dechartres et al., 2019; Manservisi et al., 2019). Similar a lo hallado por Manservisi et al. (2019), no se observaron efectos adversos en las crías F1, como alteraciones en el número de crías por camada o en el peso corporal de las crías macho al momento del nacimiento o el destete. La exposición a GLI o HBG tampoco generó alteraciones en las concentraciones séricas E2 y T, al igual que lo reportado previamente en un estudio realizado en nuestro laboratorio (Altamirano et al., 2018). Sin embargo, existen resultados contradictorios acerca de los efectos de glifosato y HBG sobre los niveles séricos de hormonas sexuales. Mientras que una exposición perinatal a un HBG generó un aumento en la concentración sérica de T (Romano et al., 2012), en ratas macho puberales expuestas a la misma formulación se observó una disminución en los niveles de T (Romano et al., 2010). También se reportó una disminución de la concentración de T en ratas adultas (Manservisi et al., 2019) y en un experimento *in vitro* de células de Leydig de ratas expuestas a glifosato y HBG (Clair et al., 2012). En relación a los niveles de E2, algunos estudios han mostrado un aumento (Lorenz et al., 2020; Romano et al., 2010) o una disminución de sus niveles séricos (Perego et al., 2017). Sin embargo, en concordancia con los resultados hallados en este trabajo, otros estudios no han observado modificaciones en la producción de T (Dai et al., 2016; Johansson et al., 2018) o E2 (Dai et al., 2016). Estas diferencias podrían deberse tanto al momento y la duración de la exposición como a las formulaciones de HBG evaluadas. Por otro lado, en este trabajo observamos un ligero aumento en los niveles séricos de PRL en los machos HBG350 post-puberales, aunque éste no fue significativo. En este sentido, Owagboriaye et al. (2017) también reportó un aumento en los niveles de PRL en animales expuestos a HBG en una dosis de 3.6 mg/kg/día, mientras que Manservisi et al. (2019) no halló diferencias en la concentración de esta hormona.

En relación a los resultados hallados en los animales expuestos a PRO y a la mezcla de agroquímicos, los tratamientos no generaron signos de toxicidad materna, al igual que lo reportado en estudios previos de exposición a propiconazole, aún en concentraciones mayores a

las utilizadas en este trabajo (50-150 mg/kg/día) (Rockett et al., 2006; Taxvig et al., 2008). En este sentido, la exposición a la mezcla no modificó los resultados obtenidos por los compuestos individuales. Sin embargo, en los animales expuestos tanto a PRO como a PROGLI se observó una disminución del peso de los machos al día del destete. Contrariamente, Vieira et al. (2017) no observó alteraciones en el peso de los animales al destete luego de una exposición perinatal a propiconazole, en dosis iguales y mayores a las utilizadas en este trabajo. Por otro lado, existe un trabajo no publicado, que es mencionado por la evaluación de riesgo realizada por la EPA (2019), en el que reportan una reducción en el peso de las crías expuestas F1 y F2, aunque utilizando dosis de propiconazole superiores. Dado que el peso de las madres F0 y de los machos al nacimiento no fueron modificados, la disminución en el peso de las crías en DPN21 podría deberse a una lactancia inadecuada; nuevos estudios serían necesarios para evaluar el efecto de propiconazole en los pesos de las crías F1 y en la lactancia.

Finalmente, no existieron alteraciones en los niveles de las hormonas esteroides evaluadas en animales expuestos a PRO ni PROGLI. Al igual que lo descrito anteriormente en el caso de glifosato, los efectos de propiconazole sobre la producción de hormonas esteroides son variados. Estudios *in vitro* han reportado una disminución de la síntesis de E2 y T (Kjaerstad, Taxvig, Andersen, et al., 2010; Taxvig et al., 2013), mientras que estudios *in vivo* han observado una disminución en los niveles de T (Vieira et al., 2017), un aumento (Goetz et al., 2007) o la ausencia de modificaciones en los mismos (Costa et al., 2015; Taxvig et al., 2008). En el caso de los niveles séricos de E2, ciertos estudios no han hallado modificaciones en los mismos por la exposición a propiconazole (Rockett et al., 2006; Taxvig et al., 2008), mientras que también se ha reportado una disminución (Costa et al., 2015). Como se mencionó anteriormente, estas diferencias podrían deberse tanto al momento como a la vía de exposición del compuesto que se haya utilizado, ya que modificaciones en estos aspectos pueden tener diferente impacto sobre el sistema endócrino (Bergman et al., 2013; Yang et al., 2015).

CAPÍTULO 3

EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN PERINATAL AL HERBICIDA A BASE DE GLIFOSATO SOBRE EL DESARROLLO DE LA GLÁNDULA MAMARIA

*“No dejaremos de explorar y al final de nuestra
búsqueda llegaremos a donde empezamos y
conoceremos por primera vez el lugar”*

Thomas Stearns Eliot

1 | Introducción

1.1 | Efectos de glifosato o HBG sobre la glándula mamaria

Diversos estudios han evaluado los efectos de glifosato o HBG sobre líneas celulares mamarias. En células T47D el glifosato indujo la proliferación de las mismas, un aumento en la expresión de ESR1 y la activación del elemento de respuesta a estrógeno (ERE). Sin embargo, en células incubadas conjuntamente con glifosato y E2, el glifosato suprimió la activación de ERE inducida por E2, sugiriendo que en la presencia de E2 se comportaría como un antagonista (Thongprakaisang et al., 2013). En las células MCF-7 el glifosato también presentó un efecto proliferativo mediado por ESR1, aunque de manera ligando independiente (Mesnage et al., 2017). Por otro lado, en las células MDA-MB453 tanto el glifosato como las formulaciones comerciales evaluadas presentaron un efecto anti-androgénico (Gasnier et al., 2009). Finalmente, en un estudio en el que se evaluaron los cambios en la expresión inducidos por un HBG sobre las células MCF-7 y MDA-MB468, se observó que éste producía alteraciones en las vías implicadas en el ciclo celular y la reparación del ADN (Stur et al., 2019). Sin embargo, como se mencionó previamente, la información acerca de los efectos de glifosato o HBG sobre la glándula mamaria *in vivo* es escasa. En este sentido, una exposición posnatal temprana a HBG generó un mayor desarrollo de la glándula mamaria e incrementó la proliferación celular y la expresión de ESR1 en la glándula mamaria de ratas macho (Altamirano et al., 2018), mientras que favoreció el desarrollo de conductos hiperplásicos y de un estroma fibroblástico en ratas hembra de edad avanzada (Zanardi et al., 2020).

Por otro lado, como se describió anteriormente, el glifosato o sus formulaciones comerciales son capaces de afectar la expresión o actividad de ESR1 (Altamirano et al., 2018; Mesnage et al., 2017; Thongprakaisang et al., 2013). En este sentido, distintos mecanismos están implicados en la regulación transcripcional de ESR1 (Hua et al., 2018; Pinzone et al., 2004), algunos de ellos se describen a continuación.

1.1.1 | Mecanismos de regulación transcripcional de ESR1

Se ha reportado que ESR1 contiene múltiples promotores transcripcionales ubicados corriente arriba del primer exón codificante (+1), los cuales controlan su expresión en forma compleja y aún no dilucidada en su totalidad (Ishii et al., 2010; Kos et al., 2001). En la rata se han descrito 5 promotores para ESR1 (OS, ON, O, OT y E1), asociados a exones no codificantes, que se expresan de manera tejido-específica (Kato et al., 1998; Kos et al., 2001; Monje et al., 2007). El *splicing* alternativo entre el exón no codificante (transcripto a partir de los diferentes promotores) y el primer exón codificante resulta en múltiples variantes de ARNm, con distintas regiones 5' no traducibles (5'UTR, del inglés: *5' Untranslated Region*), que codifican para la misma proteína (Ishii et al., 2010). En diversos genes, incluido ESR1, se ha observado que las regiones 5'UTR

pueden afectar diferencialmente a la expresión proteica influenciando la estabilidad del ARNm (Wang et al., 2005) y la eficiencia en la traducción (Gauss et al., 2006; Kos et al., 2002). Además, en el caso de ESR1, se ha demostrado que los distintos promotores pueden ser diferencialmente regulados en situaciones fisiológicas particulares o por la acción de compuestos con actividad hormonal (Andreoli et al., 2016; Ishii et al., 2010; Monje et al., 2007; Varayoud et al., 2005), aumentando la capacidad de regulación de la transcripción de ESR1.

Otra característica de interés del gen de ESR1 es su tamaño; las grandes distancias que existen entre los promotores podrían ser necesarias para permitir modificaciones epigenéticas en secuencias regulatorias, lo que constituye otro importante mecanismo de regulación de la expresión de ESR1 (Kos et al., 2001; Pinzone et al., 2004). En este sentido, se ha observado que la ausencia de expresión de ESR1 en células de cáncer de mama ESR1-negativas se encuentra asociada con una mayor metilación de las islas CpG en múltiples promotores del gen (Hua et al., 2018; Pinzone et al., 2004). Además, varios estudios han demostrado que regiones regulatorias del gen de ESR1 son susceptibles a sufrir modificaciones epigenéticas bajo condiciones particulares como ser la exposición a compuestos con actividad hormonal (Doshi et al., 2011; Monje et al., 2007).

1.2 | Modificaciones epigenéticas ocasionadas por glifosato o HBG

Como se mencionó en la introducción, los PE pueden ocasionar modificaciones epigenéticas en regiones regulatorias de genes clave, pudiendo alterar sus niveles de expresión (Gore et al., 2015). En el caso del glifosato o sus formulaciones comerciales, se ha observado que los mismos son capaces de generar cambios en la metilación global del ADN y de genes específicos, en las modificaciones post-traduccionales de histonas y en la expresión de ARNs no codificantes en roedores y células humanas (Rossetti et al., 2021). En células mononucleares de sangre periférica humanas la exposición a glifosato produjo una reducción en el nivel global de metilación del ADN, acompañada de un aumento en la metilación del promotor del supresor tumoral p53 (Wozniak et al., 2020). En concordancia con estos hallazgos, Duforestel et al. (2019) también reportó una reducción de la metilación global del ADN en células mamarias MCF10A expuestas a glifosato, que se encontró asociada a una respuesta oncogénica de las células en presencia de un segundo factor de riesgo. Por otro lado, luego de una exposición gestacional a glifosato en hembras F0, Kubsad et al. (2019) identificó regiones diferenciales de metilación del ADN en el esperma de las generaciones F1, F2 y F3, postulando un efecto transgeneracional del glifosato.

ESR1 es otro gen en el que se han observado alteraciones epigenéticas debidas a la exposición a un HBG. En el útero de ratas hembra F1, expuestas perinatalmente a un HBG, Lorenz et al. (2019) halló una disminución en la metilación del ADN del promotor O de ESR1, que fue acompañada por modificaciones en la acetilación y metilación de histonas y por un aumento en la expresión

del ARNm de ESR1. Estos hallazgos añaden evidencias acerca de los mecanismos de regulación epigenética de ESR1, descritos en el apartado anterior.

Dado que la información acerca de la acción de HBG sobre la glándula mamaria es limitada, en este capítulo nos propusimos evaluar los efectos de la exposición a HBG durante la gestación y lactancia sobre la glándula mamaria de las crías macho F1. Además, en base a lo descrito anteriormente, se analizó la expresión de ESR1 y de sus variantes transcripcionales, como así también los niveles de metilación de sus distintos promotores.

2 | *Objetivos específicos*

Analizar si la exposición perinatal a HBG resulta en alteraciones histológicas de la glándula mamaria de ratas macho F1. Se evaluó el desarrollo mamario, la presencia y/o persistencia de estructuras inmaduras para la edad y lesiones mamarias. Se determinó el área ocupada por las estructuras epiteliales y el área de los adipocitos para evaluar el desarrollo de las estructuras mamarias y del tejido adiposo, respectivamente.

Evaluar si la exposición in utero y durante la lactancia a HBG modifica el microambiente endócrino de la glándula mamaria en las etapas pre- y post-puberal. Se analizó la expresión mamaria de los receptores de hormonas esteroides, sus vías de señalización y los factores de crecimiento involucrados en la morfogénesis ductal (i.e.: IGF1, IGF1R, Areg y EGFR).

Analizar los potenciales mecanismos de acción de HBG sobre el desarrollo mamario en ratas macho F1. Se realizó un análisis de metilación de ADN genómico del promotor de ESR1, para caracterizar las posibles modificaciones en la expresión génica resultantes de la exposición a HBG.

3 | *Materiales y métodos*

En este capítulo se evaluaron los efectos de la exposición perinatal a HBG sobre la glándula mamaria de los machos F1 en DPN21 y DPN60. Las determinaciones realizadas en cada día de estudio se detallan en la Figura 17. Las metodologías que se utilizaron para realizar las determinaciones mencionadas en la Figura 17 fueron descriptas en la sección de materiales y métodos (WMs: sección 6, Análisis histológico: sección 7, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia: sección 8, PCR en tiempo real: sección 9, Análisis de metilación del ADN: sección 10).

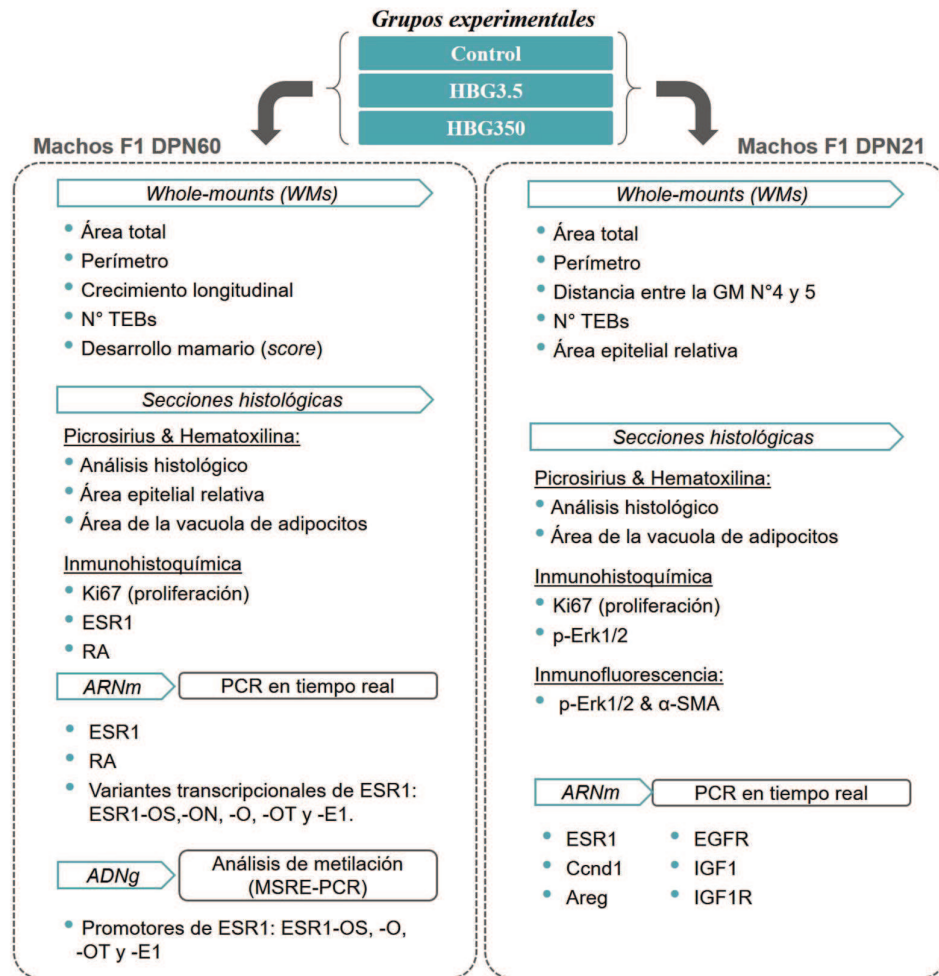


Figura 17. Determinaciones realizadas en la glándula mamaria de los machos F1 expuestos a HBG en DPN60 y DPN21. Control: animales expuestos a la dieta control. ESR1: Receptor de estrógenos alfa, RA: Receptor de andrógenos, MSRE: enzimas de restricción sensibles a metilación, GM: glándula mamaria, p-Erk1/2: quinasa regulada por señales extracelulares 1/2 fosforilada, α-SMA: α actina de músculo liso, Ccnd1: Ciclina D1, Areg: Anfirregulina, EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico, IGF1: Factor de crecimiento similar a la insulina 1, IGF1R: Receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1. ESR1-OS, -ON, -O, -OT y -E1 son exones de ESR1.

3.1 | Evaluación de la histología de la glándula mamaria

En las muestras teñidas con P&H se evaluó el desarrollo ductal y lobuloalveolar y la presencia de lesiones mamarias (Durando et al., 2007; Mandrup et al., 2015). Además, se determinó el área epitelial relativa en DPN60 y el área de los adipocitos en ambos días de estudio. Para las determinaciones se tomaron imágenes con una cámara de video color Spot Insight V3.5 (Diagnostic Instruments), acoplada al microscopio Olympus BH2, y utilizando una objetiva Dplan 20X. Por sección se analizaron al menos 7 imágenes en DPN21 y 14 en DPN60 y se evaluaron dos secciones por cada muestra de glándula mamaria. Todas las determinaciones fueron realizadas con el *software* Image J.

Área epitelial relativa (%): Se determinó como el área ocupada por las estructuras epiteliales dividida por el área total de la glándula mamaria, multiplicada por 100 (Figura 18A). En cada imagen se seleccionaron las estructuras epiteliales con la herramienta de “selección a mano alzada” y se determinó el área de las mismas con la herramienta de medida del *software*. Además, se determinó el área total ocupada por la glándula mamaria en la imagen. Finalmente se realizó una sumatoria de las áreas de las estructuras epiteliales y se dividió por el área total, obteniéndose un valor de área relativa. Se realizó un promedio de los valores de área relativa de cada imagen para obtener el valor final y se expresó en forma de porcentaje (%).

Área del adipocito (μm^2): Cada imagen fue convertida a 8-bit y se aplicó un umbral de detección que permitió seleccionar las membranas de los adipocitos. Las regiones que no fueron seleccionadas correctamente en el paso anterior se completaron con la herramienta “lápiz”. Finalmente, el área de cada adipocito fue seleccionada de manera individual con la herramienta “varita mágica” y determinada con la función de medida del *software* (Figura 18B). Se realizó un promedio del área de todos los adipocitos evaluados para obtener el valor final.

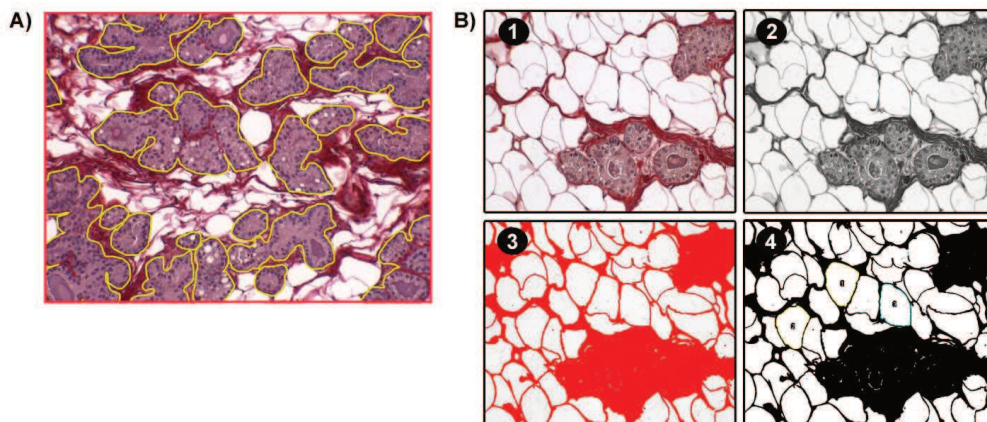


Figura 18. Determinaciones histológicas. (A) Determinación del área epitelial relativa: se cuantificó el área ocupada por las estructuras epiteliales (delimitadas en amarillo), se dividió por el área total de la glándula (recuadro rojo) y se multiplicó por 100. (B) Determinación del área de los adipocitos: Una vez abierta la imagen original (1) se transformó a 8-bit (2) y se aplicó un umbral que permitió seleccionar las membranas de los adipocitos (3). Finalmente se aceptó el umbral y se determinó el área individual de cada adipocito (4).

3.2 | Cuantificación de proteínas evaluadas por inmunohistoquímica

La expresión de Ki67, ESR1 y RA en DPN60 fue analizada en las células epiteliales, mientras que en DPN21, la expresión de Ki67 fue cuantificada en las células epiteliales y adipocitos. En todos los casos se cuantificó el porcentaje de células positivas, contando como mínimo 2000 células por muestra experimental. Para la determinación de Ki67 en DPN60 se utilizó el anticuerpo primario anti-Ki67 de Dako Corp. (USA), mientras que para DPN21 se utilizó el anticuerpo primario generado en el ISAL.

Con respecto a la cuantificación de la marcación de p-Erk1/2, ésta se evaluó en los TEBs en DPN21 mediante análisis digital de imágenes, utilizando el *software* Image J. Se tomaron imágenes de TEBs inmunomarcados con una cámara de video color Spot Insight V3.5 (Diagnostic Instruments), acoplada al microscopio Olympus BH2, utilizando una objetiva Dplan 40X. Previo a la captura de imágenes, el microscopio fue acondicionado para la iluminación Koehler y una imagen de referencia de un campo vacío fue utilizada para corregir la iluminación desigual (corrección de sombras). Las marcaciones de DAB y hematoxilina fueron separadas utilizando una función de separación de cromógenos (*color deconvolution*) provista por el *software* (Ruifrok & Johnston, 2001). Las imágenes de DAB digitalizadas se convirtieron a una escala de grises, se delimitó el compartimento histológico a evaluar (TEB junto con los fibroblastos que lo rodean) y se calibró el nivel de grises del programa de tal manera que la tinción de fondo fuera considerada como “cero”. Luego se determinó el área total ocupada por la región seleccionada, el área de marcación positiva y el promedio de la intensidad de marcación (Figura 19). A partir de estos parámetros se calculó la densidad óptica integrada (DOI), definida como la combinación lineal entre el área relativa ocupada por la marcación positiva y la intensidad promedio de dicha marcación: $DOI = [(\text{Área de marcación positiva} / \text{Área total evaluada}) \times 100] \times \text{Promedio de la intensidad de marcación}$ (Ramos et al., 2002). Debido a que la DOI es un parámetro adimensional, los resultados fueron expresados como unidades arbitrarias. La marcación de p-Erk1/2 se determinó en al menos cuatro TEBs por animal.

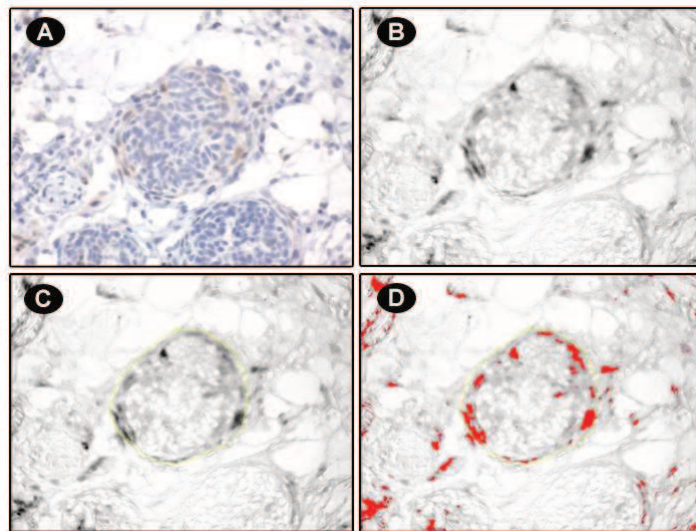


Figura 19. Cuantificación de la expresión de p-Erk1/2 en TEBs y fibroblastos que los rodean mediante análisis digital de imágenes. Las imágenes muestran la secuencia de pasos para la cuantificación de la expresión de p-Erk1/2 utilizando el *software* Image J. (A) Imagen original. (B) Imagen convertida a escala de grises. (C) Selección manual de la región a evaluar (amarillo). (D) Selección del rango de marcación positiva (visualizado en rojo).

3.3 | Análisis de proteínas evaluadas por inmunofluorescencia

En DPN21, se realizó una inmunofluorescencia doble para evaluar la localización de p-Erk1/2 y α -SMA. Esta marcación fue analizada cualitativamente utilizando un microscopio equipado para detección epifluorescente (Olympus BX-51) y con filtros apropiados (Durando et al., 2011). Las imágenes fueron registradas utilizando una Cámara Color Digital USB 2.0 de alta resolución (QImaging Go-3, QImaging, Canadá).

3.4 | Análisis estadístico

Los parámetros determinados en las WMs, área total, perímetro, distancia entre la glándula mamaria N° 4 y 5 y crecimiento longitudinal, fueron evaluados utilizando un modelo lineal con el tratamiento y el peso como variables independientes (parámetro evaluado \sim tratamiento + peso), para analizar si el peso corporal tenía un efecto significativo sobre estos parámetros (Altamirano et al., 2018). Luego de descartar un efecto del peso corporal, estos parámetros fueron evaluados con una prueba ANOVA, seguida de un *post-test* de Dunnett para comparar cada grupo experimental con el grupo control. También se utilizó ANOVA seguido del *post-test* de Dunnett para analizar el área epitelial relativa evaluada en WMs, las variables histológicas y la expresión de proteínas (Ki-67, ESR1, RA). Por otro lado, se utilizó la prueba estadística Kruskal-Wallis seguida del *post-test* de Dunn para evaluar el n° de TEBs, el *score* de desarrollo mamario y la marcación de p-Erk1/2. Finalmente, para los ensayos de PCR en tiempo real y los análisis de metilación se utilizó el *test* de Mann-Whitney *U*.

4 | Resultados

4.1 | Evaluación del crecimiento de la glándula mamaria a partir de WMs en machos expuestos a HBG3.5 y HBG350

Para evaluar el desarrollo y crecimiento de la glándula mamaria, se realizó un análisis de las WMs de los machos F1, en las etapas pre-pubertad y post-pubertad. En DPN21, la glándula mamaria de todos los animales alcanzó el nódulo linfático y presentó estructuras características para la edad, como TEBs y *alveolar buds*, independientemente del grupo experimental. Además, todos los parámetros evaluados en las WMs fueron similares entre los animales tratados y controles (Tabla 13, Figura 20A-C). En DPN60, las estructuras mamarias crecieron más allá del nódulo linfático, las glándulas N° 4 y 5 convergieron, aumentó el crecimiento longitudinal y se desarrollaron las estructuras lobuloalveolares características de la glándula mamaria de ratas macho. En esta edad, el tratamiento con HBG3.5 redujo el área total y el perímetro de la glándula mamaria e indujo la persistencia de un mayor n° de TEBs. Por otro lado, los animales expuestos a HBG350 presentaron mayor crecimiento longitudinal y menor desarrollo del árbol mamario comparado con el grupo control (Tabla 13, Figura 20D-F).

Tabla 13. Análisis de WM de ratas macho expuestas a HBG.

	Control	HBG3.5	HBG350
DPN21			
Área total (mm ²)	26.71 ± 1.69	25.44 ± 1.89	24.21 ± 2.12
Perímetro (mm)	27.24 ± 1.04	28.21 ± 1.65	27.06 ± 1.39
Distancia entre la glándula mamaria N° 4 y 5 (mm)	1.78 ± 0.33	1.34 ± 0.21	1.43 ± 0.35
TEBs (N°)	1.80 ± 0.74	0.64 ± 0.24	2.60 ± 0.86
Área epitelial relativa (%)	29.85 ± 1.23	25.84 ± 1.91	30.02 ± 1.56
DPN60			
Área total (mm ²)	493.2 ± 25.3	388.2 ± 13.9*	524.9 ± 18.2
Perímetro (mm)	94.1 ± 3.1	84.2 ± 1.5*	99.3 ± 2.3
Crecimiento longitudinal (mm)	7.1 ± 0.4	6.4 ± 0.6	9.4 ± 0.6*
TEBs (N°)	0.5 ± 0.2	2.3 ± 0.7#	0.3 ± 0.2
Desarrollo mamario (<i>score</i>)	2.6 ± 0.1	2.7 ± 0.1	1.4 ± 0.1*

Los valores se expresaron como la media ± SEM de 8-10 ratas macho/grupo/día.

TEBs: estructuras terminales (*terminal end buds*).

*p<0.05 (ANOVA *test*, seguido del *post-test* de Dunnett)

p<0.05 (Kruskal Wallis, seguido del *post-test* de Dunn)

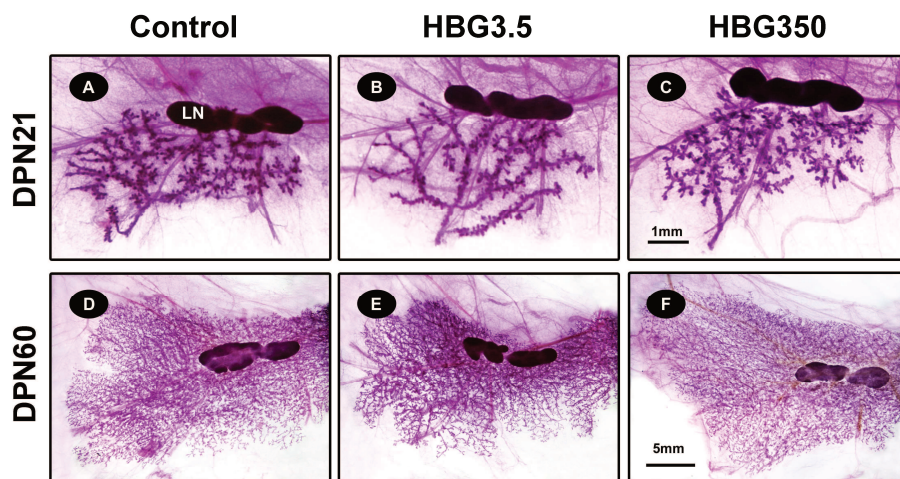


Figura 20. WMs de glándulas mamarias de machos pre- y post-puberales. Imágenes representativas de WM de animales en DPN21 (A-C) y DPN60 (D-F). En DPN21 no se observaron diferencias entre los animales expuestos a HBG y los controles. En DPN60, la glándula mamaria de los machos expuestos a HBG3.5 presentó un área reducida (E), mientras que en los machos expuestos a HBG350 se observó un mayor crecimiento longitudinal y una disminución del desarrollo del árbol mamario, en comparación con el grupo control (F). NL: nódulo linfático. Las barras representan la magnificación correspondiente a las imágenes en cada fila.

4.2 | Análisis del desarrollo mamario en machos post-puberales expuestos a HBG3.5 y HBG350

4.2.1 | Morfología de la glándula mamaria de machos post-puberales

Considerando las modificaciones halladas en los parámetros evaluados en las WMs en los machos post-puberales, se realizó un análisis de la histología mamaria. En DPN60, la glándula mamaria de los animales controles presentó estructuras lobuloalveolares características de ratas macho adultas (Filgo et al., 2016; Lucas et al., 2007), formadas por células epiteliales espumosas y vacuoladas, dispuestas alrededor de un lumen indeterminado (Figura 21A, D). Los machos expuestos a HBG3.5 presentaron un desarrollo epitelial similar al grupo control (Figura 21B, E), mientras que aquellos tratados con HBG350 mostraron una disminución en el desarrollo epitelial, mayormente de las estructuras lobulares (Figura 21C-F). De acuerdo con estas características, el área epitelial relativa disminuyó en los animales pertenecientes al grupo HBG350 comparado con el grupo control y no se observaron diferencias con los animales expuestos a la menor dosis (Figura 22A). Además, se observó un mayor desarrollo del tejido adiposo en los machos tratados con HBG350, que fue acompañado por un incremento en el área de los adipocitos (Figura 22B).

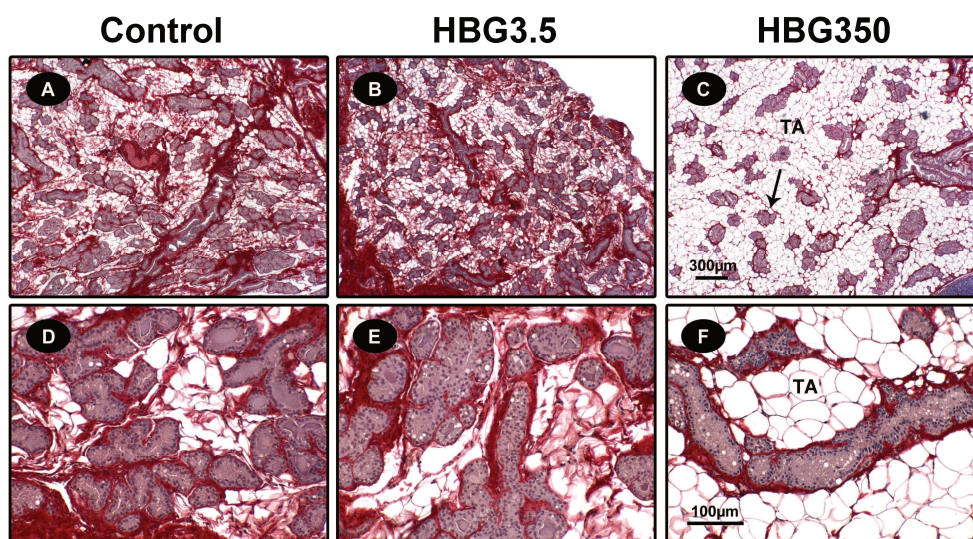


Figura 21. *Histología de la glándula mamaria de machos post-puberales expuestos a HBG.* Imágenes representativas de secciones teñidas con P&H de machos post-puberales en dos magnificaciones. La glándula mamaria de los machos expuestos a HBG3.5 (B, E) presentó una histología similar a los machos control (A, D), mientras que los animales tratados con HBG350 (C, F) mostraron un menor desarrollo de las estructuras epiteliales, principalmente lobuloalveolares (C, flecha), y un tejido adiposo prominente (C, F). TA: tejido adiposo. Las barras representan la magnificación correspondiente a las imágenes en cada fila.

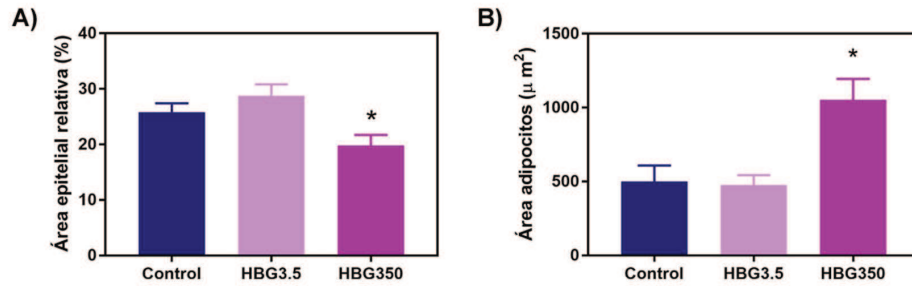


Figura 22. Determinaciones morfológicas en la glándula mamaria de machos post-puberales. (A) Área epitelial relativa (%), área ocupada por las estructuras epiteliales en relación al área total del *pad* adiposo. Los machos expuestos a HBG350 presentaron una menor área epitelial relativa en comparación con el grupo control. (B) Área promedio de los adipocitos (μm^2). La mayor dosis de HBG produjo un aumento en el tamaño de los adipocitos.

4.2.2 | Proliferación y expresión de los receptores de hormonas esteroideas en animales post-puberales

Para evaluar si las alteraciones morfológicas observadas en la glándula mamaria de los machos expuestos perinatalmente a HBG estaban asociadas a cambios en la proliferación epitelial y/o la expresión de receptores de hormonas esteroideas, se determinó el índice de proliferación celular (porcentaje de células epiteliales positivas para Ki67) y la expresión proteica y de ARNm de ESR1 y RA. Imágenes representativas de la expresión de Ki67, ESR1 y RA en células epiteliales mamarias se muestran en la Figura 23A. En los animales expuestos a HBG3.5 el índice de proliferación celular fue similar al control, mientras que la expresión proteica y de ARNm de ESR1 fue menor. Además, estos cambios fueron acompañados por un incremento en la expresión proteica de RA y una disminución en sus niveles de ARNm. Por otro lado, en los machos HBG350 la proliferación disminuyó con respecto a los controles, mientras que la expresión de ESR1 (proteína y ARNm) se redujo y no se observaron cambios en la expresión de RA (Figura 23B, C).

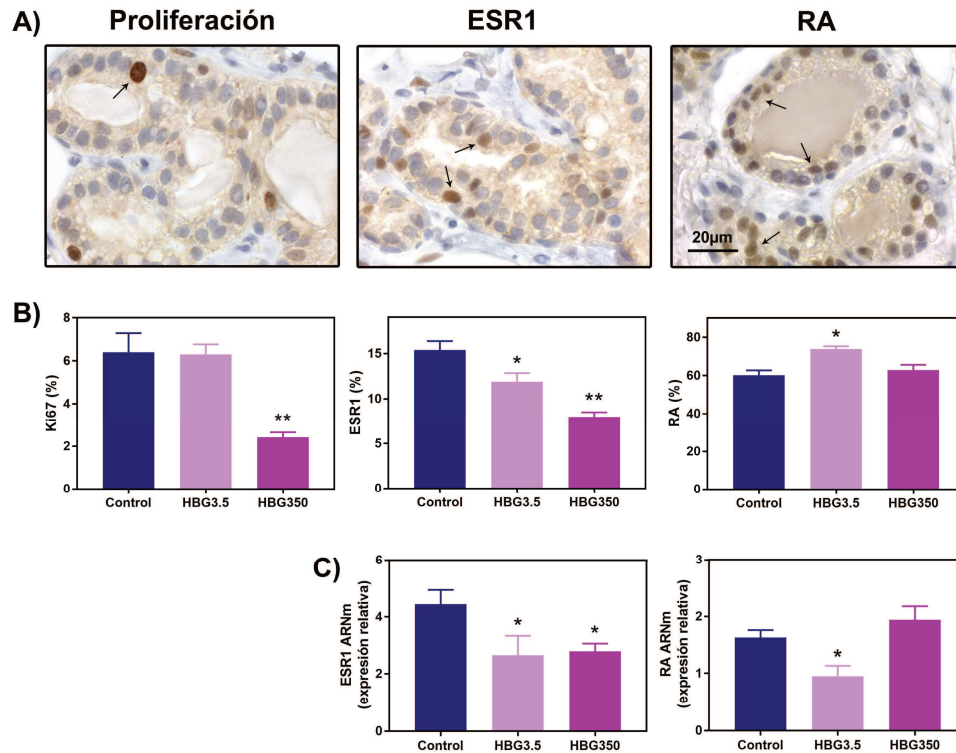


Figura 23. Proliferación y expresión de receptores de hormonas esteroides en DPN60. (A) Imágenes representativas de la inmunomarcación de Ki67 (proliferación), ESR1 y RA en animales pertenecientes al grupo control. Las células positivas se encuentran indicadas por las flechas; todas las imágenes presentan el mismo aumento. (B) Proliferación y expresión proteica de ESR1 y RA en los diferentes grupos experimentales. Las barras representan los valores medios \pm SEM de 6-8 animales por grupo experimental (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ANOVA test, seguido del *post-test* de Dunnett). (C) Expresión relativa de ARNm de ESR1 y RA; las muestras fueron normalizadas con la expresión de L19. Las barras representan los valores medios \pm SEM de 6-8 machos por grupo experimental (* $p < 0.05$, Mann Whitney U test).

4.2.3 | Abundancia relativa de las variantes transcripcionales de ESR1 en la glándula mamaria de los machos post-puberales

Debido a la disminución en la expresión del ARNm de ESR1 hallada en los animales expuestos a HBG, se evaluó si ésta se encontraba asociada a modificaciones en el uso de los distintos promotores transcripcionales de ESR1. Para llevar a cabo este objetivo se determinó la expresión relativa de los exones que codifican la región 5'UTR del gen ESR1 de rata a partir de PCR en tiempo real. Un esquema de la organización genómica de la región promotora del gen ESR1 de rata se muestra en la Figura 24A. Independientemente del grupo experimental, la transcripción del gen ESR1 en la glándula mamaria de ratas macho fue dirigida por los promotores asociados con los exones OS, O, OT y E1, mientras que no se detectó expresión del transcripto que contenía el exón ON, bajo las condiciones experimentales del estudio. Sin embargo, ambas dosis de HBG alteraron la abundancia relativa de las variantes transcripcionales. Los animales expuestos a HBG3.5 presentaron una menor expresión de la variante ESR1-OS comparado con los controles.

Contrariamente, el tratamiento con HBG350 produjo una disminución de la expresión de los otros tres transcritos (ESR1-O, OT y E1) con respecto al grupo control (Figura 24B).

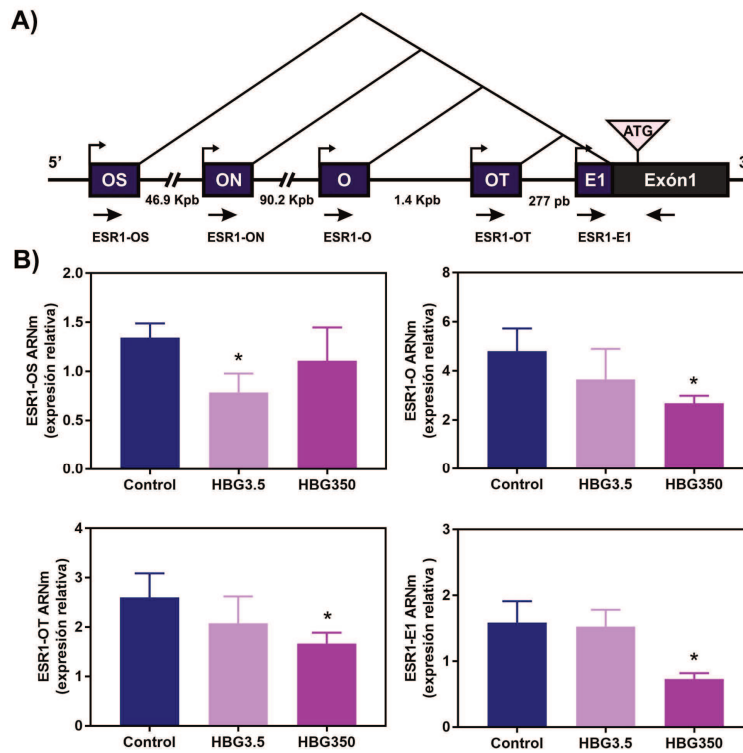


Figura 24. Variantes transcripcionales de ESR1. (A) Organización genómica de la región promotora del gen ESR1 de rata. El Exón 1 es la región común a todos los transcritos provenientes de los distintos promotores (E1, OT, O, ON y OS) del gen. Las flechas hacia arriba indican el inicio de la transcripción, mientras que las flechas horizontales corresponden a los oligonucleótidos utilizados para evaluar la expresión de las variantes. Sitio de inicio de la traducción: ATG. (B) Expresión relativa de ARNm de las variantes transcripcionales, las muestras fueron normalizadas con la expresión de L19. Las barras representan los valores medios \pm SEM de 6-8 animales por grupo (* $p < 0.05$, Mann Whitney *U* test).

4.2.4 | Estado de metilación de los promotores de ESR1 en los animales post-puberales

Considerando los cambios inducidos por la exposición a HBG en la expresión de las variantes transcripcionales de ESR1, se analizó el estado de metilación del ADN de los promotores transcripcionalmente activos y de regiones de ADN cercanas a los mismos, para determinar si las modificaciones en la expresión de los transcritos se encontraban relacionadas con una metilación diferencial del ADN. Para hallar potenciales sitios de metilación del ADN se analizó la presencia de islas CpG y de sitios de restricción para las enzimas *Bst*UI o *Mae*II (Milesi et al., 2017) en las regiones promotoras; en todos los promotores estudiados se identificaron islas CpG y sitios de restricción para *Bst*UI o *Mae*II. En la Figura 25 se muestra un esquema de los exones OS, O, OT y E1, las islas CpG y los sitios estudiados por PCR en tiempo real. En los animales expuestos a HBG3.5, solo el sitio *Bst*UI en el promotor OS presentó un aumento en el estado de metilación. Por otro lado, en los machos pertenecientes al grupo HBG350 se observó un incremento en la

metilación en los sitios *MaeII* y ambos sitios *BstUI* en el promotor O, el sitio *BstUI* en el promotor OT y el sitio *BstUI* en el promotor E1, comparado con el grupo control (Figura 25). En todos los casos, la reducción de la expresión de las variantes transcripcionales estuvo asociada con una hipermetilación de sus promotores.

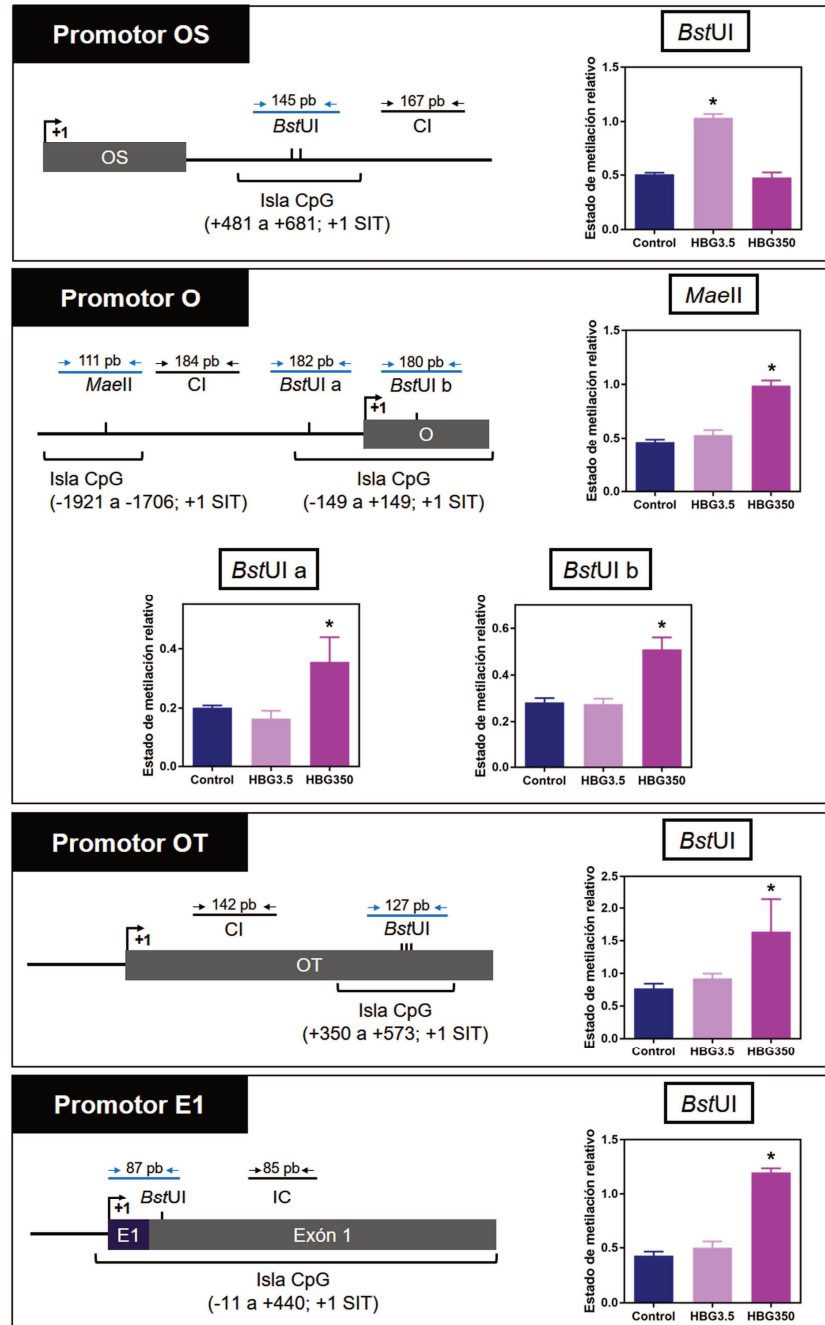


Figura 25. Análisis de la metilación de las regiones promotoras de ESR1. Esquema de los promotores ESR1-OS, -O, -OT y -E1; se indican las islas CpG, los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción sensibles a metilación *BstUI* y *MaeII* y las posiciones y orientaciones de los primers de PCR (flechas). SIT: sitio de inicio de la transcripción; CI: control interno. Las barras representan el estado de metilación de los promotores de ESR1 y los valores se expresan como la media \pm SEM de un pool de 4 muestras cuantificadas por triplicado (* $p < 0.05$, Mann Whitney *U* test).

4.3 | Análisis del desarrollo mamario en machos pre-puberales expuestos a HBG3.5 y HBG350

4.3.1 | Análisis histológico de la glándula mamaria de machos pre-puberales

La exposición a HBG no modificó el crecimiento de la glándula mamaria en los animales pre-puberales, sin embargo, se realizó su análisis histológico para determinar si las estructuras epiteliales o el compartimento estromal presentaban cambios tempranos que pudieran relacionarse con los resultados obtenidos en los machos post-puberales (DPN60). En DPN21 no se observaron diferencias en las estructuras epiteliales de la glándula mamaria; en todos los grupos experimentales los conductos presentaron una o dos capas de epitelio cúbico, rodeado por tejido conectivo y se evidenció la presencia de TEBs y pequeños *alveolar buds* (Figura 26A). Las estructuras epiteliales se hallaban inmersas en un tejido adiposo desarrollado, que en el caso de los machos expuestos a HBG350 fue similar al control, mientras que se observaron adipocitos de mayor tamaño en los machos expuestos a HBG3.5 (Figura 26B, C).

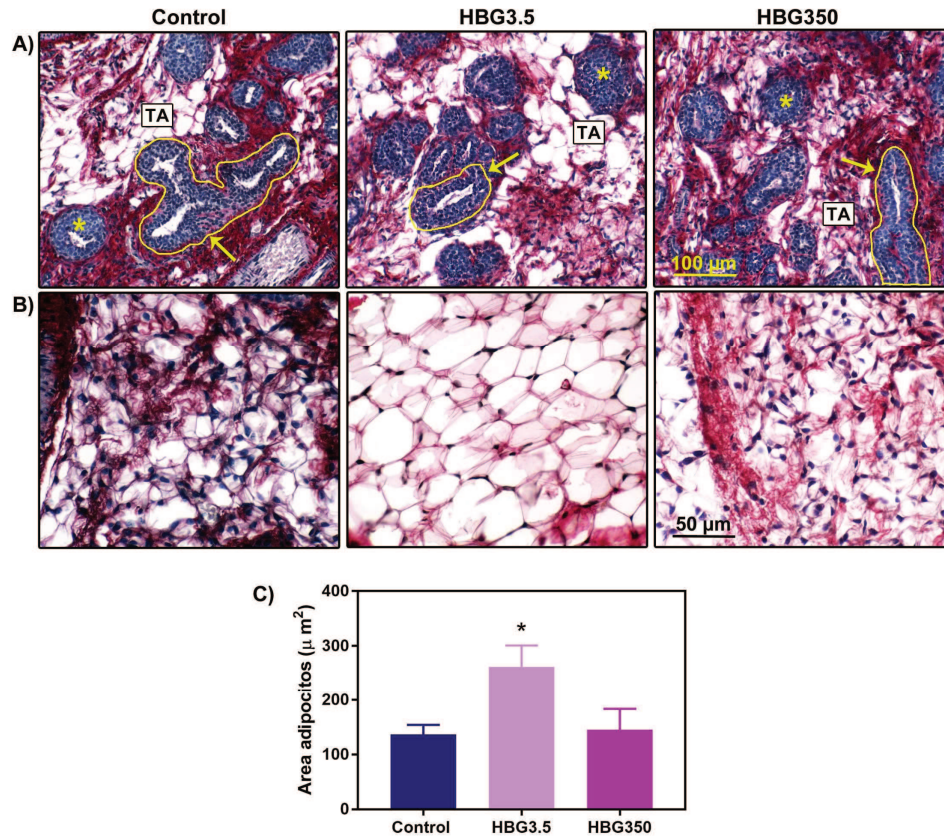


Figura 26. Histología de la glándula mamaria de machos pre-puberales expuestos a HBG. (A) Imágenes representativas de estructuras epiteliales en glándulas mamarias teñidas con P&H. Se observaron estructuras similares en todos los grupos experimentales. Los conductos se encuentran rodeados por líneas amarillas e indicados por flechas. Los TEBs se indican con un asterisco (*) y el tejido adiposo con las letras TA. Todas las imágenes presentan la misma magnificación. (B) Tejido adiposo de la glándula mamaria. La glándula mamaria de los machos expuestos a HBG3.5 presentó adipocitos de mayor tamaño comparado con el grupo control. Todas las imágenes presentan la misma magnificación. (C) Promedio del área de los adipocitos. Las barras representan los valores medios \pm SEM de 6-8 animales por grupo experimental (* $p < 0.05$, ANOVA seguido por el *post-test* de Dunnett).

4.3.2 | Proliferación de células epiteliales y adipocitos en la glándula mamaria de los machos en DPN21

Como se describió en la sección anterior (4.1), la exposición a HBG durante el desarrollo alteró la histoarquitectura de la glándula mamaria luego de la pubertad (DPN60); la dosis de HBG3.5 redujo el área de la glándula e incrementó la persistencia de TEBs, mientras que la exposición a HBG350 indujo un mayor crecimiento longitudinal y un menor desarrollo del árbol mamario. Sin embargo, en DPN21 no se observaron modificaciones en el crecimiento ni el parénquima de la glándula mamaria de los machos expuestos. Debido a esto, se determinó la proliferación (porcentaje de células positivas para Ki67) de células epiteliales y adipocitos en DPN21, para evaluar si existían modificaciones que pudieran explicar los resultados obtenidos en machos post-puberales (DPN60). La proliferación epitelial disminuyó en los animales expuestos a HBG3.5 en comparación con los animales controles y no se observaron diferencias significativas con aquellos expuestos a HBG350. Además, no existieron diferencias significativas en la proliferación de los adipocitos entre los distintos grupos experimentales (Figura 27).

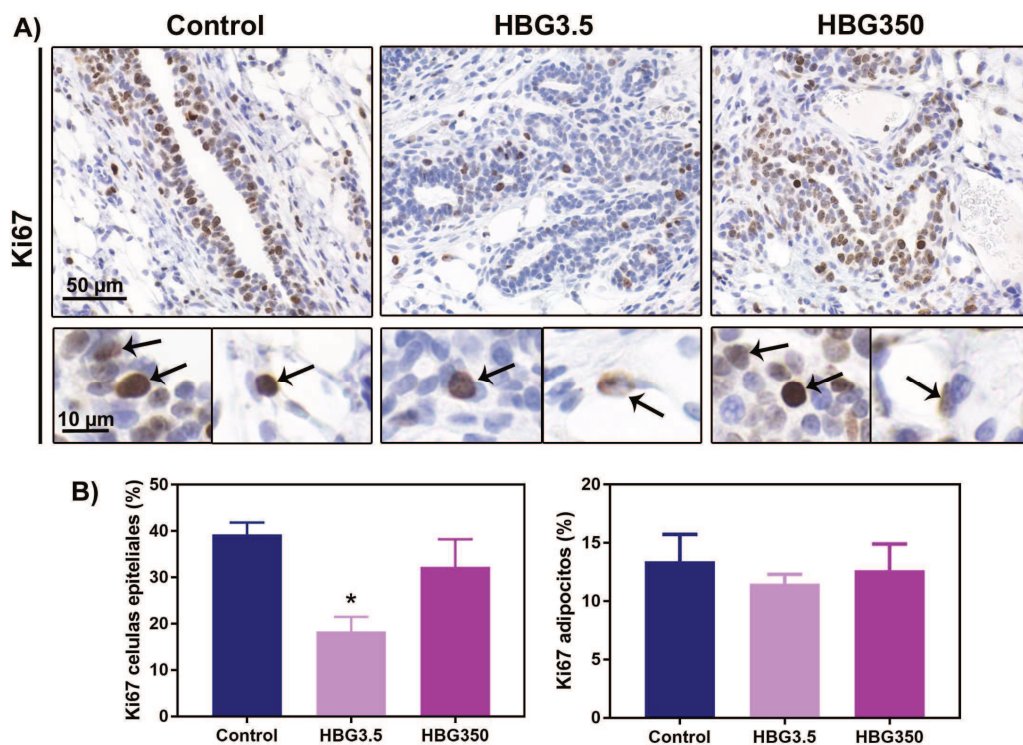


Figura 27. Proliferación celular en la glándula mamaria de ratas macho pre-puberales. (A) Imágenes representativas de la inmunomarcación de Ki67 (arriba) e insets con mayor aumento (abajo). Los insets muestran células epiteliales (izquierda) y adipocitos (derecha) con flechas indicando las células positivas. Las imágenes en cada fila presentan la misma magnificación. (B) Porcentaje de células epiteliales y adipocitos que expresan Ki67. Las barras representan los valores medios \pm SEM de 6-8 animales por grupo experimental (* $p < 0.05$, ANOVA seguido por el *post-test* de Dunnett).

4.3.3 | Expresión de genes que regulan el desarrollo mamario en animales expuestos a HBG3.5 y HBG350 en DPN21

Además de la proliferación celular, la expresión de genes que regulan el desarrollo mamario también puede afectar al crecimiento de la glándula. Por lo tanto, se evaluó la expresión de ARNm de genes implicados en este proceso, que podrían contribuir a las diferencias observadas en la glándula mamaria de los machos en DPN60. La exposición a HBG no modificó la expresión de ARNm de RA (Control: 0.71 ± 0.07 , GBH3.5: 0.61 ± 0.02 , GBH350: 0.67 ± 0.04 ; unidades arbitrarias), mientras que la expresión de ESR1 disminuyó en ambos grupos expuestos (Figura 28). Al igual que ESR1, la expresión de *Ccnd1* también fue menor en ambos grupos expuestos a HBG. Por otro lado, los niveles de ARNm de los factores de crecimiento *Areg* e *IGF1* fueron menores en los machos expuestos a HBG3.5, sin observarse diferencia con aquellos expuestos a la mayor dosis. Además, la expresión de sus receptores, *EGFR* e *IGF1R* respectivamente, se encontró reducida en ambos grupos tratados con HBG (Figura 28).

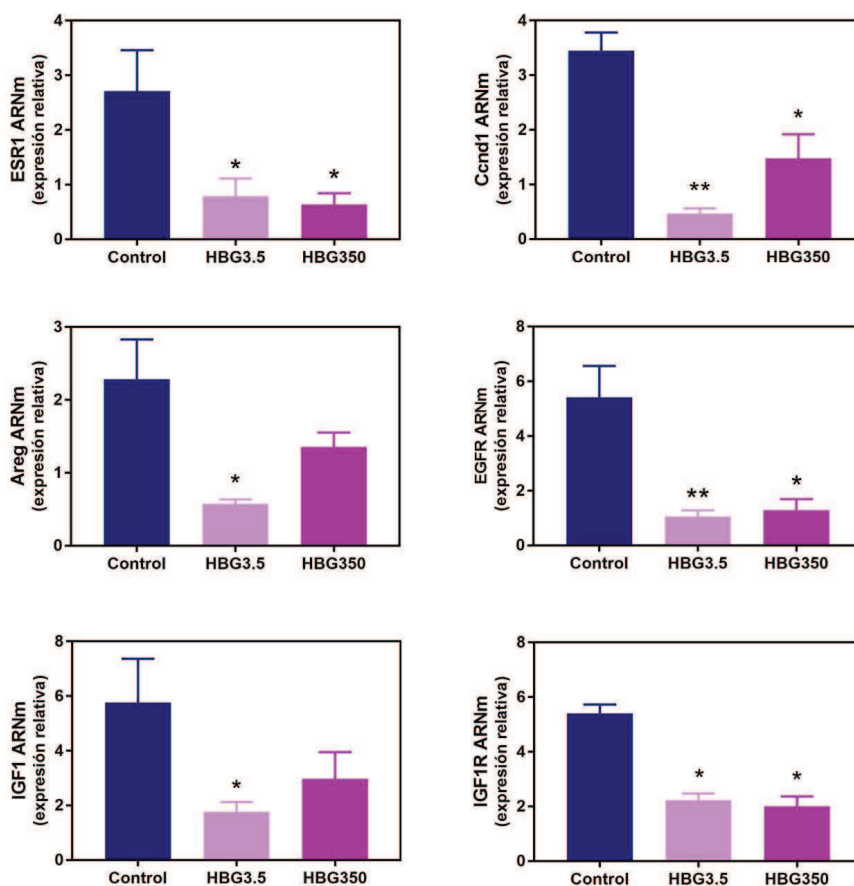


Figura 28. Expresión de ARNm de *ESR1*, *Ccnd1*, factores de crecimiento y sus receptores en la glándula mamaria de animales pre-puberales expuestos a HBG. Las barras representan los valores medios \pm SEM de 5-6 muestras por grupo experimental. Cada muestra de ARNm fue obtenida a partir de las glándulas mamarias de dos animales por camada y se utilizaron 5-6 camadas en total. Las muestras fueron normalizadas con la expresión de *L19* (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Mann Whitney *U test*).

Finalmente, se evaluó la marcación de p-Erk1/2, molécula implicada en la elongación ductal. p-Erk1/2 se encontró principalmente en conductos y TEBs; se observó una expresión nuclear y citoplasmática en las células del cuerpo de los TEBs y en los fibroblastos que los rodean (Figura 29A). La marcación de p-Erk1/2 fue similar entre los animales control y aquellos expuestos a HBG350, mientras que fue menor en los machos expuestos a la menor dosis de HBG (Figura 29B, C).

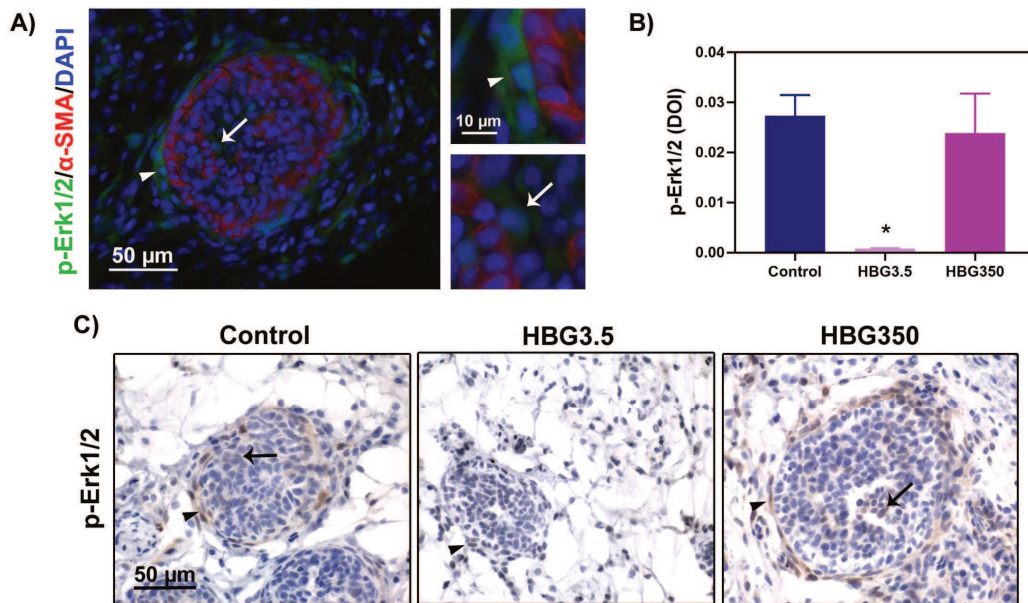


Figura 29. Marcación de p-Erk1/2. (A) Imagen representativa de inmunofluorescencia de la marcación de p-Erk1/2 y α -SMA en TEBs (izquierda) e *insets* con mayor magnificación (derecha). La expresión de α -SMA fue utilizada para identificar las células *cap* dentro de los TEBs (marcación roja). Las flechas indican células del cuerpo del TEB positivas para p-Erk1/2 (marcación verde) y las puntas de flecha muestran fibroblastos p-Erk1/2 positivos (marcación verde) alrededor del TEB. Los *insets* presentan la misma magnificación. (B) Cuantificación de la expresión de p-Erk1/2 en TEBs en muestras inmunomarcadas. DOI: Densidad óptica integrada. Las barras representan los valores medios \pm SEM de 5 animales por grupo experimental (* $p < 0.05$, Kruskal-Wallis seguido por el *post-test* de Dunn). (C) Imágenes representativas de la expresión de p-Erk1/2 en TEBs de animales control y expuestos a HBG. Flechas: células del cuerpo de los TEBs positivas, puntas de flecha: fibroblastos positivos. Todas las imágenes presentan la misma magnificación.

5 | Discusión

En el presente capítulo se evaluaron los efectos de la exposición durante el desarrollo (preñez y lactancia) a un HBG sobre la glándula mamaria de ratas macho, debido a la elevada sensibilidad a PE que presenta este órgano (Altamirano, Delconte, et al., 2017; Altamirano et al., 2018; Andrews et al., 2002; Kass et al., 2015; Miousse et al., 2013). La exposición perinatal a HBG generó una alteración del desarrollo de la glándula mamaria de machos post-puberales, aunque no se observaron modificaciones en el crecimiento de la misma en los machos pre-puberales. En DPN60, la glándula mamaria de los animales expuestos a HBG3.5 mostró una disminución de su crecimiento y un aumento del n° de TEBs, mientras que su morfología fue similar a la del grupo

control. Por otro lado, la glándula mamaria de los machos expuestos a HBG350 presentó un mayor crecimiento longitudinal con un menor desarrollo del árbol mamario, acompañado por una disminución del área ocupada por las estructuras epiteliales y un mayor desarrollo del tejido adiposo.

En un estudio previo, demostramos que la exposición subcutánea directa a HBG en la primera semana de vida aumenta el crecimiento mamario y el n° de TEBs en machos pre-puberales (Altamirano et al., 2018). En el presente estudio, la exposición perinatal oral a HBG no causó alteraciones en estos parámetros en la glándula mamaria en DPN21, en ninguna de las dosis estudiadas. Estas diferencias en las respuestas podrían deberse a los distintos periodos en que se realizó la exposición, como también a la variación de las rutas de administración (Yang et al., 2015). A pesar de que se ha demostrado que el tratamiento con ciertos PE causa un desarrollo anormal de la glándula mamaria en ratas macho pre-puberales (Altamirano, Delconte, et al., 2017; Filgo et al., 2016; Kass et al., 2015), se ha reportado que la exposición temprana a este tipo de compuestos también puede causar efectos sutiles que pueden no ser detectados hasta el inicio de la pubertad o la adultez (Fenton, 2006; Schug et al., 2011).

En DPN60, los animales tratados con HBG3.5 presentaron una glándula mamaria con menor área y perímetro, y un mayor n° de TEBs que los controles. Estos cambios sugieren un retraso en el crecimiento de la glándula mamaria de los machos expuestos a HBG3.5, en la cual la elongación ductal parecería no haber finalizado. Además, considerando que los TEBs son estructuras proliferativas indiferenciadas, altamente susceptibles a insultos oncogénicos, un aumento en el n° de TEBs o la persistencia de los mismos en los machos expuestos podría incrementar la sensibilidad de la glándula a perturbaciones endógenas o exógenas (Fenton, 2006; Paine & Lewis, 2017). Por otro lado, las características histológicas y la proliferación de células epiteliales en los machos expuestos a HBG3.5 fueron similares a las ratas control.

Con respecto a los animales post-puberales expuestos a HBG350, éstos presentaron un mayor crecimiento longitudinal y una disminución del desarrollo del árbol mamario. Se sabe que los TEBs son los principales responsables de la elongación ductal y que, en machos, comienzan a diferenciarse antes de alcanzar los extremos del *fat pad* (Filgo et al., 2016). Aunque el n° de TEBs en los animales control y tratados con HBG350 fue similar en ambos días evaluados, éstos podrían haberse diferenciado más tarde en los machos expuestos a HBG350, continuando con la elongación ductal y resultando en un mayor crecimiento longitudinal en DPN60. Además, en concordancia con el menor desarrollo mamario hallado en las WMs, los animales HBG350 presentaron una disminución del área epitelial relativa de la glándula mamaria, un menor desarrollo de estructuras lobuloalveolares características de ratas macho y un tejido adiposo más prominente. Estas características se asemejan en parte a la glándula mamaria de ratas hembra (Lucas et al., 2007). Considerando que una hiperprolactinemia puede inducir la feminización de

la glándula mamaria de ratas macho (Cardy, 1991; Lucas et al., 2007), el ligero aumento (aunque no estadísticamente significativo) de los niveles séricos de PRL observado en los animales expuestos a HBG350 (capítulo 2, sección 4.1) podría explicar parte de estos cambios histológicos.

Los cambios morfológicos observados en los animales tratados con HBG350 fueron acompañados por una disminución de la proliferación epitelial y de la expresión proteica de ESR1, sin alteraciones en la expresión de la proteína de RA. Se ha descrito que la glándula mamaria de los machos post-puberales expresa ESR1 (Altamirano, Delconte, et al., 2017; Filgo et al., 2016) pero, a diferencia de lo que sucede en hembras, la regulación de la expresión de ESR1, al igual que los efectos de los estrógenos, en la glándula mamaria de machos no han sido completamente dilucidados. Se ha encontrado que el glifosato es capaz de inducir la expresión de ESR1 en células de cáncer de mama humanas *in vitro* (Thongprakaisang et al., 2013) como así también en la glándula mamaria de ratas macho *in vivo* (Altamirano et al., 2018). Contrariamente, en este caso la expresión de ESR1 disminuyó. En este sentido, es necesario considerar que en este estudio la expresión de ESR1 fue evaluada 40 días luego de que finalizara la exposición, y que la ruta de administración y el momento de exposición fueron diferentes a los utilizados en Altamirano et al. (2018). Dado que no existieron diferencias en los niveles séricos de E2 o T entre los distintos grupos experimentales (capítulo 2, sección 4.1), la reducción en la expresión de ESR1 podría alterar la respuesta normal de la glándula mamaria a las hormonas esteroides en la pubertad y afectar al desarrollo lobuloalveolar característico de los machos post-puberales. En este sentido, ratas macho tratadas con tamoxifeno, un clásico antagonista del estrógeno en la glándula mamaria, han presentado una atrofia lobuloalveolar de la glándula (Kennel et al., 2003).

Los efectos inducidos por HBG en la expresión proteica de ESR1 podrían deberse a una reducción de su transcripción, dado que los niveles de ARNm del mismo también fueron disminuidos. Más aún, la transcripción de ESR1 inducida por tres promotores diferentes (ESR1-O, OT y E1) fue afectada en los animales expuestos a HBG350. Se ha descrito que la expresión de ESR1 ocurre a través de distintos promotores dependiendo del tipo de tejido y de los estadios fisiológicos y del desarrollo (Kato et al., 1998; Parodi et al., 2015). Además, de acuerdo con nuestros hallazgos, se ha publicado que la exposición a diferentes compuestos químicos puede alterar la abundancia relativa de los transcritos de ESR1 y por lo tanto modular su expresión (Lorenz et al., 2019; Milesi et al., 2017; Monje et al., 2007; Parodi et al., 2015). La metilación del ADN, una modificación epigenética ampliamente conocida, tiene un rol clave en el desarrollo de los mamíferos (Smith & Meissner, 2013). Perturbaciones en los patrones de metilación han sido observadas en diversas enfermedades (Jones, 2012; Schubeler, 2015) y como consecuencia a la exposición a ciertos PE durante períodos críticos (Jacobs et al., 2017). Por ejemplo, la exposición a BPA y a benzofenona-3 altera la metilación del ADN en regiones regulatorias del gen de β -caseína en la glándula mamaria durante la lactancia (Altamirano, Ramos, et al., 2017) y en

organoides mamarios (Altamirano et al., 2020), respectivamente. Además, tanto la pérdida de la expresión de ESR1, observada frecuentemente en cáncer de mama, como la presencia de tumores triple negativos, suelen estar relacionadas con una hipermetilación de las regiones regulatorias de ESR1 (Hervouet et al., 2013). En nuestro estudio, el análisis del estado de metilación de ESR1 mostró que, en machos expuestos a HBG350, la reducción en la expresión de ARNm de ESR1-O, -OT y E1 se encontró asociada con la hipermetilación de las islas CpG de sus promotores. En relación a esto, se ha publicado que la exposición a glifosato o HBG puede perturbar la programación epigenética en células de glándula mamaria *in vitro* (Duforestel et al., 2019) y en el útero de ratas preñadas (Lorenz et al., 2019), respectivamente. Con respecto a ESR1, se ha demostrado que BPA genera una hipermetilación de su región promotora en testículos (Doshi et al., 2011), mientras que HBG induce una disminución de los niveles de metilación en las regiones regulatorias en el útero de ratas, que se encuentra asociada a un aumento en su transcripción (Lorenz et al., 2019).

Aunque la morfología de la glándula mamaria y el índice de proliferación celular en los machos expuestos a HBG3.5 fueron similares al grupo control en DPN60, observamos una reducción de la expresión proteica y de ARNm de ESR1 en estos animales. Sin embargo, a diferencia de lo observado en los animales expuestos a la mayor dosis, solo la variante transcripcional ESR1-OS fue modificada y presentó una hipermetilación en su región regulatoria, comparada con el control. Llamativamente, en los animales tratados con HBG3.5, la expresión proteica de RA se incrementó mientras que los niveles de ARNm fueron disminuidos. Estos resultados podrían reflejar diferencias en la eficiencia de traducción o en la estabilidad de la proteína; en este sentido, se ha reportado que diversos mecanismos post-transcripcionales regulan los niveles proteicos de RA (Burnstein, 2005; Lee & Chang, 2003). Sin embargo, estudios previos en ratas macho expuestas a HBG no hallaron diferencias en su expresión (Altamirano et al., 2018; Cassault-Meyer et al., 2014; Dai et al., 2016). Considerando estos resultados, nuevos experimentos serían necesarios para esclarecer los efectos de HBG sobre la expresión de RA y los posibles mecanismos involucrados. En el presente trabajo, a pesar de que la expresión de ESR1 disminuyó en los animales expuestos a ambas dosis, la morfología de la glándula mamaria no fue afectada en los animales expuestos a HBG3.5. En relación a esto, debe mencionarse que la reducción en la expresión de ESR1 fue menos pronunciada en los machos expuestos a la menor dosis, lo que podría explicar la ausencia de cambios morfológicos en la glándula mamaria de estos animales.

En la segunda parte de este capítulo analizamos los efectos de la exposición durante el desarrollo a HBG en la glándula mamaria de los machos F1 pre-puberales. Además, evaluamos si efectos tempranos en machos pre-puberales podían explicar los resultados observados en los machos post-puberales. Previamente, observamos que las dosis estudiadas tuvieron diferentes efectos en la glándula mamaria de las ratas macho en DPN60, y que ambas afectaron la elongación ductal.

En base a estos resultados, se evaluó la histología y la expresión de reguladores claves en la morfogénesis ductal en los machos expuestos a HBG en un estadio pre-puberal (DPN21). En DPN21, la exposición a HBG no alteró el crecimiento de la glándula mamaria ni la morfología de las estructuras epiteliales. Sin embargo, los machos expuestos a HBG3.5 exhibieron adipocitos de mayor tamaño, comparado con los controles, sin alterar su proliferación. Se ha demostrado que el tejido adiposo presente en el estroma de la glándula mamaria es una fuente de moléculas de señalización paracrina y endócrina (Hovey & Aimo, 2010; Mueller et al., 2002; Wang et al., 2008). Como consecuencia, el tejido adiposo puede ser afectado por la acción de PE (Janesick & Blumberg, 2016). En este sentido, Kubsad et al. (2019) reportó un incremento en el tamaño de los adipocitos del tejido adiposo gonadal en ratas de la generación F3 expuestas a glifosato, mientras que Martini et al. (2016) observó que un HBG inhibía la proliferación y diferenciación de preadipocitos y la expresión de genes involucrados en la adipogénesis, en un modelo *in vitro*. Si bien nuevos estudios serían necesarios para esclarecer los efectos del glifosato o de los HBGs sobre el tejido adiposo, los cambios observados en este tejido en DPN21 fueron transitorios, ya que en DPN60 no se observaron diferencias en el tejido adiposo de los animales expuestos a HBG3.5 comparados con el control.

El crecimiento ductal a lo largo del *fat pad* es un proceso complejo, dirigido por los TEBs (Paine & Lewis, 2017), que involucra diferentes hormonas y factores de crecimiento (Gjorevski & Nelson, 2011). Aunque la elongación ductal no fue modificada en los machos pre-puberales expuestos a HBG, la proliferación de las células epiteliales y la expresión de genes implicados en este proceso sí fueron alterados en los animales expuestos. La proliferación epitelial solo fue reducida en los animales tratados con la menor dosis de HBG, mientras que ambas dosis disminuyeron la expresión de ARNm de ESR1 y Ccnd1. Los estrógenos y ESR1 son necesarios para el desarrollo ductal en la glándula mamaria (Sternlicht et al., 2006), ESR1 es un factor de transcripción crítico que regula la proliferación celular y la morfogénesis ductal. En este sentido, se observó que ratones *knockout* para ESR1 presentaron una notable disminución de la elongación ductal y la ramificación lateral (Feng et al., 2007). Por otro lado, Ccnd1 es un gen inducido por estrógenos (Prall et al., 1997), cuya ausencia genera una severa reducción de la expansión de la glándula mamaria y fallas en la respuesta a E2 (Casimiro et al., 2013). La reducción en la expresión de ESR1 y Ccnd1 en los machos expuestos a HBG3.5 podría estar asociada con la disminución de la proliferación observada, lo que a su vez podría afectar el crecimiento ductal. Además, se sabe que Ccnd1 está implicada en la expresión de genes de respuesta a estrógeno, principalmente de factores de crecimiento y sus receptores, como Areg y EGFR (Casimiro et al., 2013), siendo ambos esenciales para la elongación de los conductos mamarios (Kariagina et al., 2010; Sternlicht, 2006; Wiesen et al., 1999). La expresión de Areg es estimulada por estrógenos y ésta luego interacciona con su receptor, EGFR (Sternlicht et al., 2006). A pesar de que se han

descripto numerosos ligandos de EGFR que responden a estrógeno, Areg fue el único factor de la familia EGF inducido transcripcionalmente por estrógeno *in vivo* en la glándula mamaria de ratonas hembra en la pubertad (Ciarloni et al., 2007). Además, se ha reportado que Areg también se expresa en la glándula mamaria de ratas macho en respuesta a la administración exógena de E2 (Miousse et al., 2013). En concordancia con la disminución en la expresión de ESR1 y Ccnd1, la expresión de Areg fue reducida por la exposición a HBG3.5, mientras que los niveles de ARNm de EGFR disminuyeron con ambas dosis evaluadas. Otro factor de crecimiento necesario para el desarrollo puberal de la glándula mamaria y la formación de los TEBs es IGF1; ratones *knockout* para IGF1 presentan un número reducido de TEBs y un menor porcentaje del *pad* adiposo ocupado por las estructuras epiteliales (Kleinberg et al., 2000), mientras que transplantes mamarios deficientes en IGF1R también muestran un menor crecimiento (Bonnette & Hadsell, 2001). En DPN21, la expresión de ARNm de IGF1 e IGF1R fue menor en la glándula mamaria de los machos expuestos a HBG3.5, y solo la expresión de IGF1R se redujo en los animales expuestos a la mayor dosis de HBG. Los cambios en la expresión de IGF y su receptor en los machos tratados con HBG3.5 también podrían contribuir a la reducción del crecimiento de la glándula mamaria observado luego de la pubertad en los animales expuestos a esta dosis.

Eventos de proliferación, diferenciación y migración celular son requeridos para una morfogénesis ductal apropiada (Gjorevski & Nelson, 2011; Huebner et al., 2016). Se conoce que las MAPKs integran numerosas señales intracelulares que coordinan este proceso (Roux & Blenis, 2004) y que EGFR efectúa al menos parte de sus efectos a través de ellas; sin embargo, el rol preciso de las MAPKs en la morfogénesis mamaria *in vivo* no se encuentra completamente dilucidado (Gjorevski & Nelson, 2011). Se ha demostrado que Erk1/2, un miembro de la familia MAPK, es requerido para la migración celular individual y para la elongación del tejido mamario como un conjunto (Huebner et al., 2016) y que su activación transiente induce el crecimiento de explantos mamarios sin ramificación (Fata et al., 2007). Además, en células epiteliales de glándula mamaria humana, se observó que IGF1 activa la señalización de Erk1/2 y estimula la proliferación en un mecanismo dependiente de EGFR, que involucra la formación de un complejo entre IGF1R y EGFR (Ahmad et al., 2004). Por otro lado, la expresión de p-Erk1/2 en los fibroblastos que rodean el epitelio mamario, seguida de la activación de EGFR, induce la remodelación del estroma favoreciendo la elongación ductal y/o ramificación (Koledova et al., 2016). En este estudio, la forma activa de Erk1/2 (p-Erk1/2) fue observada en el núcleo y citoplasma de las células del cuerpo de los TEBs y en los fibroblastos que los rodean, lo que concuerda con el patrón descrito en los TEBs por Hvid et al. (2011). Como era esperado, considerando la reducción en la expresión de factores de crecimiento y sus receptores, los animales expuestos a HBG3.5 presentaron una activación reducida de Erk1/2; sin embargo, no se observaron diferencias entre los machos expuestos a HBG350 y los controles.

Las alteraciones observadas en reguladores claves de la morfogénesis ductal mamaria en las ratas macho pre-puberales expuestas a HBG3.5, como la menor proliferación celular, la regulación negativa de vías implicadas en la señalización de estrógeno (ESR1, factores de crecimiento y sus receptores) y la activación reducida de Erk1/2, podrían afectar a la elongación ductal, explicando la reducción en el crecimiento de la glándula mamaria observada en los machos post-puberales. Por el contrario, los cambios hallados en los animales expuestos a HBG350 en DPN60 no pueden ser explicados con los resultados obtenidos en DPN21. A pesar de que los machos expuestos a la mayor dosis no presentaron cambios en la proliferación, la expresión de factores de crecimiento o la activación de Erk1/2, ninguna de las modificaciones observadas en DPN21 podrían explicar la mayor elongación de los conductos de la glándula mamaria en los machos post-puberales expuestos a HBG350. Existen diferentes mecanismos implicados en el proceso de morfogénesis mamaria que no han sido analizados en esta tesis, como pueden ser la remodelación de la matriz extracelular, principalmente mediada por MMPs, o la señalización paracrina de ciertos FGFs (Gjorevski & Nelson, 2011; Sternlicht, 2006), los cuales podrían conducir a un mayor crecimiento de los conductos de la glándula mamaria. Por otro lado, la exposición a PE puede tener efectos sutiles hasta que comienza la pubertad (Muñoz-de-Toro et al., 2005); en este caso, es posible que los machos expuestos a HBG350 respondan de manera diferente a los animales controles a las hormonas esteroides presentes durante la pubertad. Finalmente, debe considerarse que se observó un ligero aumento en los niveles séricos de PRL en DPN60 en los animales expuestos a HBG350, lo que se ha demostrado que también puede inducir la elongación ductal (Arendt & Schuler, 2008).

En conclusión, nuestros resultados muestran que la exposición a HBG durante la preñez y la lactancia altera el desarrollo de la glándula mamaria de ratas macho. En la etapa post-puberal, HBG genera efectos más notorios, como alteraciones en el crecimiento y la morfología, mientras que en la etapa pre-puberal los efectos son sutiles, como modificaciones en la proliferación y expresión de genes implicados en el desarrollo mamario. A pesar de que se necesitan nuevos estudios para comprender los mecanismos implicados en la exposición a la mayor dosis de HBG, los resultados obtenidos en DPN21 podrían explicar las alteraciones observadas en el área y perímetro de la glándula mamaria en los animales post-puberales expuestos a la menor dosis de HBG. Por otro lado, es necesario notar que los efectos de la exposición a HBG descritos podrían deberse al principio activo (glifosato), los coformulantes, o ambos actuando de manera conjunta. Finalmente, los resultados de este capítulo sugieren un efecto de perturbación endócrina de HBG *in vivo* y destacan la importancia de evaluar diferentes vías y tiempos de exposición, como así también distintas edades, ya que tanto los efectos en la glándula mamaria como el momento en el cual éstos se evidencian pueden variar.

CAPÍTULO 4

***EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN AL PRINCIPIO ACTIVO
GLIFOSATO SOBRE LA GLÁNDULA MAMARIA Y SU
COMPARACIÓN CON LOS EFECTOS GENERADOS POR
EL HERBICIDA DE USO COMERCIAL***

*“Sorprendernos por algo es el primer paso
de la mente hacia el descubrimiento”*

Louis Pasteur

1 | *Introducción*

Como se mencionó previamente, se ha reportado que tanto el glifosato como sus formulaciones comerciales pueden alterar el sistema reproductor y presentar una acción de perturbación endocrina (Ingaramo et al., 2020; Jarrell et al., 2020; Milesi et al., 2021; Muñoz et al., 2021; Serra et al., 2021). Sin embargo, ciertos estudios en los que se compararon los efectos de HBGs, sus cofomulantes y glifosato puro revelaron que los HBGs podían presentar mayor toxicidad que el ingrediente activo puro (Mesnage & Antoniou, 2018; Mesnage et al., 2019). En relación a esto, Gasnier et al. (2009) mostró, en un estudio *in vitro*, que distintas formulaciones comerciales presentaban mayor citotoxicidad e inducían efectos anti-estrogénicos y anti-androgénicos a menores dosis en comparación con glifosato puro. Resultados similares fueron hallados al evaluar la actividad de la enzima aromatasas; las formulaciones comerciales y los cofomulantes generaron una disminución en la actividad de la enzima en dosis notablemente menores en comparación con glifosato (Defarge et al., 2016; Richard et al., 2005). Además, en un estudio *in vivo*, se observó que una exposición prolongada a un HBG generó alteraciones más pronunciadas en los niveles hormonales y en la distancia anogenital de ratas hembra y macho, en comparación con el ingrediente activo puro (Manservigi et al., 2019). Contrariamente, la exposición a glifosato o a un HBG provocó alteraciones similares en los niveles séricos de estradiol y en la expresión de genes implicados en el proceso de implantación, en el útero de ratas expuestas perinatalmente (Lorenz et al., 2020). Aún más, Pham et al. (2019) reportó que la exposición a glifosato, pero no a HBG, afectó la morfología de los testículos y disminuyó las concentraciones séricas de T, en ratones expuestos perinatalmente.

Teniendo en cuenta los resultados contradictorios descriptos anteriormente, en este capítulo decidimos evaluar los efectos de la exposición perinatal al principio activo glifosato sobre la glándula mamaria y compararlos con los efectos generados por el herbicida de uso comercial.

2 | *Objetivos específicos*

Analizar si la exposición perinatal a GLI resulta en alteraciones histológicas o del microambiente endócrino de la glándula mamaria de ratas macho F1 en la etapa post-puberal.

Se evaluó el desarrollo mamario, la presencia y/o persistencia de estructuras inmaduras para la edad y lesiones mamarias. Además, se analizó la expresión mamaria de los receptores de hormonas esteroides y de moléculas implicadas en su señalización (i.e.: Ccnd1, EGFR).

Analizar los potenciales mecanismos de acción de GLI sobre el desarrollo mamario en ratas macho F1. Se realizó un análisis de metilación de ADN genómico del promotor de ESR1, para caracterizar las posibles modificaciones en la expresión génica resultantes de la exposición a GLI.

Evaluar si los efectos generados por la exposición perinatal a GLI sobre la glándula mamaria de ratas macho difieren de los ocasionados por HBG. Se realizó una comparación entre los animales expuestos a GLI y la menor dosis de HBG en todos los parámetros evaluados.

3 | *Materiales y métodos*

En este capítulo se analizaron los efectos de la exposición perinatal a glifosato puro (GLI) sobre la glándula mamaria de los machos F1 en DPN60. Además, se realizó una comparación de los efectos generados por GLI con aquellos ocasionados por a la menor dosis del herbicida (HBG3.5), ya que las dosis reales de glifosato administradas fueron similares en ambos grupos. En el presente capítulo el grupo correspondiente a la menor dosis del herbicida en base a glifosato se denominará como HBG, a modo de simplificación. Las determinaciones realizadas se detallan en la Figura 30.

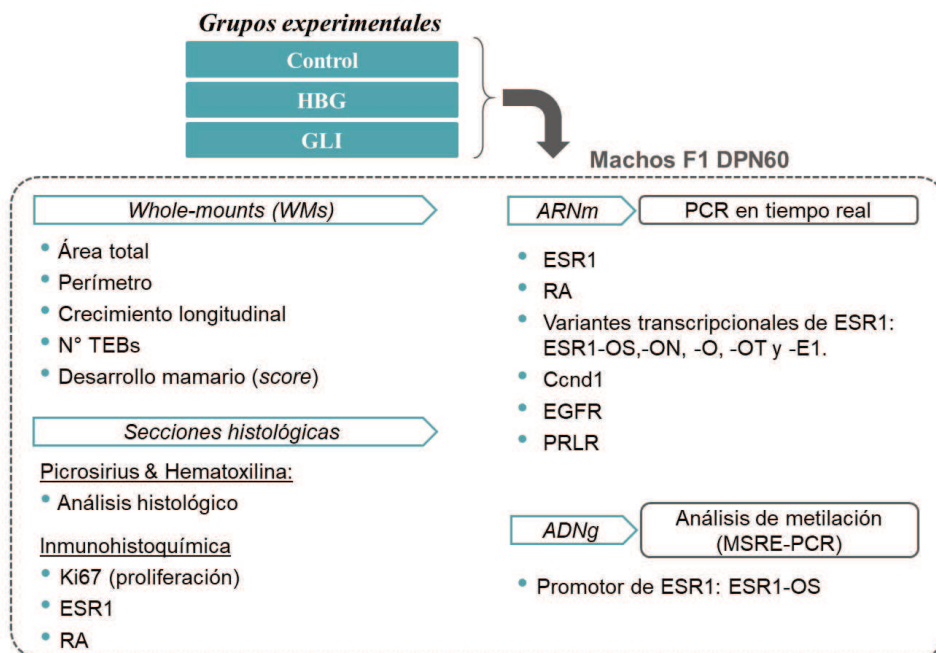


Figura 30. Determinaciones realizadas en la glándula mamaria de los machos F1 expuestos a HBG y GLI en DPN60. Control: animales expuestos a la dieta control. ESR1: Receptor de estrógenos alfa, RA: Receptor de andrógenos, Ccnd1: Ciclina D1, EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico, PRLR: Receptor de prolactina, MSRE: enzimas de restricción sensibles a metilación. ESR1-OS, -ON, -O, -OT y -E1 son exones de ESR1.

3.1 | *Cuantificación de proteínas evaluadas por inmunohistoquímica*

La cuantificación de Ki-67, ESR1 y RA se realizó de la misma manera en que se describió en capítulo 3 para DPN60 (sección 2.2).

3.2 | *Análisis estadístico*

Los parámetros determinados en las WMs, área total, perímetro y crecimiento longitudinal, fueron evaluados utilizando un modelo lineal con el tratamiento y el peso como variables independientes

(parámetro evaluado ~ tratamiento + peso), para analizar si el peso corporal tenía un efecto significativo sobre estas variables (Altamirano et al., 2018). Luego de descartar un efecto del peso corporal, estos parámetros fueron evaluados con una prueba ANOVA, seguida de un *post-test* de Tukey para realizar una comparación entre todos los grupos experimentales. También se utilizó ANOVA seguido del *post-test* de Tukey para analizar la expresión de proteínas (Ki-67, ESR1, RA). Por otro lado, se utilizó la prueba estadística Kruskal-Wallis seguida del *post-test* de Dunn para evaluar el n° de TEBs y el *score* de desarrollo mamario. Finalmente, para los ensayos de PCR en tiempo real y los análisis de metilación se utilizó el *test* de Mann-Whitney *U*.

4 | Resultados

4.1 | Evaluación del desarrollo de la glándula mamaria en DPN60 en machos expuestos a HBG y GLI

Como fue detallado en el capítulo 3, en DPN60 el tratamiento con la menor dosis de HBG redujo el área total y el perímetro de la glándula mamaria e indujo la persistencia de un mayor n° de TEBs. Para evaluar si los cambios hallados en los animales expuestos al herbicida se debían al principio activo, glifosato, o a los coformulantes o combinación de ambos, se analizaron las glándulas mamarias de animales expuestos a glifosato puro. En el caso de los animales expuestos a GLI, el área y el perímetro de la glándula no presentaron diferencias con respecto a los animales tratados con el herbicida, aunque tampoco fueron estadísticamente diferentes del grupo control. Por otro lado, el n° de TEBs en los machos expuestos a GLI se mantuvo en valores similares al grupo control, siendo menor al grupo HBG (Tabla 14, Figura 31A-C).

Al igual que la glándula mamaria de los animales pertenecientes al grupo HBG, los machos expuestos a GLI presentaron un desarrollo lobuloalveolar característico de ratas macho, con una histología similar al grupo control (Figura 31D-F).

Tabla 14. Análisis de WMs de ratas macho en DPN60 expuestas a HBG y GLI.

	Control	HBG	GLI
Área total (mm ²)*	493.2 ± 25.3 ^a	388.2 ± 13.9 ^b	418.7 ± 21.3 ^{ab}
Perímetro (mm)*	94.1 ± 3.1 ^a	84.2 ± 1.5 ^b	87.3 ± 2.2 ^{ab}
Crecimiento longitudinal (mm)	7.1 ± 0.4	6.4 ± 0.6	7.0 ± 0.4
TEBs (N°)#	0.5 ± 0.2 ^a	2.3 ± 0.7 ^b	0.5 ± 0.2 ^a
Desarrollo mamario (<i>score</i>)	2.6 ± 0.1	2.7 ± 0.1	2.4 ± 0.1

Los valores se expresaron como la media ± SEM de 8-10 ratas macho/grupo. Las medias con diferentes letras difieren significativamente ($p < 0.05$).

*ANOVA *test*, seguido del *post-test* de Tukey

#Kruskal Wallis, seguido del *post-test* de Dunn

TEBs: estructuras terminales (*terminal end buds*).

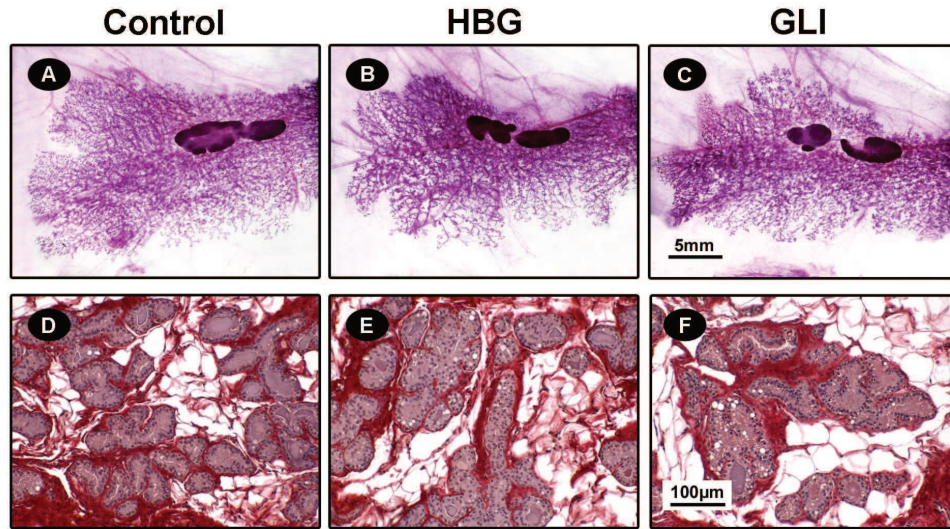


Figura 31. *Glándulas mamarias de machos post-puberales expuestos a HBG y GLI.* Imágenes representativas de WM (A-C) y secciones teñidas con P&H (D-F). Los animales expuestos a GLI no presentaron diferencias en el área y el perímetro evaluados en las WM ni en la histología de la glándula mamaria, con respecto a los animales expuestos al herbicida. Las barras representan la magnificación correspondiente a las imágenes en cada fila.

4.2 | Proliferación y expresión de receptores de hormonas esteroideas en machos expuestos a HBG y GLI en DPN60

Al igual que los machos expuestos a HBG, la proliferación de las estructuras epiteliales no fue alterada por la exposición a GLI (Figura 32A). Además, la expresión proteica y de ARNm de ESR1 fue menor en el grupo de GLI con respecto al control, sin observarse diferencias con el grupo de HBG. En relación a la expresión de proteica de RA, los animales tratados con GLI no presentaron diferencias con respecto a HBG ni al grupo control, aunque la expresión fue mayor en los animales expuestos a HBG con respecto al control. Por otro lado, la expresión de ARNm de RA en los machos expuestos a GLI fue similar a aquellos expuestos al herbicida y menor con respecto al control (Figura 32A, B).

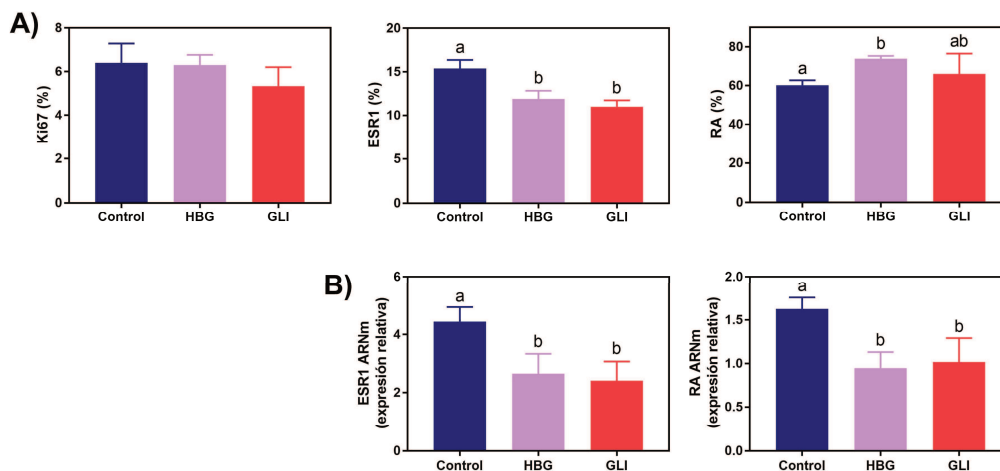


Figura 32. Proliferación y expresión de receptores de hormonas esteroideas en DPN60. (A) Proliferación y expresión proteica de ESR1 y RA en los diferentes grupos experimentales. Las barras representan los valores medios \pm SEM de 6-8 animales por grupo experimental y aquellas con diferentes letras difieren significativamente ($p < 0.05$, ANOVA *test*, seguido del *post-test* de Tukey). (B) Expresión relativa de ARNm de ESR1 y RA; las muestras fueron normalizadas con la expresión de L19. Las barras representan los valores medios \pm SEM de 6-8 machos por grupo experimental y aquellas con diferentes letras difieren significativamente ($p < 0.05$, Mann Whitney *U test*).

4.3 | Abundancia relativa de las variantes transcripcionales de ESR1 y estado de metilación del promotor ESR1-OS en animales tratados con HBG y GLI en DPN60

Debido a que no se observaron diferencias en la expresión de ARNm de ESR1 entre los animales expuestos a GLI y los expuestos a la formulación comercial, se analizó si el uso de los distintos promotores transcripcionales del gen ESR1 también era similar entre ambos grupos. Al igual que en los animales expuestos a HBG, en los machos pertenecientes al grupo de GLI se expresaron los transcritos que contenían los exones OS, O, OT y E1, mientras que no se detectó expresión de la variante que contenía la región ON. La exposición a GLI solo alteró la abundancia relativa de la variante ESR1-OS, generando una disminución en su expresión con respecto al control, y no se observaron diferencias con HBG en ninguno de los transcritos evaluados (Figura 33A). Además, se evaluó el estado de metilación del promotor ESR1-OS para analizar si la disminución en su expresión podría estar asociada a modificaciones en la metilación del mismo, como se observó en el caso de HBG. Se halló un aumento en la metilación del promotor ESR1-OS en los animales expuestos a GLI con respecto al control; sin embargo, ésta fue menor comparada con el grupo HBG (Figura 33B).

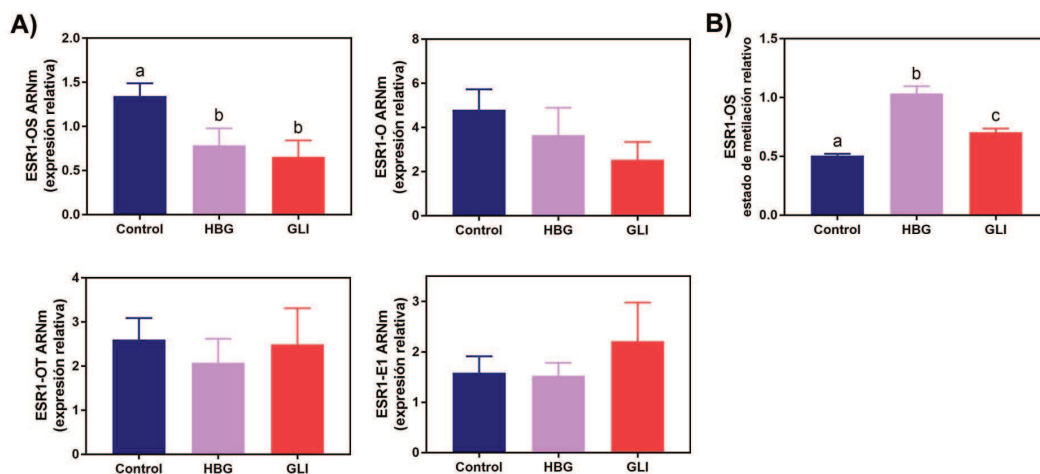


Figura 33. Variantes transcripcionales de ESR1. (A) Expresión relativa de ARNm de las variantes transcripcionales de ESR1; las muestras fueron normalizadas con la expresión de L19. Las barras representan los valores medios \pm SEM de 6-8 machos por grupo experimental y aquellas con diferentes letras difieren significativamente ($p < 0.05$, Mann Whitney *U test*). (B) Estado de metilación relativo del promotor ESR1-OS. Las barras representan los valores medios \pm SEM de un *pool* de 4 muestras cuantificadas por triplicado y aquellas con diferentes letras difieren significativamente ($p < 0.05$, Mann Whitney *U test*).

4.4 | Expresión de genes implicados en el desarrollo mamario en animales expuestos a HBG y GLI en DPN60

Además de la expresión de receptores de hormonas esteroides, se evaluó si existían diferencias en la expresión de ARNm de genes implicados en el desarrollo mamario entre los animales expuestos al principio activo y aquellos expuestos al herbicida. No existieron diferencias en la expresión de ARNm de *Ccnd1* en los machos expuestos a GLI en comparación con los animales expuestos al herbicida o con el grupo control, aunque la expresión fue menor en el grupo HBG con respecto al control. Por otro lado, los machos tratados con GLI presentaron expresiones de EGFR y del receptor de prolactina (PRLR) similares al grupo HBG y una reducción de las mismas comparadas con el grupo control (Figura 34).

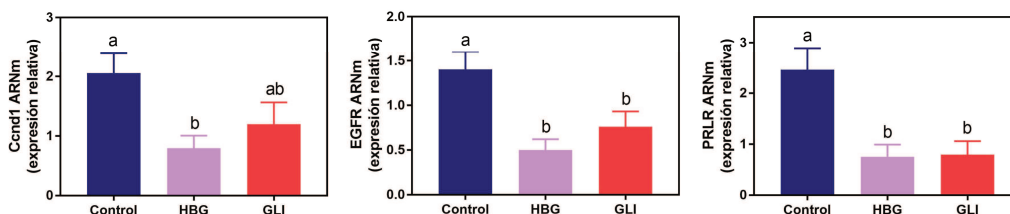


Figura 34. Expresión relativa de ARNm de genes implicados en el desarrollo mamario. Las muestras fueron normalizadas con la expresión de L19. Las barras representan los valores medios \pm SEM de 6-8 machos por grupo experimental y aquellas con diferentes letras difieren significativamente ($p < 0.05$, Mann Whitney *U test*).

5 | *Discusión*

En el capítulo 3 describimos los efectos de la exposición a un HBG sobre la glándula mamaria; sin embargo, como se mencionó anteriormente, estos efectos podían deberse a la acción del principio activo (glifosato), los coformulantes o una combinación de ellos. Numerosos estudios han reportado que los efectos generados por las formulaciones comerciales de HBG son más potentes que aquellos producidos por glifosato puro (Defarge et al., 2016; Johansson et al., 2018; Manservigi et al., 2019; Mesnage & Antoniou, 2018; Mesnage, Defarge, et al., 2015; Nerozzi et al., 2020; Toth et al., 2020). Por lo tanto, para dilucidar si el glifosato es capaz de generar alteraciones similares a las producidas por la exposición a HBG, en el presente capítulo se evaluaron los efectos de la exposición perinatal a glifosato puro sobre el desarrollo de la glándula mamaria de animales post-puberales.

En la mayoría de los parámetros evaluados, los efectos ocasionados por GLI fueron similares a los producidos por el herbicida, aunque en algunos casos fueron más leves. En cuanto al crecimiento de la glándula, el área y el perímetro de la misma no difirieron del grupo control, pero tampoco de los animales expuestos a HBG. Al igual que sucedió con la exposición a HBG, GLI no modificó la proliferación epitelial, redujo la expresión proteica y de ARNm de ESR1 y disminuyó la expresión de ARNm de RA. Sin embargo, la expresión proteica de RA en el grupo GLI no fue diferente al grupo control ni a los animales expuestos a HBG, presentando un valor intermedio a ambos grupos experimentales. Este menor aumento en la expresión de RA podría explicar, en parte, los efectos más leves observados en el área y perímetro de la glándula mamaria de los animales expuestos a GLI, comparado con los machos expuestos al herbicida. En este sentido, se ha observado que el tratamiento con andrógenos reduce el crecimiento ductal en la glándula mamaria de ratonas post-puberales (Peters et al., 2011). Por otro lado, en la glándula mamaria de ratas macho se ha reportado que el metoxicloro, cuyo principal metabolito es agonista de ESR1 y antagonista de RA, genera un mayor crecimiento longitudinal de la glándula (Wang et al., 2006), mientras que endosulfán induce una disminución de la expresión de RA asociada a una mayor proliferación, sugiriendo un efecto inhibitorio de los andrógenos (Altamirano et al., 2018).

Del mismo modo que HBG, GLI redujo la expresión de la variante transcripcional ESR1-OS, sin modificar la expresión del resto de las variantes (ESR1-O, -OT, -E1). Además, aumentó el estado de metilación del ADN en la región ESR1-OS comparado con el grupo control, aunque este aumento fue menor al generado por HBG. Si bien existieron diferencias en el grado de metilación inducido por GLI y HBG, ambos generaron el mismo efecto en la expresión del transcripto ESR1-OS. En este sentido, el grado de metilación inducido por GLI podría ser suficiente para reducir la expresión de la variante u otros mecanismos de regulación podrían estar implicados; por ejemplo, se ha reportado que las modificaciones post-traduccionales de las histonas también pueden afectar a la expresión de las variantes de ESR1 (Lorenz et al., 2019).

En este capítulo se evaluó también la expresión de diferentes genes implicados en la regulación del desarrollo mamario. En el caso de *Ccnd1*, ésta se halló disminuida en HBG, mientras que *GLI* no presentó diferencias entre los animales tratados con el herbicida y los controles. Se sabe que *Ccnd1* es inducida por E2 (Prall et al., 1997) y es necesaria en la señalización de ESR1. Además, ratonas deficientes en *Ccnd1* presentaron un menor crecimiento en respuesta al tratamiento con E2 (Casimiro et al., 2013). En este sentido, los resultados hallados en *Ccnd1* también podrían explicar las diferencias observadas en el crecimiento de la glándula mamaria entre glifosato puro y HBG. Por otro lado, tanto HBG como *GLI* ocasionaron una reducción en la expresión de *EGFR* y *PRLR*. La disminución en la expresión de *EGFR* podría estar asociada con la disminución del área hallada en la glándula mamaria de estos grupos experimentales, ya que se ha demostrado que la expresión del mismo en el estroma es esencial para la morfogénesis ductal de la glándula mamaria (Sternlicht, 2006; Sternlicht & Sunnarborg, 2008; Wiesen et al., 1999). En cuanto a los efectos generados en la expresión de *PRLR*, si bien en ratones hembra se ha observado que *PRL* no afecta al desarrollo ductal (Briskin et al., 1999), en machos se ha reportado que esta hormona es capaz de inducir una elongación de los conductos mamaros (Arendt & Schuler, 2008).

Finalmente, nuevos estudios en estadios pre-puberales o durante la pubertad serían necesarios para evaluar si existen diferencias entre los efectos generados por glifosato puro y HBG, que no son detectadas luego de la pubertad. Como señaló Mesnage, Defarge, et al. (2015), los adyuvantes presentes en las formulaciones comerciales pueden tener su propia toxicidad, aunque también pueden aumentar la toxicidad de glifosato. En relación a esto, ciertos estudios han reportado que las formulaciones comerciales de HBG generan efectos más pronunciados que el glifosato puro (Defarge et al., 2016; Manservisi et al., 2019; Mesnage & Antoniou, 2018; Mesnage, Defarge, et al., 2015; Nerozzi et al., 2020), mientras que otros han hallado mayores efectos con una exposición a glifosato (Pham et al., 2019) o no han encontrado diferencias entre la acción del herbicida y el compuesto activo en los parámetros evaluados (Lorenz et al., 2020). En base a los resultados hallados en este capítulo, los efectos observados podrían deberse principalmente al compuesto activo, aunque serían potenciados por los adyuvantes presentes en la formulación comercial. Sin embargo, como se mencionó en el capítulo 2, los valores séricos de glifosato en las madres F0 tratadas con *GLI* fueron menores a los encontrados en el tratamiento con HBG, por lo que no puede descartarse que los efectos observados en los animales expuestos solo al principio activo sean menos pronunciados debido a una menor concentración sérica de glifosato.

CAPÍTULO 5

***EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN PERINATAL A
GLIFOSATO, PROPICONAZOLE Y LA MEZCLA DE
AMBOS FITOSANITARIOS SOBRE EL DESARROLLO DE
LA GLÁNDULA MAMARIA***

*“El científico no es aquella persona que
da las respuestas correctas, sino aquél
quien hace las preguntas correctas”*

Claude Lévi-Strauss

1 | Introducción

1.1 | Exposición a mezclas de compuestos

En los capítulos anteriores se abordaron los efectos generados por la exposición a glifosato o a una formulación comercial (HBG) sobre la glándula mamaria. Sin embargo, en una situación real, la población general se encuentra expuesta a un amplio rango y número de químicos a través del medioambiente, lo que ha generado interrogantes acerca de los potenciales efectos adversos que pueden producirse cuando distintos químicos se encuentran de manera conjunta. Aunque durante décadas la toxicología y la evaluación de riesgos se han enfocado en los efectos de compuestos individuales sobre la salud humana, recientemente, se ha advertido acerca de la necesidad de evaluar la acción que presentan las mezclas de compuestos sobre la salud, más allá de los efectos que pueden generar individualmente (Carlin et al., 2013; WHO, 2017). En relación con esto, distintos efectos pueden observarse cuando se produce la exposición a una mezcla de compuestos y se detallan a continuación.

1.1.1 | Efectos de compuestos químicos en una mezcla

Tres tipos de acciones han sido identificadas para las mezclas de compuestos (revisado en Hernandez et al., 2017; WHO, 2017):

- **Adición de la dosis o concentración:** Este tipo de comportamiento puede producirse cuando los componentes individuales de la mezcla comparten un mecanismo de acción similar. En este caso los efectos generados por la mezcla pueden estimarse por la suma de las dosis o concentraciones, teniendo en cuenta la potencia relativa de las sustancias individuales. Debido a este efecto aditivo, la exposición a estas mezclas puede presentar un riesgo a la salud, aunque los constituyentes individuales se encuentren en niveles menores a la dosis NOAEL.
- **Acción independiente:** Este tipo de acción se observa con compuestos que presentan mecanismos de acción diferentes y, por lo tanto, los efectos de la mezcla pueden estimarse a partir de las respuestas generadas por los compuestos individuales. En este caso no se considera que la exposición a la mezcla conlleve un riesgo a la salud, mientras las concentraciones de los compuestos individuales se encuentren por debajo de las dosis NOAEL.
- **Interacción (sinergismo o antagonismo):** Esta situación se produce cuando la mezcla de compuestos afecta a la toxicidad de los compuestos individuales, por lo que los efectos de la mezcla pueden desviarse de las predicciones de adición. En este caso los efectos generados por la combinación de compuestos pueden clasificarse como antagónicos (menor al efecto aditivo) o sinérgicos (mayores al efecto aditivo). Las interacciones pueden ocurrir a nivel toxicocinético o toxicodinámico. Las interacciones toxicocinéticas ocurren cuando un químico

modifica la absorción, distribución, metabolismo o eliminación de otro compuesto presente en la mezcla. Por otro lado, las interacciones toxicodinámicas se deben a interacciones en las respuestas biológicas de los compuestos, como por ejemplo, la unión al mismo sitio de un receptor o la acción sobre distintos blancos dentro de una misma vía metabólica.

1.2 | Exposición a propiconazole

Como se describió en la introducción, el propiconazole es un fungicida del grupo de los triazoles, ampliamente utilizado para tratar enfermedades causadas por hongos en diversos cultivos (EFSA et al., 2017; EPA, 2015c). Recientemente, el uso de este pesticida ha sido prohibido por la EFSA (EFSA et al., 2021), mientras que en Argentina continúa aprobado para su uso sobre diversos cultivos alimentarios (SENASA, 2020, 2021). Aunque los estudios acerca de la ocurrencia de propiconazole en el medioambiente son escasos, en Argentina éste ha sido detectado en cursos de agua (Williman et al., 2017). Por otro lado, previamente se describieron los efectos de la exposición a propiconazole observados en estudios *in vivo* e *in vitro* (Costa et al., 2015; Goetz et al., 2007; Kjaerstad, Taxvig, Andersen, et al., 2010; Kjeldsen et al., 2013; Taxvig et al., 2013; Vieira et al., 2017) y, aunque se ha analizado su efecto sobre líneas celulares de cáncer de mama (Kjaerstad, Taxvig, Nellemann, et al., 2010), el efecto de una exposición *in vivo* a este compuesto sobre la glándula mamaria no ha sido evaluado.

Como se mencionó en la introducción, el propiconazole es utilizado principalmente en cereales y cítricos (EPA, 2006). Sin embargo, también puede ser utilizado en los cultivos de soja para controlar la roya de la soja (Juliatti et al., 2017), y por lo tanto utilizarse conjuntamente con glifosato. Además, estos agroquímicos pueden encontrarse tanto en cursos de agua (Battaglin et al., 2011; Mas et al., 2020; Ronco et al., 2016; Williman et al., 2017) como en diversos alimentos (EFSA et al., 2020; EPA, 2019; Martins-Gomes et al., 2022; Myers et al., 2016; Xu et al., 2019) y, por lo tanto, generar una exposición ambiental a ambos. Debido a lo expuesto anteriormente, en este capítulo decidimos evaluar los efectos de la exposición perinatal a glifosato, propiconazole y la mezcla de los mismos, sobre la glándula mamaria de los machos F1.

2 | Objetivos específicos

Analizar si la exposición perinatal a glifosato ó propiconazole resulta en alteraciones histológicas de la glándula mamaria de ratas macho. Se evaluó el desarrollo mamario, la presencia y/o persistencia de estructuras inmaduras para la edad y lesiones mamarias (hiperplasias lobuloalveolares y ductales). El desarrollo lobuloalveolar en las secciones histológicas se evaluó aplicando un *score*.

Evaluar si la exposición in utero y durante la lactancia a glifosato ó propiconazole modifica el microambiente endócrino de la glándula mamaria en las etapas pre- y post-puberal. Se analizó

la expresión mamaria de los receptores de hormonas esteroides, sus vías de señalización (i.e.: Ccnd1, p-Erk1/2) y la enzima aromatasa.

Investigar si la exposición a la mezcla de fitosanitarios potencia los efectos producidos por los compuestos individuales analizando el desarrollo morfológico de la glándula mamaria y su microambiente hormonal. Se evaluaron los parámetros enumerados en los objetivos anteriores.

3 | Materiales y métodos

En este capítulo se evaluaron los efectos de la exposición perinatal a GLI, PRO y PROGLI sobre la glándula mamaria de los machos F1 en DPN21 y DPN60. Las determinaciones realizadas en cada día de estudio se detallan en la Figura 35. Las metodologías que se utilizaron para realizar las determinaciones mencionadas en la Figura 35 fueron descritas en la sección de materiales y métodos (WMs: sección 6, Análisis histológico: sección 7, inmunohistoquímica: sección 8, PCR en tiempo real: sección 9).

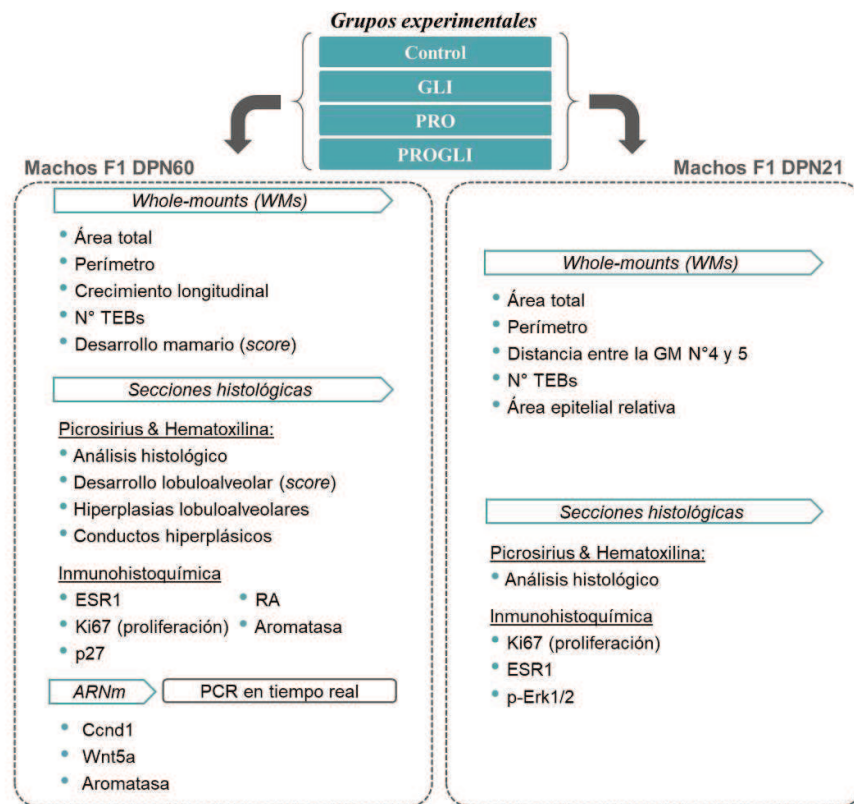


Figura 35. Determinaciones realizadas en la glándula mamaria de los machos F1 expuestos a GLI, PRO y PROGLI en DPN60 y DPN21. Control: animales expuestos a la dieta control, a aceite de sésamo por vía intragástrica y a ambos (dieta control y aceite de sésamo). ESR1: Receptor de estrógenos alfa, RA: Receptor de andrógenos, GM: glándula mamaria, p-Erk1/2: quinasa regulada por señales extracelulares 1/2 fosforilada, Ccnd1: Ciclina D1.

3.1 | Evaluación de la histología de la glándula mamaria

En las muestras teñidas con P&H se evaluó el desarrollo ductal y lobuloalveolar y la presencia de lesiones mamarias (Durando et al., 2007; Mandrup et al., 2015). Además, se realizaron las siguientes determinaciones en DPN60:

- Score de desarrollo lobuloalveolar: Las muestras de glándula mamaria fueron clasificadas con un *score* subjetivo en una escala del 1 al 4. El valor de 4 correspondió al mayor desarrollo lobuloalveolar. Para llevar a cabo la clasificación se consideró tanto el tamaño de las estructuras lobuloalveolares como la proporción de la glándula que ocupaban las mismas. Una vez determinado el *score*, los machos se dividieron en aquellos que presentaban un *score* de 1-2 y aquellos con un *score* 3-4.
- Presencia de hiperplasias lobuloalveolares: Se consideraron como hiperplasias lobuloalveolares a estructuras lobulares tamaño aumentado, que podían contener mayor número de alvéolos, mayor número de capas celulares o alvéolos dilatados (Eighmy et al., 2018; Rudmann et al., 2012).
- Presencia de conductos hiperplásicos: Se consideraron como conductos hiperplásicos a aquellos que presentaban tres o más capas de células epiteliales (Mandrup et al., 2015). Se determinó el número de conductos hiperplásicos presentes en la glándula, en dos profundidades diferentes, y los machos se dividieron en aquellos que presentaban 2 o menos conductos hiperplásicos y aquellos que presentaban más de 2.

3.2 | Cuantificación de proteínas evaluadas por inmunohistoquímica

En DPN60 se analizó la expresión de ESR1, Ki67, RA y p27 en las células epiteliales. En DPN21, se determinó la expresión de ESR1 y Ki67; esta última determinación se realizó de manera diferenciada en conductos y alveolos, por un lado, y TEBs por otro lado. Además, en este día se determinó el porcentaje de células con marcación nuclear para p-Erk1/2 en los conductos. En todos los casos se cuantificó el porcentaje de células positivas, contando como mínimo 2000 células por muestra experimental. Para la determinación de Ki67 en ambos días estudiados se utilizó el anticuerpo primario anti-Ki67 generado en el ISAL.

Por otro lado, la expresión de aromatasa en DPN60 y la marcación de p-Erk1/2 en el estroma que rodea los TEBs en DPN21 se evaluó a partir de la determinación de densidad óptica integrada (DOI). Esta determinación se realizó mediante análisis digital de imágenes, utilizando el *software* Image J, y se describió previamente en el capítulo 3, sección 3.2. La cuantificación de aromatasa se realizó en las estructuras epiteliales, eliminando el lumen de las mismas (Figura 36A). Por otro lado, en el caso de la marcación de p-Erk1/2 en el estroma que rodea los TEBs, se definió un área

que se extendía 10 μm alrededor de los TEBS, utilizando la opción “*make band*” provista por el *software* (Figura 36B).

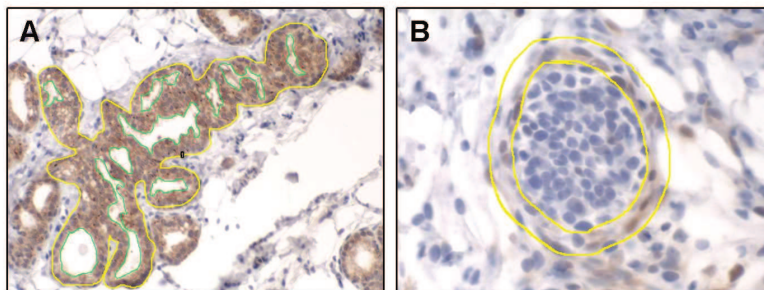


Figura 36. Áreas seleccionadas para la determinación de DOI. (A) Área seleccionada para la cuantificación de aromatasa; en amarillo la estructura epitelial, en verde los lúmenes que se eliminan de la selección. (B) Área seleccionada para la cuantificación de p-Erk1/2 en el estroma alrededor de los TEBS (amarillo).

3.3 | Análisis estadístico

Los parámetros determinados en las WMs, área total, perímetro, distancia entre la glándula mamaria N° 4 y 5 y crecimiento longitudinal, fueron evaluados utilizando un modelo lineal con el tratamiento y el peso como variables independientes (parámetro evaluado \sim tratamiento + peso), para analizar si el peso corporal tenía un efecto significativo sobre estos parámetros (Altamirano et al., 2018). Luego de descartar un efecto del peso corporal, estos parámetros fueron evaluados con una prueba ANOVA, seguida de un *post-test* de Tukey para realizar la comparación entre los distintos grupos experimentales. También se utilizó ANOVA seguido del *post-test* de Tukey para analizar el área epitelial relativa evaluada en WMs y la expresión de proteínas (ESR1, Ki67, RA, aromatasa y p-Erk1/2 en los conductos). Por otro lado, se utilizó la prueba estadística Kruskal-Wallis seguida del *post-test* de Dunn para evaluar el n° de TEBS, el *score* de desarrollo mamario en WM y la marcación de p-Erk1/2 alrededor de los TEBS. Para el análisis del *score* de desarrollo lobuloalveolar y la presencia de conductos hiperplásicos se utilizó el *test* de Fisher, mientras que para los ensayos de PCR en tiempo real se utilizó el *test* de Mann-Whitney *U*.

4 | Resultados

4.1 | Evaluación del desarrollo y crecimiento de la glándula mamaria de machos pre- y post-puberales pertenecientes a los grupos experimentales GLI, PRO y PROGLI

En los animales pre- y post-puberales se realizó el análisis de las WMs, de manera de evaluar el desarrollo y crecimiento de la glándula mamaria. Dado que los animales expuestos a la dieta control, al aceite de sésamo por vía intragástrica o a ambos no presentaron diferencias en los parámetros asociados al modelo experimental (detallados en el capítulo 2), ni en las variables evaluadas en las WMs, éstos fueron unificados en un único grupo control. En DPN21, los machos expuestos a PROGLI presentaron una reducción en el área de la glándula mamaria y un aumento

de la distancia entre la glándula N° 4 y 5, con respecto al grupo control y GLI, mientras que en los animales expuestos a PRO estos parámetros no fueron diferentes a ninguno de los grupos experimentales. Además, en los machos expuestos a GLI se observó un aumento en el n° de TEBs en comparación con los animales expuestos a PRO (Tabla 15).

Por otro lado, en DPN60, la exposición a GLI disminuyó el área de la glándula mamaria en comparación con el grupo control. A diferencia de lo observado en DPN21, en los animales post-puberales el tratamiento con PROGLI no modificó el área de la glándula mamaria. Los demás parámetros evaluados en las WMs fueron similares entre los distintos grupos experimentales (Tabla 15, Figura 37).

Tabla 15. Análisis de WMs de ratas macho expuestas a GLI, PRO y PROGLI.

	Control	GLI	PRO	PROGLI
DPN21				
Área total (mm ²)*	27.31 ± 1.69 ^a	27.32 ± 2.85 ^a	23.42 ± 2.06 ^{ab}	18.16 ± 1.07 ^b
Perímetro (mm)	27.24 ± 1.04	25.50 ± 1.81	24.78 ± 1.43	23.84 ± 1.10
Distancia entre la glándula mamaria N° 4 y 5 (mm)*	1.84 ± 0.31 ^a	1.39 ± 0.43 ^a	2.39 ± 0.33 ^{ab}	3.42 ± 0.27 ^b
TEBs (N°)#	1.80 ± 0.74 ^{ab}	7.36 ± 1.90 ^a	1.30 ± 0.40 ^b	3.09 ± 0.82 ^{ab}
Área epitelial relativa (%)	31.04 ± 1.03	32.69 ± 1.16	33.47 ± 1.95	32.90 ± 1.07
DPN60				
Área total (mm ²)*	492.0 ± 15.8 ^a	418.7 ± 21.3 ^b	435.9 ± 17.0 ^{ab}	472.5 ± 18.9 ^{ab}
Perímetro (mm)	94.1 ± 1.9	87.3 ± 2.2	94.8 ± 3.1	87.4 ± 2.6
Crecimiento longitudinal (mm)	7.0 ± 0.3	7.0 ± 0.4	7.0 ± 0.5	7.4 ± 0.5
TEBs (N°)	0.8 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.9 ± 0.4	1.0 ± 0.3
Desarrollo mamario (<i>score</i>)	2.5 ± 0.1	2.4 ± 0.1	2.4 ± 0.1	2.1 ± 0.2

Los valores se expresaron como la media ± SEM. En el grupo control se analizaron 23 WMs de machos/día, mientras que en los demás grupos experimentales se evaluaron 8-11 animales/grupo/día. Las medias con diferentes letras difieren significativamente (p<0.05).

* ANOVA *test*, seguido del *post-test* de Tukey

#Kruskal Wallis, seguido del *post-test* de Dunn

TEBs: estructuras terminales (*terminal end buds*).

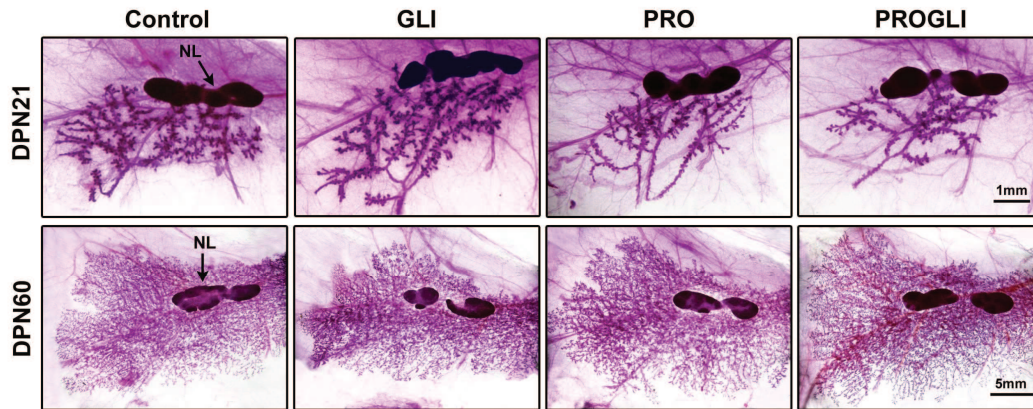


Figura 37. WMs de glándulas mamarias de machos pre- y post-puberales expuestos a GLI, PRO y PROGLI. Imágenes representativas de WM de animales en DPN21 y DPN60. En DPN21 los animales expuestos a PROGLI presentaron un área reducida con respecto a los animales controles. En DPN60, la glándula mamaria de los machos expuestos a GLI presentó una menor área en comparación con el grupo control. NL: nódulo linfático. Las barras representan la magnificación correspondiente a las imágenes en cada fila.

4.2 | Análisis del desarrollo mamario de machos post-puberales expuestos a GLI, PRO y PROGLI

4.2.1 | Análisis histológico de la glándula mamaria en DPN60

En DPN60, la glándula mamaria de los animales presentó un desarrollo de tipo lobuloalveolar, característico de ratas macho, independientemente del grupo experimental. Sin embargo, los animales expuestos a PRO presentaron un mayor desarrollo lobuloalveolar, con estructuras de gran tamaño que ocupaban una mayor proporción de la glándula mamaria (Figura 38A). Este desarrollo se evaluó utilizando un *score* (con una escala subjetiva de 1 a 4) y se encontró que un mayor porcentaje de los machos expuestos a PRO presentaron un *score* de 3-4, en comparación con el grupo control. En el caso de los animales expuestos a la mezcla de agroquímicos, éstos no presentaron diferencias con el grupo control ni con la exposición a PRO (Figura 38B).

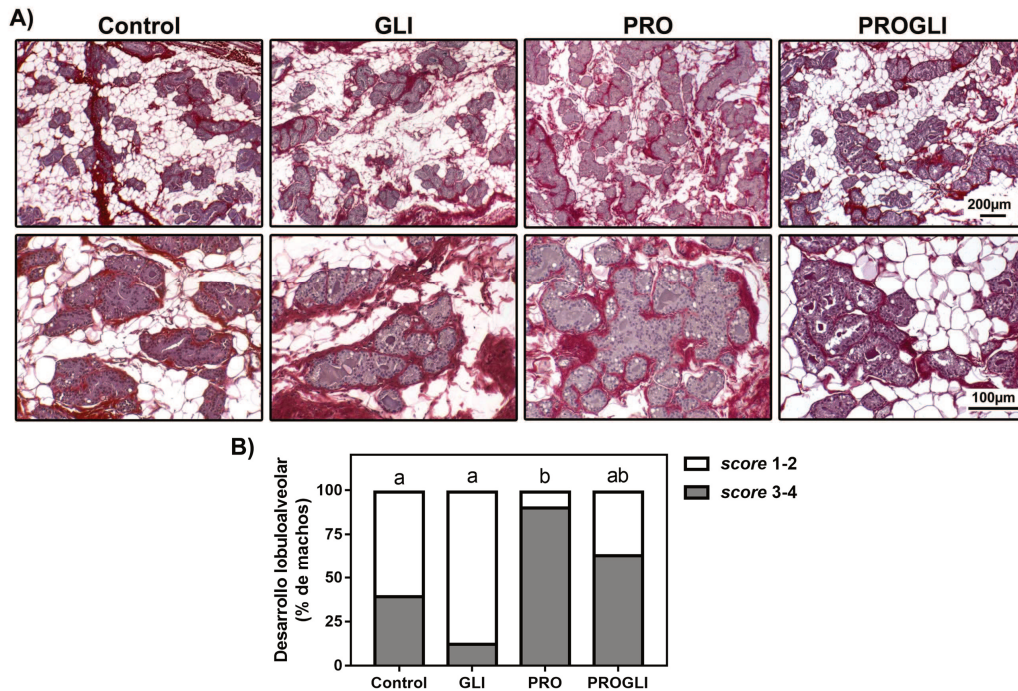


Figura 38. Histología de la glándula mamaria de machos post-puberales expuestos a GLI, PRO y PROGLI. (A) Imágenes representativas de la glándula mamaria de los animales control y expuestos a GLI, PRO y PROGLI teñidas con P&H en DPN60. Las barras representan la magnificación correspondiente a las imágenes en cada fila. Los machos expuestos a PRO presentaron un mayor desarrollo lobuloalveolar, mientras que no se observaron diferencias entre los demás grupos experimentales. (B) *Score* de desarrollo lobuloalveolar. Se utilizó una escala subjetiva del 1 al 4, en donde 4 representó el mayor nivel de desarrollo lobuloalveolar. Las barras representan el porcentaje de machos que presentaron un *score* 1-2 y aquellos con un *score* 3-4. Las distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$, *test* de Fisher).

A partir del análisis de la histología mamaria también se evidenció la presencia de hiperplasias lobuloalveolares en los animales expuestos a PRO (3 de 11 animales) y PROGLI (1 de 11 animales) (Figura 39A). Este tipo de estructura no fue observada en los animales controles (0 de 23 animales) ni expuestos a GLI (0 de 8 animales). Por otro lado, no se hallaron diferencias en la presencia de conductos hiperplásicos entre los distintos grupos experimentales (Figura 39B).

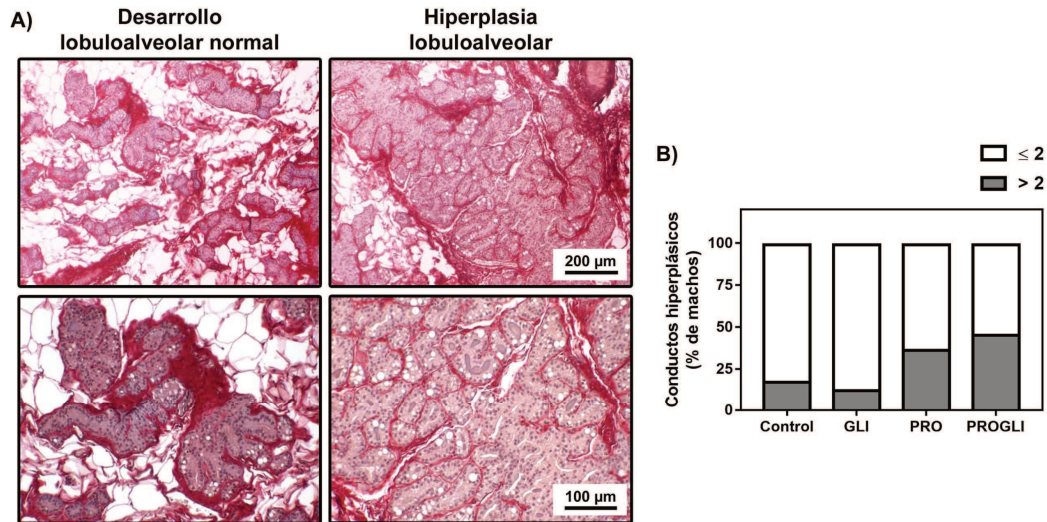


Figura 39. Hiperplasias lobuloalveolares y ductales. (A) Imágenes representativas de P&H de desarrollo lobuloalveolar normal y de hiperplasia lobuloalveolar en dos magnificaciones (las imágenes en cada fila presentan el mismo aumento). (B) Cuantificación de conductos hiperplásicos. Las barras representan el porcentaje de machos que presentaron dos o menos conductos hiperplásicos y aquellos que presentaron más de dos (*test* de Fisher).

4.2.2 | Expresión de genes implicados en la regulación del desarrollo mamario y el ciclo celular en animales post-puberales

Se determinó la expresión proteica de ESR1, la proliferación celular (Ki67) y la expresión de genes implicados en la regulación del ciclo celular, para evaluar si modificaciones en los mismos podían explicar las diferencias en el desarrollo mamario observado en los machos post-puberales. La expresión de ESR1 se encontró disminuida en los animales expuestos a GLI, mientras que en los machos PROGLI ésta no fue diferente al control ni a GLI (Figura 40A, B). Sin embargo, no se observaron diferencias en la proliferación celular de las células epiteliales entre los distintos grupos experimentales (Figura 40C). Por otro lado, la expresión proteica de p27 y de ARNm de Cnd1, ambos implicados en la regulación del ciclo celular, fueron similares entre el control y los animales expuestos a los fitosanitarios (Figura 40C, D).

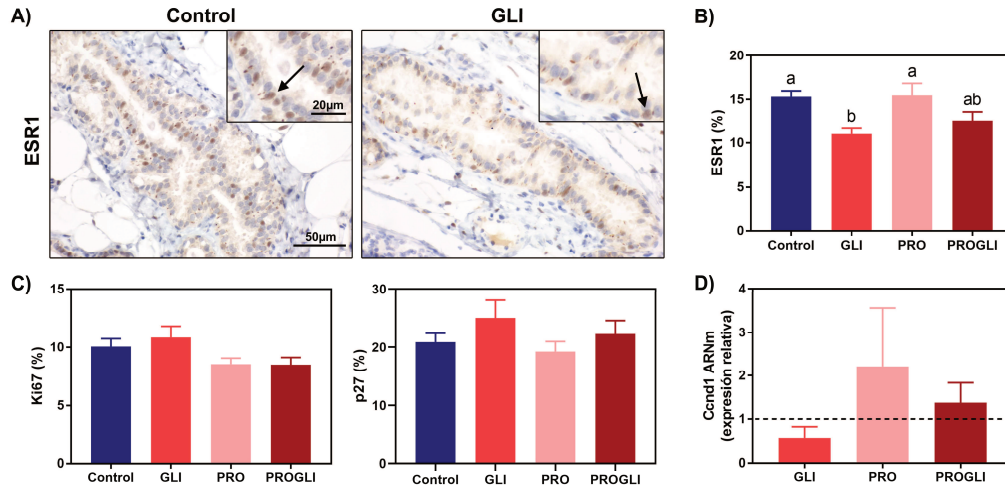


Figura 40. Expresión de ESR1, proliferación y genes implicados en el ciclo celular. (A) Imágenes representativas de la inmunomarcación de ESR1 e *insets* con mayor aumento de los animales pertenecientes al grupo control y GLI, las flechas indican las células positivas. Las imágenes y los *insets* presentan la misma magnificación en ambos grupos experimentales. (B) Expresión proteica de ESR1, las barras representan el porcentaje de células positivas para ESR1 y las distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$, ANOVA seguido del *post-test* de Tukey). (C) Proliferación (Ki67) y expresión proteica de p27, las barras representan el porcentaje de células positivas para Ki67 y p27. En todos los casos (B y C) se representa el valor medio \pm SEM de 6-8 animales por grupo experimental. (D) Expresión relativa de ARNm de Cnd1. Las barras representan los valores medios \pm SEM de 5-6 machos por grupo experimental. Las muestras fueron normalizadas con la expresión de L19 y el grupo control (Mann-Whitney *U test*).

También se evaluó la expresión proteica de RA y los niveles de ARNm de Wnt5a, molécula inhibidora del desarrollo mamario, en la glándula mamaria de los machos post-puberales, sin encontrarse diferencias entre los distintos grupos experimentales (Figura 41).

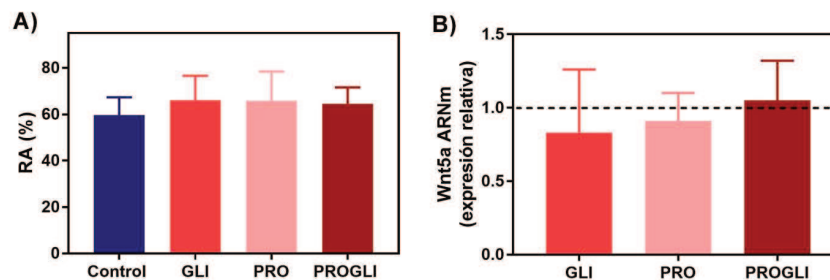


Figura 41. Expresión de RA y Wnt5a. (A) Porcentaje de células positivas para RA, las barras representan el valor medio \pm SEM de 6-8 animales por grupo experimental (ANOVA seguido del *post-test* de Tukey). (B) Expresión relativa de ARNm de Wnt5a. Las barras representan los valores medios \pm SEM de 5-6 machos por grupo experimental. Las muestras fueron normalizadas con la expresión de L19 y el grupo control (Mann-Whitney *U test*).

4.2.3 | Expresión de aromatasa en la glándula mamaria en DPN60

Debido a las alteraciones observadas en la expresión de ESR1, se evaluó la expresión proteica y de ARNm de aromatasa. Se observó una expresión citoplasmática de aromatasa en las células epiteliales de las estructuras mamarias en todos los grupos experimentales. Sin embargo, los animales expuestos a GLI presentaron una mayor expresión proteica de aromatasa, mientras que

en el caso de la expresión de ARNm el aumento observado no fue estadísticamente significativo. Por otro lado, no existieron diferencias en la expresión proteica ni de ARNm entre el control y los animales expuestos a PRO y PROGLI (Figura 42).

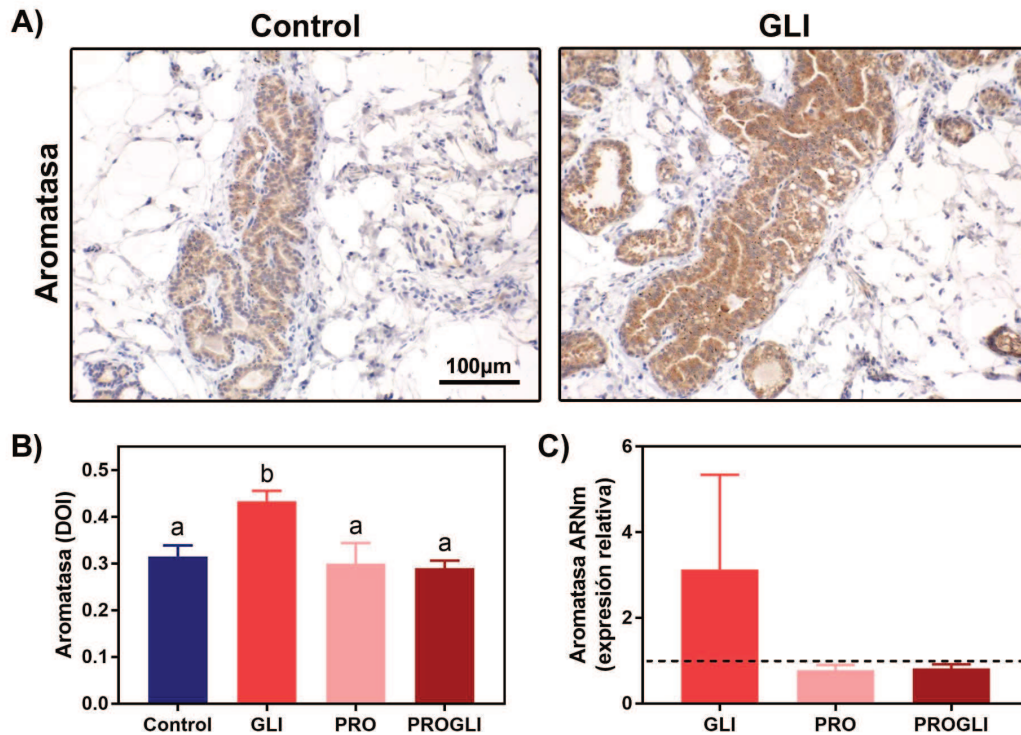


Figura 42. Expresión de aromatasa. (A) Imágenes representativas de la inmunomarcación de aromatasa de los animales controles y expuestos a GLI. Las imágenes presentan la misma magnificación. (B) Cuantificación de la expresión de aromatasa. DOI: Densidad óptica integrada. Las barras representan los valores medios \pm SEM de 6-8 animales por grupo experimental y las distintas letras indican diferencias significativas (ANOVA seguido del *post-test* de Tukey). (C) Expresión relativa de ARNm de aromatasa. Las barras representan los valores medios \pm SEM de 5-6 machos por grupo experimental. Las muestras fueron normalizadas con la expresión de L19 y el grupo control (Mann-Whitney *U test*).

4.3 | Análisis del desarrollo mamario en machos pre-puberales expuestos a GLI, PRO y PROGLI

4.3.1 | Análisis histológico de la glándula mamaria en machos pre-puberales

Al igual que lo descrito anteriormente en el capítulo 3, en glándula mamaria de los machos pre-puberales se evidenció la presencia de conductos, TEBs y pequeños alvéolos. A pesar de observarse una reducción en el área de la glándula en las WMs en los animales expuestos a PROGLI en DPN21, no se hallaron diferencias en el desarrollo de las estructuras epiteliales ni en el estroma de la glándula mamaria entre los distintos grupos experimentales (Figura 43).

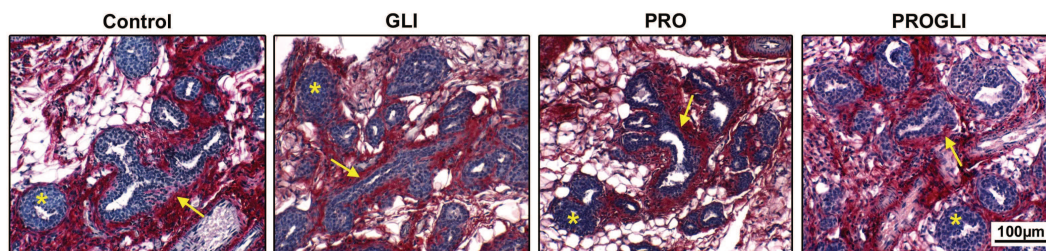


Figura 43. Histología de la glándula mamaria de machos pre-puberales expuestos a GLI, PRO y PROGLI. Imágenes representativas de glándula mamaria teñidas con P&H, se observaron estructuras similares en todos los grupos experimentales. Los conductos se encuentran indicados por flechas y los TEBs se indican con un asterisco (*). Todas las imágenes presentan la misma magnificación.

4.3.2 | Proliferación y expresión de ESR1 en DPN21

Aunque no se hallaron modificaciones en la histología de la glándula de los animales expuestos a fitosanitarios en DPN21, se determinó la proliferación celular y la expresión de ESR1 en esta edad, con el objetivo de evaluar si existen alteraciones que puedan explicar los cambios observados en los animales post-puberales. En este sentido, en los machos expuestos a GLI se redujo la proliferación de las células epiteliales de conductos y alvéolos, mientras que en los animales expuestos a PROGLI no fue diferente al grupo control ni a GLI. Por otro lado, no se observaron diferencias en la proliferación en los TEBs ni en la expresión de ESR1 entre los distintos grupos experimentales (Figura 44).

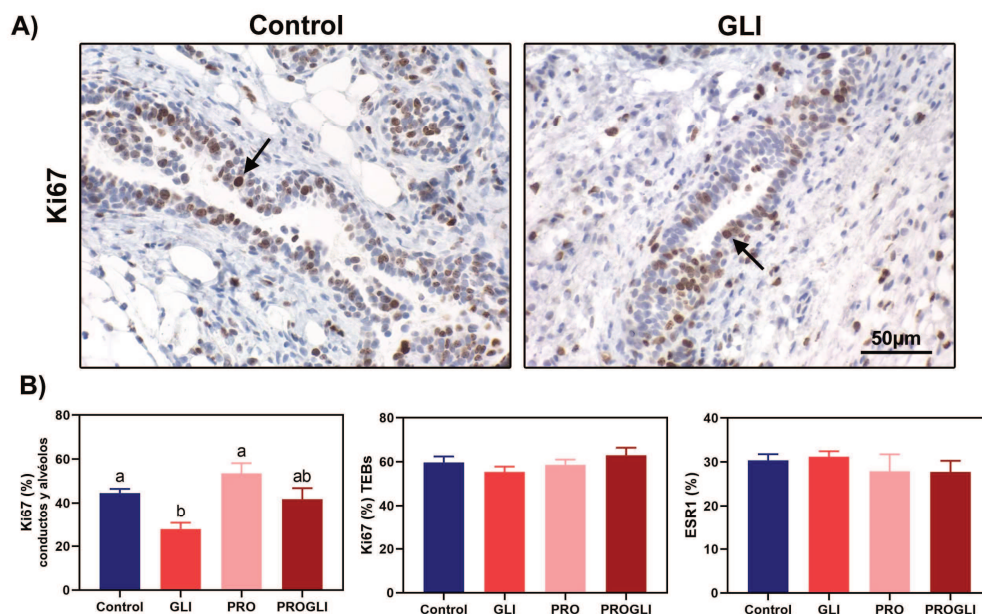


Figura 44. Proliferación y expresión de ESR1. (A) Imágenes representativas de conductos inmunomarcados para Ki67 en machos del grupo control y GLI, las flechas indican las células positivas. Las imágenes presentan la misma magnificación. (B) Expresión proteica de Ki67 y ESR1, las barras representan el porcentaje de células positivas para Ki67 (en conductos y alvéolos y en TEBs) y para ESR1. Las distintas letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$, ANOVA seguido del *post-test* de Tukey). En todos los casos se representa el valor medio \pm SEM de 6 animales por grupo experimental.

4.3.3 | Fosforilación de Erk1/2 en machos pre-puberales

Finalmente se evaluó la presencia de p-Erk1/2, implicado en procesos de proliferación y diferenciación celular, en la glándula mamaria de los animales pre-puberales. Se observó un aumento de la marcación nuclear de p-Erk1/2 en las células epiteliales de los conductos en los animales expuestos a PRO en comparación con los demás grupos experimentales, mientras que no se hallaron diferencias en la marcación citoplasmática y nuclear de p-Erk1/2 en el estroma alrededor de los TEBs entre los distintos grupos experimentales (Figura 45).

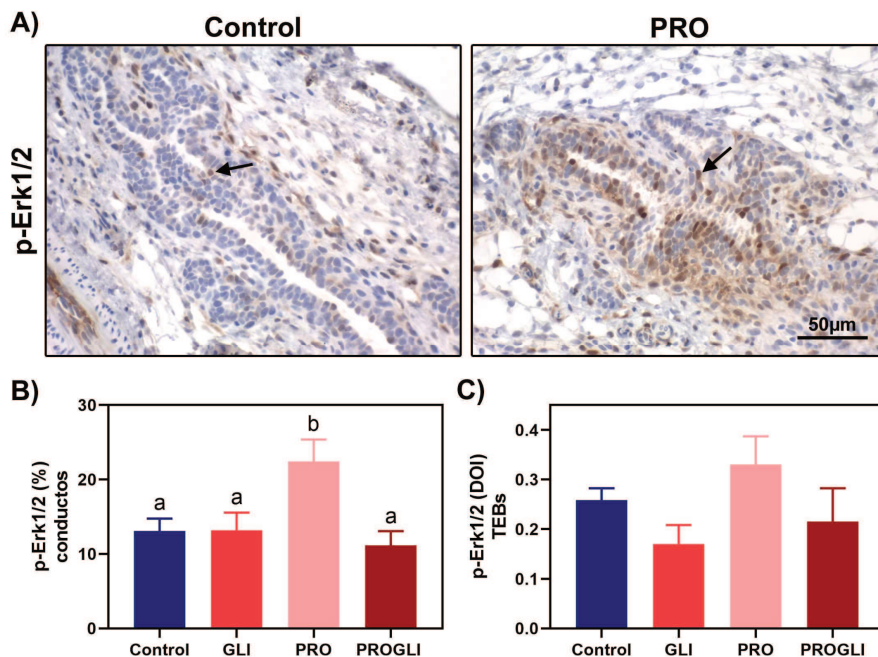


Figura 45. Inmunomarcación de p-Erk1/2. (A) Imágenes representativas de conductos inmunomarcados para p-Erk1/2 en animales controles y expuestos a PRO, las flechas indican las células positivas. Las imágenes presentan la misma magnificación. (B) Porcentaje de células epiteliales con marcación nuclear positiva para p-Erk1/2, las barras representan el valor medio \pm SEM de 6 animales por grupo experimental (ANOVA seguido del *post-test* de Tukey). (C) Cuantificación de la marcación citoplasmática y nuclear de p-Erk1/2 en el estroma alrededor de los TEBs. DOI: Densidad óptica integrada. Las barras representan los valores medios \pm SEM de 6 animales por grupo experimental (Kruskal-Wallis seguido por el *post-test* de Dunn).

5 | Discusión

Como se mencionó en la introducción, existe el riesgo de exposición ambiental a glifosato y propiconazole (Battaglin et al., 2011; Mas et al., 2020; Ronco et al., 2016; Williman et al., 2017) y se ha puesto de manifiesto la necesidad de evaluar los efectos que las mezclas de compuestos puedan producir (Carlin et al., 2013; Ribeiro et al., 2017; WHO, 2017). En este sentido, la combinación de compuestos podría generar un efecto aditivo o sinérgico y, por lo tanto, conllevar un mayor riesgo para la salud (Hernandez et al., 2017). En base a esto, en el presente capítulo se evaluaron los efectos de la exposición durante la preñez y lactancia a glifosato, propiconazole y

la mezcla de ambos agroquímicos sobre la glándula mamaria de ratas macho. La exposición perinatal a GLI generó una reducción en el crecimiento de la glándula mamaria de machos post-puberales, aunque sin producir alteraciones en la histología de la misma. Tampoco se observaron modificaciones en el crecimiento de la glándula mamaria en los machos pre-puberales expuestos a GLI. Por otro lado, en DPN60, la exposición a PRO provocó un mayor desarrollo lobuloalveolar en la glándula mamaria e indujo la aparición de hiperplasias lobuloalveolares, pero no modificó el crecimiento de la misma evaluado a partir de las WMs. Los efectos generados por los agroquímicos de manera individual fueron atenuados por la exposición a la mezcla (PROGLI) y solo se observó una disminución del crecimiento de la glándula mamaria en DPN21, que fue revertido en los machos post-puberales.

En DPN60, la exposición a GLI produjo una reducción del área de la glándula mamaria, que fue acompañada por un aumento en la expresión de aromatasa y una disminución en la expresión de ESR1, aunque sin modificaciones en la proliferación de las células epiteliales. La enzima aromatasa (citocromo P450 aromatasa) es la responsable de la conversión irreversible de andrógenos a estrógenos (To et al., 2015) y es expresada por numerosos tejidos (Simpson et al., 2002). Existe controversia acerca de la localización de esta enzima en la glándula mamaria, algunos estudios han reportado que su expresión se produce en las células estromales de la glándula (Simpson, 2000), mientras que también se ha observado en el citoplasma de células epiteliales y tumorales mamarias (Armasu et al., 2020; Brodie et al., 1997). En relación a esto, en el presente trabajo observamos la expresión de aromatasa en el citoplasma de las células epiteliales mamarias. Si bien hasta este momento no existen otros trabajos que hayan evaluado su expresión en la glándula mamaria de ratas macho, sí se ha observado que la sobreexpresión de aromatasa en la glándula mamaria de ratones macho induce un mayor crecimiento epitelial y el desarrollo de hiperplasias mamarias (Gill et al., 2001). Por otro lado, diversos trabajos *in vitro* han demostrado que el glifosato o sus formulaciones comerciales son capaces de reducir la actividad de aromatasa (Benachour et al., 2007; Defarge et al., 2018; Defarge et al., 2016; Richard et al., 2005; C. Zhang et al., 2020) y, en algunos casos, inducir un aumento en su expresión (Gasnier et al., 2009). En estudios *in vivo*, Pham et al. (2019) no halló cambios en la expresión de aromatasa en testículos de ratones expuestos a glifosato, mientras que Cassault-Meyer et al. (2014) observó un aumento en la expresión proteica y de ARNm de la enzima en testículos de ratas adultas expuestas a un HBG. Sin embargo, la actividad de la enzima no fue evaluada en estos estudios. Dado que en este trabajo no se determinó la actividad de aromatasa, no puede concluirse si la exposición a GLI genera un aumento o una disminución en la actividad de la misma. Sin embargo, las modificaciones halladas en los animales expuestos a GLI difieren de aquellas observadas en animales que sobreexpresan aromatasa (Gill et al., 2001); en este caso se produce una reducción del crecimiento mamario y no se altera la morfología de la glándula.

Debido a esto, podría hipotetizarse que el efecto del aumento en la expresión de aromatasa, observado en los animales expuestos a GLI, podría ser atenuado por una acción inhibitoria de GLI sobre la enzima. Nuevos estudios que evalúen los efectos de GLI sobre la actividad de aromatasa en la glándula mamaria, como también los niveles de estrógenos presentes en la misma, serían necesarios para poder confirmar esta hipótesis.

Al igual que lo observado en animales expuestos a HBG, la expresión de ESR1 fue disminuida por la exposición a GLI. Es sabido que la acción de los estrógenos a través de su receptor ESR1 es necesaria para que se produzca la morfogénesis ductal y que, por lo tanto, la reducción de su expresión podría afectar al crecimiento de la glándula (Feng et al., 2007; Sternlicht, 2006). Sin embargo, no se hallaron modificaciones en la proliferación de las células epiteliales ni en la expresión del ARNm de *Ccnd1* en este día de estudio. En este sentido, *Ccnd1* es un gen inducido por estrógenos (Castro-Rivera et al., 2001; Liu et al., 2002), implicado en la acción proliferativa generada por los mismos y en la actividad transcripcional de ESR1 (Casimiro et al., 2013; Tchakarska & Sola, 2020). Debido a que no se hallaron alteraciones en estos parámetros, no podría concluirse que los cambios observados en el crecimiento de la glándula se deban a modificaciones relacionadas con la señalización de estrógenos, al menos en DPN60. En este día, también se evaluaron otros factores que podrían afectar al crecimiento mamario. Por un lado, se evaluó la expresión proteica de RA que, como se describió en la introducción y el capítulo 4, es necesario para que la glándula mamaria presente el desarrollo lobuloalveolar característico de ratas macho (Lucas et al., 2007) y que podría tener un efecto inhibitorio en el crecimiento de la glándula (Altamirano et al., 2018; Peters et al., 2011). Por otro lado, también se determinó la expresión de ARNm de *Wnt5a*, miembro de la vía no canónica de Wnt. Se ha reportado que esta molécula es capaz de inhibir la extensión ductal y que la ausencia de la misma genera un desarrollo mamario acelerado en explantes mamarios (Pavlovich et al., 2011; Roarty & Serra, 2007). Sin embargo, la expresión de ninguna de estas moléculas se vio modificada por la exposición a GLI. Además, para analizar si existía alguna alteración en la regulación del ciclo celular, se evaluó la expresión de p27, un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclinas (Cdk) (Besson et al., 2008). En la glándula mamaria p27 presenta un rol dual, es requerido para un correcto desarrollo de la glándula ya que estabiliza el complejo *Ccnd1*-Cdk4, permitiendo la progresión del ciclo celular, mientras que también inhibe el complejo *CcndE*-Cdk2, deteniendo el ciclo celular (Musgrove et al., 2004). Aunque se ha reportado que la exposición a un HBG altera la expresión de p27 en el útero de ovejas y ratas (Alarcon et al., 2020; Ingaramo et al., 2016), en el presente trabajo no se observaron diferencias en su expresión por la exposición a GLI. En base a lo descrito anteriormente, los resultados obtenidos en DPN60 no permitirían explicar las modificaciones en el crecimiento de la glándula mamaria generadas por la exposición a GLI. Debido a esto, se evaluó la glándula mamaria en los animales pre-puberales. En DPN21

no se hallaron diferencias en el crecimiento de la glándula, la histología, la expresión de ESR1 o la marcación de p-Erk1/2 entre los animales control y expuestos a GLI. Sin embargo, en los animales expuestos se observó una reducción en la proliferación celular de conductos y alveolos. Esto podría generar una reducción en la ramificación y expansión lateral de la glándula mamaria y, por lo tanto, explicar en parte las modificaciones en el crecimiento de la glándula halladas en DPN60.

Por otro lado, la exposición a PRO generó un aumento en el desarrollo lobuloalveolar e indujo el desarrollo de hiperplasias lobuloalveolares en DPN60. Algunos trabajos han reportado la presencia de hiperplasias en la glándula mamaria de ratas macho adultas, en animales expuestos a una mezcla de compuestos estrogénicos o a etinil-estradiol (Latendresse et al., 2009; Mandrup et al., 2015); sin embargo, la acción de compuestos con actividad androgénica no ha sido estudiada en machos. Si bien no se conocen las implicancias de la presencia de hiperplasias en la glándula mamaria de ratas macho, esta alteración en el desarrollo de la glándula podría indicar una acción endócrina por parte del compuesto evaluado. Por otro lado, ciertos estudios *in vitro* han observado una acción anti-estrogénica y anti-androgénica de propiconazole (Ait-Aissa et al., 2010; Kjaerstad, Taxvig, Andersen, et al., 2010; Kjaerstad, Taxvig, Nellemann, et al., 2010; Kjeldsen et al., 2013); sin embargo, pocos estudios *in vivo* han confirmado este efecto (Taxvig et al., 2008; Vieira et al., 2017). En este sentido, las alteraciones histológicas halladas en la glándula mamaria de los animales expuestos a PRO no indicarían este tipo de acción, ya que se esperaría que una acción anti-estrogénica o anti-androgénica genere una atrofia de las estructuras epiteliales de la glándula (Lucas et al., 2007). En relación a esto, en los animales expuestos a PRO tampoco se hallaron modificaciones en la expresión de los receptores de hormonas esteroides (ESR1 y RA) ni en la expresión de ARNm del gen de respuesta a estrógenos, Cend1. Diversos trabajos *in vitro* han reportado un efecto inhibitorio de propiconazole sobre la actividad de la enzima aromatasa (Laville et al., 2006; Sanderson et al., 2002; Trosken et al., 2006), mientras que Kjeldsen et al. (2013) observó un comportamiento dual, en el que se producía una inhibición de la enzima con las mayores concentraciones evaluadas y un aumento de la actividad con concentraciones menores. Sin embargo, hasta la fecha, el efecto de propiconazole sobre la actividad de aromatasa o sus niveles de expresión *in vivo* solo han sido evaluados en anfibios y peces. En el cerebro de anfibios se encontró un aumento de la actividad de aromatasa (Svanholm et al., 2021), mientras que en el ovario de peces se observó un aumento en la expresión de ARNm de aromatasa, pero asociado a una disminución en los niveles de E2 (Skolness et al., 2013). En relación a esto, en este trabajo evaluamos el efecto de PRO sobre la expresión de aromatasa en la glándula mamaria, sin hallar diferencias entre los animales expuestos a PRO y los controles. A pesar de las alteraciones observadas en la histología de la glándula mamaria, la exposición a PRO no modificó el crecimiento de la misma evaluado en las WMs ni alteró la expresión de ninguno de los

receptores o genes evaluados. Una posible explicación de estos resultados es que en DPN60 se observen los efectos causados por PRO en la histología de la glándula pero que las alteraciones a nivel molecular se hayan producido a edades más tempranas, al igual que lo observado previamente en el capítulo 3 en animales expuestos a HBG. Debido a esto, se analizaron los efectos de la exposición a PRO sobre la glándula mamaria en DPN21. En este día no se observaron diferencias en el crecimiento y la histología de la glándula, la proliferación celular, la expresión de ESR1, ni la marcación de p-Erk1/2 alrededor de los TEBs entre los machos expuestos a PRO y los controles, pero se encontró un aumento en la marcación nuclear de p-Erk1/2 en los conductos. Como se mencionó previamente, la MAPK Erk1/2 está implicada en eventos de proliferación, diferenciación y migración celular (Chambard et al., 2007; Gjorevski & Nelson, 2011; Huebner et al., 2016). Además, se ha observado que la fosforilación de Erk1/2 en los fibroblastos que rodean el epitelio mamario induce la remodelación del estroma favoreciendo la elongación ductal o ramificación (Koledova et al., 2016). En este sentido, la exposición a PRO no modificó la marcación de p-Erk1/2 en el estroma que rodea los TEBs, lo que se encuentra de acuerdo con la ausencia de modificaciones en el crecimiento de la glándula en ambos días evaluados. Por otro lado, se ha observado que la presencia de p-Erk1/2 en las células epiteliales mamarias se encuentra asociada a procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia (Whyte et al., 2009), regulando el proceso de formación del lumen de estructuras mamarias y la apoptosis de las células luminales (Ender et al., 2020; Whyte et al., 2009). En base a esto, un aumento de p-Erk1/2 en las células epiteliales de los conductos podría indicar una alteración en el balance de proliferación/apoptosis de estas células, que luego se traduzca en un mayor desarrollo mamario, como se observó en DPN60.

Las exposiciones a GLI y PRO de manera individual afectaron a distintos parámetros evaluados en la glándula mamaria, GLI afectó al crecimiento de la misma, mientras que PRO modificó el desarrollo de las estructuras epiteliales. Además, también fueron diferentes sus efectos sobre las moléculas evaluadas, GLI afectó la expresión de ESR1, aromataasa y la proliferación celular, mientras que PRO solo afectó la activación de Erk1/2 en los conductos de los animales pre-puberales. En base a estos resultados podría proponerse que estos compuestos presentan mecanismos de acción independientes; sin embargo, la exposición a la mezcla de agroquímicos atenuó los efectos producidos por los compuestos de manera individual. En DPN60, la exposición a la mezcla de agroquímicos no modificó ninguno de los parámetros evaluados en la glándula mamaria. Como se mencionó en la introducción de este capítulo, las mezclas de compuestos pueden presentar distintos efectos (Hernandez et al., 2017). En este caso se observa un menor efecto por la exposición a la mezcla, por lo que la combinación de ambos agroquímicos produciría una acción antagónica. Se ha descrito que pueden existir interacciones en la toxicodinámica o la toxicocinética entre los distintos compuestos presentes en una mezcla (Hernandez et al., 2017;

WHO, 2017). Dado que los parámetros alterados por GLI y PRO en la glándula mamaria fueron diferentes, esto no sugeriría una interacción en las vías metabólicas afectadas por ambos compuestos, es decir en la toxicodinámica, al menos en los aspectos analizados en este trabajo. Por otro lado, como se describió previamente, las interacciones en la toxicocinética se deben a alteraciones en la absorción, metabolismo, transporte o eliminación de los compuestos (Hernandez et al., 2017; WHO, 2017). Si bien no contamos con los valores séricos de propiconazole y glifosato en los animales expuestos a la mezcla de agroquímicos, la exposición a ambos compuestos podría afectar a la absorción y transporte de los mismos. Se ha observado que ciertos pesticidas pueden ser sustratos de transportadores de membrana, como así también modificar su actividad o su expresión, lo que puede generar alteraciones en la toxicocinética de mezclas de pesticidas (Chedik et al., 2018). En relación a esto, se ha reportado que la exposición a una mezcla de pesticidas (5 compuestos) redujo la concentración de propiconazole hallada en líquido amniótico de ratas, en comparación a lo que sucedía cuando la mezcla contenía solo 3 compuestos (Bossi et al., 2013). Por otro lado, como se describió previamente, el propiconazole es altamente metabolizado, generando una amplia variedad de metabolitos secundarios (EFSA et al., 2017; JMPR, 2007), y es capaz de inducir un aumento de las enzimas hepáticas (JMPR, 2006). En relación a esto, se ha reportado que el glifosato puede dañar los hepatocitos, afectando de esta manera al funcionamiento hepático (Mesnage, Arno, et al., 2015; Singh et al., 2020), lo que podría alterar la metabolización del propiconazole. Si bien el perfil toxicológico de los metabolitos generados a partir de propiconazole no ha sido descrito en su totalidad (EFSA et al., 2021; EPA, 2006), se han reportado ciertas diferencias en la toxicidad de algunos de ellos (EPA, 2006), lo que podría implicar que alteraciones en la metabolización de propiconazole modifiquen los efectos generados por el fungicida. En cuanto a glifosato, no se han realizado estudios que evalúen su toxicocinética en presencia de otros compuestos; sin embargo, a diferencia de propiconazole, solo una pequeña proporción de este compuesto es absorbida (alrededor del 20%). Por otro lado, el metabolismo de glifosato en los mamíferos es limitado y su principal metabolito, AMPA, ha sido reportado en cantidades reducidas (Anadon et al., 2009; JMPR, 2006; Williams et al., 2000), por lo que esta no parecería ser una vía de interacción importante. Las acciones de glifosato junto con otros pesticidas se han evaluado principalmente en anfibios; la combinación de glifosato con otros herbicidas generó principalmente efectos sinérgicos, aunque también se observaron efectos antagónicos, dependiendo del parámetro evaluado (Carvalho et al., 2019; Lajmanovich et al., 2013). Además, en un trabajo realizado en nuestro laboratorio, en el que se analizaron los efectos de la mezcla de endosulfán y un HBG sobre el útero de ratas, se hallaron resultados similares en los animales expuestos a la mezcla y solo a HBG. Sin embargo, en este caso la exposición a los agroquímicos se realizó por vía subcutánea (Ingaramo et al., 2019). Hasta la fecha no existen trabajos que evalúen la acción de glifosato junto con compuestos del grupo de los triazoles, por

lo que nuevos estudios con estos agroquímicos administrados en forma individual y combinada serían necesarios para corroborar si existe una interacción entre los mismos.

Finalmente, ambos agroquímicos alteran el desarrollo de la glándula mamaria; sin embargo, estos efectos no se observan cuando los animales son expuestos a la mezcla de los mismos. Aunque a partir de las determinaciones realizadas no podemos inferir con exactitud el mecanismo por el cual los efectos ocasionados por los compuestos individuales son atenuados cuando ambos se administran simultáneamente, se encuentra documentado que la mezcla de ciertos pesticidas puede generar efectos antagónicos (Gomez-Gimenez et al., 2018; Hernandez et al., 2017; Rizzati et al., 2016). Si bien en este caso un efecto antagónico no revestiría mayores riesgos para la salud, demuestra la posibilidad de interacción entre pesticidas y la incapacidad de predecir el comportamiento de mezclas de compuestos. En este sentido, ciertos estudios con mezclas de pesticidas han hallado efectos aditivos o sinérgicos (Hernandez et al., 2017; Jacobsen et al., 2012; Taxvig et al., 2013), lo que enfatiza la necesidad de evaluar los efectos de la exposición a las mezclas de compuestos.

CONCLUSIONES

*“A los hombres les encanta maravillarse.
esto es la semilla de la ciencia”*

Ralph Waldo Emerson

La glándula mamaria de ratas macho se ha propuesto como un modelo apropiado para el estudio de los efectos de PE (Filgo et al., 2016; Kass et al., 2015; Mandrup et al., 2016). Algunos PE han mostrado efectos sobre el desarrollo mamario en los machos más tempranamente que en las hembras (Mandrups et al., 2012), mientras que otros solo modificaron la glándula mamaria de los machos (You et al., 2002), lo que hace que la glándula masculina sea de interés para evaluar los efectos de la exposición a este tipo de compuestos. Teniendo en cuenta que se ha propuesto que el glifosato (el compuesto puro como sus formulaciones comerciales) y el propiconazole pueden presentar una acción de perturbación endócrina (Costa et al., 2015; Muñoz et al., 2021; Taxvig et al., 2013) y que los efectos de los mismos sobre la glándula mamaria han sido poco estudiados, en esta tesis decidimos analizar si la exposición perinatal a estos fitosanitarios altera el desarrollo en la glándula mamaria de ratas macho en la pre- y post-pubertad.

En relación al objetivo planteado, en este trabajo de tesis observamos que la exposición perinatal a HBG altera el crecimiento y desarrollo de la glándula mamaria de machos post-puberales, efecto que difiere según la dosis utilizada: la exposición a la menor dosis de HBG reduce el crecimiento de la glándula mamaria mientras que la mayor dosis induce un mayor crecimiento longitudinal y un menor desarrollo lobuloalveolar. Además, la exposición al herbicida disminuye la expresión de ESR1, alterando la abundancia relativa de sus variantes transcripcionales e induciendo un aumento en la metilación de sus promotores. Por otro lado, en DPN21 HBG disminuye la proliferación de las células epiteliales y la expresión de factores de crecimiento y sus receptores, implicados en el proceso de desarrollo mamario.

También mostramos que la exposición durante la preñez y la lactancia a glifosato puro reduce el crecimiento de la glándula mamaria y la expresión de ESR1 en los machos post-puberales, y disminuye la proliferación en animales pre-puberales, generando efectos similares a HBG aunque menos pronunciados. Como se mencionó anteriormente, los adyuvantes presentes en las formulaciones comerciales pueden tener su propia toxicidad, aunque también pueden aumentar la toxicidad de glifosato (Mesnage, Defarge, et al., 2015). En base a los resultados hallados en este trabajo, los efectos generados por HBG podrían deberse principalmente al compuesto activo, aunque serían potenciados por los adyuvantes presentes en la formulación comercial.

En el caso de la exposición a PRO, se halló que el fungicida induce mayor desarrollo lobuloalveolar y la aparición de hiperplasias lobuloalveolares en la glándula mamaria en machos post-puberales, y aumenta la fosforilación de Erk1/2 en los animales pre-puberales. Sin embargo, los efectos generados por los agroquímicos (glifosato y propiconazole) de manera individual son atenuados cuando los animales son expuestos a la mezcla de los mismos (PROGLI), observándose un efecto antagónico. Si bien un efecto antagónico no revestiría mayores riesgos para la salud, demuestra la posibilidad de interacción entre pesticidas y la incapacidad de predecir el

comportamiento de mezclas de compuestos, lo que enfatiza la necesidad de evaluar los efectos de la exposición a mezclas de los mismos.

Finalmente, nuestros resultados muestran que la exposición a HBG, GLI o PRO durante la preñez y la lactancia altera el desarrollo de la glándula mamaria de ratas macho. En general, los efectos más notorios se observan en la etapa post-puberal, como alteraciones en el crecimiento y la morfología, mientras que en la etapa pre-puberal los efectos son sutiles, como modificaciones en la proliferación y expresión de genes implicados en el desarrollo mamario. Esto destaca la importancia de evaluar los efectos generados por los PE en distintas edades, ya que tanto los efectos sobre la glándula mamaria como el momento en el cual éstos se evidencian pueden variar.

En conclusión, los resultados de esta tesis aportan nuevas evidencias a favor del potencial de PE de glifosato, sus formulaciones comerciales y propiconazole, como así también conocimiento acerca de los mecanismos moleculares afectados. Además, enfatizan la elevada sensibilidad de la glándula mamaria de ratas macho a compuestos con acción hormonal, durante períodos críticos del desarrollo.

BIBLIOGRAFÍA

“La vida es y siempre seguirá siendo una ecuación incapaz de resolver, pero tiene ciertos factores que conocemos”

Nikola Tesla

- Abdel-Halim, K. Y., Abuzeid, M. A., Seddik, F. A., & Khozimy, A. M. (2019). Glyphosate and pendimethalin in breast milk samples from egyptian rural areas: a pilot study for infants risk assessment. *Int. J. of Adv. Res.*, 7, 991-1002. <https://doi.org/10.21474/IJAR01/9747>
- Ahmad, T., Farnie, G., Bundred, N. J., & Anderson, N. G. (2004). The mitogenic action of insulin-like growth factor I in normal human mammary epithelial cells requires the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem*, 279(3), 1713-1719. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306156200>
- Ait-Aissa, S., Laskowski, S., Laville, N., Porcher, J. M., & Brion, F. (2010). Anti-androgenic activities of environmental pesticides in the MDA-kb2 reporter cell line. *Toxicol In Vitro*, 24(7), 1979-1985. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.08.014>
- Alarcon, R., Rivera, O. E., Ingaramo, P. I., Tschopp, M. V., Dioguardi, G. H., Milesi, M. M., . . . Luque, E. H. (2020). Neonatal exposure to a glyphosate-based herbicide alters the uterine differentiation of prepubertal ewe lambs. *Environ Pollut*, 265(Pt B), 114874. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114874>
- Alonso, L. L., Demetrio, P. M., Agustina Etchegoyen, M., & Marino, D. J. (2018). Glyphosate and atrazine in rainfall and soils in agroproductive areas of the pampas region in Argentina. *Sci Total Environ*, 645, 89-96. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.134>
- Altamirano, G. A., Delconte, M. B., Gomez, A. L., Alarcon, R., Bosquiazzo, V. L., Luque, E. H., . . . Kass, L. (2017). Early postnatal exposure to endosulfan interferes with the normal development of the male rat mammary gland. *Toxicol Lett*, 281, 102-109. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.09.012>
- Altamirano, G. A., Delconte, M. B., Gomez, A. L., Ingaramo, P. I., Bosquiazzo, V. L., Luque, E. H., . . . Kass, L. (2018). Postnatal exposure to a glyphosate-based herbicide modifies mammary gland growth and development in Wistar male rats. *Food Chem Toxicol*, 118, 111-118 <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.011>
- Altamirano, G. A., Gomez, A. L., Schierano-Marotti, G., Munoz-de-Toro, M., Rodriguez, H. A., & Kass, L. (2020). Bisphenol A and benzophenone-3 exposure alters milk protein expression and its transcriptional regulation during functional differentiation of the mammary gland in vitro. *Environ Res*, 191, 110185. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110185>
- Altamirano, G. A., Ramos, J. G., Gomez, A. L., Luque, E. H., Munoz-de-Toro, M., & Kass, L. (2017). Perinatal exposure to bisphenol A modifies the transcriptional regulation of the beta-Casein gene during secretory activation of the rat mammary gland. *Mol Cell Endocrinol*, 439, 407-418. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.09.032>
- Anadon, A., Martinez-Larranaga, M. R., Martinez, M. A., Castellano, V. J., Martinez, M., Martin, M. T., . . . Bernal, J. L. (2009). Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. *Toxicol Lett*, 190(1), 91-95. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.07.008>
- Andreoli, M. F., Stoker, C., Rossetti, M. F., Alzamendi, A., Castrogiovanni, D., Luque, E. H., & Ramos, J. G. (2015). Withdrawal of dietary phytoestrogens in adult male rats affects hypothalamic regulation of food intake, induces obesity and alters glucose metabolism. *Mol Cell Endocrinol*, 401, 111-119. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2014.12.002>
- Andreoli, M. F., Stoker, C., Rossetti, M. F., Lazzarino, G. P., Luque, E. H., & Ramos, J. G. (2016). Dietary withdrawal of phytoestrogens resulted in higher gene expression of 3-beta-HSD

- and ARO but lower 5-alpha-R-1 in male rats. *Nutr Res*, 36(9), 1004-1012. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2016.05.003>
- Andrews, P., Freyberger, A., Hartmann, E., Eiben, R., Loof, I., Schmidt, U., . . . Kayser, M. (2002). Sensitive detection of the endocrine effects of the estrogen analogue ethinylestradiol using a modified enhanced subacute rat study protocol (OECD Test Guideline no. 407). *Arch Toxicol*, 76(4), 194-202. <https://doi.org/10.1007/s00204-002-0337-7>
- Aparicio, V. C., Aimar, S., De Gerónimo, E., Mendez, M. J., & Costa, J. L. (2018). Glyphosate and AMPA concentrations in wind-blown material under field conditions. *Land Degradation & Development*, 29(5), 1317-1326. <https://doi.org/10.1002/ldr.2920>
- Aparicio, V. C., De, G. E., Marino, D., Primost, J., Carriquiriborde, P., & Costa, J. L. (2013). Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere*, 93(9), 1866-1873. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.06.041>
- Arbuckle, T. E., Lin, Z., & Mery, L. S. (2001). An exploratory analysis of the effect of pesticide exposure on the risk of spontaneous abortion in an Ontario farm population. *Environ Health Perspect*, 109(8), 851-857. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109851>
- Arendt, L. M., & Schuler, L. A. (2008). Prolactin drives estrogen receptor-alpha-dependent ductal expansion and synergizes with transforming growth factor-alpha to induce mammary tumors in males. *Am J Pathol*, 172(1), 194-202. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070597>
- Armasu, I., Preda, C., Ianole, V., Mocanu, V., Hristov, I., Andriescu, E. C., . . . Ciobanu Apostol, D. G. (2020). Insights on Aromatase Immunohistochemistry: Variations between Intrinsic Molecular Subtypes of Breast Cancers. *Acta Endocrinol (Buchar)*, 16(1), 22-29. <https://doi.org/10.4183/aeb.2020.22>
- Arregui, M. C., Lenardon, A., Sanchez, D., Maitre, M. I., Scotta, R., & Enrique, S. (2004). Monitoring glyphosate residues in transgenic glyphosate-resistant soybean. *Pest Manag Sci*, 60(2), 163-166. <https://doi.org/10.1002/ps.775>
- Avila-Vazquez, M., Maturano, E., Etchegoyen, A., Difilippo, F. S., & Maclean, B. (2017). Association between Cancer and Environmental Exposure to Glyphosate *International Journal of Clinical Medicine*, 8, 73-85. <https://doi.org/10.4236/ijcm.2017.82007>
- Awada, Z., Nasr, R., Akika, R., Cahais, V., Cuenin, C., Zhivagui, M., . . . Zgheib, N. K. (2019). DNA methylome-wide alterations associated with estrogen receptor-dependent effects of bisphenols in breast cancer. *Clin Epigenetics*, 11(1), 138. <https://doi.org/10.1186/s13148-019-0725-y>
- Battaglin, W. A., Sandstrom, M. W., Kuivila, K. M., Kolpin, D. W., & Meyer, M. T. (2011). Occurrence of Azoxytobin, Propiconazole, and Selected Other Fungicides in US Streams, 2005–2006. *Water, Air, & Soil Pollution*, 218(1), 307-322. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0643-2>
- Benachour, N., Sipahutar, H., Moslemi, S., Gasnier, C., Travert, C., & Seralini, G. E. (2007). Time- and dose-dependent effects of roundup on human embryonic and placental cells. *Arch Environ Contam Toxicol*, 53(1), 126-133. <https://doi.org/10.1007/s00244-006-0154-8>

- Benbrook, C. M. (2016). Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ Sci Eur*, 28(1), 3. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>
- Beranger, R., Hardy, E. M., Dexet, C., Guldner, L., Zaros, C., Nougadere, A., . . . Appenzeller, B. M. R. (2018). Multiple pesticide analysis in hair samples of pregnant French women: Results from the ELFE national birth cohort. *Environ Int*, 120, 43-53. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.07.023>
- Bergman, Å., Heindel, J. J., Jobling, S., Kidd, K., & Zoeller, T. R. (2013). *State of the science of endocrine disrupting chemicals 2012 : summary for decision-makers*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/78102>
- Besson, A., Dowdy, S. F., & Roberts, J. M. (2008). CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell*, 14(2), 159-169. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.01.013>
- Biegel, L. B., Cook, J. C., Hurtt, M. E., & O'Connor, J. C. (1998). Effects of 17 beta-estradiol on serum hormone concentrations and estrous cycle in female Crl:CD BR rats: effects on parental and first generation rats. *Toxicol Sci*, 44(2), 143-154. <https://doi.org/10.1006/toxs.1998.2469>
- Biegel, L. B., Flaws, J. A., Hirshfield, A. N., O'Connor, J. C., Elliott, G. S., Ladics, G. S., . . . Frame, S. R. (1998). 90-day feeding and one-generation reproduction study in Crl:CD BR rats with 17 beta-estradiol. *Toxicol Sci*, 44(2), 116-142. <https://doi.org/10.1006/toxs.1998.2468>
- Bonansea, R. I., Filippi, I., Wunderlin, D. A., Marino, D. J. G., & Ame, M. V. (2018). The Fate of Glyphosate and AMPA in a Freshwater Endorheic Basin: An Ecotoxicological Risk Assessment. *Toxics*, 6(1), 3. <https://doi.org/10.3390/toxics6010003>
- Bonnette, S. G., & Hadsell, D. L. (2001). Targeted disruption of the IGF-I receptor gene decreases cellular proliferation in mammary terminal end buds. *Endocrinology*, 142(11), 4937-4945. <https://doi.org/10.1210/endo.142.11.8500>
- Bossi, R., Vinggaard, A. M., Taxvig, C., Boberg, J., & Bonefeld-Jorgensen, E. C. (2013). Levels of pesticides and their metabolites in Wistar rat amniotic fluids and maternal urine upon gestational exposure. *Int J Environ Res Public Health*, 10(6), 2271-2281. <https://doi.org/10.3390/ijerph10062271>
- Briskin, C., & Ataca, D. (2015). Endocrine hormones and local signals during the development of the mouse mammary gland. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 4(3), 181-195. <https://doi.org/10.1002/wdev.172>
- Briskin, C., Kaur, S., Chavarria, T. E., Binart, N., Sutherland, R. L., Weinberg, R. A., . . . Ormandy, C. J. (1999). Prolactin controls mammary gland development via direct and indirect mechanisms. *Dev Biol*, 210(1), 96-106. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9271>
- Briskin, C., & Scabia, V. (2020). 90 YEARS OF PROGESTERONE: Progesterone receptor signaling in the normal breast and its implications for cancer. *J Mol Endocrinol*, 65(1), T81-T94. <https://doi.org/10.1530/JME-20-0091>
- Brodie, A., Lu, Q., & Nakamura, J. (1997). Aromatase in the normal breast and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 61(3-6), 281-286. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9365202>
- Bromer, J. G., Zhou, Y., Taylor, M. B., Doherty, L., & Taylor, H. S. (2010). Bisphenol-A exposure in utero leads to epigenetic alterations in the developmental programming of

- uterine estrogen response. *FASEB J*, 24(7), 2273-2280. <https://doi.org/10.1096/fj.09-140533>
- Burnstein, K. L. (2005). Regulation of androgen receptor levels: implications for prostate cancer progression and therapy. *J Cell Biochem*, 95(4), 657-669. <https://doi.org/10.1002/jcb.20460>
- Cai, W., Ji, Y., Song, X., Guo, H., Han, L., Zhang, F., . . . Xu, M. (2017). Effects of glyphosate exposure on sperm concentration in rodents: A systematic review and meta-analysis. *Environ Toxicol Pharmacol*, 55, 148-155. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.07.015>
- Cardy, R. H. (1991). Sexual dimorphism of the normal rat mammary gland. *Vet Pathol*, 28(2), 139-145. <https://doi.org/10.1177/030098589102800206>
- Carlin, D. J., Rider, C. V., Woychik, R., & Birnbaum, L. S. (2013). Unraveling the health effects of environmental mixtures: an NIEHS priority. *Environ Health Perspect*, 121(1), A6-8. <https://doi.org/10.1289/ehp.1206182>
- Carvalho, W. F., Ruiz de Arcaute, C., Perez-Iglesias, J. M., Laborde, M. R. R., Soloneski, S., & Larramendy, M. L. (2019). DNA damage exerted by mixtures of commercial formulations of glyphosate and imazethapyr herbicides in *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles. *Ecotoxicology*, 28(3), 367-377. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02029-x>
- CASAFE. (2012). *Mercado Argentino de productos fitosanitarios /Año 2012. Camara Argentina de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. KLEFFMANNGROUP Argentina, Buenos Aires*. Acceso: 25 de noviembre de 2022 <https://www.casafe.org/publicaciones/datos-del-mercado-argentino-de-fitosanitarios/>
- CASAFE. (2014). *Mercado Argentino de productos fitosanitarios /Año 2014. Camara Argentina de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. KLEFFMANNGROUP Argentina, Buenos Aires*. Acceso: 25 de febrero de 2022. <https://www.casafe.org/publicaciones/datos-del-mercado-argentino-de-fitosanitarios/>
- Casimiro, M. C., Wang, C., Li, Z., Di Sante, G., Willmart, N. E., Addya, S., . . . Pestell, R. G. (2013). Cyclin D1 determines estrogen signaling in the mammary gland in vivo. *Mol Endocrinol*, 27(9), 1415-1428. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1065>
- Cassault-Meyer, E., Gress, S., Seralini, G. E., & Galeraud-Denis, I. (2014). An acute exposure to glyphosate-based herbicide alters aromatase levels in testis and sperm nuclear quality. *Environ Toxicol Pharmacol*, 38(1), 131-140. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.05.007>
- Castro-Rivera, E., Samudio, I., & Safe, S. (2001). Estrogen regulation of cyclin D1 gene expression in ZR-75 breast cancer cells involves multiple enhancer elements. *J Biol Chem*, 276(33), 30853-30861. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103339200>
- Chambard, J. C., Lefloch, R., Pouyssegur, J., & Lenormand, P. (2007). ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta*, 1773(8), 1299-1310. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.11.010>
- Chedik, L., Bruyere, A., Bacle, A., Potin, S., Le Vee, M., & Fardel, O. (2018). Interactions of pesticides with membrane drug transporters: implications for toxicokinetics and toxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 14(7), 739-752. <https://doi.org/10.1080/17425255.2018.1487398>

- Chen, Z., Xu, L., Shi, W., Zeng, F., Zhuo, R., Hao, X., & Fan, P. (2020). Trends of female and male breast cancer incidence at the global, regional, and national levels, 1990-2017. *Breast Cancer Res Treat*, *180*(2), 481-490. <https://doi.org/10.1007/s10549-020-05561-1>
- Choi, J., Aarøe Mørck, T., Polcher, A., Knudsen, L. E., & A., J. (2015). Review of the state of the art of human biomonitoring for chemical substances and its application to human exposure assessment for food safety. *EFSA J*, *724*, 321. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2015.EN-724>
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, *162*(1), 156-159. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>
- Ciarloni, L., Mallepell, S., & Briskin, C. (2007). Amphiregulin is an essential mediator of estrogen receptor alpha function in mammary gland development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(13), 5455-5460. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611647104>
- Cikos, S., Bukovska, A., & Koppel, J. (2007). Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Mol Biol*, *8*, 113. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-8-113>
- Clair, E., Mesnage, R., Travert, C., & Seralini, G. E. (2012). A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells in vitro, and testosterone decrease at lower levels. *Toxicol In Vitro*, *26*(2), 269-279. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2011.12.009>
- Conrad, A., Schroter-Kermani, C., Hoppe, H. W., Ruther, M., Pieper, S., & Kolossa-Gehring, M. (2017). Glyphosate in German adults - Time trend (2001 to 2015) of human exposure to a widely used herbicide. *Int J Hyg Environ Health*, *220*(1), 8-16. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.09.016>
- Corcoran, S., Metcalfe, C. D., Sultana, T., Ame, M. V., & Menone, M. L. (2020). Pesticides in Surface Waters in Argentina Monitored Using Polar Organic Chemical Integrative Samplers. *Bull Environ Contam Toxicol*, *104*(1), 21-26. <https://doi.org/10.1007/s00128-019-02758-z>
- Costa, N. O., Vieira, M. L., Sgarioni, V., Pereira, M. R., Montagnini, B. G., Mesquita Sde, F., & Gerardin, D. C. (2015). Evaluation of the reproductive toxicity of fungicide propiconazole in male rats. *Toxicology*, *335*, 55-61. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.06.011>
- Dai, P., Hu, P., Tang, J., Li, Y., & Li, C. (2016). Effect of glyphosate on reproductive organs in male rat. *Acta Histochem*, *118*(5), 519-526. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2016.05.009>
- Dallegrave, E., Mantese, F. D., Oliveira, R. T., Andrade, A. J., Dalsenter, P. R., & Langeloh, A. (2007). Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. *Arch Toxicol*, *81*(9), 665-673. <https://doi.org/10.1007/s00204-006-0170-5>
- Darbre, P. D. (2015). Chapter 2 - How Could Endocrine Disrupters Affect Human Health? En P. D. Darbre (Ed.), *Endocrine Disruption and Human Health* (pp. 27-45). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801139-3.00002-8>
- Davis, B. J., & Fenton, S. E. (2013). Chapter 61 - Mammary Gland. En W. M. Haschek, M. A. Wallig, & C. G. Rousseaux (Eds.), *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic*

- Pathology* (Vol. 3, pp. 2665-2694). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415759-0.00061-3>
- Dechartres, J., Pawluski, J. L., Gueguen, M. M., Jablaoui, A., Maguin, E., Rhimi, M., & Charlier, T. D. (2019). Glyphosate and glyphosate-based herbicide exposure during the peripartum period affects maternal brain plasticity, maternal behaviour and microbiome. *J Neuroendocrinol*, *31*(9), e12731. <https://doi.org/10.1111/jne.12731>
- Defarge, N., Spiroux de Vendomois, J., & Seralini, G. E. (2018). Toxicity of formulants and heavy metals in glyphosate-based herbicides and other pesticides. *Toxicol Rep*, *5*, 156-163. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2017.12.025>
- Defarge, N., Takacs, E., Lozano, V. L., Mesnage, R., Spiroux de Vendomois, J., Seralini, G. E., & Szekacs, A. (2016). Co-Formulants in Glyphosate-Based Herbicides Disrupt Aromatase Activity in Human Cells below Toxic Levels. *Int J Environ Res Public Health*, *13*(3). <https://doi.org/10.3390/ijerph13030264>
- Delfosse, V., Grimaldi, M., Pons, J. L., Boulahtouf, A., le Maire, A., Cavailles, V., . . . Balaguer, P. (2012). Structural and mechanistic insights into bisphenols action provide guidelines for risk assessment and discovery of bisphenol A substitutes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(37), 14930-14935. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203574109>
- Delfosse, V., Maire, A. L., Balaguer, P., & Bourguet, W. (2014). A structural perspective on nuclear receptors as targets of environmental compounds. *Acta Pharmacol Sin*. <https://doi.org/10.1038/aps.2014.133>
- Demeneix, B., & Slama, R. (2019). Endocrine Disruptors: From Scientific Evidence to Human Health Protection. *Policy Department for Citizens' Rights and Constitutional Affairs, European Parliament*. Acceso: 30 de noviembre de 2022. http://www.europarl.europa.eu/thinktank/es/document.html?reference=IPOL_STU%282019%29608866
- Dolinoy, D. C. (2007). Epigenetic gene regulation: early environmental exposures. *Pharmacogenomics*, *8*(1), 5-10. <https://doi.org/10.2217/14622416.8.1.5>
- Doshi, T., Mehta, S. S., Dighe, V., Balasinor, N., & Vanage, G. (2011). Hypermethylation of estrogen receptor promoter region in adult testis of rats exposed neonatally to bisphenol A. *Toxicology*, *289*(2-3), 74-82. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.07.011>
- Duforestel, M., Nadaradjane, A., Bougras-Cartron, G., Briand, J., Olivier, C., Frenel, J. S., . . . Cartron, P. F. (2019). Glyphosate Primes Mammary Cells for Tumorigenesis by Reprogramming the Epigenome in a TET3-Dependent Manner. *Front Genet*, *10*, 885. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00885>
- Durando, M., Kass, L., Perdomo, V., Bosquiazzo, V. L., Luque, E. H., & Muñoz-de-Toro, M. (2011). Prenatal exposure to bisphenol A promotes angiogenesis and alters steroid-mediated responses in the mammary glands of cycling rats. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *127*(1-2), 35-43. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.04.001>
- Durando, M., Kass, L., Piva, J., Sonnenschein, C., Soto, A. M., Luque, E. H., & Muñoz-de-Toro, M. (2007). Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats. *Environ Health Perspect*, *115*(1), 80-86. <https://doi.org/10.1289/ehp.9282>

- Edwards, P. G., Murphy, T. M., & Lydy, M. J. (2016). Fate and transport of agriculturally applied fungicidal compounds, azoxystrobin and propiconazole. *Chemosphere*, *146*, 450-457. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.11.116>
- EFSA. (2015). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA Journal*, *13*(11), 4302. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4302>
- EFSA. (2017). Peer review of the pesticide risk assessment of the potential endocrine disrupting properties of glyphosate. *EFSA Journal*, *15*(9), 4979. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4979>
- EFSA, Anastassiadou, M., Bernasconi, G., Brancato, A., Carrasco Cabrera, L., Ferreira, L., . . . Verani, A. (2021). Evaluation of confirmatory data following the Article 12 MRL review for propiconazole. *EFSA Journal*, *19*(2), 6405. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6405>
- EFSA, Arena, M., Auteri, D., Barmaz, S., Bellisai, G., Brancato, A., . . . Villamar-Bouza, L. (2017). Peer review of the pesticide risk assessment of the active substance propiconazole. *EFSA Journal*, *15*(7), 4887. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4887>
- EFSA, Medina-Pastor, P., & Triacchini, G. (2020). The 2018 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA Journal*, *18*(4), 6057. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6057>
- Eighmy, J. J., Sharma, A. K., & Blackshear, P. E. (2018). Chapter 21 - Mammary Gland. En A. W. Suttie (Ed.), *Boorman's Pathology of the Rat (Second Edition)* (pp. 369-388). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391448-4.00021-6>
- Elfikrie, N., Ho, Y. B., Zaidon, S. Z., Juahir, H., & Tan, E. S. S. (2020). Occurrence of pesticides in surface water, pesticides removal efficiency in drinking water treatment plant and potential health risk to consumers in Tenggi River Basin, Malaysia. *Sci Total Environ*, *712*, 136540. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136540>
- Ender, P., Gagliardi, P. A., Dobrzyński, M., Dessauges, C., Höhener, T., Jacques, M.-A., . . . Pertz, O. (2020). Spatio-temporal Control of ERK Pulse Frequency Coordinates Fate Decisions during Mammary Acinar Morphogenesis. *bioRxiv*, 2020.2011.2020.387167. <https://doi.org/10.1101/2020.11.20.387167>
- EPA. (2006). Reregistration Eligibility Decision (RED) for Propiconazole. Acceso: 15 de diciembre de 2022. <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2005-0497-0050>
- EPA. (2015a). EDSP: weight of evidence analysis of potential interaction with the estrogen, androgen or thyroid pathways. Chemical: glyphosate. Acceso: 19 de octubre de 2018. <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2009-0361-0047>
- EPA. (2015b). Problem Formulation of the Environmental Fate and Ecological Risk in Support of the Registration Review of Propiconazole. Acceso: 20 de diciembre de 2022. <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2015-0459-0007>
- EPA. (2015c). Propiconazole: Human Health Risk Scoping Document in Support of Registration Review. Acceso: 13 de diciembre de 2022. <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2015-0459-0008>
- EPA. (2017a). Glyphosate. Draft Human Health Risk Assessment in Support of Registration Review. Acceso: 9 de diciembre de 2022. <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2009-0361-0068>

- EPA. (2017b). Revised Glyphosate Issue Paper: Evaluation of Carcinogenic Potential. EPA's Office of Pesticide Programs. Acceso: 30 de marzo de 2020. <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2009-0361-0073>
- EPA. (2019). Propiconazole Human Health Risk Assessment for the New Use of Propiconazole on Avocado, along with Conversion to Brassica, leafy greens, subgroup 4-16B, except watercress, Leaf petiole vegetable subgroup 22B, Celtuce, Florence fennel, Swiss chard, and the expansion to Vegetable, root, except sugar beet, subgroup 1B. Acceso: 3 de febrero de 2022. <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2018-0127-0007>
- FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division). (2019). *Pesticides use*. Acceso: 2 de febrero de 2022. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/RP/visualize>
- Fata, J. E., Mori, H., Ewald, A. J., Zhang, H., Yao, E., Werb, Z., & Bissell, M. J. (2007). The MAPK(ERK-1,2) pathway integrates distinct and antagonistic signals from TGFalpha and FGF7 in morphogenesis of mouse mammary epithelium. *Dev Biol*, *306*(1), 193-207. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.03.013>
- Feng, Y., Manka, D., Wagner, K. U., & Khan, S. A. (2007). Estrogen receptor-alpha expression in the mammary epithelium is required for ductal and alveolar morphogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(37), 14718-14723. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706933104>
- Fenton, S. E. (2006). Endocrine-disrupting compounds and mammary gland development: early exposure and later life consequences. *Endocrinology*, *147*(6 Suppl), S18-24. <https://doi.org/10.1210/en.2005-1131>
- Ferguson, J. E., Schor, A. M., Howell, A., & Ferguson, M. W. (1992). Changes in the extracellular matrix of the normal human breast during the menstrual cycle. *Cell Tissue Res*, *268*(1), 167-177. <https://doi.org/10.1007/BF00338066>
- Filgo, A. J., Foley, J. F., Puvanesarajah, S., Borde, A. R., Midkiff, B. R., Reed, C. E., . . . Fenton, S. E. (2016). Mammary Gland Evaluation in Juvenile Toxicity Studies: Temporal Developmental Patterns in the Male and Female Harlan Sprague-Dawley Rat. *Toxicol Pathol*, *44*(7), 1034-1058. <https://doi.org/10.1177/0192623316663864>
- Forsyth, I. (1999). Mammary Gland, overview. En E. Knobil, Nelly, D. J. (Ed.), *Encyclopedia of reproduction* (Vol. 3, pp. 81-88). Academic Press.
- Gao, Y. R., Walters, K. A., Desai, R., Zhou, H., Handelsman, D. J., & Simanainen, U. (2014). Androgen receptor inactivation resulted in acceleration in pubertal mammary gland growth, upregulation of ERalpha expression, and Wnt/beta-catenin signaling in female mice. *Endocrinology*, *155*(12), 4951-4963. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1226>
- Gasnier, C., Dumont, C., Benachour, N., Clair, E., Chagnon, M. C., & Seralini, G. E. (2009). Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology*, *262*(3), 184-191. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.06.006>
- Gauss, K. A., Bunker, P. L., Crawford, M. A., McDermott, B. E., Swearingen, R., Nelson-Overton, L. K., . . . Quinn, M. T. (2006). Variants of the 5'-untranslated region of human NCF2: expression and translational efficiency. *Gene*, *366*(1), 169-179. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.09.012>

- Ghasemi, A., Jeddi, S., & Kashfi, K. (2021). The laboratory rat: Age and body weight matter. *EXCLI J*, 20, 1431-1445. <https://doi.org/10.17179/excli2021-4072>
- Gill, K., Kirma, N., & Tekmal, R. R. (2001). Overexpression of aromatase in transgenic male mice results in the induction of gynecomastia and other biochemical changes in mammary glands. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 77(1), 13-18. [https://doi.org/10.1016/s0960-0760\(01\)00032-2](https://doi.org/10.1016/s0960-0760(01)00032-2)
- Gillezeau, C., van Gerwen, M., Shaffer, R. M., Rana, I., Zhang, L., Sheppard, L., & Taioli, E. (2019). The evidence of human exposure to glyphosate: a review. *Environ Health*, 18(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s12940-018-0435-5>
- Gjorevski, N., & Nelson, C. M. (2011). Integrated morphodynamic signalling of the mammary gland. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(9), 581-593. <https://doi.org/10.1038/nrm3168>
- Goetz, A. K., Ren, H., Schmid, J. E., Blystone, C. R., Thillainadarajah, I., Best, D. S., . . . Dix, D. J. (2007). Disruption of testosterone homeostasis as a mode of action for the reproductive toxicity of triazole fungicides in the male rat. *Toxicol Sci*, 95(1), 227-239. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl124>
- Gomez-Gimenez, B., Llansola, M., Cabrera-Pastor, A., Hernandez-Rabaza, V., Agusti, A., & Felipo, V. (2018). Endosulfan and Cypermethrin Pesticide Mixture Induces Synergistic or Antagonistic Effects on Developmental Exposed Rats Depending on the Analyzed Behavioral or Neurochemical End Points. *ACS Chem Neurosci*, 9(2), 369-380. <https://doi.org/10.1021/acchemneuro.7b00364>
- Gomez, A. L., Delconte, M. B., Altamirano, G. A., Vigezzi, L., Bosquiazzo, V. L., Barbisan, L. F., . . . Kass, L. (2017). Perinatal Exposure to Bisphenol A or Diethylstilbestrol Increases the Susceptibility to Develop Mammary Gland Lesions After Estrogen Replacement Therapy in Middle-Aged Rats. *Horm Cancer*, 8(2), 78-89. <https://doi.org/10.1007/s12672-016-0282-1>
- Gore, A. C., Chappell, V. A., Fenton, S. E., Flaws, J. A., Nadal, A., Prins, G. S., . . . Zoeller, R. T. (2015). EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocr Rev*, 36(6), E1-E150. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1010>
- Gouda, Z. A., Ahmed, S. M., & Elghonaimy, N. M. (2015). Characterization of adult male albino rat mammary gland: a histological and serological study. *Journal of Histology and Histopathology*, 2(1). <https://doi.org/10.7243/2055-091X-2-5>
- Greaves, P., Goonetilleke, R., Nunn, G., Topham, J., & Orton, T. (1993). Two-year carcinogenicity study of tamoxifen in Alderley Park Wistar-derived rats. *Cancer Res*, 53(17), 3919-3924. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8358718>
- Guerrero Schimpf, M., Milesi, M. M., Ingaramo, P. I., Luque, E. H., & Varayoud, J. (2017). Neonatal exposure to a glyphosate based herbicide alters the development of the rat uterus. *Toxicology*, 376, 2-14. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2016.06.004>
- Guerrero Schimpf, M., Milesi, M. M., Zanardi, M. V., & Varayoud, J. (2022). Disruption of developmental programming with long-term consequences after exposure to a glyphosate-based herbicide in a rat model. *Food Chem Toxicol*, 159, 112695. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112695>

- Harris, J., Stanford, P. M., Oakes, S. R., & Ormandy, C. J. (2004). Prolactin and the prolactin receptor: new targets of an old hormone. *Ann Med*, 36(6), 414-425. <https://doi.org/10.1080/07853890410033892>
- Henderson, A. M., Gervais, J. A., Luukinen, B., Buhl, K., & Stone, D. (2010). *Glyphosate technical fact sheet. National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services*. Acceso: 20 de febrero de 2022. <http://npic.orst.edu/factsheets/archive/glyphotech.html>
- Hernandez, A. F., Gil, F., & Lacasana, M. (2017). Toxicological interactions of pesticide mixtures: an update. *Arch Toxicol*, 91(10), 3211-3223. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2043-5>
- Hervouet, E., Cartron, P. F., Jouvenot, M., & Delage-Mourroux, R. (2013). Epigenetic regulation of estrogen signaling in breast cancer. *Epigenetics*, 8(3), 237-245. <https://doi.org/10.4161/epi.23790>
- Hickey, T. E., Robinson, J. L., Carroll, J. S., & Tilley, W. D. (2012). Minireview: The androgen receptor in breast tissues: growth inhibitor, tumor suppressor, oncogene? *Mol Endocrinol*, 26(8), 1252-1267. <https://doi.org/10.1210/me.2012-1107>
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, 11(9), 1026-1030. <https://doi.org/10.1038/nbt0993-1026>
- Hovey, R. C., & Aimo, L. (2010). Diverse and active roles for adipocytes during mammary gland growth and function. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 15(3), 279-290. <https://doi.org/10.1007/s10911-010-9187-8>
- Hua, H., Zhang, H., Kong, Q., & Jiang, Y. (2018). Mechanisms for estrogen receptor expression in human cancer. *Exp Hematol Oncol*, 7, 24. <https://doi.org/10.1186/s40164-018-0116-7>
- Huebner, R. J., Neumann, N. M., & Ewald, A. J. (2016). Mammary epithelial tubes elongate through MAPK-dependent coordination of cell migration. *Development*, 143(6), 983-993. <https://doi.org/10.1242/dev.127944>
- Hvid, H., Fels, J. J., Kirk, R. K., Thorup, I., Jensen, H. E., Hansen, B. F., & Oleksiewicz, M. B. (2011). In situ phosphorylation of Akt and ERK1/2 in rat mammary gland, colon, and liver following treatment with human insulin and IGF-1. *Toxicol Pathol*, 39(4), 623-640. <https://doi.org/10.1177/0192623311406936>
- Hynes, N. E., & Watson, C. J. (2010). Mammary gland growth factors: roles in normal development and in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(8), a003186. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003186>
- Imagawa, W., Bandyopadhyay, G. K., & Nandi, S. (1990). Regulation of mammary epithelial cell growth in mice and rats. *Endocr Rev*, 11(4), 494-523. <https://doi.org/10.1210/edrv-11-4-494>
- Imagawa, W., Yang, J., Guzman, R., & Nandi, S. (1994). Control of mammary gland development. En E. Knobil & J. D. Neill (Eds.), *The Physiology of Reproduction* (2nd ed., Vol. 2). Raven Press.
- Ingaramo, P., Alarcon, R., Munoz-de-Toro, M., & Luque, E. H. (2020). Are glyphosate and glyphosate-based herbicides endocrine disruptors that alter female fertility? *Mol Cell Endocrinol*, 518, 110934. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110934>

- Ingaramo, P. I., Guerrero Schimpf, M., Milesi, M. M., Luque, E. H., & Varayoud, J. (2019). Acute uterine effects and long-term reproductive alterations in postnatally exposed female rats to a mixture of commercial formulations of endosulfan and glyphosate. *Food Chem Toxicol*, *134*, 110832. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110832>
- Ingaramo, P. I., Varayoud, J., Milesi, M. M., Guerrero Schimpf, M., Alarcon, R., Muñoz-de-Toro, M., & Luque, E. H. (2017). Neonatal exposure to a glyphosate-based herbicide alters uterine decidualization in rats. *Reprod Toxicol*, *73*, 87-95. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.07.022>
- Ingaramo, P. I., Varayoud, J., Milesi, M. M., Schimpf, M. G., Munoz-de-Toro, M., & Luque, E. H. (2016). Effects of neonatal exposure to a glyphosate-based herbicide on female rat reproduction. *Reproduction*, *152*(5), 403-415. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0171>
- INRS. (2019). *Institut National de Recherche et de Sécurité. Base de donnée. Fiches Toxicologiques: Glyphosate, Fiche toxicologique N° 273*. Acceso: 4 de enero de 2022. http://www.inrs.fr/publications/bdd/fichetox/fiche.html?refINRS=FICHETOX_273
- Ishii, H., Kobayashi, M., & Sakuma, Y. (2010). Alternative promoter usage and alternative splicing of the rat estrogen receptor alpha gene generate numerous mRNA variants with distinct 5'-ends. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *118*(1-2), 59-69. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2009.10.001>
- Jacobs, M. N., Marczylo, E. L., Guerrero-Bosagna, C., & Rüegg, J. (2017). Marked for Life: Epigenetic Effects of Endocrine Disrupting Chemicals. *Annual Review of Environment and Resources*, *42*(1), 105-160. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-102016-061111>
- Jacobsen, P. R., Axelstad, M., Boberg, J., Isling, L. K., Christiansen, S., Mandrup, K. R., . . . Hass, U. (2012). Persistent developmental toxicity in rat offspring after low dose exposure to a mixture of endocrine disrupting pesticides. *Reprod Toxicol*, *34*(2), 237-250. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.05.099>
- Janesick, A. S., & Blumberg, B. (2016). Obesogens: an emerging threat to public health. *Am J Obstet Gynecol*, *214*(5), 559-565. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2016.01.182>
- Jarrell, Z. R., Ahammad, M. U., & Benson, A. P. (2020). Glyphosate-based herbicide formulations and reproductive toxicity in animals. *Vet Anim Sci*, *10*, 100126. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2020.100126>
- JMPR. (2006). Pesticide residues in food: 2004. Toxicological evaluations / Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group, Rome, Italy, 20-29 September 2004. (WHO/PCS/06.1). Acceso: 6 de octubre de 2022. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43624>
- JMPR. (2007). Pesticide Residues in Food 2007 - Report 2007. Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group, Geneva, Switzerland, 18-27 September 2007. Acceso: 6 de octubre de 2022. <https://www.fao.org/publications/card/es/c/a88a681d-df67-5cce-939f-6703650eeb03/>
- JMPR. (2016). Pesticide residues in food 2016 - Report 2016 - Special session of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues Geneva, Switzerland, 9-13 May 2016. Acceso: 30 de marzo de 2020. <https://www.fao.org/publications/card/es/c/22b948ec-af63-45c9-8de1-34153d2482c5/>

- Johansson, H. K. L., Schwartz, C. L., Nielsen, L. N., Boberg, J., Vinggaard, A. M., Bahl, M. I., & Svingen, T. (2018). Exposure to a glyphosate-based herbicide formulation, but not glyphosate alone, has only minor effects on adult rat testis. *Reprod Toxicol*, *82*, 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.09.008>
- Jones, P. A. (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*, *13*(7), 484-492. <https://doi.org/10.1038/nrg3230>
- Juliatti, F. C., De Azevedo, L. A. S., & Juliatti, F. C. (2017). Strategies of Chemical Protection for Controlling Soybean Rust. En M. Kasai (Ed.), *Soybean - The Basis of Yield, Biomass and Productivity*. IntechOpen. <https://doi.org/https://doi.org/10.5772/67454>
- Jung, M., & Pfeifer, G. P. (2013). CpG Islands. En S. Maloy & K. Hughes (Eds.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)* (pp. 205-207). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00349-1>
- Junqueira, L. C., & Junqueira, J. L. (1983). *Técnicas básicas en citología e histología*. Santos.
- Kang, S. C., & Lee, B. M. (2005). DNA methylation of estrogen receptor alpha gene by phthalates. *J Toxicol Environ Health A*, *68*(23-24), 1995-2003. <https://doi.org/10.1080/15287390491008913>
- Kariagina, A., Xie, J., Leipprandt, J. R., & Haslam, S. Z. (2010). Amphiregulin mediates estrogen, progesterone, and EGFR signaling in the normal rat mammary gland and in hormone-dependent rat mammary cancers. *Horm Cancer*, *1*(5), 229-244. <https://doi.org/10.1007/s12672-010-0048-0>
- Karlsson, S., Hirsimaki, Y., Mantyla, E., Nieminen, L., Kangas, L., Hirsimaki, P., . . . Williams, G. M. (1996). A two-year dietary carcinogenicity study of the antiestrogen toremifene in Sprague-Dawley rats. *Drug Chem Toxicol*, *19*(4), 245-266. <https://doi.org/10.3109/01480549608998236>
- Kass, L., Altamirano, G. A., Bosquiazzo, V. L., Luque, E. H., & Muñoz-de-Toro, M. (2012). Perinatal exposure to xenoestrogens impairs mammary gland differentiation and modifies milk composition in Wistar rats. *Reprod Toxicol*, *33*(3), 390-400. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.02.002>
- Kass, L., Durando, M., Altamirano, G. A., Manfroni-Ghibaud, G. E., Luque, E. H., & Muñoz-de-Toro, M. (2015). Prenatal Bisphenol A exposure delays the development of the male rat mammary gland. *Reprod Toxicol*, *54*, 37-46. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.02.001>
- Kass, L., Gomez, A. L., & Altamirano, G. A. (2020). Relationship between agrochemical compounds and mammary gland development and breast cancer. *Mol Cell Endocrinol*, *508*, 110789. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110789>
- Kato, J., Hirata, S., Koh, T., Yamada-Mouri, N., Hoshi, K., & Okinaga, S. (1998). The multiple untranslated first exons and promoters system of the oestrogen receptor gene in the brain and peripheral tissues of the rat and monkey and the developing rat cerebral cortex. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *65*(1-6), 281-293. [https://doi.org/10.1016/s0960-0760\(97\)00184-2](https://doi.org/10.1016/s0960-0760(97)00184-2)
- Kennel, P., Pallen, C., Barale-Thomas, E., Espuna, G., & Bars, R. (2003). Tamoxifen: 28-day oral toxicity study in the rat based on the Enhanced OECD Test Guideline 407 to detect

- endocrine effects. *Arch Toxicol*, 77(9), 487-499. <https://doi.org/10.1007/s00204-003-0476-5>
- Kheradmand, F., Rishi, K., & Werb, Z. (2002). Signaling through the EGF receptor controls lung morphogenesis in part by regulating MT1-MMP-mediated activation of gelatinase A/MMP2. *J Cell Sci*, 115(Pt 4), 839-848. <https://doi.org/10.1242/jcs.115.4.839>
- Kjaerstad, M. B., Taxvig, C., Andersen, H. R., & Nellemann, C. (2010). Mixture effects of endocrine disrupting compounds in vitro. *Int J Androl*, 33(2), 425-433. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2009.01034.x>
- Kjaerstad, M. B., Taxvig, C., Nellemann, C., Vinggaard, A. M., & Andersen, H. R. (2010). Endocrine disrupting effects in vitro of conazole antifungals used as pesticides and pharmaceuticals. *Reprod Toxicol*, 30(4), 573-582. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.07.009>
- Kjeldsen, L. S., Ghisari, M., & Bonefeld-Jorgensen, E. C. (2013). Currently used pesticides and their mixtures affect the function of sex hormone receptors and aromatase enzyme activity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 272(2), 453-464. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.06.028>
- Kleinberg, D. L., Feldman, M., & Ruan, W. (2000). IGF-I: an essential factor in terminal end bud formation and ductal morphogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 5(1), 7-17. <https://doi.org/10.1023/a:1009507030633>
- Knight, C. H., & Peaker, M. (1982). Development of the mammary gland. *J Reprod Fertil*, 65(2), 521-536. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7097655>
- Knower, K. C., To, S. Q., Leung, Y. K., Ho, S. M., & Clyne, C. D. (2014). Endocrine disruption of the epigenome: a breast cancer link. *Endocr Relat Cancer*, 21(2), T33-55. <https://doi.org/10.1530/ERC-13-0513>
- Koledova, Z., Zhang, X., Streuli, C., Clarke, R. B., Klein, O. D., Werb, Z., & Lu, P. (2016). SPRY1 regulates mammary epithelial morphogenesis by modulating EGFR-dependent stromal paracrine signaling and ECM remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(39), E5731-5740. <https://doi.org/10.1073/pnas.1611532113>
- Kongtip, P., Nankongnab, N., Phupancharoensuk, R., Palarach, C., Sujirarat, D., Sangprasert, S., . . . Woskie, S. R. (2017). Glyphosate and Paraquat in Maternal and Fetal Serums in Thai Women. *J Agromedicine*, 22(3), 282-289. <https://doi.org/10.1080/1059924X.2017.1319315>
- Kos, M., Denger, S., Reid, G., & Gannon, F. (2002). Upstream open reading frames regulate the translation of the multiple mRNA variants of the estrogen receptor alpha. *J Biol Chem*, 277(40), 37131-37138. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206325200>
- Kos, M., Reid, G., Denger, S., & Gannon, F. (2001). Minireview: genomic organization of the human ERalpha gene promoter region. *Mol Endocrinol*, 15(12), 2057-2063. <https://doi.org/10.1210/mend.15.12.0731>
- Kubsad, D., Nilsson, E. E., King, S. E., Sadler-Riggelman, I., Beck, D., & Skinner, M. K. (2019). Assessment of Glyphosate Induced Epigenetic Transgenerational Inheritance of Pathologies and Sperm Epimutations: Generational Toxicology. *Sci Rep*, 9(1), 6372. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42860-0>

- Lacau-Mengido, I. M., Libertun, C., & Becú-Villalobos, D. (1996). Different serotonin receptor subtypes participate in the 5-HTP induced gonadotropins and prolactin release in the female infantile rat. *Neuroendocrinology*, 63, 415-421. <https://doi.org/10.1159/000127089>
- Lajmanovich, R. C., Junges, C. M., Attademo, A. M., Peltzer, P. M., Cabagna-Zenklusen, M. C., & Basso, A. (2013). Individual and Mixture Toxicity of Commercial Formulations Containing Glyphosate, Metsulfuron-Methyl, Bispyribac-Sodium, and Picloram on *Rhinella arenarum* Tadpoles. *Water, Air, & Soil Pollution*, 224(3), 1404. <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1404-1>
- Latendresse, J. R., Bucci, T. J., Olson, G., Mellick, P., Weis, C. C., Thorn, B., . . . Delclos, K. B. (2009). Genistein and ethinyl estradiol dietary exposure in multigenerational and chronic studies induce similar proliferative lesions in mammary gland of male Sprague-Dawley rats. *Reprod Toxicol*, 28(3), 342-353. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.04.006>
- Laville, N., Balaguer, P., Brion, F., Hinfray, N., Casellas, C., Porcher, J. M., & Ait-Aissa, S. (2006). Modulation of aromatase activity and mRNA by various selected pesticides in the human choriocarcinoma JEG-3 cell line. *Toxicology*, 228(1), 98-108. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.08.021>
- Lee, D. K., & Chang, C. (2003). Endocrine mechanisms of disease: Expression and degradation of androgen receptor: mechanism and clinical implication. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(9), 4043-4054. <https://doi.org/10.1210/jc.2003-030261>
- Lewis, E. M., Barnett, J. F., Jr., Freshwater, L., Hoberman, A. M., & Christian, M. S. (2002). Sexual maturation data for Crl Sprague-Dawley rats: criteria and confounding factors. *Drug Chem Toxicol*, 25(4), 437-458. <https://doi.org/10.1081/dct-120014794>
- Li, E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet*, 3(9), 662-673. <https://doi.org/10.1038/nrg887>
- Liu, M. M., Albanese, C., Anderson, C. M., Hilty, K., Webb, P., Uht, R. M., . . . Kushner, P. J. (2002). Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression. *J Biol Chem*, 277(27), 24353-24360. <https://doi.org/10.1074/jbc.M201829200>
- Lorenz, V., Milesi, M. M., Schimpf, M. G., Luque, E. H., & Varayoud, J. (2019). Epigenetic disruption of estrogen receptor alpha is induced by a glyphosate-based herbicide in the preimplantation uterus of rats. *Mol Cell Endocrinol*, 480, 133-141. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.10.022>
- Lorenz, V., Pacini, G., Luque, E. H., Varayoud, J., & Milesi, M. M. (2020). Perinatal exposure to glyphosate or a glyphosate-based formulation disrupts hormonal and uterine milieu during the receptive state in rats. *Food Chem Toxicol*, 143, 111560. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111560>
- Lu, P., Ewald, A. J., Martin, G. R., & Werb, Z. (2008). Genetic mosaic analysis reveals FGF receptor 2 function in terminal end buds during mammary gland branching morphogenesis. *Dev Biol*, 321(1), 77-87. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.06.005>
- Lucas, J. N., Rudmann, D. G., Credille, K. M., Irizarry, A. R., Peter, A., & Snyder, P. W. (2007). The rat mammary gland: morphologic changes as an indicator of systemic hormonal perturbations induced by xenobiotics. *Toxicol Pathol*, 35(2), 199-207. <https://doi.org/10.1080/01926230601156260>

- Lupi, L., Bedmar, F., Puricelli, M., Marino, D., Aparicio, V. C., Wunderlin, D., & Miglioranza, K. S. B. (2019). Glyphosate runoff and its occurrence in rainwater and subsurface soil in the nearby area of agricultural fields in Argentina. *Chemosphere*, 225, 906-914. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.090>
- Mac Loughlin, T. M., Peluso, L., & Marino, D. J. G. (2017). Pesticide impact study in the peri-urban horticultural area of Gran La Plata, Argentina. *Sci Total Environ*, 598, 572-580. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.116>
- Mac Loughlin, T. M., Peluso, M. L., & Marino, D. J. G. (2022). Multiple pesticides occurrence, fate, and environmental risk assessment in a small horticultural stream of Argentina. *Sci Total Environ*, 802, 149893. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149893>
- Mamy, L., Gabrielle, B., & Barriuso, E. (2010). Comparative environmental impacts of glyphosate and conventional herbicides when used with glyphosate-tolerant and non-tolerant crops. *Environ Pollut*, 158(10), 3172-3178. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.06.036>
- Mandrup, K., Boberg, J., Isling, L. K., Christiansen, S., & Hass, U. (2016). Low-dose effects of bisphenol A on mammary gland development in rats. *Andrology*, 4(4), 673-683. <https://doi.org/10.1111/andr.12193>
- Mandrup, K. R., Hass, U., Christiansen, S., & Boberg, J. (2012). Perinatal ethinyl oestradiol alters mammary gland development in male and female Wistar rats. *Int J Androl*, 35(3), 385-396. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2012.01258.x>
- Mandrup, K. R., Johansson, H. K., Boberg, J., Pedersen, A. S., Mortensen, M. S., Jorgensen, J. S., . . . Hass, U. (2015). Mixtures of environmentally relevant endocrine disrupting chemicals affect mammary gland development in female and male rats. *Reprod Toxicol*, 54, 47-57. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.09.016>
- Manservigi, F., Lesseur, C., Panzacchi, S., Mandrioli, D., Falcioni, L., Bua, L., . . . Belpoggi, F. (2019). The Ramazzini Institute 13-week pilot study glyphosate-based herbicides administered at human-equivalent dose to Sprague Dawley rats: effects on development and endocrine system. *Environ Health*, 18(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s12940-019-0453-y>
- March, G. J. (2014). *Agricultura y plaguicidas: un análisis global*. Fundación Agropecuaria para el Desarrollo de Argentina. <https://fundacionfada.org/informes/agricultura-y-plaguicidas-un-analisis-global/>
- Martini, C. N., Gabrielli, M., Brandani, J. N., & Vila Mdel, C. (2016). Glyphosate Inhibits PPAR Gamma Induction and Differentiation of Preadipocytes and is able to Induce Oxidative Stress. *J Biochem Mol Toxicol*, 30(8), 404-413. <https://doi.org/10.1002/jbt.21804>
- Martins-Gomes, C., Silva, T. L., Andreani, T., & Silva, A. M. (2022). Glyphosate vs. Glyphosate-Based Herbicides Exposure: A Review on Their Toxicity. *J Xenobiot*, 12(1), 21-40. <https://doi.org/10.3390/jox12010003>
- Mas, L. I., Aparicio, V. C., De Gerónimo, E., & Costa, J. L. (2020). Pesticides in water sources used for human consumption in the semiarid region of Argentina. *SN Applied Sciences*, 2(4), 691. <https://doi.org/10.1007/s42452-020-2513-x>

- Masso-Welch, P. A., Darcy, K. M., Stangle-Castor, N. C., & Ip, M. M. (2000). A developmental atlas of rat mammary gland histology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 5(2), 165-185. <https://doi.org/10.1023/a:1026491221687>
- Mathiesen, L., Morck, T. A., Poulsen, M. S., Nielsen, J. K. S., Mose, T., Long, M., . . . Knudsen, L. E. (2020). Placental transfer of pesticides studied in human placental perfusion. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 127(6), 505-515. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13456>
- McGuire, M. K., McGuire, M. A., Price, W. J., Shafii, B., Carrothers, J. M., Lackey, K. A., . . . Vicini, J. L. (2016). Glyphosate and aminomethylphosphonic acid are not detectable in human milk. *Am J Clin Nutr*, 103(5), 1285-1290. <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.126854>
- McLachlan, J. A. (2001). Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocr Rev*, 22(3), 319-341. <https://doi.org/10.1210/edrv.22.3.0432>
- Medina, D. (1996). The mammary gland: a unique organ for the study of development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 1(1), 5-19. <https://doi.org/10.1007/BF02096299>
- Mendez, M. J., Aimar, S. B., Aparicio, V. C., Ramirez Haberkon, N. B., Buschiazzo, D. E., De Gerónimo, E., & Costa, J. L. (2017). Glyphosate and Aminomethylphosphonic acid (AMPA) contents in the respirable dust emitted by an agricultural soil of the central semiarid region of Argentina. *Aeolian Research*, 29, 23-29. <https://doi.org/10.1016/j.aeolia.2017.09.004>
- Mesnager, R., & Antoniou, M. N. (2018). Ignoring Adjuvant Toxicity Falsifies the Safety Profile of Commercial Pesticides. *Front Public Health*, 5, 361. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00361>
- Mesnager, R., Arno, M., Costanzo, M., Malatesta, M., Seralini, G. E., & Antoniou, M. N. (2015). Transcriptome profile analysis reflects rat liver and kidney damage following chronic ultra-low dose Roundup exposure. *Environ Health*, 14, 70. <https://doi.org/10.1186/s12940-015-0056-1>
- Mesnager, R., Benbrook, C., & Antoniou, M. N. (2019). Insight into the confusion over surfactant co-formulants in glyphosate-based herbicides. *Food Chem Toxicol*, 128, 137-145. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.053>
- Mesnager, R., Defarge, N., Spiroux de Vendomois, J., & Seralini, G. E. (2015). Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food Chem Toxicol*, 84, 133-153. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.012>
- Mesnager, R., Phedonos, A., Biserni, M., Arno, M., Balu, S., Corton, J. C., . . . Antoniou, M. N. (2017). Evaluation of estrogen receptor alpha activation by glyphosate-based herbicide constituents. *Food Chem Toxicol*, 108(Pt A), 30-42. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.07.025>
- Milesi, M. M., Lorenz, V., Durando, M., Rossetti, M. F., & Varayoud, J. (2021). Glyphosate Herbicide: Reproductive Outcomes and Multigenerational Effects. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 12, 672532. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.672532>
- Milesi, M. M., Lorenz, V., Pacini, G., Repetti, M. R., Demonte, L. D., Varayoud, J., & Luque, E. H. (2018). Perinatal exposure to a glyphosate-based herbicide impairs female

- reproductive outcomes and induces second-generation adverse effects in Wistar rats. *Arch Toxicol*, 92(8), 2629-2643. <https://doi.org/10.1007/s00204-018-2236-6>
- Milesi, M. M., Varayoud, J., Ramos, J. G., & Luque, E. H. (2017). Uterine ERalpha epigenetic modifications are induced by the endocrine disruptor endosulfan in female rats with impaired fertility. *Mol Cell Endocrinol*, 454, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.05.028>
- Miousse, I. R., Gomez-Acevedo, H., Sharma, N., Vantrease, J., Hennings, L., Shankar, K., . . . Ronis, M. J. (2013). Mammary gland morphology and gene expression signature of weanling male and female rats following exposure to exogenous estradiol. *Exp Biol Med (Maywood)*, 238(9), 1033-1046. <https://doi.org/10.1177/1535370213497322>
- Missaghian, E., Kempna, P., Dick, B., Hirsch, A., Alikhani-Koupaei, R., Jegou, B., . . . Fluck, C. E. (2009). Role of DNA methylation in the tissue-specific expression of the CYP17A1 gene for steroidogenesis in rodents. *J Endocrinol*, 202(1), 99-109. <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0353>
- Miyamoto, Y., Kawaguchi, H., & Tanimoto, A. (2018). Relationship between morphological development and sex hormone receptor expression of mammary glands with age in male rats. *Experimental animals*, 67(3), 361-371. <https://doi.org/10.1538/expanim.17-0134>
- Monje, L., Varayoud, J., Luque, E. H., & Ramos, J. G. (2007). Neonatal exposure to bisphenol A modifies the abundance of estrogen receptor alpha transcripts with alternative 5'-untranslated regions in the female rat preoptic area. *J Endocrinol*, 194(1), 201-212. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0014>
- Montes, G. S., & Luque, E. H. (1988). Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Acta Anat (Basel)*, 133(3), 192-199. <https://doi.org/10.1159/000146639>
- Montevil, M., Acevedo, N., Schaeberle, C. M., Bharadwaj, M., Fenton, S. E., & Soto, A. M. (2020). A Combined Morphometric and Statistical Approach to Assess Nonmonotonicity in the Developing Mammary Gland of Rats in the CLARITY-BPA Study. *Environ Health Perspect*, 128(5), 57001. <https://doi.org/10.1289/EHP6301>
- Mueller, S. O., Clark, J. A., Myers, P. H., & Korach, K. S. (2002). Mammary gland development in adult mice requires epithelial and stromal estrogen receptor alpha. *Endocrinology*, 143(6), 2357-2365. <https://doi.org/10.1210/endo.143.6.8836>
- Muñoz-de-Toro, M., Markey, C. M., Wadia, P. R., Luque, E. H., Rubin, B. S., Sonnenschein, C., & Soto, A. M. (2005). Perinatal exposure to bisphenol-A alters peripubertal mammary gland development in mice. *Endocrinology*, 146(9), 4138-4147. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0340>
- Muñoz-de-Toro, M. M., & Luque, E. H. (1997). Lack of relationship between the expression of Hsp27 heat shock estrogen receptor-associated protein and estrogen receptor or progesterone receptor status in male breast carcinoma. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 60(5-6), 277-284. [https://doi.org/10.1016/s0960-0760\(96\)00221-x](https://doi.org/10.1016/s0960-0760(96)00221-x)
- Muñoz-de-Toro, M. M., Maffini, M. V., Kass, L., & Luque, E. H. (1998). Proliferative activity and steroid hormone receptor status in male breast carcinoma. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 67(4), 333-339. [https://doi.org/10.1016/s0960-0760\(98\)00124-1](https://doi.org/10.1016/s0960-0760(98)00124-1)

- Muñoz, J. P., Bleak, T. C., & Calaf, G. M. (2021). Glyphosate and the key characteristics of an endocrine disruptor: A review. *Chemosphere*, 270, 128619. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128619>
- Musgrove, E. A., Davison, E. A., & Ormandy, C. J. (2004). Role of the CDK inhibitor p27 (Kip1) in mammary development and carcinogenesis: insights from knockout mice. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 9(1), 55-66. <https://doi.org/10.1023/B:JOMG.0000023588.55733.84>
- Myers, J. P., Antoniou, M. N., Blumberg, B., Carroll, L., Colborn, T., Everett, L. G., . . . Benbrook, C. M. (2016). Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environ Health*, 15, 19. <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0117-0>
- Nerozzi, C., Recuero, S., Galeati, G., Bucci, D., Spinaci, M., & Yeste, M. (2020). Effects of Roundup and its main component, glyphosate, upon mammalian sperm function and survival. *Sci Rep*, 10(1), 11026. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-67538-w>
- O'Connor, J. C., Davis, L. G., Frame, S. R., & Cook, J. C. (2000). Evaluation of a Tier I screening battery for detecting endocrine-active compounds (EACs) using the positive controls testosterone, coumestrol, progesterone, and RU486. *Toxicol Sci*, 54(2), 338-354. <https://doi.org/10.1093/toxsci/54.2.338>
- O'Connor, J. C., Frame, S. R., & Ladics, G. S. (2002a). Evaluation of a 15-day screening assay using intact male rats for identifying antiandrogens. *Toxicol Sci*, 69(1), 92-108. <https://doi.org/10.1093/toxsci/69.1.92>
- O'Connor, J. C., Frame, S. R., & Ladics, G. S. (2002b). Evaluation of a 15-day screening assay using intact male rats for identifying steroid biosynthesis inhibitors and thyroid modulators. *Toxicol Sci*, 69(1), 79-91. <https://doi.org/10.1093/toxsci/69.1.79>
- OECD. (2008). Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. OECD Publishing*. <https://doi.org/10.1787/9789264070684-en>
- Okazaki, K., Okazaki, S., Nishimura, S., Nakamura, H., Kitamura, Y., Hatayama, K., . . . Hirose, M. (2001). A repeated 28-day oral dose toxicity study of methoxychlor in rats, based on the 'enhanced OECD test guideline 407' for screening endocrine-disrupting chemicals. *Arch Toxicol*, 75(9), 513-521. <https://doi.org/10.1007/s002040100273>
- Owagboriaye, F. O., Dedek, G. A., Ademolu, K. O., Olujimi, O. O., Ashidi, J. S., & Adeyinka, A. A. (2017). Reproductive toxicity of Roundup herbicide exposure in male albino rat. *Exp Toxicol Pathol*, 69(7), 461-468. <https://doi.org/10.1016/j.etp.2017.04.007>
- Paine, I. S., & Lewis, M. T. (2017). The Terminal End Bud: the Little Engine that Could. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 22(2), 93-108. <https://doi.org/10.1007/s10911-017-9372-0>
- Panzacchi, S., Mandrioli, D., Manservigi, F., Bua, L., Falcioni, L., Spinaci, M., . . . Belpoggi, F. (2018). The Ramazzini Institute 13-week study on glyphosate-based herbicides at human-equivalent dose in Sprague Dawley rats: study design and first in-life endpoints evaluation. *Environ Health*, 17(1), 52. <https://doi.org/10.1186/s12940-018-0393-y>

- Papadakis, E. N., Tسابoula, A., Vryzas, Z., Kotopoulou, A., Kintzikoglou, K., & Papadopoulou-Mourkidou, E. (2018). Pesticides in the rivers and streams of two river basins in northern Greece. *Sci Total Environ*, *624*, 732-743. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.074>
- Papoutsis, A. J., Selmin, O. I., Borg, J. L., & Romagnolo, D. F. (2015). Gestational exposure to the AhR agonist 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces BRCA-1 promoter hypermethylation and reduces BRCA-1 expression in mammary tissue of rat offspring: preventive effects of resveratrol. *Mol Carcinog*, *54*(4), 261-269. <https://doi.org/10.1002/mc.22095>
- Parodi, D. A., Greenfield, M., Evans, C., Chichura, A., Alpaugh, A., Williams, J., & Martin, M. B. (2015). Alteration of mammary gland development and gene expression by in utero exposure to arsenic. *Reprod Toxicol*, *54*, 66-75. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.12.011>
- Parvez, S., Gerona, R. R., Proctor, C., Friesen, M., Ashby, J. L., Reiter, J. L., . . . Winchester, P. D. (2018). Glyphosate exposure in pregnancy and shortened gestational length: a prospective Indiana birth cohort study. *Environ Health*, *17*(1), 23. <https://doi.org/10.1186/s12940-018-0367-0>
- Pavlovich, A. L., Boghaert, E., & Nelson, C. M. (2011). Mammary branch initiation and extension are inhibited by separate pathways downstream of TGFbeta in culture. *Exp Cell Res*, *317*(13), 1872-1884. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.03.017>
- Peng, F. J., Emond, C., Hardy, E. M., Sauvageot, N., Alkerwi, A., Lair, M. L., . . . Luxembourg, N. p. g. f. t. G. D. o. (2021). Population-based biomonitoring of exposure to persistent and non-persistent organic pollutants in the Grand Duchy of Luxembourg: Results from hair analysis. *Environ Int*, *153*, 106526. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106526>
- Peng, F. J., Hardy, E. M., Mezzache, S., Bourokba, N., Palazzi, P., Stojiljkovic, N., . . . Appenzeller, B. M. R. (2020). Exposure to multiclass pesticides among female adult population in two Chinese cities revealed by hair analysis. *Environ Int*, *138*, 105633. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105633>
- Perego, M. C., Schutz, L. F., Caloni, F., Cortinovia, C., Albonico, M., & Spicer, L. J. (2017). Evidence for direct effects of glyphosate on ovarian function: glyphosate influences steroidogenesis and proliferation of bovine granulosa but not theca cells in vitro. *J Appl Toxicol*, *37*(6), 692-698. <https://doi.org/10.1002/jat.3417>
- Peruzzo, P. J., Porta, A. A., & Ronco, A. E. (2008). Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environ Pollut*, *156*(1), 61-66. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.01.015>
- Peters, A. A., Ingman, W. V., Tilley, W. D., & Butler, L. M. (2011). Differential effects of exogenous androgen and an androgen receptor antagonist in the peri- and postpubertal murine mammary gland. *Endocrinology*, *152*(10), 3728-3737. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1133>
- Pham, T. H., Derian, L., Kervarrec, C., Kernanec, P. Y., Jegou, B., Smagulova, F., & Gely-Pernot, A. (2019). Perinatal Exposure to Glyphosate and a Glyphosate-Based Herbicide Affect Spermatogenesis in Mice. *Toxicol Sci*, *169*(1), 260-271. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfz039>

- Pinzone, J. J., Stevenson, H., Strobl, J. S., & Berg, P. E. (2004). Molecular and cellular determinants of estrogen receptor alpha expression. *Mol Cell Biol*, 24(11), 4605-4612. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.11.4605-4612.2004>
- Pond, A. C., Bin, X., Batts, T., Roarty, K., Hilsenbeck, S., & Rosen, J. M. (2013). Fibroblast growth factor receptor signaling is essential for normal mammary gland development and stem cell function. *Stem Cells*, 31(1), 178-189. <https://doi.org/10.1002/stem.1266>
- Prall, O. W., Sarcevic, B., Musgrove, E. A., Watts, C. K., & Sutherland, R. L. (1997). Estrogen-induced activation of Cdk4 and Cdk2 during G1-S phase progression is accompanied by increased cyclin D1 expression and decreased cyclin-dependent kinase inhibitor association with cyclin E-Cdk2. *J Biol Chem*, 272(16), 10882-10894. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.16.10882>
- Primost, J. E., Marino, D. J. G., Aparicio, V. C., Costa, J. L., & Carriquiriborde, P. (2017). Glyphosate and AMPA, "pseudo-persistent" pollutants under real-world agricultural management practices in the Mesopotamic Pampas agroecosystem, Argentina. *Environ Pollut*, 229, 771-779. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.006>
- Prusinski, L., Al-Hendy, A., & Yang, Q. (2016). Developmental exposure to endocrine disrupting chemicals alters the epigenome: Identification of reprogrammed targets. *Gynecol Obstet Res*, 3(1), 1-6. <https://doi.org/10.17140/GOROJ-3-127>
- Quintana, J., de la Cal, A., & Boleda, M. R. (2019). Monitoring the complex occurrence of pesticides in the Llobregat basin, natural and drinking waters in Barcelona metropolitan area (Catalonia, NE Spain) by a validated multi-residue online analytical method. *Sci Total Environ*, 692, 952-965. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.07.317>
- Ramos, J. G., Varayoud, J., Bosquiazzo, V. L., Luque, E. H., & Munoz-de-Toro, M. (2002). Cellular turnover in the rat uterine cervix and its relationship to estrogen and progesterone receptor dynamics. *Biol Reprod*, 67(3), 735-742. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.101.002402>
- Rasmussen, S. B., Young, L. J., & Smith, G. H. (2000). Preparing mammary gland whole-mounts from mice. In M. M. Ip & B. B. Asch (Eds.), *Methods in mammary gland biology and breast cancer research* (pp. 75-85). Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Rendon-von Osten, J., & Dzul-Caamal, R. (2017). Glyphosate Residues in Groundwater, Drinking Water and Urine of Subsistence Farmers from Intensive Agriculture Localities: A Survey in Hopelchen, Campeche, Mexico. *Int J Environ Res Public Health*, 14(6), 595. <https://doi.org/10.3390/ijerph14060595>
- Ribeiro, E., Ladeira, C., & Viegas, S. (2017). EDCs Mixtures: A Stealthy Hazard for Human Health? *Toxics*, 5(1). <https://doi.org/10.3390/toxics5010005>
- Richard, S., Moslemi, S., Sipahutar, H., Benachour, N., & Seralini, G. E. (2005). Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. *Environ Health Perspect*, 113(6), 716-720. <https://doi.org/10.1289/ehp.7728>
- Richert, M. M., Schwertfeger, K. L., Ryder, J. W., & Anderson, S. M. (2000). An atlas of mouse mammary gland development. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 5(2), 227-241. <https://doi.org/10.1023/a:1026499523505>

- Rizzati, V., Briand, O., Guillou, H., & Gamet-Payrastré, L. (2016). Effects of pesticide mixtures in human and animal models: An update of the recent literature. *Chem Biol Interact*, 254, 231-246. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.06.003>
- Roarty, K., & Serra, R. (2007). Wnt5a is required for proper mammary gland development and TGF-beta-mediated inhibition of ductal growth. *Development*, 134(21), 3929-3939. <https://doi.org/10.1242/dev.008250>
- Rockett, J. C., Narotsky, M. G., Thompson, K. E., Thillainadarajah, I., Blystone, C. R., Goetz, A. K., . . . Dix, D. J. (2006). Effect of conazole fungicides on reproductive development in the female rat. *Reprod Toxicol*, 22(4), 647-658. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.05.008>
- Rodrigues, N. R., & de Souza, A. P. F. (2018). Occurrence of glyphosate and AMPA residues in soy-based infant formula sold in Brazil. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35(4), 724-731. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1419286>
- Romano, M. A., Romano, R. M., Santos, L. D., Wisniewski, P., Campos, D. A., de Souza, P. B., . . . de Oliveira, C. A. (2012). Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. *Arch Toxicol*, 86(4), 663-673. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0788-9>
- Romano, R. M., Romano, M. A., Bernardi, M. M., Furtado, P. V., & Oliveira, C. A. (2010). Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. *Arch Toxicol*, 84(4), 309-317. <https://doi.org/10.1007/s00204-009-0494-z>
- Ronco, A. E., Marino, D. J., Abelando, M., Almada, P., & Apartin, C. D. (2016). Water quality of the main tributaries of the Parana Basin: glyphosate and AMPA in surface water and bottom sediments. *Environ Monit Assess*, 188(8), 458. <https://doi.org/10.1007/s10661-016-5467-0>
- Rossetti, M. F., Canesini, G., Lorenz, V., Milesi, M. M., Varayoud, J., & Ramos, J. G. (2021). Epigenetic Changes Associated With Exposure to Glyphosate-Based Herbicides in Mammals. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 12, 671991. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.671991>
- Rossetti, M. F., Schumacher, R., Lazzarino, G. P., Gomez, A. L., Varayoud, J., & Ramos, J. G. (2019). The impact of sensory and motor enrichment on the epigenetic control of steroidogenic-related genes in rat hippocampus. *Mol Cell Endocrinol*, 485, 44-53. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.01.025>
- Roux, P. P., & Blenis, J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68(2), 320-344. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.320-344.2004>
- Rudel, R. A., Fenton, S. E., Ackerman, J. M., Euling, S. Y., & Makris, S. L. (2011). Environmental exposures and mammary gland development: state of the science, public health implications, and research recommendations. *Environ Health Perspect*, 119(8), 1053-1061. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002864>
- Rudmann, D., Cardiff, R., Chouinard, L., Goodman, D., Kuttler, K., Marxfeld, H., . . . Clitoral Gland Organ Working, G. (2012). Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse mammary, Zymbal's, preputial, and clitoral glands. *Toxicol Pathol*, 40(6 Suppl), 7S-39S. <https://doi.org/10.1177/0192623312454242>

- Rudmann, D. G., Cohen, I. R., Robbins, M. R., Coutant, D. E., & Henck, J. W. (2005). Androgen dependent mammary gland virilism in rats given the selective estrogen receptor modulator LY2066948 hydrochloride. *Toxicol Pathol*, 33(6), 711-719. <https://doi.org/10.1080/01926230500343902>
- Ruifrok, A. C., & Johnston, D. A. (2001). Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol*, 23(4), 291-299. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11531144>
- Russo, I. F., & Russo, J. (1978). Developmental stage of the rat mammary gland as determinant of its susceptibility to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *J Natl Cancer Inst*, 61(6), 1439-1449. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/102856/>
- Russo, I. H., & Russo, J. (1996). Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ Health Perspect*, 104(9), 938-967. <https://doi.org/10.1289/ehp.96104938>
- Russo, J., Tay, L. K., & Russo, I. H. (1982). Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat*, 2(1), 5-73. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6216933>
- Sambrook, J. F., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. W., & van den Berg, M. (2002). Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 182(1), 44-54. <https://doi.org/10.1006/taap.2002.9420>
- Schubeler, D. (2015). Function and information content of DNA methylation. *Nature*, 517(7534), 321-326. <https://doi.org/10.1038/nature14192>
- Schug, T. T., Janesick, A., Blumberg, B., & Heindel, J. J. (2011). Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 127(3-5), 204-215. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.08.007>
- SENASA. (2020). *Listado de principios activos inscriptos, enero 2020*. Acceso: 23 de diciembre de 2021. <https://www.argentina.gob.ar/senasa/programas-sanitarios/productosveterinarios-fitosanitarios-y-fertilizantes/registro-nacional-de-terapeutica-vegetal>
- SENASA. (2021). *Listado de límites máximos de residuos permitidos, mayo 2021*. . Acceso: 23 de diciembre de 2021. <https://www.argentina.gob.ar/files/listadolmrsmayo2021xlsx>
- Serra, L., Estienne, A., Vasseur, C., Froment, P., & Dupont, J. (2021). Review: Mechanisms of Glyphosate and Glyphosate-Based Herbicides Action in Female and Male Fertility in Humans and Animal Models. *Cells*, 10(11), 3079. <https://doi.org/10.3390/cells10113079>
- Simpson, E. R. (2000). Biology of aromatase in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 5(3), 251-258. <https://doi.org/10.1023/a:1009590626450>
- Simpson, E. R., Clyne, C., Rubin, G., Boon, W. C., Robertson, K., Britt, K., . . . Jones, M. (2002). Aromatase-a brief overview. *Annu Rev Physiol*, 64, 93-127. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.081601.142703>
- Singh, S., Kumar, V., Datta, S., Wani, A. B., Dhanjal, D. S., Romero, R., & Singh, J. (2020). Glyphosate uptake, translocation, resistance emergence in crops, analytical monitoring,

- toxicity and degradation: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 18(3), 663-702. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-00969-z>
- Skolness, S. Y., Blanksma, C. A., Cavallin, J. E., Churchill, J. J., Durhan, E. J., Jensen, K. M., . . . Ankley, G. T. (2013). Propiconazole inhibits steroidogenesis and reproduction in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicol Sci*, 132(2), 284-297. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft010>
- Slepicka, P. F., Somasundara, A. V. H., & Dos Santos, C. O. (2021). The molecular basis of mammary gland development and epithelial differentiation. *Semin Cell Dev Biol*, 114, 93-112. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.09.014>
- Smith, Z. D., & Meissner, A. (2013). DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*, 14(3), 204-220. <https://doi.org/10.1038/nrg3354>
- Sourla, A., Martel, C., Labrie, C., & Labrie, F. (1998). Almost exclusive androgenic action of dehydroepiandrosterone in the rat mammary gland. *Endocrinology*, 139(2), 753-764. <https://doi.org/10.1210/endo.139.2.5762>
- Speirs, V., & Shaaban, A. M. (2009). The rising incidence of male breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*, 115(2), 429-430. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-0053-y>
- Stanko, J. P., Easterling, M. R., & Fenton, S. E. (2015). Application of Sholl analysis to quantify changes in growth and development in rat mammary gland whole mounts. *Reprod Toxicol*, 54, 129-135. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.11.004>
- Stanko, J. P., Kissling, G. E., Chappell, V. A., & Fenton, S. E. (2016). Differences in the Rate of in Situ Mammary Gland Development and Other Developmental Endpoints in Three Strains of Female Rat Commonly Used in Mammary Carcinogenesis Studies: Implications for Timing of Carcinogen Exposure. *Toxicol Pathol*, 44(7), 1021-1033. <https://doi.org/10.1177/0192623316655222>
- Staska, L. M., & Pike, J. T. (2016). Chapter 1 - Skin and Mammary Gland. En G. A. Parker & C. A. Picut (Eds.), *Atlas of Histology of the Juvenile Rat* (pp. 1-28). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802682-3.00001-X>
- Steinborn, A., Alder, L., Michalski, B., Zomer, P., Bendig, P., Martinez, S. A., . . . Pinheiro, N. C. (2016). Determination of Glyphosate Levels in Breast Milk Samples from Germany by LC-MS/MS and GC-MS/MS. *J Agric Food Chem*, 64(6), 1414-1421. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b05852>
- Sternlicht, M. D. (2006). Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast Cancer Res*, 8(1), 201. <https://doi.org/10.1186/bcr1368>
- Sternlicht, M. D., Kouros-Mehr, H., Lu, P., & Werb, Z. (2006). Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis. *Differentiation*, 74(7), 365-381. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2006.00105.x>
- Sternlicht, M. D., & Sunnarborg, S. W. (2008). The ADAM17-amphiregulin-EGFR axis in mammary development and cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 13(2), 181-194. <https://doi.org/10.1007/s10911-008-9084-6>
- Stur, E., Aristizabal-Pachon, A. F., Peronni, K. C., Agostini, L. P., Waigel, S., Chariker, J., . . . Louro, I. D. (2019). Glyphosate-based herbicides at low doses affect canonical pathways in estrogen positive and negative breast cancer cell lines. *PLoS One*, 14(7), e0219610. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219610>

- Svanholm, S., Safholm, M., Brande-Lavridsen, N., Larsson, E., & Berg, C. (2021). Developmental reproductive toxicity and endocrine activity of propiconazole in the *Xenopus tropicalis* model. *Sci Total Environ*, 753, 141940. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141940>
- Takeshima, H., & Ushijima, T. (2019). DNA Methylation Changes in Cancer: Mechanisms. En P. Boffetta & P. Hainaut (Eds.), *Encyclopedia of Cancer (Third Edition)* (pp. 520-529). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.65058-4>
- Taxvig, C., Hadrup, N., Boberg, J., Axelstad, M., Bossi, R., Bonefeld-Jorgensen, E. C., & Vinggaard, A. M. (2013). In vitro-in vivo correlations for endocrine activity of a mixture of currently used pesticides. *Toxicol Appl Pharmacol*, 272(3), 757-766. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.07.028>
- Taxvig, C., Vinggaard, A. M., Hass, U., Axelstad, M., Metzдорff, S., & Nellemann, C. (2008). Endocrine-disrupting properties in vivo of widely used azole fungicides. *Int J Androl*, 31(2), 170-177. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2007.00838.x>
- Tchakarska, G., & Sola, B. (2020). The double dealing of cyclin D1. *Cell Cycle*, 19(2), 163-178. <https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1706903>
- Test-Biotech. (2013). *High levels of residues from spraying with glyphosate found in soybeans in Argentina*. Acceso: 2 de febrero de 2022. <http://www.testbiotech.org/en/node/926>
- Thongprakaisang, S., Thiantanawat, A., Rangkadilok, N., Suriyo, T., & Satayavivad, J. (2013). Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. *Food Chem Toxicol*, 59, 129-136. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.057>
- To, S. Q., Knowler, K. C., Cheung, V., Simpson, E. R., & Clyne, C. D. (2015). Transcriptional control of local estrogen formation by aromatase in the breast. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 145, 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.05.004>
- Toda, M., Beer, K. D., Kuivila, K. M., Chiller, T. M., & Jackson, B. R. (2021). Trends in Agricultural Triazole Fungicide Use in the United States, 1992-2016 and Possible Implications for Antifungal-Resistant Fungi in Human Disease. *Environ Health Perspect*, 129(5), 55001. <https://doi.org/10.1289/EHP7484>
- Toth, G., Hahn, J., Rado, J., Szalai, D. A., Kriszt, B., & Szoboszlai, S. (2020). Cytotoxicity and hormonal activity of glyphosate-based herbicides. *Environ Pollut*, 265(Pt B), 115027. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115027>
- Toyoda, K., Shibutani, M., Tamura, T., Koujitani, T., Uneyama, C., & Hirose, M. (2000). Repeated dose (28 days) oral toxicity study of flutamide in rats, based on the draft protocol for the 'Enhanced OECD Test Guideline 407' for screening for endocrine-disrupting chemicals. *Arch Toxicol*, 74(3), 127-132. <https://doi.org/10.1007/s002040050664>
- Trosken, E. R., Fischer, K., Volkel, W., & Lutz, W. K. (2006). Inhibition of human CYP19 by azoles used as antifungal agents and aromatase inhibitors, using a new LC-MS/MS method for the analysis of estradiol product formation. *Toxicology*, 219(1-3), 33-40. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.10.020>
- Vandenberg, L. N., Blumberg, B., Antoniou, M. N., Benbrook, C. M., Carroll, L., Colborn, T., . . . Myers, J. P. (2017). Is it time to reassess current safety standards for glyphosate-based

- herbicides? *J Epidemiol Community Health*, 71(6), 613-618. <https://doi.org/10.1136/jech-2016-208463>
- Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Jr., Lee, D. H., . . . Myers, J. P. (2012). Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev*, 33(3), 378-455. <https://doi.org/10.1210/er.2011-1050>
- Vanlaeys, A., Dubuisson, F., Seralini, G. E., & Travert, C. (2018). Formulants of glyphosate-based herbicides have more deleterious impact than glyphosate on TM4 Sertoli cells. *Toxicol In Vitro*, 52, 14-22. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.01.002>
- Varayoud, J., Durando, M., Ramos, J. G., Milesi, M. M., Ingaramo, P. I., Muñoz-de-Toro, M., & Luque, E. H. (2017). Effects of a glyphosate-based herbicide on the uterus of adult ovariectomized rats. *Environ Toxicol*, 32(4), 1191-1201. <https://doi.org/10.1002/tox.22316>
- Varayoud, J., Ramos, J. G., Monje, L., Bosquiazzo, V., Munoz-de-Toro, M., & Luque, E. H. (2005). The estrogen receptor alpha sigma3 mRNA splicing variant is differentially regulated by estrogen and progesterone in the rat uterus. *J Endocrinol*, 186(1), 51-60. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06099>
- Vereecken, H. (2005). Mobility and leaching of glyphosate: a review. *Pest Manag Sci*, 61(12), 1139-1151. <https://doi.org/10.1002/ps.1122>
- Vieira, M. L., Costa, N. O., Pereira, M. R. F., de Fatima Paccola Mesquita, S., Moreira, E. G., & Gerardin, D. C. C. (2017). Chronic exposure to the fungicide propiconazole: Behavioral and reproductive evaluation of F1 and F2 generations of male rats. *Toxicology*, 389, 85-93. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2017.07.012>
- Vigizzi, L., Ramos, J. G., Kass, L., Tschopp, M. V., Muñoz-de-Toro, M., Luque, E. H., & Bosquiazzo, V. L. (2016). A deregulated expression of estrogen-target genes is associated with an altered response to estradiol in aged rats perinatally exposed to Bisphenol A. *Mol Cell Endocrinol*, 426, 33-42. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.02.010>
- Wang, G., Guo, X., & Floros, J. (2005). Differences in the translation efficiency and mRNA stability mediated by 5'-UTR splice variants of human SP-A1 and SP-A2 genes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 289(3), 497-508. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00100.2005>
- Wang, P., Mariman, E., Renes, J., & Keijer, J. (2008). The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue. *J Cell Physiol*, 216(1), 3-13. <https://doi.org/10.1002/jcp.21386>
- Wang, X. J., Bartolucci-Page, E., Fenton, S. E., & You, L. (2006). Altered mammary gland development in male rats exposed to genistein and methoxychlor. *Toxicol Sci*, 91(1), 93-103. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj120>
- WHO. (2017). *Chemical mixtures in source water and drinking-water*. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/255543>
- Whyte, J., Bergin, O., Bianchi, A., McNally, S., & Martin, F. (2009). Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. Mitogen-activated protein kinase signalling in experimental models of breast cancer progression and in mammary gland development. *Breast Cancer Res*, 11(5), 209. <https://doi.org/10.1186/bcr2361>

- Wiesen, J. F., Young, P., Werb, Z., & Cunha, G. R. (1999). Signaling through the stromal epidermal growth factor receptor is necessary for mammary ductal development. *Development*, *126*(2), 335-344. <https://doi.org/10.1242/dev.126.2.335>
- Williams, G. M., Kroes, R., & Munro, I. C. (2000). Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regul Toxicol Pharmacol*, *31*(2 Pt 1), 117-165. <https://doi.org/10.1006/rtp.1999.1371>
- Williman, C., Munitz, M. S., Montti, M. I. T., Medina, M. B., Navarro, A. F., & Ronco, A. E. (2017). Pesticide survey in water and suspended solids from the Uruguay River Basin, Argentina. *Environ Monit Assess*, *189*(6), 259. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-5956-9>
- Woodward, W. A., Chen, M. S., Behbod, F., & Rosen, J. M. (2005). On mammary stem cells. *J Cell Sci*, *118*(Pt 16), 3585-3594. <https://doi.org/10.1242/jcs.02532>
- Wozniak, E., Reszka, E., Jablonska, E., Balcerzyk, A., Broncel, M., & Bukowska, B. (2020). Glyphosate affects methylation in the promoter regions of selected tumor suppressors as well as expression of major cell cycle and apoptosis drivers in PBMCs (in vitro study). *Toxicol In Vitro*, *63*, 104736. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104736>
- Xu, J., Smith, S., Smith, G., Wang, W., & Li, Y. (2019). Glyphosate contamination in grains and foods: An overview. *Food Control*, *106*, 106710. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106710>
- Yalaza, M., Inan, A., & Bozer, M. (2016). Male Breast Cancer. *J Breast Health*, *12*(1), 1-8. <https://doi.org/10.5152/tjbh.2015.2711>
- Yang, O., Kim, H. L., Weon, J. I., & Seo, Y. R. (2015). Endocrine-disrupting Chemicals: Review of Toxicological Mechanisms Using Molecular Pathway Analysis. *J Cancer Prev*, *20*(1), 12-24. <https://doi.org/10.15430/JCP.2015.20.1.12>
- You, L., Sar, M., Bartolucci, E. J., McIntyre, B. S., & Sriperumbudur, R. (2002). Modulation of mammary gland development in prepubertal male rats exposed to genistein and methoxychlor. *Toxicol Sci*, *66*(2), 216-225. <https://doi.org/10.1093/toxsci/66.2.216>
- Zamani, Z., Zare, S., Sadrkhanlou, R., Ahmadi, A., & Movahed, E. (2015). Chlorpromazine-Induced Hyperprolactinemia on Rat's Uterus. *Iran Biomed J*, *19*(4), 226-232. <https://doi.org/10.7508/ibj.2015.04.006>
- Zanardi, M. V., Schimpf, M. G., Gastiazoro, M. P., Milesi, M. M., Munoz-de-Toro, M., Varayoud, J., & Durando, M. (2020). Glyphosate-based herbicide induces hyperplastic ducts in the mammary gland of aging Wistar rats. *Mol Cell Endocrinol*, *501*, 110658. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110658>
- Zhang, C., Schiliro, T., Gea, M., Bianchi, S., Spinello, A., Magistrato, A., . . . Di Nardo, G. (2020). Molecular Basis for Endocrine Disruption by Pesticides Targeting Aromatase and Estrogen Receptor. *Int J Environ Res Public Health*, *17*(16), 5664. <https://doi.org/10.3390/ijerph17165664>
- Zhang, F., Xu, Y., Liu, X., Pan, L., Ding, E., Dou, J., & Zhu, B. (2020). Concentration Distribution and Analysis of Urinary Glyphosate and Its Metabolites in Occupationally Exposed Workers in Eastern China. *Int J Environ Res Public Health*, *17*(8), 2943. <https://doi.org/10.3390/ijerph17082943>

- Zoeller, R. T., Brown, T. R., Doan, L. L., Gore, A. C., Skakkebaek, N. E., Soto, A. M., . . . Vom Saal, F. S. (2012). Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society. *Endocrinology*, *153*(9), 4097-4110. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1422>
- Zoller, O., Rhy, P., Rupp, H., Zarn, J. A., & Geiser, C. (2018). Glyphosate residues in Swiss market foods: monitoring and risk evaluation. *Food Addit Contam Part B Surveill*, *11*(2), 83-91. <https://doi.org/10.1080/19393210.2017.1419509>

ANEXO

*“Duda siempre de ti mismo, hasta que los
datos no dejen lugar a dudas.”*

Louis Pasteur

Tabla A1. Composición y perfil de ácidos grasos de la comida.

Composición	
Humedad (máximo)	12%
Proteína (mínimo)	23%
Extracto etéreo (mínimo)	5%
Fibra cruda (máximo)	6%
Minerales (máximo)	10%
Calcio (mín-máx)	1.0% - 1.4%
Fósforo (mín-máx)	0.5% - 0.8%
Cloro	0.3%
Sodio	0.2%
Potasio	0.7%
Magnesio	0.2%
Sulfuro	0.16%
Valor energético	2900 kcal/kg
Materia prima	
Fuente animal	20% , harina de pescado
Fuente Vegetal	76%, maíz, gluten de maíz, harina de girasol, trigo, salvado de trigo, harina de soja y aceite de soja (el contenido de soja representa el 30% de la fuente vegetal de la materia prima)
Vitaminas-Minerales	4%
Perfil de ácidos grasos en lípidos totales*	
	Valores expresados como la media \pm SEM
C8:0	0.60 \pm 0.02 %
C12:0; C14:0; C15:0	Trazas
C16:0	24.50 \pm 1.51 %
C16:1	1.80 \pm 0.20 %
C18:0	2.12 \pm 0.11 %
C18:1	42.33 \pm 2.45 %
C18:2	12.76 \pm 0.90 %
C18:3n-3	6.12 \pm 0.15 %
C18:4n-3	Trazas
C20:0; C20:1	Trazas
C22:0; C22:1	Trazas
C20:4n-6	0.31 \pm 0.04 %
Otros AGs poliinsaturados	0.91 \pm 0.06 %

Pellet para ratones-ratas (16-014007, Nutrición Animal, Santa Fe, Argentina)

* El perfil de ácidos grasos en la dieta fue cuantificado en el laboratorio del Dr. Carlos A. Marra, INIBIOLP, CCT-La Plata, Argentina.

Tabla A2. Procesamiento de muestras para la obtención de *whole-mounts*.

<i>Deshidratación</i>	
Alcohol 70°	
Alcohol 96°	1 hora en c/u
Alcohol 100°	
<i>Eliminación de grasa mamaria</i>	
Tolueno I	2 horas
Tolueno II	<i>Overnight</i> (ON)
<i>Rehidratación</i>	
Alcohol 100°	
Alcohol 96°	
Alcohol 70°	1 hora en c/u
<i>Tinción</i>	
Carmín alúmina (0.2%)*	5 a 7 días a 4°C
<i>Lavado</i>	
Agua destilada	30 min
<i>Deshidratación</i>	
Alcohol 70°	
Alcohol 96°	1 hora en cada solución
Alcohol 100°	
<i>Clarificación</i>	
Xilol	2 horas

Tabla A3. Protocolo para la técnica de inmunohistoquímica.

Desparafinización e hidratación	
Bioclear 1, 2 y 3	5 min c/u
Alcohol 100°, 96°, 70°	3 min c/u
PBS	5 min
Recuperación Antigénica	
	3 min al 100% sin portas
Calentamiento en Horno microondas utilizando Buffer Citrato 0.01 M, pH: 6	1 min al 100% con portas
	14 min al 40% (360 W) con portas
	20 min apagado
PBS	5 min
Bloqueo de actividad de peroxidasa endógena	
Metanol + Agua oxigenada 30 vol. (36 ml de metanol y 4ml de H ₂ O ₂)	15 min
PBS	15 min
Bloqueo de uniones no específicas	
Suero normal de caballo (1:20 disuelto en PBS con 1,5% de leche en polvo descremada)	30 min (en cámara húmeda)
Anticuerpo Primario	
Dilución de anticuerpo primario en BC-11	Overnight 4°C
PBS	15 min
Sistema de Revelado	
Anticuerpo secundario biotilado (diluido en PBS-BSA 1%)	30 min (en cámara húmeda)
PBS	10 min
Extravidina-peroxidasa (diluido en PBS-BSA 1%)	30 min (en cámara húmeda)
PBS	10 min
Revelado con DAB	
	10 min aprox
Agua destilada	5 min
Contracoloración	
Hematoxilina de Mayer	1 min
Agua corriente	30 seg
Agua amoniacal	15-20 seg
Agua corriente	1 min
Deshidratación	
Alcohol 70°, 96°, 100°(1) y 100°(2)	1 min c/u
Bioclear 1	5 min
Bioclear 2	5 min
Montar con Bálsamo de Canadá	

Tabla A4. Protocolo para la técnica de inmunofluorescencia.

<i>Desparafinización e hidratación</i>	
Bioclear 1, 2 y 3	5 min c/u
Alcohol 100°, 96°, 70°	3 min c/u
PBS	5 min
<i>Bloqueo de la autofluorescencia</i>	
Borohidruro de sodio	40 min
PBS	5 min
<i>Recuperación Antigénica</i>	
	3 min al 100% sin portas
Calentamiento en Horno microondas utilizando Buffer Citrato 0.01 M, pH: 6	1 min al 100% con portas
	14 min al 40% (360 W) con portas
	20 min apagado
PBS	5 min
PBS-Tween 0.1%	7 min
PBS	5 min
<i>Bloqueo de uniones no específicas</i>	
Suero normal de cabra (1:20 disuelto en PBS con 1,5% de leche en polvo descremada)	1 h (en cámara húmeda)
<i>Anticuerpo/s Primario/s</i>	
Dilución de anticuerpo primario en BC-11	<i>Overnight</i> 4°C
PBS-Tween 0.1%	7 min
<i>Sistema de Revelado</i>	
Anticuerpo/s secundario/s (diluido en PBS-BSA 1%)	1 h (en cámara húmeda)
PBS	15 min
DAPI (1/1000 en PBS)	5 min
PBS	5 min
<i>Montado</i>	
ProLong Gold	