



## **Efectos de la exposición gestacional a oxibenzona sobre la involución mamaria en un modelo experimental murino** **Beckley, Belén**

*Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL-UNL)*

*Director/a: Kass, Laura*

*Codirector/a: Gomez, Ayelén*

Área: Ciencias Biológicas

Palabras clave: Glándula mamaria; Protectores Solares; Apoptosis.

### **INTRODUCCIÓN**

Varios estudios han demostrado que la glándula mamaria es un órgano sensible a la exposición a perturbadores endócrinos en diferentes momentos de su desarrollo (Fenton, 2009; Kass et al., 2020). Sin embargo, existen pocos estudios que evalúen los efectos de la exposición a este tipo de compuestos sobre el proceso de involución mamaria. Alteraciones en este proceso podrían ocasionar una involución temprana, lo que puede provocar una interrupción de la lactancia y menor producción de leche, influyendo en la calidad de vida de los bebés y/o predisponer al desarrollo de tumores en las madres expuestas. La benzofenona-3 u oxibenzona es un agente bloqueante de rayos ultravioleta usado ampliamente en la composición de cremas protectoras solares (NTP, 2020) y otros productos, y se ha reportado que tiene actividad hormonal, por lo que podría perturbar el desarrollo normal de la glándula mamaria. En este trabajo se estudió la influencia de la exposición a oxibenzona sobre el proceso de involución mamaria utilizando un modelo experimental murino.

### **OBJETIVOS**

Evaluar si el proceso de involución del parénquima mamario se altera por la exposición a oxibenzona durante la gestación.

### **METODOLOGÍA**

#### **Tratamiento de los animales y obtención de muestras**

Ratones hembra C57BL/6 fueron preñadas y expuestas por vía dérmica a 5 o 50 mg/kg/día de oxibenzona (Oxy5 y Oxy50) y aceite de sésamo (Control) desde el día 8.5 hasta el día 18.5 de gestación. Luego del parto, se mantuvieron camadas de 4 crías por madre. En día 10 de lactancia (L10) se forzó la involución mamaria por remoción de las crías y se

Título del proyecto: el uso de protectores solares con actividad estrogénica ¿altera la involución mamaria en un modelo murino?

Instrumento: PICT 2020-SERIEA-00223

Año convocatoria: 2020

Organismo financiador: Agencia I+D+i

Directora: Dra. Laura Kass



obtuvieron muestras a las 0 (L10) y 48 hs (I48) post-destete. En ambos días se obtuvieron muestras de glándula mamaria N°4 para realizar el análisis histológico y la evaluación de la apoptosis celular.

La dosis de Oxy50 es equivalente a la dosis alcanzada luego de la aplicación dérmica en humanos de un formulado que contenía 10% de oxibenzona (Juanja et al., 2008), y se eligió además, una dosis que fuera 10 veces menor a ésta (Oxy5).

### **Procesado e inclusión en parafina**

Las muestras se fijaron durante 6 hs en formol buffer al 10% (V/V) y posteriormente se procesaron hasta su inclusión en parafina, obteniendo finalmente tacos de parafina con el tejido en su interior (Altamirano et al., 2015).

### **Análisis histomorfológico de las muestras de glándula mamaria**

Se realizaron cortes histológicos de 5  $\mu$ m de los tacos de parafina de muestras de L10 e I48, se montaron en portaobjetos pretratados con adhesivo tisular (3-aminopropil trietoxisilano, Sigma), y se secaron en estufa a 37° por 24 hs. Posteriormente, los cortes fueron utilizados para tinción con hematoxilina-eosina (H&E) (Gomez et al., 2017) y para TUNEL (Durando et al., 2007).

A partir de las muestras teñidas con H&E se obtuvieron 6-7 imágenes por muestra utilizando una cámara de video color acoplada a un microscopio Olympus BH2 (Olympus, Japón), y utilizando una objetiva Dplan 4X. En estas imágenes se cuantificó el área alveolar en L10 e I48. El área alveolar se determinó como el porcentaje de la glándula ocupada por alvéolos (epitelio más lumen) con respecto al área total de la glándula. Estas determinaciones se realizaron con el software Fiji (ImageJ, NIH; USA).

### **Determinación de apoptosis con técnica de TUNEL**

El Kit de detección de muerte celular *in situ* (Roche, Argentina) utilizado para la técnica de TUNEL permite la detección de la fragmentación del DNA producida durante la apoptosis, mediante una marcación enzimática en los extremos libres de las hebras de DNA rotas con nucleótidos modificados. Luego de realizar el ensayo de TUNEL siguiendo las instrucciones del fabricante, las muestras fueron contracoloreadas con hematoxilina y montadas con líquido de montaje permanente. El porcentaje de células positivas para TUNEL fue cuantificado utilizando un microscopio Olympus BH2 y una magnificación de 20X. Se cuantificaron 300 células por campo, y se analizaron 25 y 20 campos por muestra en L10 e I48, respectivamente.

### **Determinación de apoptosis morfológica**

Se consideraron como células con apoptosis morfológica a aquellas que se encontraban en el lumen de los alveolos, que presentaban un mayor tamaño y un núcleo fragmentado e hipercrómico. La cuantificación se llevó a cabo utilizando un microscopio Olympus BH2, contando el total de células apoptóticas en cada campo de 20X, L10 (25 campos) e I48 (20 campos).

### **Análisis estadístico**

Se realizó un Análisis de la Varianza (ANOVA) de un factor para evaluar los resultados experimentales, considerando significativo un  $p < 0.05$  en todos los casos.



## RESULTADOS

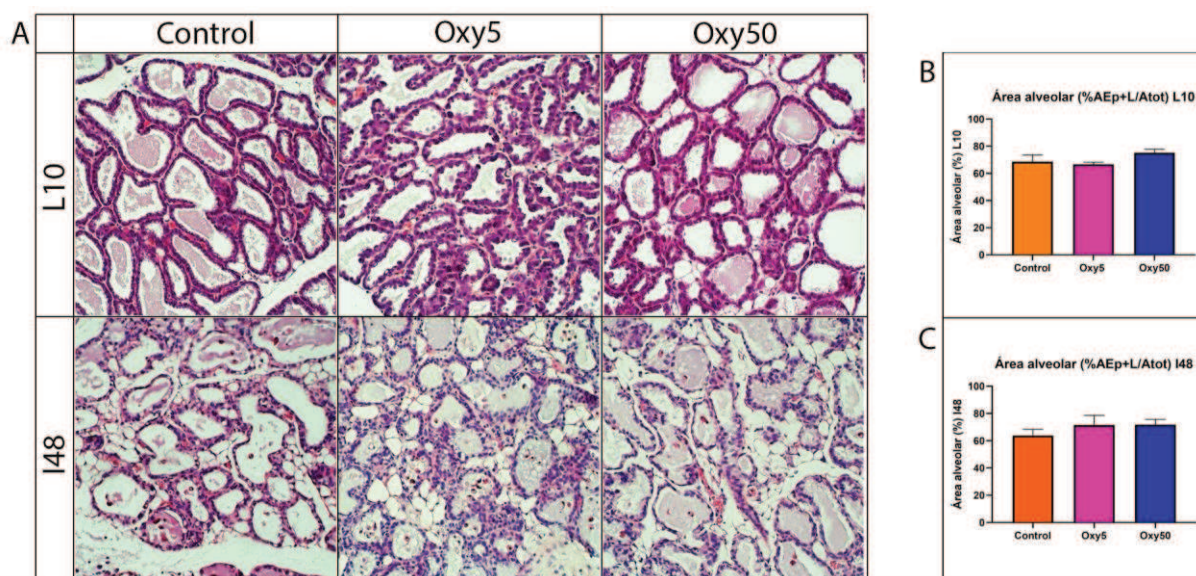
### Modelo experimental

No se encontraron 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.

### Morfología mamaria

A partir del análisis histológico de los cortes de glándula mamaria teñidos con H&E se pudo observar la diferencia en la morfología mamaria de los animales sacrificados en L10 e I48. En L10, día en que las madres fueron separadas de sus crías, las células epiteliales de los alveolos se encontraban más tumescentes y con escaso tejido adiposo rodeando los lóbulos mamarios (Figura 1A). Mientras que en día I48, dos días después de que las madres fueran separadas de sus crías, se observaron alveolos de mayor tamaño, ya que presentaban estasis debido a la acumulación de la leche, células epiteliales más planas, y mayor presencia de tejido adiposo (Figura 1A).

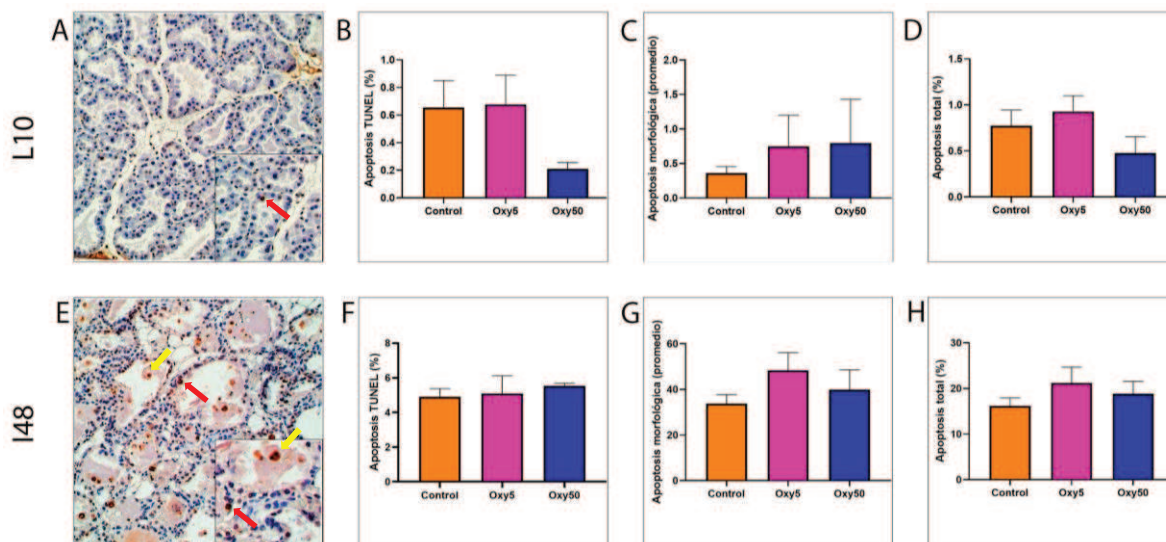
En los cortes teñidos con H&E se determinó el área alveolar en L10 e I48. Sin embargo, no se observó diferencia significativa en el porcentaje de área alveolar entre ninguno de los tres grupos experimentales (Figura 1B, C).



**Figura 1.** Histología de glándula mamaria. (A) Imágenes representativas de la morfología de la glándula mamaria N°4 de animales Control, Oxy5 y Oxy50 en día L10 e I48 en imágenes coloreadas con H&E. Magnificación: 20X. (B, C) Análisis del área alveolar de las muestras de glándula mamaria en L10 e I48, respectivamente. Las barras representan el porcentaje del área alveolar con respecto al área total. Expresado como media  $\pm$  SEM, con 3 muestras por grupo experimental.

### Apoptosis

En la Figura 2A y E se muestran imágenes representativas de células en apoptosis. Señaladas con flechas rojas se ven células positivas para TUNEL, y con flechas amarillas células con apoptosis morfológica en el lumen de los alveolos. El análisis de los resultados de la cuantificación no mostró diferencias significativas entre los tres grupos experimentales en el porcentaje de células positivas para TUNEL, en el promedio de apoptosis morfológica, ni en el porcentaje de apoptosis total (TUNEL y apoptosis morfológica), en ninguno de los días analizados (L10 - Figura 2B, C, D; I48 - Figura 2F, G, H).



**Figura 2.** Apoptosis mamaria en L10 e I48. Imágenes representativas de células apoptóticas en el grupo Oxy5 en L10 (A) y Oxy50 en I48 (E). Magnificación: 20X. Flechas rojas: células con marcación TUNEL positiva. Flechas amarillas: células con apoptosis morfológica. Las barras representan el porcentaje de células positivas para TUNEL en relación al total de células (B, F), el promedio de apoptosis morfológica por campo (C, G), y el porcentaje de apoptosis total (positivas para TUNEL más morfológicas) en relación al total de células (D, H). Expresado como media  $\pm$  SEM (n=3).

## CONCLUSIÓN

El modelo experimental utilizado es capaz de inducir la involución de la glándula mamaria, lo que se ve reflejado en los cambios observados entre L10 e I48 en los animales controles. La exposición a oxibenzona no modificó las variables analizadas (porcentaje de área alveolar e índice de apoptosis) en los dos días estudiados. Sin embargo, existe una tendencia a una mayor apoptosis morfológica en los animales expuestos a la menor dosis de oxibenzona.

## BIBLIOGRAFÍA

- Altamirano, G. A., Muñoz-de-Toro, M., Luque, E. H., Gomez, A. L., Delconte, M. B., Kass, L.,** 2015. Milk lipid composition is modified by perinatal exposure to bisphenol A. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 411, 258-267.
- 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. *Environmental Health Perspectives*, 115, 80-86.
- Fenton, S. E.,** 2009. The mammary gland: a tissue sensitive to environmental exposures. *Reviews on Environmental Health*, 24(4), 319–325.
- Gomez, A. L., Delconte, M. B., Altamirano, G. A., Vigezzi, L., Bosquiazzo, V. L., Barbisan, L. F., Ramos, J. G., Luque, E. H., Muñoz-de-Toro, M., 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. *Hormones and Cancer*, 8(2), 78-89.
- Janjua, N. R., Kongshoj, B., Andersson, A. M., Wulf, H. C.** 2008. Sunscreens in human plasma and urine after repeated whole-body topical application. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, 22(4), 456–461.
- Kass, L., Gomez, A. L., Altamirano, G. A.,** 2020. Relationship between agrochemical compounds and mammary gland development and breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 508(1 Suppl).
- NTP, National Toxicology Program,** 2020. NTP Technical Report on the Toxicology and Carcinogenesis Studies of 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone (CASRN 131-57-7) Administered in Feed to Sprague Dawley (Hsd:Sprague Dawley® SD®) Rats and B6C3F1/N Mice. Technical Report 597.