



Universidad Nacional del Litoral
Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas
Laboratorio de Endocrinología y Tumores
Hormonodependientes

**Exposición a perturbadores endocrinos y su efecto
sobre el desarrollo y funcionalidad de la
glándula mamaria**

Tesis para aspirar al título de Doctor en Ciencias Biológicas

Autor: Bioq. Milena de Lourdes Durando

Director: Prof. Dra. Mónica Muñoz-de-Toro

Co-director: Prof. Dr. Enrique H. Luque

Santa Fe, 2009

*A mis padres, Ana María y Oscar,
por el amor, la confianza, la educación, los ejemplos.
Por acompañarme en cada etapa de mi vida, por estar...*

*A mi hermano Damián,
por ser además, un poco padre, un poco amigo.
Por transitar la vida a mi lado...*

*A mi abuelo Viyín,
por el amor prodigado, los juegos inventados, las
sonrisas regaladas, por
construirme una infancia feliz.
Porque su recuerdo es mi lugar de refugio...*

Agradecimientos

Quisiera expresar mi agradecimiento a las personas e instituciones que han contribuido para hacer posible este trabajo de tesis.

A mis queridos directores Prof. Dra. Mónica Muñoz-de-Toro y Prof. Dr. Enrique H. Luque, por darme la oportunidad de incorporarme a su grupo, por brindarme en todo momento sus conocimientos, por guiarme en este camino, por regalarme además, su afecto, cariño y tiempo.

A los Dres. Horacio A. Rodríguez, J. Guillermo Ramos, Jorgelina Varayoud y Laura Kass, a quienes acudí con las dudas más insólitas y de quienes recibí siempre no sólo la ayuda necesaria, sino también, consejos, aliento, apoyo y energía para seguir, a pesar de las dificultades de la mesada y de la vida. Por ser sobre todo, buenos amigos.

A los compañeros que tengo y tuve en el LETH en todos estos años y con quienes compartí la mayor parte de mis días: Negro, Guille, Jor, Lau, Flor, Vero, Marce, Juanca, Guillermito, Cora, Virginia, Lucas, Maricel, Germán, Oscar, Adriana, Pablo, Hugo, Marianela, Noelia, Juan. Especialmente a Vero y Flor, por la amistad de todo este tiempo.

Al Dr. Julio Piva, por su valiosa colaboración con este trabajo, por su excelente disposición en todo momento.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme los medios para realizar esta tesis.

A las autoridades de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas por darme un lugar y apoyar mi crecimiento académico.

A mi mamá, por contagiarme su entusiasmo por las cosas simples de la vida.

A mi papá, por transmitirme (en silencio) su pasión por el trabajo.

A Damián y Eliana, porque sin reproches ni reclamos, se hicieron cargo de los “huecos” que dejé como hija y nieta en todos estos años.

A mis amigos de siempre: Mariela, Feny, Ivana, Jose por comprender, sobre todo, mis ausencias en estos últimos años, por darme tanto cariño.

A las amigas que encontré en mis años de estudiante: Sol, Naty, Lore y Laura, porque a pesar de las distancias, siempre están a mi lado.

A mi terapeuta, porque en cada sesión me desafió a descubrir el espejo y sostuvo mi mano.

A todas las personas que tuvieron que asumir mis responsabilidades y obligaciones en cada una de mis migrañas.

A Gabriel García Márquez, Ernesto Sábato, Isabel Allende, John Katzenbach, Irvin D. Yalom, Dan Brown y Dean Koontz por brindarme distracción, entretenimiento y compañía en los momentos claves y necesarios.

A Horacio, por intentarlo cada día.

A la vida, que no deja de sorprenderme, que hace lo imposible para evitar que renuncie a mis sueños.

Listado de presentaciones a congresos y publicaciones

Los resultados de esta tesis fueron publicados y/o presentados en congresos.

Publicaciones

Durando M, Kass L, Piva J, Sonnenschein C, Soto AM, Luque EH, Muñoz-de-Toro M. Prenatal Bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats. *Environ. Health Perspect.* 115: 80–86, 2007.

Otras publicaciones realizadas durante el desarrollo de esta tesis:

Rodríguez HA, Kass L, Varayoud J, Ramos JG, Ortega HH, **Durando M**, Muñoz-de-Toro M, Luque EH. Collagen remodelling in the guinea-pig uterine cervix at term is associated with a decrease in progesterone receptor expression. *Mol. Hum. Reprod.* 9: 807-813, 2003.

Kass L, **Durando M**, Ramos JG, Varayoud J, Powell CE, Luque EH, Muñoz-de-Toro M. Association of increased estrogen receptor β 2 expression with parity-induced alterations in the rat mammary gland. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 91: 29-39, 2004.

Bosquiazzo VL*, **Durando M***, Varayoud J, Ramos JG, Rodríguez HA, Muñoz-de-Toro M, Luque EH. Macrophage density in the pregnant rat uterine cervix is modulated by mast cells degranulation. *J. Reprod. Immunol.* 65: 147-158, 2005. (*THESE AUTHORS CONTRIBUTED EQUALLY TO THIS WORK).

Muñoz-de- Toro M, **Durando M**, Beldoménico PM, Beldoménico HR, Kass L, García SR, Luque EH. Estrogenic microenvironment generated by organochlorine residues in adipose mammary tissue modulates biomarkers expression in ER α -positive breast carcinomas. *Breast Cancer Res.* 8: R47, 2006.

Presentaciones en congresos

Durando M, Kass L, Luque EH, Muñoz-de-Toro M. Efectos de la exposición prenatal al xenoestrógeno Bisfenol A sobre el desarrollo de la glándula mamaria. XLVIII Reunión

Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC)- LI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). 2003; Mar del Plata.

Durando ML, Kass L, Piva J, Luque EH, Muñoz-de-Toro M. La exposición prenatal al xenoestrógeno Bisfenol A: ¿modula la acción de un carcinógeno químico sobre la glándula mamaria? Congreso Conjunto de Sociedades Biomédicas (SAIC-SAI-SAFE-SAB-SAB-SAN-SAF). 2004; Mar del Plata.

Durando ML, Kass L, Piva J, Luque EH, Muñoz-de-Toro M. La exposición prenatal a Bisfenol A aumenta la sensibilidad de la glándula mamaria a la acción de un carcinógeno químico. III Encuentro Bioquímico del Litoral- VI Jornadas de Comunicaciones Técnico Científicas. 2005; Santa Fe.

Perdomo V, **Durando M**, Muñoz-de-Toro, M. Efectos de la exposición *in utero* a bisfenol A sobre algunos parámetros de la fisiología reproductiva de ratas hembras. IX Encuentro de Jóvenes Investigadores de la UNL. 2005; Santa Fe.

Durando M, Perdomo V, Ramos JG, Luque EH, Muñoz-de-Toro M. La exposición *in utero* a Bisfenol A aumenta la expresión de mediadores de la angiogénesis en la glándula mamaria de la rata. LI Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) y LIV Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). 2006; Mar del Plata.

Durando M, Perdomo V, Bosquiazzo VL, Luque EH, Muñoz-de-Toro M. La exposición prenatal a Bisfenol A (BPA) altera el micro-ambiente endocrino en la glándula mamaria de la rata. LII Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC)- LV Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI)- Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS). 2007; Mar del Plata.

Durando M, Kass L, Perdomo V, Luque EH, Muñoz-de-Toro M. La exposición *in utero* a bisfenol A promueve angiogénesis y modula la respuesta mediada por receptores de esteroides en la glándula mamaria post-puberal LIII Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC)- Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS). 2008; Mar del Plata.

Otras presentaciones a congresos realizadas durante el desarrollo de esta tesis

Kass L, **Durando M**, Ramos JG, Varayoud J, Rodríguez HA, Luque EH, Muñoz-de-Toro M. Parity-induced alterations in proliferation, differentiation, and steroid hormone receptor profiles in the rat mammary gland. Gordon Research Conference in Mammary Gland Biology. 2003; Rhode Island, USA.

Kass L, **Durando M**, Ramos JG, Varayoud J, Muñoz-de-Toro M, Luque EH. Parity-associated changes in proliferation, differentiation, ER α and PR expression in the rat mammary gland. 36th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction. 2003; Cincinnati, Ohio, USA.

Kass L, **Durando M**, Luque EH, Muñoz-de-Toro M. Modificaciones en la expresión de RE α , RE β , RP y de la variante RE β 2 se asocian a cambios en la proliferación de la glándula mamaria de ratas multíparas. XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), LI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). 2003; Mar del Plata.

Durando M, Ramos JG, Perdomo V, Luque EH, Muñoz-de-Toro M. La expresión de nestina en las células estromales de la glándula mamaria de la rata se asocia a áreas del parénquima con alta proliferación. LI Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) y LIV Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). 2006; Mar del Plata.

Ramos JG, Varayoud J, Monje L, Bosquiazzo V, **Durando M**, Lower M, Santambrosio N, Bernhardt T, Muñoz-de-Toro M, Luque EH. Desarrollo de un test de alta sensibilidad para la detección de actividad estrogénica *in vivo* de perturbadores endocrinos. LI Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) y LIV Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). 2006; Mar del Plata.

Muñoz-de-Toro M, **Durando M**, Beldoménico HR, Beldoménico PM, Kass L, García SR, Luque EH. Estrogenic microenvironment generated by organochlorine residues in adipose mammary tissue modulates biomarkers expression in ER α -positive breast carcinomas. 4th

European Conference on Pesticides and Related Organic Micropollutants in the Environment-10th Symposium on Chemistry and Fate of Modern Pesticides. 2006; Almería, España.

Durando M, Ramos-González B, Castro R, Cikutovic M, Bustos-Obregón E. Hipoxia hipobárica intermitente y funcionalidad de la vesícula seminal en ratas. VI Congreso Internacional de la Sociedad de Andrología y Gametología de Chile, VIII Jornadas Internacionales de Verano en Medicina Reproductiva y Biotecnología. 2007; Temuco, Chile.

Bustos-Obregón E, Ramos-González B, **Durando M**, Cikutovic M. Sperm quality in mice exposed to hypobaric hypoxia. XIX North American Testis Workshop: "Chromosome Structure and Gene Expression". 2007; Tampa, Florida, USA.

Bustos-Obregón E, Ramos-González B, **Durando M**, Castro R. Reproductive damage induced in male rats by intermittent hypobaric hypoxia. XIX North American Testis Workshop: "Chromosome Structure and Gene Expression". 2007; Tampa, Florida, USA.

Durando M, Larrea V, Ramos B, Muñoz-de-Toro M, Luque EH, Sarabia L, Maurer I, Bustos-Obregón E. Efecto del Boro sobre testículo y espermatozoides de ratones tratados durante su vida prenatal y postnatal. XX Reunión Bienal de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana (ALIRH). 2007; Buenos Aires.

Bustos-Obregón E, Ramos-González B, **Durando M**, Castro R, Lara Á. Morfofisiología espermática en ratón post-hipoxia hipobárica simulada. XX Reunión Bienal de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana (ALIRH). 2007; Buenos Aires.

Ramos-González B, Bustos-Obregón E, **Durando M**, Castro R, Lara Á, Cikutovic M. Hipoxia hipobárica y daño espermatogénico en ratas. XX Reunión Bienal de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana (ALIRH). 2007; Buenos Aires.

Perdomo V, Bosquiazzo VL, **Durando M**. La exposición a Bisfenol A, ¿modifica la involución de la glándula mamaria de la rata? XI Encuentro de Jóvenes Investigadores de la Universidad Nacional del Litoral & II Encuentro de Jóvenes Investigadores de Universidades de Santa Fe. 2007; Santa Fe.

Kass L, Bosquiazzo VL, **Durando M**, Luque EH, Muñoz-de-Toro M. La exposición perinatal a bisfenol A altera la diferenciación de la glándula mamaria durante la gestación. LIII Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC)- Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS). 2008; Mar del Plata.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Abreviaturas utilizadas	i
Índice de Tablas	iv
Índice de Figuras	vi
I- INTRODUCCIÓN	
1. PERTURBADORES ENDOCRINOS	
1.1. Generalidades	2
1.1.1. Fuentes de exposición	3
1.1.2. Mecanismo de acción	4
1.2. Bisfenol A (BPA)	6
1.2.1. Mecanismos de acción y riesgo de exposición	14
2. GLÁNDULA MAMARIA: desarrollo normal y cáncer	
2.1. Generalidades	15
2.1.1. Tipos celulares en la glándula mamaria	17
2.1.2. Irrigación sanguínea y linfática	18
2.1.3. Períodos críticos del desarrollo e involución de la glándula mamaria	19
2.1.3.1. Período prenatal	19
2.1.3.2. Período peripuberal	19
2.1.3.3. Etapa adulta	20
2.1.3.4. Preñez y lactancia	21
2.1.3.5. Involución post-lactancia	22
2.2. Regulación hormonal del desarrollo mamario	22
2.2.1. Generalidades	22
2.2.2. Desarrollo mamario prenatal	22
2.2.3. Desarrollo mamario peripuberal	23
2.2.4. Desarrollo mamario adulto	23
2.3. Receptores para hormonas esteroideas	25
2.3.1. Receptores para Eg	26
2.3.2. Receptores para Pg	28
2.3.3. Expresión de RE y RP durante el desarrollo de la glándula mamaria	29

2.4. Co-reguladores de receptores nucleares	31
2.4.1. Co-activadores	31
2.4.2. Co-represores	33
3. CARCINOGENESIS	
3.1. Generalidades	35
3.2. El rol de los carcinógenos	37
3.3. Carcinogénesis mamaria	38
3.3.1. Hormonas y cáncer de mama	38
3.3.2. Modelos de carcinogénesis química	40
3.3.3. El modelo de tumores inducidos por NMU	42
3.3.4. El rol del estroma durante el desarrollo de tumores mamarios	42
3.3.5. Angiogénesis y tumores mamarios	43
4. EXPOSICIÓN A PERTURBADORES ENDOCRINOS Y GLÁNDULA MAMARIA	45
II-OBJETIVOS	
OBJETIVO GENERAL	48
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
III-MATERIALES Y MÉTODOS	
1. ANIMALES	51
2. DISEÑO EXPERIMENTAL	51
2.1. Obtención de hembras preñadas	51
2.2. Tratamiento <i>in utero</i>	51
2.3. ETAPA I	52
2.3.1. Crías: crecimiento y desarrollo	53
2.3.2. Desarrollo de la glándula mamaria	54
2.3.3. Ambiente endocrino y angiogénesis	54
2.4. ETAPA II	54
2.4.1. Evaluación de la susceptibilidad mamaria a un carcinógeno químico	54
2.4.2. La exposición prenatal a BPA, ¿modifica la respuesta de la glándula mamaria a un carcinógeno químico?	55

3. ADMINISTRACIÓN DE TRATAMIENTOS, OBTENCIÓN Y PROCESADO DE MUESTRAS	58
3.1. Administración de drogas	58
3.1.1. Administración prenatal de BPA	58
3.1.2. Administración posnatal de NMU	58
3.1.3. Administración de bromodeoxiuridina	59
3.2. Mastectomía	59
3.3. Muestras de sangre	60
3.4. Procesado de las muestras para microscopía óptica	61
3.5. Procesado para la obtención de <i>whole-mounts</i>	61
3.6. Extracción de proteínas	63
4. DETERMINACIONES Y EVALUACIONES	63
4.1. Cuantificación de hormonas circulantes por RIA	63
4.1.1. Determinación de E ₂ sérico	63
4.1.2. Determinación de Pg sérica	64
4.2. Especificidad de los anticuerpos utilizados	65
4.3. Inmunohistoquímica	66
4.3.1. Proliferación celular	69
4.3.2. Detección de receptores para esteroides, co-reguladores y VEGF	69
4.3.3. Reconocimiento de vasos sanguíneos	70
4.3.4. Detección de mastocitos	71
4.4. Inmunofluorescencia doble	71
4.5. Apoptosis <i>in situ</i> por el método de TUNEL	73
4.6. Morfometría y análisis de imágenes	75
4.6.1. Porcentaje de conductos hiperplásicos	75
4.6.2. Densidad de núcleos del estroma	76
4.6.3. Evaluación de los cortes inmunoteñidos	76
4.6.3.1. Proliferación y apoptosis	76
4.6.3.2. Mastocitos	77
4.6.3.3. Receptores hormonales, co-reguladores y VEGF	77
4.6.3.4. Área y densidad vascular	78
4.7. Evaluación de las <i>whole-mounts</i>	78
4.7.1. Detección, procesamiento y clasificación histopatológica de	78

tumores mamarios en <i>whole-mounts</i>	
4.7.2. Cuantificación de conductos hiperplásicos	79
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	80
IV-RESULTADOS	
ETAPA I	82
1. Efectos de la exposición a BPA sobre variables relacionadas con la preñez y el parto	82
2. Efectos de la exposición a BPA sobre crecimiento y desarrollo de las crías	82
3. Desarrollo de la glándula mamaria	84
3.1. Proliferación y apoptosis	84
3.2. Conductos hiperplásicos	84
3.3. Densidad de núcleos del estroma	85
3.4. Infiltración de mastocitos	85
4. Ambiente endocrino	89
4.1. Niveles circulantes de hormonas esteroideas ováricas	89
4.2. Expresión de receptores hormonales y co-reguladores	90
4.2.1. Expresión del RE α	90
4.2.2. Expresión del RP	91
4.2.3. Expresión de SRC-3 y de SMRT	91
4.2.4. Expresión de SRC-3 y co-localización con RE α	92
4.2.5. Expresión de SMRT y co-localización con RE α	93
4.2.6. Expresión del VEGF	96
4.2.7. Área y densidad vascular	96
ETAPA II	97
1. Susceptibilidad de la glándula mamaria frente al carcinógeno NMU	97
1.1. Incidencia y latencia de tumores mamarios en animales tratados con NMU en la pre-pubertad	97
1.2. Selección de una dosis subcarcinogénica de NMU	97
2. Respuesta de la glándula mamaria a NMU luego de la exposición a <i>in utero</i> a BPA	98
2.1. Proliferación y apoptosis	98

2.2. Conductos hiperplásicos	99
2.3. Densidad de núcleos del estroma	100
2.4. Infiltración de mastocitos	101
2.5. Incidencia y multiplicidad tumoral	101
V- DISCUSIÓN	
ETAPA I	106
1. Selección del modelo animal	106
2. Efecto de la exposición prenatal a BPA	108
2.1. La exposición <i>in utero</i> a BPA adelantó el inicio de la pubertad	108
2.2. La exposición <i>in utero</i> a BPA indujo cambios histomorfológicos en la glándula mamaria que se evidenciaron sólo después de la pubertad	109
2.3. La exposición <i>in utero</i> a BPA modificó el ambiente endocrino de la glándula mamaria de ratas púberes y adultas	111
2.4. La exposición <i>in utero</i> a BPA indujo mayor angiogénesis	115
ETAPA II	116
1. Las ratas de la cepa Wistar son susceptibles a la acción de NMU	116
2. La asociación entre la exposición prenatal a BPA y posnatal a una dosis subcarcinogénica de NMU promovió la progresión de lesiones pre-neoplásicas a neoplasias	117
3. Los tumores generados por la administración de NMU son hormonodependientes	119
VI- CONCLUSIONES	123
VII- RESUMEN	125
VIII- ABSTRACT	132
IX- BIBLIOGRAFÍA	138

Abreviaturas utilizadas

AB	<i>Alveolar bud</i>
AC	Adenocarcinoma
ADN(c)	Ácido desoxirribonucleico (copia)
AhR	Receptor de arilhidrocarbonados
ARN(m)	Ácido ribonucleico (mensajero)
ATP	Trifosfato de adenosina
BPA	Bisfenol A
BrdU	Bromodeoxiuridina
BSA	Albúmina sérica bovina
°C	Grados Celsius o centígrados
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CK8	Citoqueratina 8
cm	Centímetro/s
cpm	Cuentas por minuto
d	Día/s
DAB	Diaminobencidina
DAG	Distancia ano-genital
DAPI	Diamino-2-phenylindole dihydrochloride
DBD	Dominio de unión a ADN
DES	Dietilestilbestrol
DG	Día de gestación
DMBA	7,12-dimethylbenz(α)anthracene
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOI	Densidad óptica integrada
DPN	Día/s posnatal
E₂	17- β estradiol
Eg	Estrógenos
ERE	Elemento de respuesta a estrógenos
FSH	Hormona foliculoestimulante
FvW	Factor de von Willebrand
g	Gramos
h/s	Hora/s

H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
H-E	Hematoxilina-Eosina
HRE	Elemento de respuesta a hormona
HSP	Proteínas de choque térmico
IA	Índice de apoptosis
ip	Intraperitoneal
IP	Índice de proliferación
iv	Intravenosa
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramo/s
L	Lóbulos
LBD	Dominio de unión a ligando
LH	Hormona luteinizante
LOAEL	<i>Lowest Observed Adverse Effect Level</i>
MCP	Muerte celular programada
mg	Miligramo/s
min	Minuto/s
ml	Mililitro/s
mm	Milímetro/s
(m)M	(Mili)molar
NCoR	Co-represor de receptores nucleares
ng	Nanogramo/s
NL	Nódulos linfáticos
NMU	<i>N-methyl-N-nitrosourea</i>
NOAEL	<i>Non Observed Adverse Effects Level</i>
P	Pezón
PBS	Buffer de fosfatos
pc	Peso corporal
PCBs	Bifenilos policlorados
PE	Perturbador endocrino
Pg	Progesterona
pg	Picogramo/s
PID	Proliferaciones intraductales

PRE	Elemento de respuesta a progesterona
PRL	Prolactina
REα	Receptor para estrógenos α
REβ	Receptor para estrógenos β
RIA	Radioinmunoensayo
RMCP I	Rat Mast Cell Proteinase I
RP	Receptor para progesterona
rpm	Revoluciones por minuto
sc	Subcutánea
SEM	Error estándar de la media
SF	Solución fisiológica
SMRT	Mediador del silenciamiento del receptor retinoico y tiroideo
SRC	Co-activador de receptores para esteroides
TA	Tejido adiposo
TA	Temperatura ambiente
TC	Tejido conectivo
TD	<i>Terminal duct</i>
TDI	Ingesta diaria tolerable
TdT	Deoxinucleotidil transferasa terminal
TEB	<i>Terminal end bud</i>
UA	Unidades arbitrarias
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
Vv	Densidad de volumen
W-M	<i>Whole-mount</i>
α-SMA	α -actina de músculo liso
μl	Microlitro/s
μm	Micrómetro

Índice de Tablas

		Pág
Tabla 1	Exposición potencial por vía oral a diferentes estrógenos	4
Tabla 2	Efectos de la exposición a BPA en roedores de laboratorio	9
Tabla 3	Efectos de exposición a BPA, reportados por Luque y colaboradores	12
Tabla 4	Características de los carcinógenos más empleados en los modelos de carcinogénesis de mama en rata	41
Tabla 5	Esquema de los grupos utilizados para evaluar si el tratamiento prenatal con BPA modifica la respuesta de la glándula mamaria a NMU	56
Tabla 6	Procesamiento de muestras para la obtención de <i>whole-mounts</i>	62
Tabla 7	Protocolo estándar para la realización de inmunohistoquímica	66
Tabla 8	Anticuerpos y sistema de revelado usados para inmunohistoquímica	68
Tabla 9	Anticuerpos usados para inmunofluorescencia	72
Tabla 10	Protocolo estándar para la detección de apoptosis (técnica de TUNEL)	73
Tabla 11	Variables relacionadas con la preñez y el parto	82
Tabla 12	Distancia ano-genital y peso evaluados en crías hembras	83
Tabla 13	Efecto de la exposición <i>in utero</i> a BPA sobre la incidencia de conductos hiperplásicos. Distribución de conductos hiperplásicos según el número de capas de células epiteliales	88

Tabla 14	Efecto de la exposición <i>in utero</i> a BPA y posnatal a NMU sobre la incidencia de conductos hiperplásicos. Distribución de conductos hiperplásicos según el número de capas de células epiteliales	100
Tabla 15	Efecto del tratamiento <i>in utero</i> con BPA y posnatal con NMU sobre la incidencia y multiplicidad tumoral	102

Índice de Figuras

		Pág
Figura 1	Mecanismo de acción de PEs, mediado por AhR	6
Figura 2	Estructuras químicas de BPA, DES y estradiol	7
Figura 3	Representación esquemática de la ubicación de los pezones mamarios en la rata y su correspondiente glándula mamaria subcutánea	15
Figura 4	Representación esquemática de las estructuras presentes en la glándula mamaria de la rata	16
Figura 5	Fotomicrografía de glándula mamaria de una rata adulta virgen	16
Figura 6	Fotomicrografía de conducto y alvéolos de glándula mamaria	17
Figura 7	Células mioepiteliales en un alvéolo mamario	17
Figura 8	Desarrollo posnatal de la glándula mamaria de la rata Wistar	21
Figura 9	Niveles hormonales durante el ciclo estral de la rata	24
Figura 10	Dominios funcionales de un receptor nuclear de hormonas esteroideas	26
Figura 11	Mecanismos de acción propuestos para la vía E ₂ -RE	28
Figura 12	Representación esquemática de las dos isoformas del RP: RP-A y RP-B	29
Figura 13	Mecanismo propuesto para la acción de los co-activadores del RE α	33
Figura 14	Mecanismo de acción de co-represores del RE	34
Figura 15	Múltiples mutaciones originan el cancer de acuerdo con la teoría de la mutación somática	36

Figura 16	Cambios celulares asociados con el cáncer	37
Figura 17	Diseño experimental (ETAPA I)	53
Figura 18	Diseño experimental: la exposición prenatal a BPA, ¿modifica la respuesta de la glándula mamaria a NMU?	57
Figura 19	Armado y colocación de mini-bombas osmóticas	59
Figura 20	Mastectomía	60
Figura 21	Inmunohistoquímica para BrdU en epitelio mamario	69
Figura 22	Detección por inmunohistoquímica de RE α , RP, SRC-3, SMRT y VEGF	70
Figura 23	Inmunohistoquímica para detección de vasos sanguíneos	71
Figura 24	Inmunohistoquímica para la detección de mastocitos	71
Figura 25	Fundamento del método TUNEL para detección de células en apoptosis	74
Figura 26	Fotomicrografía de glándula mamaria de un ratón hembra con elevado índice de apoptosis	75
Figura 27	Conductos normales e hiperplásicos	76
Figura 28	Modelo de <i>whole-mount</i> evaluada	79
Figura 29	Inicio de la pubertad	83
Figura 30	Proliferación, apoptosis y <i>turnover</i> celular	86
Figura 31	Conductos hiperplásicos y densidad de núcleos del estroma	87

Figura 32	Distribución de conductos hiperplásicos clasificados según la magnitud de la hiperplasia	88
Figura 33	Infiltración de mastocitos	89
Figura 34	Niveles séricos de E ₂	89
Figura 35	Niveles séricos de Pg	90
Figura 36	Expresión del RE α	90
Figura 37	Expresión del RP	91
Figura 38	<i>Western-blot</i> para anti-SMRT y anti-SRC-3	91
Figura 39	Expresión de SRC-3	92
Figura 40	Co-localización de RE α y SRC-3 en conductos mamarios	93
Figura 41	Patrón de expresión de SMRT	94
Figura 42	Expresión de SMRT	95
Figura 43	Co-localización de RE α y SMRT en conductos mamarios	95
Figura 44	Expresión del VEGF	96
Figura 45	Área y densidad vascular	97
Figura 46	Proliferación, apoptosis y <i>turnover</i> celular en animales expuestos posnatalmente a NMU	98
Figura 47	Conductos hiperplásicos y distribución de los mismos según la magnitud de la hiperplasia	99
Figura 48	Densidad de núcleos del estroma	100

Figura 49	Infiltración de mastocitos en DPN 110	101
Figura 50	<i>Whole-mounts</i> y cortes histológicos de tumores mamarios	103
Figura 51	Caracterización de los tumores mamarios generados por exposición a BPA + NMU	104