

## **II- Objetivos**

## OBJETIVO GENERAL

Los mamíferos en desarrollo (desde la etapa fetal hasta la pubertad) son particularmente más susceptibles a la injuria ambiental. La histogénesis/organogénesis son procesos delicadamente regulados donde la proliferación y diferenciación están coordinadas no sólo entre sí, sino también con la muerte celular programada. A medida que las células proliferan ocurren alteraciones génicas y epigenéticas como consecuencia de este rápido crecimiento, y durante la diferenciación, es posible que la expresión génica sufra cambios masivos. Por lo tanto, la división celular y la diferenciación ofrecen múltiples oportunidades para la iniciación de lesiones y la promoción del crecimiento de células alteradas. Se sugiere que ambos eventos podrían dar origen a diferentes enfermedades, incluyendo las lesiones neoplásicas. Es bien conocido que las barreras fisiológicas protectoras (hemato-encefálica y placentaria) no están completas durante el desarrollo *in utero*, y que la capacidad de metabolizar y eliminar sustancias tóxicas/nocivas recién se completa después del nacimiento. Los fetos y los recién nacidos son más susceptibles a efectos adversos desencadenados por compuestos presentes en el medio ambiente y durante esta etapa inicial de la vida, el organismo puede recibir señales que dejen marcas permanentes en su genoma.

Nuestra hipótesis propone que la exposición a bajas dosis de un xenoestrógeno (por ejemplo el BPA) durante períodos críticos de la histogénesis/organogénesis/diferenciación de la glándula mamaria produce cambios permanentes a nivel del genoma los que se manifiestan con alteraciones en el equilibrio proliferación/apoptosis y/o el microambiente tisular favoreciendo el proceso de la carcinogénesis.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En ratas Wistar, estudiar si la exposición *in utero* a bajas dosis de BPA, altera una serie de parámetros en las crías hembras:

- ▲ modifica parámetros de crecimiento corporal e inicio de la pubertad;
- ▲ altera el desarrollo histomorfológico de la glándula mamaria;
- ▲ perturba la histoarquitectura del estroma mamario;

- ▲ modifica la infiltración y/o presencia de células inmunocompetentes en la glándula mamaria;
- ▲ modifica la esteroidogénesis ovárica generando cambios en los niveles séricos de esteroides ováricos;
- ▲ modifica la expresión de receptores para hormonas esteroideas y de co-reguladores en la glándula mamaria;
- ▲ modifica parámetros relacionados con la angiogénesis mamaria;

En ratas hembras expuestas *in utero* a BPA y posnatalmente a NMU se estudiará:

- ▲ la sensibilidad de la glándula mamaria a la acción de un carcinógeno químico;
- ▲ la histomorfología del parénquima y estroma mamarios;
- ▲ la incidencia y multiplicidad de tumores de mama y de lesiones preneoplásicas;
- ▲ el tipo de los tumores generados, de acuerdo con su histomorfología y con la expresión de receptores hormonales.

### **III- Materialles y Métodos**

## 1. ANIMALES

Se utilizaron ratas hembras adultas de la cepa Wistar (aproximadamente 200-250 g de peso corporal -pc-) pertenecientes al bioterio del Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes, de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (UNL). Los animales se mantuvieron bajo condiciones reguladas de luz [luz entre las 6:00 y las 20:00 horas (hs)] y temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), con libre acceso a comida (alimento balanceado en forma de *pellets*, Alimentos Cooperación, Rafaela, Santa Fe). La concentración de fitoestrógenos en la dieta no fue evaluada; sin embargo, como el alimento ingerido fue idéntico entre animales controles y tratados (ver 2.2) asumimos que todos los animales estuvieron expuestos a los mismos niveles de fitoestrógenos (en caso de que éstos estuvieran presentes en el alimento). Para minimizar la exposición a otros químicos considerados PEs, todas las ratas fueron colocadas en jaulas de acero inoxidable con libre acceso al agua de bebida provista en botellas de vidrio con tapones de goma.

Todos los animales utilizados fueron manipulados de acuerdo a la Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (National Academy of Sciences, 1996) y los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Asesor de Ética y Seguridad de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL.

## 2. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 2.1. Obtención de hembras preñadas

Las hembras fueron sometidas a control de ciclo estral, evaluando diariamente la citología vaginal (Montes y Luque, 1988) entre las 9:00 y las 11:00 hs. Cuando una hembra se detectaba en proestro, esa noche era colocada en una jaula junto con un macho adulto de fertilidad comprobada. La preñez fue confirmada en la mañana posterior al proestro mediante la detección de espermatozoides en el extendido vaginal y este día se consideró como día de gestación 1 (DG 1). En adelante estos animales serán considerados como el grupo de hembras F0.

### 2.2. Tratamiento *in utero*

Alcanzado el DG 8, las hembras F0 se dividieron en cuatro grupos experimentales, según el tratamiento administrado: a) vehículo (dimetilsulfóxido-DMSO-, Sigma-Aldrich de Argentina S.A.), b) 25  $\mu\text{g}$  BPA/kg/d (Sigma-Aldrich de Argentina S.A.), c) 250  $\mu\text{g}$

BPA/kg/d; d) 25 mg BPA/kg/d; en adelante denominados 25 BPA, 250 BPA y 25 mBPA respectivamente. El tratamiento se administró en forma subcutánea (sc) mediante minibombas osmóticas (ver **3.1.1**).

Las dosis empleadas fueron seleccionadas según los datos de NOAEL y TDI o dosis segura reportados por la Comisión Europea y la EPA. Así, la dosis más baja de BPA (25 µg/kg/d) es equivalente a la mitad de la TDI (50 µg/kg/d) y es 200 veces menor que la NOAEL (5 mg/kg/d), la dosis intermedia (250 µg/kg/d) equivale a 5 veces la TDI y la dosis más alta de BPA (25 mg/kg/d) es equivalente a 5 veces la NOAEL.

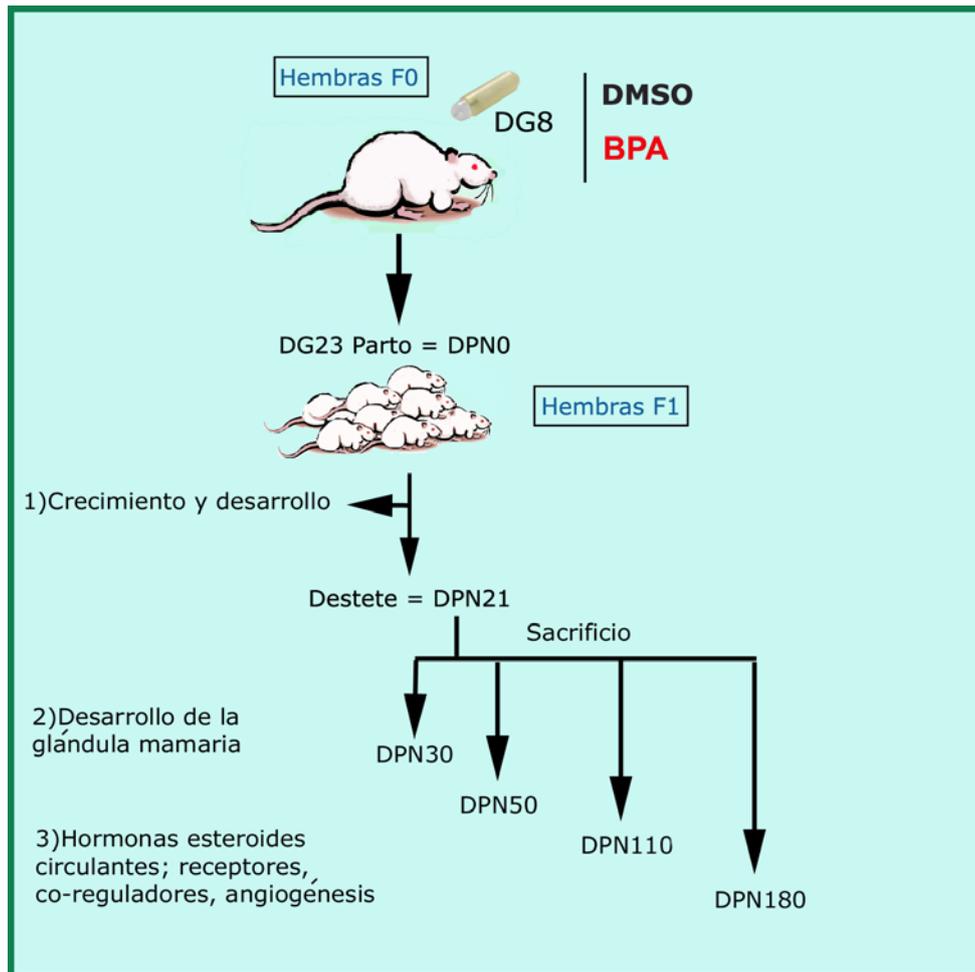
Iniciar el tratamiento en el DG 8, nos aseguró: a) no interferir con el proceso de implantación (el cual ocurre en el DG 5- Weitlauf, 1994-) y b) que las crías estuvieran sometidas al tratamiento durante la mayor parte de la organogénesis (el DG 8 es considerado el inicio de la misma -Nicholas, 1971-).

Para alcanzar los objetivos propuestos se diseñaron experimentos en dos etapas. En la **ETAPA I** evaluamos los efectos de la exposición prenatal a BPA sobre: 1) parámetros de crecimiento y desarrollo de las crías; 2) desarrollo de la glándula mamaria; 3) niveles séricos de hormonas esteroideas; receptores hormonales y sus co-reguladores en la glándula mamaria; 4) parámetros de angiogénesis; en diferentes etapas de la vida posnatal.

En la **ETAPA II**, evaluamos: 1) la susceptibilidad de la glándula mamaria frente a un carcinógeno químico, 2) si la exposición prenatal a BPA modifica la respuesta de la glándula mamaria al carcinógeno.

### **2.3. ETAPA I:**

En la Figura 17 se muestra el diseño experimental empleado para abordar los objetivos propuestos para esta etapa.



**Figura 17. Diseño experimental (ETAPA I).** *DMSO*: dimetilsulfóxido; *BPA*: Bisfenol A; *DG*: día de gestación; *DPN*: día posnatal.

### 2.3.1. Crías: crecimiento y desarrollo

En nuestra colonia, el parto ocurre el vigésimo tercer día de la gestación (DG 23) y es considerado como el DPN 0 (cero) para las crías, denominadas F1.

El DPN 1, todas las crías F1 fueron pesadas y sexadas según el criterio de distancia ano-genital, -DAG- (definida como la la distancia entre la papila genital y la apertura anal, que en los primeros días de vida es mayor en machos que en hembras). El peso se registró a distintos intervalos a lo largo de lactancia (DPN 1, 5, 10, 15 y 21), utilizando una balanza mecánica. Como el peso mínimo requerido por la balanza es mayor al peso corporal de una cría en los primeros días de vida, fue necesario pesar a la camada completa (es decir, todas las crías de una misma madre juntas) para obtener el peso total ( $P_T$ ) y calcular el peso medio de las crías como:  $P_T / N^\circ$  de crías pesadas. Con el objetivo de asegurar a cada cría un crecimiento óptimo, el DPN 5 se sacrificaron las crías en exceso de forma tal que cada madre F0 continuó lactando sólo 8 crías, 4 hembras y 4 machos siempre que fue posible. El destete fue realizado el DPN 21. El peso de las hembras se registró hasta DPN 110. A

partir del DPN 30, todas las hembras fueron periódicamente observadas para detectar el día en que ocurrió la apertura vaginal, considerado el día de inicio de la pubertad (Ojeda y Urbanski, 1994).

### **2.3.2. Desarrollo de la glándula mamaria**

Para responder si el tratamiento *in utero* con BPA modifica el desarrollo y/o diferenciación de la glándula mamaria, un grupo de hembras F1 control y tratados fue sacrificado en momentos claves del desarrollo (n= 6-8 animales/grupo/edad): a) prepuberal (DPN 30), b) peripuberal (DPN 50), c) adultez temprana (DPN 110) y d) adultez tardía (DPN 180). Sobre estas muestras se evaluó: índices de proliferación y apoptosis celular, infiltración de mastocitos, reacción desmoplásica en el estroma, porcentaje de conductos hiperplásicos o hiperplasias ductales.

### **2.3.3. Ambiente endocrino y angiogénesis**

Utilizando muestras de suero de crías de DPN 50 y DPN 110, expuestas *in utero* a BPA o DMSO (n= 6-8 animales/grupo/edad), se determinaron los niveles de E<sub>2</sub> y Pg; y sobre muestras de glándula mamaria se evaluó en parénquima: la expresión de receptores hormonales, de dos co-reguladores y del VEGF; y en estroma: el área y la densidad vascular.

Las muestras (suero y glándula mamaria) fueron obtenidas, procesadas y sometidas a la técnica correspondiente para cada evaluación según se detalla en las secciones correspondientes.

## **2.4. ETAPA II**

### **2.4.1. Evaluación de la susceptibilidad mamaria a un carcinógeno químico**

Con el objetivo de evaluar si un animal expuesto durante su vida intrauterina a BPA, presenta mayor susceptibilidad al desarrollo de tumores mamarios inducidos por un carcinógeno químico, fue necesario seleccionar la edad adecuada para la administración y establecer una dosis subcarcinogénica del carcinógeno.

Para conocer si en ratas de la cepa Wistar, la susceptibilidad al carcinógeno es mayor en animales pre-púberes (DPN 21) o post-puberales (DPN 50), según fue demostrado para ratas Sprague-Dawley (Thompson y col., 1995), realizamos la siguiente prueba piloto. Un grupo de hembras (n=6) de DPN 21, carente de cualquier tratamiento *in*

*utero*, fue inyectado con una dosis de 50 mg NMU/kg pc (50 NMU) considerada carcinogénica (Thompson y col., 1995). Una semana después de la inyección los animales se pesaron y palparon semanalmente para la detección de tumores. El sacrificio se realizó en el momento de la aparición del primer tumor o bien transcurridas aproximadamente 50 semanas desde la inyección.

Para seleccionar una dosis sub-carcinogénica de NMU y evitar el uso excesivo de animales en una curva dosis-respuesta se realizó otra experiencia piloto. Teniendo en cuenta que 50 NMU se considera una dosis carcinogénica (Thompson y col., 1995) evaluamos inducción de tumores utilizando una dosis de 25 mgNMU/kg pc (25 NMU). Hembras vírgenes de DPN 50 recibieron una inyección intraperitoneal (ip) de 25 NMU (n=10) o 50 NMU (n=6) disuelto en 0,9 % de NaCl, acidificado a pH 4,0 con ácido acético (Thompson y Adlaka, 1991). Estos animales fueron pesados y palpados dos veces por semana para la detección de tumores. Fueron sacrificados 18 semanas después de la inyección de NMU y se determinó la incidencia tumoral.

#### **2.4.2. La exposición prenatal a BPA, ¿modifica la respuesta de la glándula mamaria a un carcinógeno químico?**

Una vez seleccionada la dosis subcarcinogénica de NMU, un grupo de hembras F1 expuestas *in utero* a DMSO, recibieron una inyección ip de 25 NMU (grupo control) o 50 NMU (grupo control positivo de acción del carcinógeno); mientras que las hembras F1 de los grupos 25 BPA y 250 BPA, recibieron únicamente la dosis 25 NMU (Fig. 18).

Todos los animales fueron pesados y palpados (para detección de lesiones y/o tumores mamarios) dos veces por semana, empezando una semana después de la administración de NMU.

Las ratas tratadas con la dosis 50 NMU fueron sacrificadas a las 18 semanas post-carcinógeno (DPN 180) y las ratas que recibieron la dosis 25 NMU fueron sacrificadas a las 8 ó 18 semanas post-NMU (DPN 110 o DPN 180, respectivamente).

En el momento del sacrificio, se extrajeron ambas cadenas mamarias abdomino-inguinales y se procedió como sigue: una glándula N° 4 se procesó para microscopía óptica según se detalla en la sección 3.4; la cadena abdomino-inguinal contralateral fue procesada como *whole-mount* (*W-M*, ver sección 3.5). Las lesiones tumorales presentes fueron extraídas, procesadas para microscopía óptica de rutina (ver 3.4) y sometidas a clasificación histopatológica, siguiendo los criterios descriptos previamente (Russo y Russo, 2000; Thompson y col., 2000).

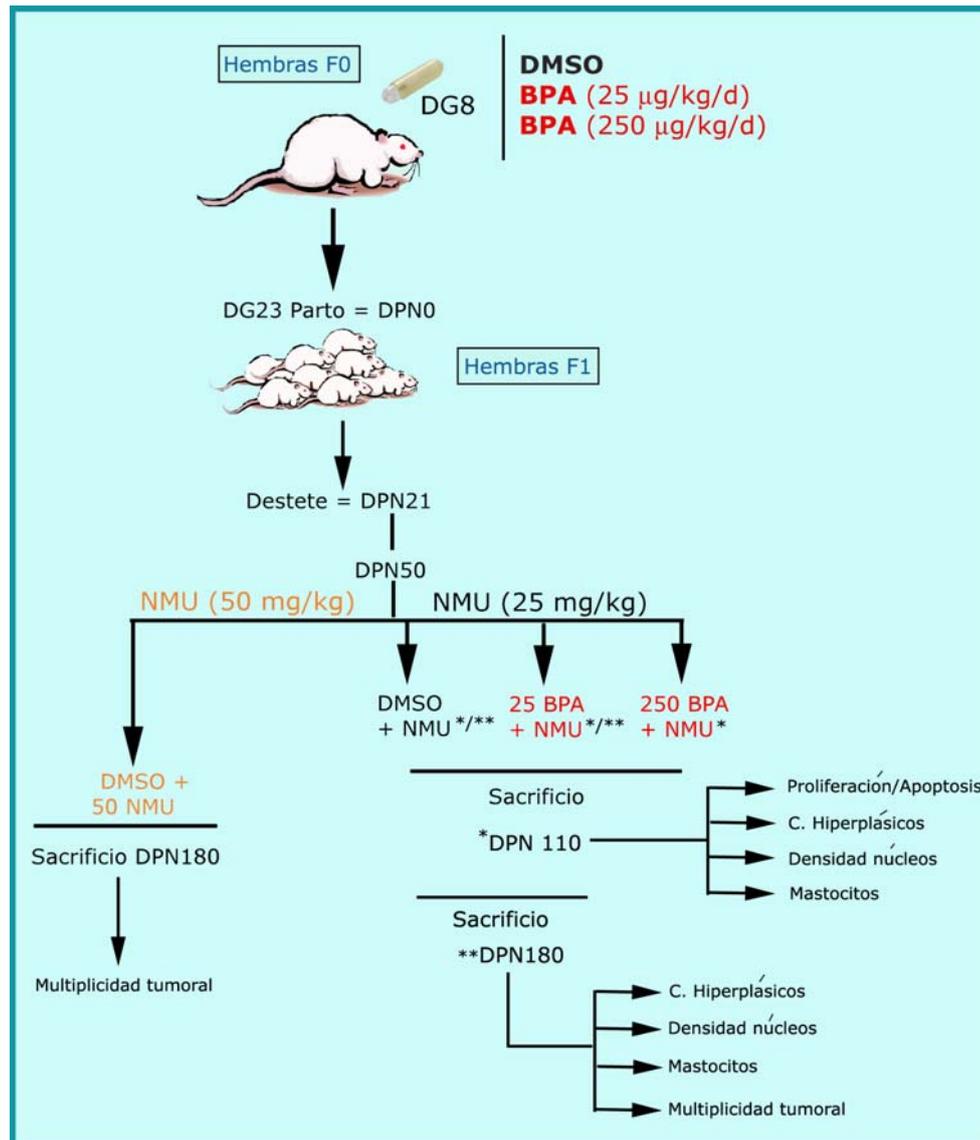
La multiplicidad tumoral, es decir el número de tumores por rata, fue un parámetro evaluado en todos animales expuestos a NMU y sacrificados el DPN 180.

En la Tabla 5, se muestra un resumen de los grupos experimentales, como así también el número de animales que conformaron cada uno de los mismos.

**Tabla 5.** Esquema de los grupos utilizados para evaluar si el tratamiento prenatal con BPA modifica la respuesta de la glándula mamaria a NMU.

<i>In utero</i>	<b>DPN 50</b>	<b>Número (n=)</b>	<b>Sacrificio</b>
DMSO	25 NMU	9	DPN 110
25 BPA	25 NMU	9	DPN 110
250 BPA	25 NMU	9	DPN 110
DMSO	25 NMU	10	DPN 180
25 BPA	25 NMU	15	DPN 180
<b>DMSO*</b>	<b>50 NMU</b>	<b>10</b>	<b>DPN 180</b>

\*: Grupo control positivo de actividad carcinogénica.



**Figura 18. Diseño experimental: la exposición prenatal a BPA, ¿modifica la respuesta de la glándula mamaria a NMU?** *DMSO*: dimetilsulfóxido; *BPA*: Bisfenol A; *DG*: día de gestación; *DPN*: día posnatal; *NMU*: N-nitroso-N-metilurea. \* y \*\* indican el momento en que los animales fueron sacrificados, según se detalla en la Tabla 5.

Todas las madres asignadas a las ETAPAS I y II, que recibieron una mini-bomba osmótica conteniendo DMSO, o 25 BPA o 250 BPA, fueron controladas a lo largo de la gestación, como una medida de evaluación de bienestar de la madre, y de las crías recién nacidas. Las variables evaluadas fueron: porcentaje de gestaciones exitosas, ganancia de peso de las madres durante la gestación, extensión de la preñez, N° de crías nacidas/parto.

### **3. ADMINISTRACIÓN DE TRATAMIENTOS, OBTENCIÓN Y PROCESADO DE MUESTRAS**

#### **3.1. Administración de drogas**

##### **3.1.1. Administración prenatal de BPA**

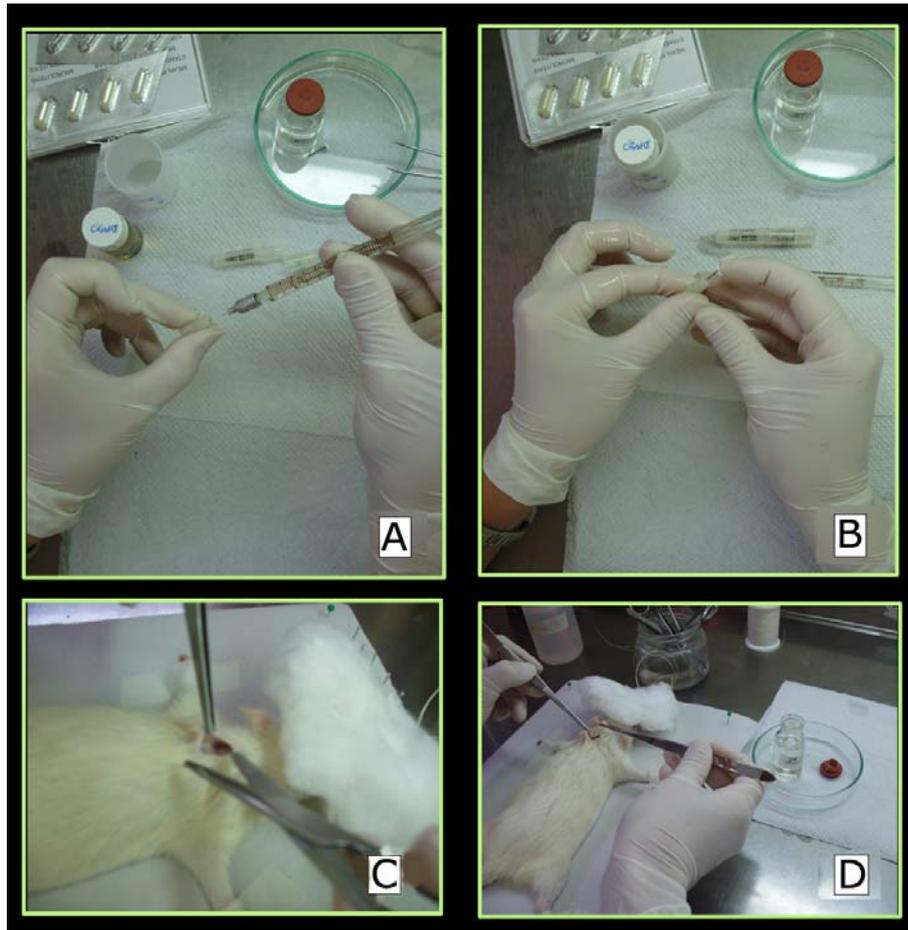
Se utilizaron mini-bombas osmóticas Alzet modelo 1002 (Alza Corporation, Palo Alto, California, USA) que tienen una capacidad de 90  $\mu$ l ( $\pm$  10  $\mu$ l), con una tasa de liberación de 0,25  $\mu$ l/hora ( $\pm$  0,05  $\mu$ l/hora) y aseguran una liberación continua y uniforme de la solución contenida durante 14 días.

Las bombas osmóticas se llenaron siguiendo las instrucciones del fabricante (Alza Corporation), utilizando jeringas de vidrio y agujas metálicas con un calibre 27 G, provistas por el fabricante. El llenado se hizo introduciendo lentamente la solución correspondiente para no generar burbujas (Fig. 19 A-B). Una vez llena, la bomba se sumergió en SF estéril y se incubó durante 5 hs en estufa a 37°C. Este procedimiento garantiza la liberación constante y homogénea de la solución contenida en la bomba.

Para la colocación de la bomba el animal se anestesió utilizando una cámara con éter sulfúrico y se colocó sobre una tabla de cirugía con el abdomen hacia abajo de forma tal de exponer la región dorsal del cuerpo. La zona en la cual se hizo la incisión (nuca) se limpió con alcohol 70° y se realizó un pequeño corte (aproximadamente 1 cm) en sentido longitudinal. Utilizando tijeras de punta roma se divulsionó para separar la piel del músculo, en la cavidad creada se introdujo la bombita (Fig. 19 C-D). Luego se procedió a suturar la herida con uno o dos puntos discontinuos, evitando que el animal despertara antes de haber concluido la sutura. Acto seguido, cada hembra F0 fue colocada en una jaula separada del resto de los animales, en la cual permaneció durante todo el experimento.

##### **3.1.2. Administración posnatal de NMU**

Se administró por vía ip una dosis de 50 mg NMU/kg pc o una dosis de 25 mgNMU/kg pc, disuelto en solución fisiológica (SF: 0,9 g NaCl/100 ml de agua destilada) acidificada a pH 4,0 con ácido acético (Thompson y Adlakha, 1991).



**Figura 19. Armado y colocación de mini-bombas osmóticas.** En A y B se observa la maniobra que permite el llenado de cada bombita. Para introducir la bombita en el animal, debe realizarse una incisión en la piel (C), y alojar la bomba en la cavidad subcutánea generada (D).

### 3.1.3. Administración de bromodeoxiuridina.

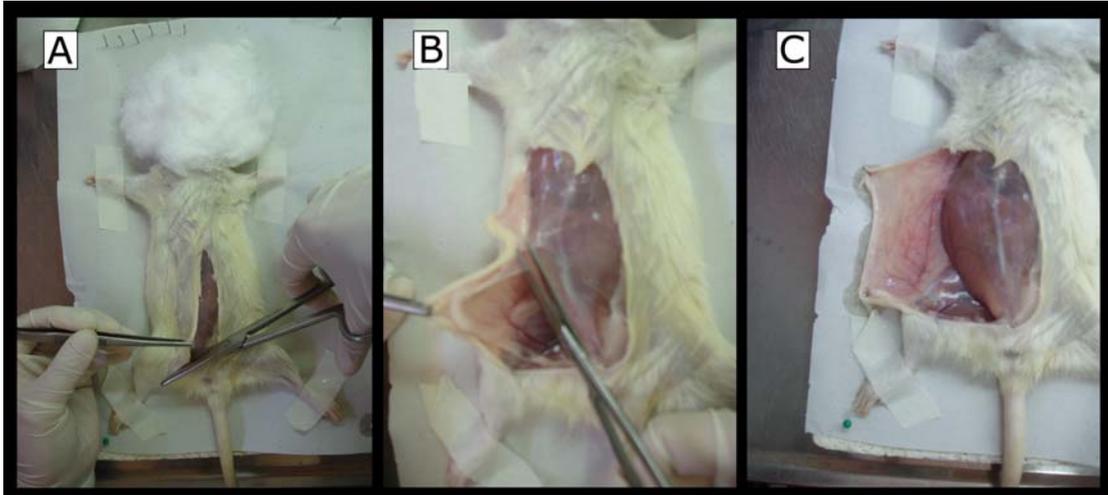
Siempre que fue necesaria la cuantificación de proliferación celular, los animales recibieron 2 hs antes del sacrificio una inyección ip con 6 mg/100 g de pc de bromodeoxiuridina (BrdU; Sigma-Aldrich de Argentina S.A., Buenos Aires, Argentina) disuelta en buffer de fosfatos salinos (PBS) pH 7,5. Los animales se sacrificaron por decapitación evitando situaciones de *stress*. Se obtuvieron muestras de sangre y glándulas mamarias.

### 3.2. Mastectomía

Para obtener las mamas se identificaron los pares N° 4, 5 y 6 por la localización de los correspondientes pezones (Fig. 3). Se desinfectó el área a operar con alcohol 70° y se realizó un corte a lo largo en la zona ventro-medial de la piel del animal, de aproximadamente 4-5 cm, entre el par N° 4. Luego se realizaron dos cortes oblicuos y hacia abajo simulando una “Y” invertida (Fig. 20 A). Se separaron ambas cadenas

abdomino-inguinales del músculo subyacente (Fig. 20 B); la piel, a la cual permaneció adherida cada cadena mamaria, se fijó a la tabla de disección y se procedió a separar la cadena completa de la piel (Fig. 20 C).

Las muestras así obtenidas se procesaron según fueran destinadas a microscopía óptica o montaje como *W-M*.



**Figura 20. Mastectomía.** Luego del corte ventro-medial inicial, se realiza un nuevo corte oblicuo al primero (A). La cadena mamaria dispuesta subcutáneamente es desprendida del músculo abdominal (B) y queda expuesta para su disección completa (C).

Las muestras de glándulas mamarias, según el objetivo asignado (ver sección 2. **Diseño experimental**), fueron procesadas como *W-M* (cadena abdomino-inguinal), o bien un par N°4 se procesó para microscopía óptica y el otro, para *W-M*. Adicionalmente se extrajeron glándulas mamarias de 4 animales seleccionados al azar para ser incluidas en los ensayos de *Western-blot* (ver sección 4.2) como método para validar la especificidad de algunos anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica.

### 3.3. Muestras de sangre

Las muestras de sangre obtenidas fueron recolectadas en tubos de vidrio. Para facilitar la retracción del coágulo los tubos se incubaron por 15 min en estufa a 37°C, después de una centrifugación, se separó el suero que fue conservado a -80°C hasta el momento de la realización del radioinmunoensayo (RIA, *Radio Immuno Assay*) para dosaje hormonal.

### 3.4. Procesado de las muestras para microscopía óptica

Las muestras de glándulas mamarias obtenidas se fijaron utilizando una solución de formol al 4% (Cicarelli, Rosario, Argentina) tamponada a pH 7,5 con PBS durante 6 hs a temperatura ambiente (TA), respetando la proporción recomendada de fijador/muestra (20/1) para garantizar la adecuada conservación morfológica de las estructuras tisulares. Cumplido el tiempo de fijación, se realizaron dos lavados con PBS (pH 7,5) de 10 min cada uno y las muestras se mantuvieron en solución de etanol 70°. Para la inclusión de las muestras en tacos de parafina se siguió el protocolo de rutina descrito por Junqueira y Junqueira (1983). Brevemente, consiste en la deshidratación de las muestras en soluciones de etanol de graduación creciente (70°, 96° y 100°), clarificación a través de sucesivos pasajes por xilol e inclusión en bloques de parafina.

Posteriormente, se realizaron cortes histológicos de 5 µm de espesor utilizando un micrótopo rotativo manual (Leica Jung RM 2025). Dichos cortes se montaron sobre portaobjetos previamente tratados con 3-aminopropyl triethoxysilane (Sigma-Aldrich de Argentina S.A) como sustancia adherente. Los cortes se secaron en estufa a 37°C durante 24 hs y posteriormente fueron sometidos a tinción de rutina con Hematoxilina-Eosina (H-E) (Junqueira y Junqueira, 1983) o a marcación inmunohistoquímica o inmunofluorescencia, según se indica en las secciones correspondientes.

### 3.5. Procesado para la obtención de *whole-mounts*

Las glándulas mamarias son estiradas sobre portaobjetos limpios y desengrasados de 5,5 x 7,5 cm (Fisherbrand; Fisher Scientific; Pittsburg, PA, U.S.A.). Luego son sometidas a fijación en una solución de formol al 4% (Cicarelli) tamponada a pH 7,5 con PBS durante 18 hs a TA. Luego de la fijación, los portaobjetos con las muestras adheridas se lavaron con agua destilada durante 15 min y se continuó con el protocolo descrito en la Tabla 6 (Thompson y col., 1995).

Luego de la clarificación, las *W-M* se colocaron en bolsas plásticas que se sellan por calor (de 10 x 15 cm; Kapak Seal PAK pouches; KAPAK Corporation; Minneapolis; MN; U.S.A.) con 10 ml de salicilato de metilo (Sigma-Aldrich de Argentina S.A.). La elección del salicilato de metilo como agente de conservación se debió a que presenta un índice de refracción muy cercano al del tejido, garantizando de este modo una resolución fotográfica de gran calidad.

Esta forma de procesado como *W-M*, permite no sólo la visualización macroscópica de lesiones o tumores, sino que además posibilita capturar pequeñas zonas del tejido

sospechosas de ser lesiones y que no pueden confirmarse por la simple observación bajo estereomicroscopio. De este modo, toda masa oscura macro o microscópica fue removida de la *W-M*, procesada e incluida en parafina para análisis histológico de rutina y caracterización histopatológica, siempre que se hubiera confirmado la naturaleza anormal del tejido. Se obtuvieron cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espesor utilizando un micrótopo rotativo manual (Leica Jung RM 2025). Los cortes se montaron sobre portaobjetos tratados con 3-aminopropyl triethoxysilane (Sigma-Aldrich de Argentina S.A) y se secaron en estufa a 37°C durante 24 hs. Posteriormente fueron sometidos a tinción de rutina con H-E (Junqueira y Junqueira, 1983) o a marcación inmunohistoquímica, según se indica en las secciones correspondientes.

**Tabla 6:** Procesamiento de muestras para la obtención de *whole-mounts*.

<b><i>Deshidratación</i></b>	
Alcohol 70°	1 h en cada solución
Alcohol 96°	
Alcohol 100°	
<b><i>Eliminación de grasa mamaria</i></b>	
Tolueno I	2 hs en cada solución
Tolueno II	
<b><i>Rehidratación</i></b>	
Alcohol 100°	1 h en cada solución
Alcohol 96°	
Alcohol 70°	
<b><i>Tinción</i></b>	
Carmín alúmina (0,2% )*	5 a 7 días a 4°C
<b><i>Lavado</i></b>	
Agua destilada	30 min
<b><i>Deshidratación</i></b>	
Alcohol 70°	1 h en cada solución
Alcohol 96°	
Alcohol 100°	
<b><i>Clarificación</i></b>	
Xilol I	2 hs en cada solución
Xilol II	

\* El colorante carmín alúmina 0,2% fue preparado según un protocolo descrito con anterioridad (Rasmussen y col., 2000).

### 3.6. Extracción de proteínas

Se obtuvieron extractos proteicos de las glándulas mamarias extraídas para ser usadas como control de especificidad en los ensayos de *Western blot*. Las muestras fueron procesadas siguiendo una metodología descrita previamente en nuestro laboratorio (Rodríguez y col., 2003). Brevemente, la homogeneización se realizó en buffer RIPA [Nonidet P40 1%, deoxicolato de sodio 0,5%, duodecil sulfato de sodio (SDS) 0,1%, EDTA 2 mM, fluoruro de sodio 50 mM; todos de Sigma-Aldrich de Argentina S.A.] conteniendo inhibidores de proteasas (vanadato de sodio 1 mM, aprotinina 0,20 mg/ml, fluoruro de fenilmetisulfonilo -PMSF- 100 µg/ml; todos de Sigma-Aldrich de Argentina S.A), en buffer PBS, 0,1 M pH: 7,00. El tejido fue homogeneizado con un homogeneizador Ultra-Turrax T25 Basic (IKA®- Werke GMBH & Co.KG, Staufen, Germany), el homogenato fue incubado en hielo por 30 min y centrifugado a 14000 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante separado se guardó a -80°C. La concentración de proteínas se determinó usando el kit *BCA Protein Assay* (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) que se fundamenta en la reducción de catión cúprico ( $\text{Cu}^{+2}$ ) a catión cuproso ( $\text{Cu}^{+1}$ ), por las proteínas presentes en la muestra, en un medio alcalino con la detección colorimétrica (altamente sensible y selectiva) del  $\text{Cu}^{+1}$  por el ácido bicinónico (<http://www.piercenet.com>; último acceso mayo de 2008).

## 4. DETERMINACIONES Y EVALUACIONES

### 4.1. Cuantificación de hormonas circulantes por RIA

#### 4.1.1. Determinación de E<sub>2</sub> sérico

La determinación de E<sub>2</sub> sérico se realizó siguiendo la metodología de rutina utilizada en nuestro laboratorio (Kass y col., 2004). Los esteroides se extrajeron a partir de 700 µl de suero con éter etílico (Merck, Buenos Aires, Argentina) y se resuspendieron en buffer conteniendo PBS con el agregado de azida sódica y gelatina (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) durante 1,5 hs en baño térmico (37°C). Posteriormente se agregó la hormona marcada (<sup>3</sup>H-E<sub>2</sub> (Estradiol 2,4,6,7,16,17-<sup>3</sup>H(N)) (NETS 17) NEN PerkinElmer Life And Analytical Sciences, Inc., Boston, USA) en una concentración comprendida entre 8000 y 10000 cuentas por minuto (cpm). La hormona marcada (denominada “hormona caliente”) compete con la hormona endógena por la unión al anticuerpo anti-E<sub>2</sub>, provisto por el Dr. Gordon N. Niswender, (Colorado State University, Department of Physiology,

Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, CO, USA). El complejo “hormona caliente-hormona endógena-anticuerpo” se incubó a 4°C durante toda la noche. Producida la inmunorreacción, se realizó la adsorción de la hormona que quedó libre (tanto marcada como endógena) incubando con una suspensión de carbón dextrán (0,5%-0,05%) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) durante 10 min con agitación periódica; mediante una centrifugación a 3500 rpm a 4°C por 10 min, se separó el carbón-dextrán unido a hormona libre. El sobrenadante se homogeneizó con líquido de centelleo (PerkinElmer) en una relación de volumen 1:10 (muestra:líquido de centelleo) y se contaron las cpm en un contador beta (WinSpectral, Modelo: 1414). En paralelo se realizó una curva estándar con diluciones seriadas de E<sub>2</sub>, (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) comprendiendo un rango de 1,5625 a 400 pg/ml.

En todos los casos se realizaron los siguientes controles: 1) blanco de extracción: agregando agua destilada en lugar de suero, 2) control de recuperación luego de la extracción: para conocer la eficiencia de la extracción, una cantidad conocida de hormona marcada fue agregada a un suero de rata macho al que luego se le realizó la extracción de rutina; evaluando de este modo las cuentas recuperadas luego de este proceso. Los resultados de los diferentes ensayos fueron corregidos según la recuperación calculada.

La curva de calibrado y los controles se realizaron por triplicado; los sueros experimentales fueron medidos por duplicado. La sensibilidad del ensayo fue de 6,125 pg/ml, y los coeficientes de variación (CV%) intra e interensayo fueron de 11% y 3,6%, respectivamente.

#### **4.1.2. Determinación de Pg sérica**

La determinación de Pg circulante se realizó siguiendo una técnica basada en la extracción de esteroides de 50 µl de muestra con n-Hexano (Merck, Buenos Aires, Argentina) (Kass y col., 2004) y resuspensión en un buffer de fosfato de sodio con el agregado de azida sódica y gelatina (Sigma-Aldrich) por 1,5 hs en baño térmico (37°C). El agregado de Pg marcada [<sup>3</sup>H-Pg (Progesterone 1,2,6,7-<sup>3</sup>H(N)), PerkinElmer Life Sciences], la competencia con la hormona endógena por el anticuerpo anti-Pg (provisto por el Dr. Gordon N. Niswender) y la adsorción con carbón dextrán, son idénticas a las descriptas para RIA de E<sub>2</sub>. Luego de la centrifugación, el sobrenadante se homogeneizó con líquido de centelleo (PerkinElmer) en una relación de volumen 1:6 (muestra:líquido de centelleo). La cuantificación se realizó en contador beta (WinSpectral, Modelo: 1414). Se realizó una

curva estándar con diluciones seriadas de Pg (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) comprendidas entre 0,0625 y 32 ng/ml.

Al igual que en el RIA para medición de E<sub>2</sub> se realizaron los siguientes controles: 1) blanco de extracción, 2) control de recuperación luego de la extracción, 3) suero de rata macho pre-absorbido con carbón-dextrán con agregado de una cantidad conocida de hormona fría (Sugden, 1978).

La curva de calibrado y los controles se realizaron por triplicado; los sueros experimentales fueron medidos por duplicado. La sensibilidad del ensayo fue de 0,125 ng/ml y los coeficientes de variación (CV%) intra e interensayo fueron de 8,3% y 11%, respectivamente.

#### 4.2. Especificidad de los anticuerpos utilizados

La especificidad de los anticuerpos anti-SMRT y anti-SRC-3 fue validada por electroforesis seguida de *Western-blot*, como se detalla a continuación.

Las proteínas se separaron por electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida-duodecil sulfato de sodio (PAGE-SDS), utilizando geles de concentración variable de poliacrilamida (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) entre 6 y 10% en el gel de resolución. Se sembró un pool de homogenatos de glándula mamaria equivalente a 25 µg de proteínas por calle. En cada corrida, se sembró también un patrón de peso molecular de amplio espectro (10-250 kDa; Full Range RAINBOW, Amersham Pharmacia Biotech., Argentina S.A.). Una vez realizada la corrida electroforética, los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa (tamaño de poro 0,45 µm; Protran Nitrocellulose Membrana, Schleicher and Schuell, USA) para realizar *western blot*. La transferencia se realizó durante 2 hs en baño de hielo, a voltaje (V) constante de 100 V/h.

Una vez obtenidas las membranas, éstas fueron sometidas a tinción reversible con Ponceau S para detectar las bandas proteicas transferidas. La tinción con Ponceau S, permitió identificar la zona de la membrana en la que deberían estar las proteínas de interés SMRT y SRC-3, según el peso molecular conocido para ambas (150 kDa y 160 kDa, respectivamente). Las membranas fueron cortadas para identificar individualmente cada proteína y luego fueron bloqueadas con leche descremada 5% PBS durante toda la noche a 4°C con el objeto de bloquear las uniones inespecíficas. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 10 min en agitación con Tris buffer salino-Tween (TBST; Tris 25 mM, NaCl 0,14 M, Tween-20 0,05% v/v, pH 7,4) y se incubó 1,5 hs con el anticuerpo primario

correspondiente: anti-SMRT o anti-SRC-3, ambos obtenidos y purificados en el LETH (Varayoud y col., 2008). Ambos anticuerpos se diluyeron (1/500) utilizando TBST con leche descremada 2% y la incubación se realizó a 37°C en un agitador orbital, durante 3 hs. Luego, cada membrana se lavó nuevamente con TBST y se incubó con anticuerpo secundario, anti-IgG de conejo generado en cabra marcado con peroxidasa (Amersham), diluido 1/2500 en TBST-leche 2%, durante 1 h a 30°C en un agitador orbital. Las membranas se lavaron 3 veces con TBST y la reacción se visualizó utilizando 0,5 mgDAB/ml de Tris-HCl (Sigma-Aldrich de Argentina S.A.) como sustrato de la enzima ligada al anticuerpo secundario.

Cada *blotting* incluyó controles positivos (homogenatos obtenidos de útero, próstata y cerebro de rata) y controles negativos, en los cuales se omitió la incubación con anticuerpos primarios.

### 4.3. Inmunohistoquímica

Las inmunomarcaciones se realizaron sobre cortes de 5 µm de espesor con el método avidina-biotina peroxidasa, siguiendo un protocolo previamente descrito por nuestro laboratorio (Bosquiazzo y col., 2005; Kass y col, 2004; Muñoz de Toro y col., 2006b), con algunas modificaciones. Se realizaron inmunohistoquímicas para detección de: **BrdU** incorporada, **RMCP I** (*Rat Mast Cells Proteinase I*), **RE $\alpha$** , **RP**, **SRC-3**, **SMRT**, **p63**, **CK8**, **VEGF** y **factor de von Willebrand (FvW)**. Brevemente, el método consiste en una recuperación antigénica, bloqueo de la actividad de peroxidasa endógena, incubación con anticuerpos primarios y secundarios, seguido de revelado (Tabla 7).

**Tabla 7:** Protocolo estándar para la realización de inmunohistoquímica

<b>- Desparafinización e hidratación:</b>	
Xilol	3 pasajes de 3 min c/u
Alcohol 100°	3 min
PBS	5 min
<b>- Recuperación Antigénica</b>	
	Calentamiento en horno de microondas, utilizando una solución de Buffer Citrato 0.01 M, pH: 6
PBS	5 min
<b>-Bloqueo de actividad de peroxidasa endógena</b>	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (3 volúmenes) en metanol	15 min

PBS	15 min
<b>- Bloqueo de uniones no específicas</b>	
Suero normal de cabra 5% adicionado con leche 1.5 % en PBS	30 min (en cámara húmeda)
<b>- Incubación con Anticuerpo Primario</b>	
(ver Tabla 8 para el detalle de los anticuerpos utilizados)	14 - 16 hs a 4°C (en cámara húmeda)
PBS	15 min
<b>- Sistema de Revelado</b>	
Anticuerpo secundario biotilado (ver Tabla 8)	30 min (en cámara húmeda)
PBS	5 min
Avidina-peroxidasa (ver Tabla 8)	30 min (en cámara húmeda)
PBS	5 min
Sustrato enzimático (0,001% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) + cromógeno (2,3 mg Diaminobencidina, DAB-Sigma Aldrich de Argentina S.A., Buenos Aires) Disueltos en Tris-HCl 0,05 M (pH 7,5)	10 min
Agua destilada	5 min
<b>- Contracoloración</b>	
Hematoxilina de Mayer o de Harris	1 min ó 10 seg
Agua destilada	1 min
Agua amoniacal	10 seg
<b>- Deshidratación</b>	
Alcohol 70°	1 min
Alcohol 96°	1 min
Alcohol 100°	2 pasajes de 1 min c/u
<b>- Montaje</b>	
Utilizando un líquido de montaje hidrofóbico, PMyR (Instrumental Pasteur S.R.L., Buenos Aires, Argentina).	

En la Tabla 8 se consigna un detalle pormenorizado de los anticuerpos utilizados con su respectiva dilución.

En todos los casos se realizaron controles negativos de especificidad sustituyendo el anticuerpo primario con un suero no inmune. Los controles positivos consistieron en tejidos cuya reacción positiva fue comprobada con anterioridad.

**Tabla 8.** Anticuerpos y sistema de revelado usados para inmunohistoquímica

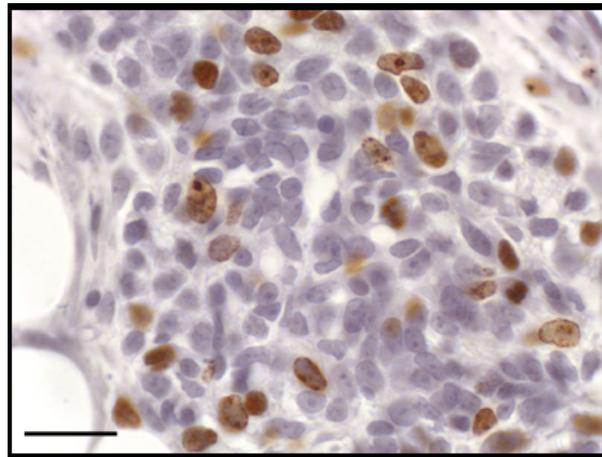
<b>Anticuerpo primario</b>	<b>Especie de origen</b>	<b>Clon</b>	<b>Compañía comercial</b>	<b>Dilución utilizada</b>	<b>Suero de bloqueo*</b>	<b>Anticuerpo secundario (Dilución)</b>	<b>Avidina-Peroxidasa*</b>
<b>Anti-BrdU</b>	Ratón	85-2C8	Novocastra Laboratories Ltd. (Newcastle upon Tyne, UK)	1:100	De cabra	Anti-ratón*	1:100
<b>Anti-RMCP I</b>	Conejo	-----	Moredun Scientific Ltd. (Midlothian, Edinburg, Escocia)	1:200	De cabra	Anti-conejo** (1:200)	1:150
<b>Anti-CK8</b>	Oveja	-----	The Binding Site (Birmingham, UK)	1:400	De burro	Anti-oveja* (1:200)	1:150
<b>Anti-p63</b>	Ratón	4-A4	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)	1:100	De cabra	Anti-ratón* (1:80)	1:100
<b>Anti-RE<math>\alpha</math></b>	Ratón	6F11	Novocastra Laboratories Ltd.	1:200	De cabra	Anti-ratón* (1:80)	1:150
<b>Anti-RP</b>	Conejo	-----	Dako (Glostrup, Dinamarca)	1:500	De cabra	Anti-conejo** (1:200)	1:150
<b>Anti-SMRT (SMRT 180)</b>	Conejo	-----	LETH, FBCB, UNL	1:100	De cabra	Anti-conejo** (1:200)	1:150
<b>Anti-SRC-3 (SRC-3 240)</b>	Conejo	-----	LETH, FBCB, UNL	1:150	De cabra	Anti-conejo** (1:200)	1:150
<b>Anti-FvW</b>	Conejo	-----	Dako (Glostrup, Dinamarca).	1:100	De cabra	Anti-conejo** (1:200)	1:150
<b>Anti-VEGF</b>	Ratón	C-1	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)	1:40	De cabra	Anti-ratón (1:50)	1:80

\* Obtenidos en Sigma-Aldrich de Argentina S.A.

\*\*Obtenidos en Zymed Laboratories Inc., San Francisco, U.S.A.

#### 4.3.1. Proliferación celular

La detección de células en fase S del ciclo celular, se realizó mediante la determinación inmunohistoquímica de la incorporación de BrdU, inyectada en los animales según se describió en el inciso 3.1.3. La técnica de inmunohistoquímica aplicada fue la que se describió previamente (ver 4.3), aunque con una pequeña modificación. Luego del tratamiento de recuperación antigénica se realizó una hidrólisis ácida (con ácido clorhídrico 2 N) con el objeto de desnaturalizar las hebras de ADN del tejido contribuyendo a exponer la BrdU incorporada (Kass y col., 2000) (Fig. 21).



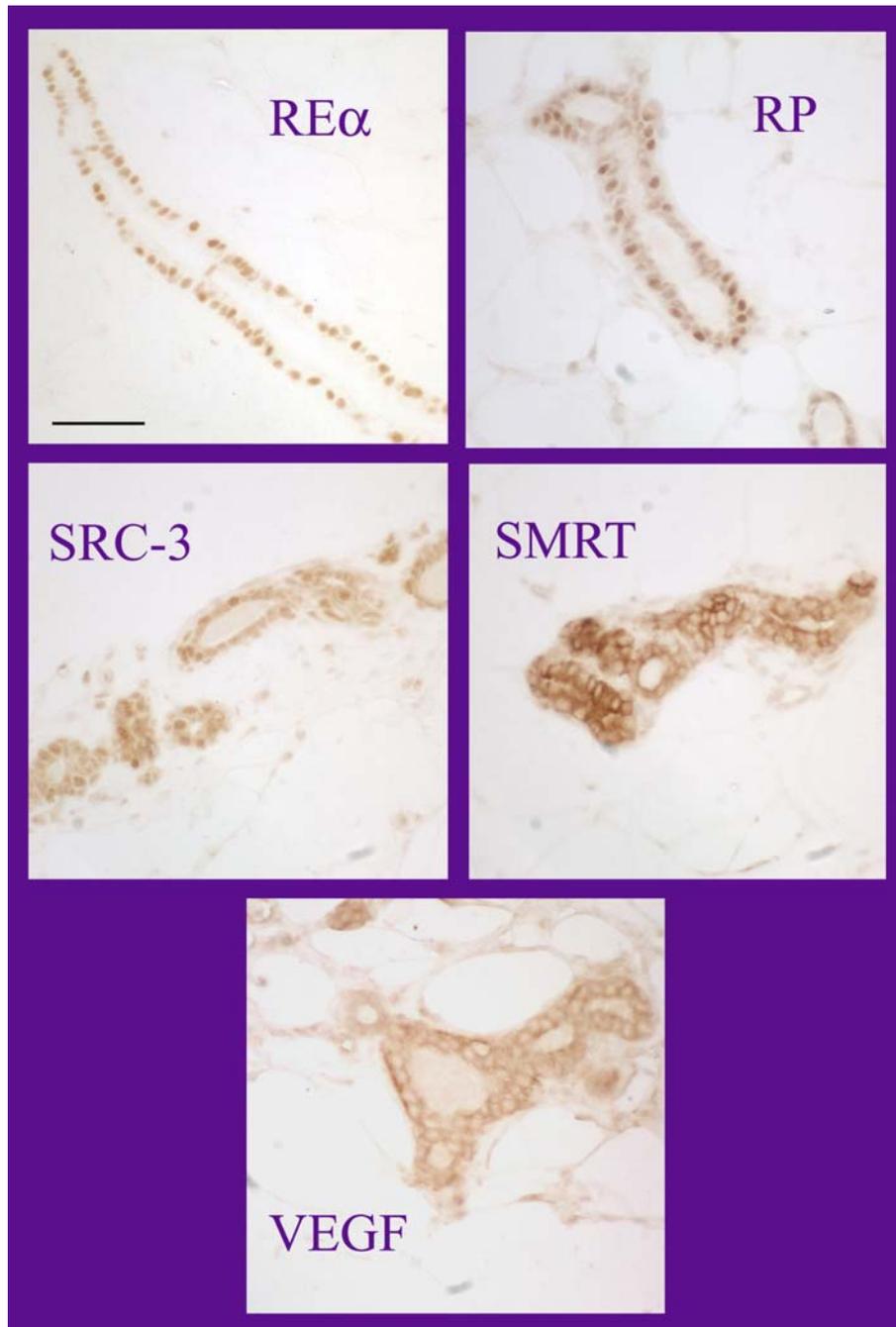
**Figura 21. Inmunohistoquímica para BrdU en epitelio mamario.** Los núcleos teñidos de marrón (cromógeno: DAB) incorporaron BrdU durante la fase S del ciclo celular, por lo tanto, se consideran en proliferación. Aquellos núcleos teñidos de azul (contracoloración con hematoxilina de Harris) representan células que no incorporaron BrdU y se consideran negativas para este marcador. La barra representa 20  $\mu\text{m}$ .

#### 4.3.2. Detección de receptores para esteroides, co-reguladores y VEGF

El renacimiento de células que expresan RE $\alpha$ , RP, SMRT, SRC-3 y VEGF se realizó mediante la técnica de inmunohistoquímica estándar que se describió en la Tabla 7, utilizando las diluciones de anticuerpos primarios y secundarios y de avidina-peroxidasa según se indicó en la Tabla 8.

Debido al método empleado para cuantificar la expresión de estas proteínas (ver 4.6.3.3), no se utilizó la contracoloración con hematoxilina de Mayer.

En la Figura 22 se muestran imágenes representativas de cada una de las proteínas evaluadas.



**Figura 22. Detección por inmunohistoquímica de RE $\alpha$ , RP, SRC-3, SMRT y VEGF.** Imágenes representativas de conductos mamarios que expresan las mencionadas proteínas. Como puede observarse RE $\alpha$ , RP y SRC-3 exhiben marcación nuclear, mientras que SMRT y VEGF, tienen localización citoplasmática (cromógeno: DAB; sin contracoloración). La barra representa 40  $\mu$ m.

#### **4.3.3. Reconocimiento de vasos sanguíneos**

El reconocimiento de los vasos se realizó mediante la inmunomarcación de un antígeno específico de las células endoteliales: el FvW, en las condiciones descritas en las Tablas 7 y 8. Sin embargo, en este caso, el cromógeno estuvo compuesto por DAB adicionada de cloruro de níquel, lo cual otorgó una coloración azul intensa a las células endoteliales (Fig. 23). Para facilitar la visualización de las estructuras y el estroma

mamarios, una contracoloración con *nuclear fast red* siguió al revelado de la inmunohistoquímica.



**Figura 23. Inmunohistoquímica para detección de vasos sanguíneos.** Imagen representativa de vasos sanguíneos (vs) localizados en el estroma adyacente a un conducto mamario. Las flechas señalan la marcación positiva de las células endoteliales expresando FvW (coloración azul intensa, cromógeno: DAB-cloruro de níquel; contracoloración con *nuclear fast red*); los asteriscos están ubicados sobre glóbulos rojos presentes en el interior de los vasos. La barra representa 25  $\mu$ m.

#### 4.3.4. Detección de mastocitos

Para identificar mastocitos, la proteinasa I de los mismos fue reconocida con el anticuerpo anti-RMCP I luego de aplicar un tratamiento con ácido peryódico (0,1 M) y borohidrato de sodio (0,02%) (Bosquiazzo y col., 2005) (Fig. 24).



**Figura 24. Inmunohistoquímica para la detección de mastocitos.** Los mastocitos se identifican por la marcación citoplasmática para proteinasa I. La flecha señala un mastocito en el estroma que rodea a un conducto mamario; la barra representa 35  $\mu$ m. Contracoloración con hematoxilina de Mayer.

#### 4.4. Inmunofluorescencia doble

La detección y co-localización de RE $\alpha$  y SMRT o RE $\alpha$  y SRC-3 mediante inmunofluorescencia, se realizó según se describió previamente (Varayoud y col., 2008).

Para minimizar la autofluorescencia del tejido sobre cortes de 5  $\mu\text{m}$  realizamos un tratamiento con borohidruro de sodio (10 mg/ml) (Sigma-Aldrich de Argentina S.A.) durante 40 min a TA. Luego los cortes se expusieron a recuperación antigénica en horno de microondas, utilizando buffer citrato 0,01 M; pH 6,00. El bloqueo de las uniones inespecíficas, se realizó incubando las muestras con suero normal de cabra durante 1 hora a TA. Los anticuerpos primarios se utilizaron en las diluciones indicadas en la Tabla 9 y la incubación se realizó durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Los anticuerpos secundarios Alexa Fluor®488 (verde) o Alexa Fluor®546 (rojo) (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) se utilizaron en las diluciones indicadas en la Tabla 9 y se incubaron durante 1 hora a TA. Luego se realizaron lavados con PBS, durante 45 min totales, con tres cambios de PBS. Para la visualización de los núcleos, los cortes se contracoloraron con 4',6-diamino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI; Fluka, Sigma) y se montaron con medio de montaje para fluorescencia Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA). Los vidrios se mantuvieron en oscuridad a 4°C. Los controles negativos se realizaron incubando cortes de glándula mamaria con el buffer utilizado para la dilución de los anticuerpos primarios (BSA 3% + Tween 20 0,1% en PBS), omitiendo el anticuerpo primario. Todos los cortes inmunoteñidos se observaron con un microscopio Olympus BX-51 equipado para detección epifluorescente con los filtros adecuados (Olympus). Las imágenes se obtuvieron utilizando una cámara digital de alta resolución USB 2.0 (QImaging® Go-3, QImaging, Surrey, BC, Canadá).

**Tabla 9.** Anticuerpos usados para inmunofluorescencia

<b>Anticuerpo primario</b>	<b>Especie de origen</b>	<b>Clon</b>	<b>Compañía comercial</b>	<b>Dilución utilizada</b>	<b>Anticuerpo secundario (Dilución)</b>
<b>Anti-RE<math>\alpha</math></b>	Ratón	6F11	Novocastra Laboratories Ltd.	1:200	Anti-ratón-ALEXA Fluor 546*
<b>Anti-SMRT (SMRT 180)</b>	Conejo	-----	LETH, FBCB, UNL	1:100	Anti-conejo-ALEXA Fluor 488* (1:200)
<b>Anti-SRC-3 (SRC-3 240)</b>	Conejo	-----	LETH, FBCB, UNL	1:50	Anti-conejo-ALEXA Fluor 488* (1:200)

\*: Invitrogen, Eugene, Oregon, USA.

#### 4.5. Apoptosis *in situ* por el método de TUNEL

Los fragmentos de ADN que se generan durante el proceso de apoptosis pueden identificarse por inmunohistoquímica y localizarse *in situ* (Gavrieli y col., 1992). La particularidad de estos fragmentos es el predominio de terminales 3'OH libres en cadenas simples o dobles de ADN, que pueden ser detectados mediante la incorporación de nucleótidos marcados con digoxigenina por acción de la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (TdT). El heteropolímero formado se pone de manifiesto mediante la aplicación de un anticuerpo anti-digoxigenina, conjugado con la enzima peroxidasa, responsable de generar una señal a partir del sustrato cromogénico DAB (Sigma-Aldrich de Argentina S.A.).

La metodología descrita se define como técnica de TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling*) (Fig. 25), para la cual existen *kits* comerciales que permiten la detección de las células en apoptosis sobre cortes histológicos.

Se siguió un protocolo de rutina en nuestro laboratorio (Tabla 10) (Muñoz-de-Toro y col., 2005), utilizando el ApopTag®Kit (Intergen Co., Purchase, New York, USA).

**Tabla 10:** Protocolo estándar para la detección de apoptosis (técnica de TUNEL)

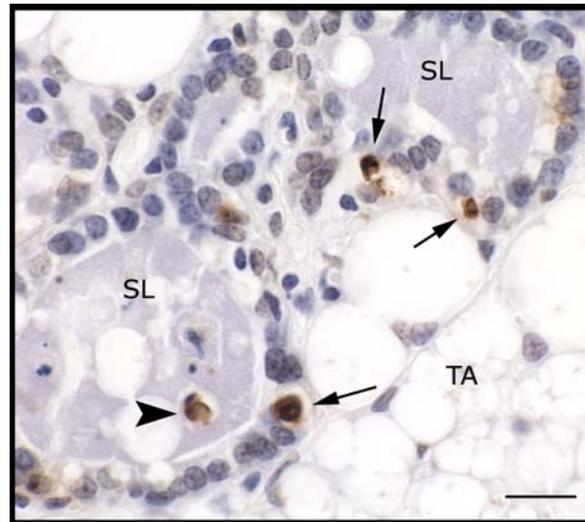
<b>- Desparafinización e hidratación:</b>	
Xilol	2 pasajes de 5 min c/u
Alcohol 100°	2 pasajes de 5 min c/u
Alcohol 96°	3 min
Alcohol 70°	3 min
PBS	5 min
<b>- Digestión proteica</b>	
	Proteínasa K (5 µg/ml) durante 10 min a 37°C en cámara húmeda
Agua destilada	4 lavados de 2 min c/u
<b>-Bloqueo de actividad de peroxidasa endógena</b>	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (3 volúmenes) en metanol	5 min
PBS	5 min
Buffer de equilibración	10-15 seg
<b>- Incorporación del antígeno</b>	
TdT + Digoxigenina-desoxinucleótidos	60 min a 37°C (en cámara húmeda, cubriendo el corte con parafilm)
Buffer STOP/WASH	10 min a TA
PBS	3 lavados de 5 min c/u

<b>- Sistema de Revelado</b>	
Antidigoxigenina-Peroxidasa	30 min (en cámara húmeda, cubriendo el corte con parafilm)
PBS	4 lavados de 5 min c/u
Sustrato enzimático (0,001% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) + cromógeno (2,3 mg Diaminobencidina, DAB) disueltos en Tris-HCl 0,05 M (pH 7,5)	4 min
Agua destilada	10 min
<b>- Contracoloración</b>	
Hematoxilina de Mayer	2 min
Agua destilada	1 min
Agua amoniacal	10 seg
<b>- Deshidratación</b>	
Alcohol 70°	1 min
Alcohol 96°	1 min
Alcohol 100°	2 pasajes de 1 min c/u
<b>- Montaje</b>	
Utilizando un líquido de montaje hidrofóbico, PMyR (Instrumental Pasteur S.R.L., Buenos Aires, Argentina).	



**Figura 25: Fundamento del método TUNEL para detección de células en apoptosis.**  
Modificado de [www.chemicon.com](http://www.chemicon.com).

Como control positivo se utilizaron cortes histológicos de glándulas mamarias de ratones hembras luego de 4 días del destete (considerado el momento con el mayor índice de apoptosis inducido por el destete- Wilde y col., 1999-) (Fig. 26). Los controles negativos se realizaron sobre cortes histológicos sometidos a las mismas condiciones de reacción pero reemplazando la enzima TdT por agua destilada.



**Figura 26. Fotomicrografía de glándula mamaria de un ratón hembra con elevado índice de apoptosis.** Las muestras usadas como control positivo de la técnica de TUNEL fueron obtenidas a los 4 días post-destete. Las flechas señalan células en apoptosis (reconocidas por la marcación con DAB y la presencia de cuerpos apoptóticos de color azul). La punta de flecha señala una célula en apoptosis en el interior del alvéolo. SL: secreción láctea; TA: tejido adiposo. La barra representa 20  $\mu$ m.

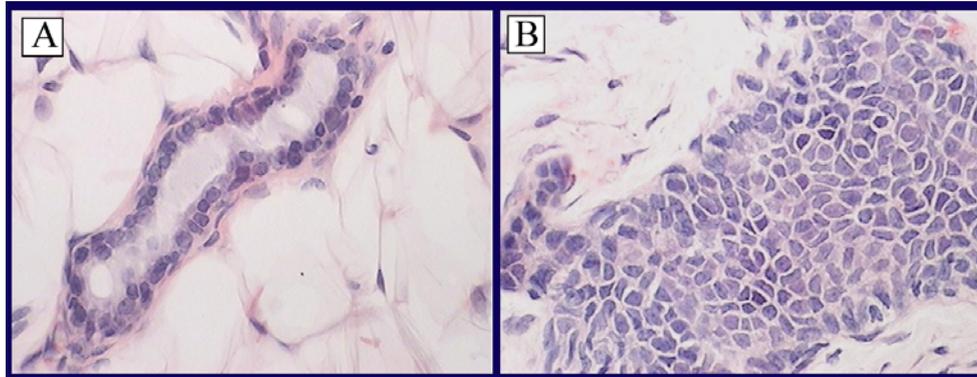
#### **4.6. Morfometría y análisis de imágenes**

##### **4.6.1. Porcentaje de conductos hiperplásicos**

El porcentaje de conductos hiperplásicos (o hiperplasias ductales) fue cuantificado en cortes teñidos con H-E, utilizando un microscopio Olympus BH2 (Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japón) y una lente objetiva de 40X. El criterio utilizado para diagnosticar un conducto hiperplásico fue el descrito por Singh y colaboradores (2000). Es decir, si un conducto presenta cuatro o más capas de células epiteliales, es considerado hiperplásico (Fig. 27). Se analizaron tres cortes histológicos por glándula mamaria, separados al menos 30  $\mu$ m uno de otro y 50 conductos por corte fueron analizados para obtener el número de conductos hiperplásicos, respecto del número total de conductos analizados. Los resultados fueron expresados como porcentaje de conductos hiperplásicos, calculado como:  $(N^{\circ} \text{ conductos hiperplásicos} / N^{\circ} \text{ de conductos totales}) \times 100$ .

Adicionalmente, los conductos hiperplásicos se clasificaron en tres categorías de acuerdo al número de capas de células epiteliales: 4 capas, hiperplasia leve; 5 capas,

hiperplasia moderada; más de 5 capas hiperplasia florida. La frecuencia de cada categoría se cuantificó como un porcentaje respecto del número total de conductos hiperplásicos.



**Figura 27. Conductos normales e hiperplásicos.** Los conductos de la glándula mamaria están formados (como se muestra en A) por un epitelio compuesto por una o dos capas de células cúbicas; mientras que los conductos hiperplásicos muestran cuatro o más capas de células epiteliales y como se aprecia en B, muchas veces la luz del conducto queda ocluida. Hematoxilina-Eosina; magnificación 600X.

#### 4.6.2. Densidad de núcleos del estroma

Para obtener la densidad de núcleos presentes en el estroma mamario, imágenes del estroma adiposo (*fat pad*) fueron capturadas utilizando una cámara de video color Sony ExwaveHAD (Sony Electronics Inc., Sony Drive, Park Ridge, NJ) acoplada a un microscopio Olympus BH2 (Olympus Optical Co., Ltd.), el cual fue preparado para iluminación Köhler. La resolución de las imágenes fue establecida a 640 x 480 *pixeles* y la resolución final de la pantalla fue 0,103  $\mu\text{m}/\text{pixel}$ . Se analizaron dos cortes de glándula mamaria por cada animal y se obtuvieron 40 imágenes en cada corte, cubriendo un área total de evaluación de 0,1  $\text{mm}^2$  (denominada área total:  $A_T$ ). Para poder establecer el área de estroma adiposo cubierta por núcleos (denominada área de núcleos del estroma:  $A_N$ ), se creó una operación de secuencia automatizada (Image Pro-Plus 4.1.0.1 system; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA). Las células infiltrantes y los vasos sanguíneos y/o linfáticos fueron excluidos del análisis. La relación entre  $A_N$  y  $A_T$  fue denominada la densidad de núcleos del estroma mamario.

#### 4.6.3. Evaluación de los cortes inmunoteñidos

##### 4.6.3.1. Proliferación y apoptosis

Para conocer el *turnover* celular, se realizó un estudio del balance entre la proliferación celular y la muerte celular programada o apoptosis, como indicativo del recambio celular (Shilkaitis y col., 2000) ocurrido en la glándula mamaria a lo largo del desarrollo y como consecuencia de la exposición a BPA.

Proliferación y apoptosis se cuantificaron en forma independiente. El porcentaje de células BrdU positivas y de células en apoptosis fue determinado discriminando los compartimientos mamarios (epitelial y estromal), totalizando como mínimo 2000 células epiteliales y 1000 células estromales en cada corte. Al cálculo de células BrdU (+)/células totales se lo denominó **Índice de Proliferación (IP)**; y análogamente, al de células en apoptosis/células totales: **Índice de Apoptosis (IA)**. La relación entre ambos parámetros (como medida del *turnover*) fue calculada como:  $R=IP/IA$ .

#### 4.6.3.2. Mastocitos

Los mastocitos fueron identificados por la presencia de gránulos de color marrón en el citoplasma, rodeando al núcleo teñido de azul por la contracoloración con hematoxilina. Utilizando una objetiva de 20X, y siguiendo un procedimiento de cuantificación por puntos, previamente utilizado en nuestro laboratorio (Bosquiazzo y col., 2005) se obtuvo información respecto del número de mastocitos presentes en la glándula mamaria. Para conocer la densidad de volumen (Vv) de mastocitos, se empleó una grilla cuadrada (11 x 11 puntos) inserta en el ocular del microscopio. La Vv es definida como  $P_i/P$ , donde  $P_i$  es el número de puntos de la grilla que inciden sobre la célula estudiada (mastocito) y P es el número total de puntos que inciden sobre la unidad de volumen, es decir, el corte de glándula mamaria (Weibel, 1969).

#### 4.6.3.3. Receptores hormonales, co-reguladores y VEGF

La cuantificación de los niveles de expresión de RE $\alpha$ , RP, SMRT, SRC-3 y VEGF se realizó mediante una combinación de área de marcación positiva e intensidad de dicha marcación (Varayoud y col., 2008), denominada **densidad óptica integrada (DOI)**.

Para la determinación de la **DOI**, se obtuvieron imágenes de estructuras mamarias con una cámara de video color O-Spot Insight V3.5 (Diagnostic Instruments, Sterling Hights, USA) acoplada a un microscopio Olympus BH2 (Olympus Optical Co.) con una objetiva plana de 20X (apertura numérica: 0,40; 160/0,17). El microscopio fue apropiadamente acondicionado para la iluminación Koehler. Correcciones de iluminación desigual (corrección de sombras) y la calibración espacial del sistema fue realizada con imágenes de las celdillas de una cámara de Neubauer utilizando el software Image Pro-Plus 4.1.0.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

Las imágenes de los cortes histológicos inmunoteñidos fueron convertidos a escala de grises y evaluadas utilizando el *software* Image Pro Plus 4.1.0.1 (Media Cybernetics),

mediante el cual se obtuvieron tanto el área de marcación epitelial positiva, el área epitelial total evaluada y la media de la densidad óptica. Con estas determinaciones se calculó la DOI como una combinación lineal entre la media de intensidades de grises y el área relativa ocupada por células positivas. El resultado se expresó como unidades arbitrarias (UA) y en total se analizaron 2 cortes por cada animal.

#### 4.6.3.4. Área y densidad vascular

El área del estroma mamario ocupada por vasos sanguíneos y el número de los mismos nos permitió determinar la existencia de un proceso de angiogénesis. El reconocimiento de los vasos sanguíneos se realizó según se describió previamente (ver sección 4.3.3) mediante la detección del FvW. Se cuantificó el área vascular relativa y el número de vasos en imágenes obtenidas utilizando una cámara de video color O-Spot Insight V3.5 (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, USA) acoplada a un microscopio Olympus BH2 (Olympus Optical Co.) con una objetiva plana de 40X. El microscopio fue apropiadamente acondicionado para la iluminación Koehler. La calibración espacial del sistema fue realizada con imágenes de las celdillas de una cámara de Neubauer utilizando el software Image Pro-Plus 4.1.0.1 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA).

Las imágenes de los cortes histológicos inmunoteñidos fueron evaluadas utilizando el *software* Image Pro Plus 4.1.0.1 (Media Cybernetics). La evaluación del área vascular, se realizó según fue descrito previamente (Naccarato y col., 2003) con modificaciones menores. Brevemente, se delimitó alrededor de cada estructura mamaria, una zona de estroma equidistante (aproximadamente 50  $\mu\text{m}$ ) de la membrana basal, a ésta se la denominó área total. Se registró cada vaso presente dentro del área total delimitada y se calculó su sección transversal (área individual). La suma de todas las áreas individuales se consideró como el **área vascular absoluta**. El **área vascular relativa** se determinó dividiendo el área vascular absoluta por el área total (Varayoud y col. 2001, Ramos y col. 2002). La densidad vascular se calculó como:  $N^{\circ}$  vasos/área total y se expresó como: vasos/0,1  $\text{mm}^2$  (Pavlakakis y col., 2008).

#### 4.7. Evaluación de las *whole-mounts*.

##### 4.7.1. Detección, procesamiento y clasificación histopatológica de tumores mamarios en *whole-mounts*

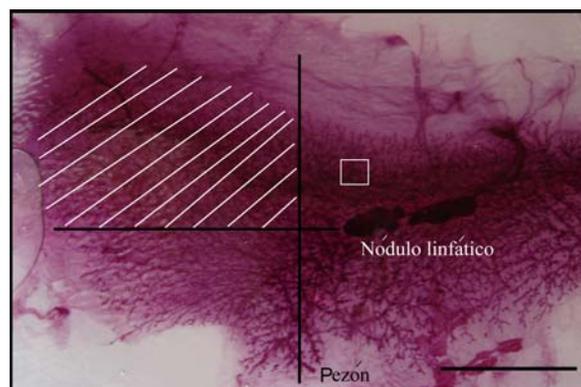
Para detectar lesiones microscópicas, las *W-M* se observaron bajo un estereomicroscopio Leica (Leica Inc., Buffalo, NY, USA) y las condensaciones oscuras

(micro y macroscópicas, sospechosas de ser lesiones tumorales) se recortaron y procesaron hasta su inclusión en parafina, según la metodología descrita (Junqueira y Junqueira, 1983).

Cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espesor montados sobre portaobjetos con adherente tisular (3-aminopropyl triethoxysilane; Sigma-Aldrich de Argentina S.A) se tiñieron con H-E para clasificar histopatológicamente los tumores detectados (Singh y col., 2000) o se utilizaron para inmunohistoquímica (sección 4.3.). Para conocer el comportamiento de la lesión/tumor, es decir, si es invasivo o localizado *in situ*, se recurrió a la detección de las proteínas p63 y CK8; para poder reconocer los límites de la lesión definidos por las células mioepiteliales (con expresión positiva para p63) y el epitelio luminal (cuyas células expresan CK8). La hormonodependencia de estas lesiones/tumores fue evaluada mediante la expresión de los receptores hormonales RE $\alpha$  y RP. La presencia de mastocitos y la expresión del VEGF fueron cualitativamente analizadas.

#### 4.7.2. Cuantificación de conductos hiperplásicos

Luego de realizar la inspección de las *whole-mounts* y extraer las lesiones sospechosas, del resto de la glándula mamaria se cortó un cuadrante representativo de la región denominada línea de avance, contrapuesto a la ubicación del pezón (Fig. 28). Esta porción de tejido fue procesada hasta su inclusión en parafina (Junqueira y Junqueira, 1983) y en cortes de 5  $\mu\text{m}$  teñidos con H-E se cuantificó el porcentaje de conductos hiperplásicos, según se describió previamente (sección 4.6.1).



**Figura 28. Modelo de *whole-mount* evaluada.** En la cual se muestran: el pezón, la cadena de nódulos linfáticos, una condensación oscura sospechosa (marco blanco) y el cuadrante utilizado para la cuantificación de conductos hiperplásicos (zona rayada). La barra representa 1 cm.

## **5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados se analizaron utilizando análisis de variancia no paramétrico intergrupos de Kruskal-Wallis, seguido del post-test de Dunn para comparar cada grupo experimental con el grupo control. Para la comparación entre 2 grupos se utilizó el test no paramétrico Mann-Whitney (Siegel, 1972). En todos los casos un  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo.