

IV- Resultados

ETAPA I**1. Efectos de la exposición a BPA sobre variables relacionadas con la preñez y el parto**

El tratamiento administrado a las madres (mediante mini-bombas osmóticas) no perturbó el normal desarrollo de la gestación, no se detectaron abortos y no se modificó la ganancia de peso durante la preñez. Después del parto, tanto las madres como las crías se mostraron saludables y en los parámetros evaluados no se diferenciaron de los controles (Tabla 11).

Tabla 11. Variables relacionadas con la preñez y el parto.

	Tratamiento ^a			
	DMSO	25 BPA	250 BPA	25 mBPA
Nº de animales preñados	13	17	12	5
Nº de camadas nacidas	13	17	12	5
% de gestaciones exitosas ^b	100	100	100	100
Ganancia de peso durante la gestación (g) ^c	112 ± 4	116 ± 15	100 ± 8	106 ± 8
Duración de la gestación (d) ^d	23	23	23	23
Nº de crías nacidas/camada	11 ± 3	9 ± 3	10 ± 3	10 ± 2

^a: administrado a la madre mediante mini-bombas osmóticas desde el DG 8 (según se describió en M&M).

^b: porcentaje de hembras que completaron la gestación.

^c: en gramos (g).

^d: en días (d).

2. Efectos de la exposición a BPA sobre crecimiento y desarrollo de las crías.

El sexado de las crías F1 en el DPN 1, permitió realizar el seguimiento de las hembras, registrando variables como: DAG; peso durante la lactancia, inicio de la pubertad. Mientras que, la exposición *in utero* a BPA no modificó la DAG ni el peso de las crías lactantes (Tabla 12), sí indujo un adelantamiento en la apertura vaginal signo que

evidencia un inicio de la pubertad a edad más temprana ($p < 0,05$ y $p < 0,01$; para 25 BPA y 250 BPA, respectivamente) (Fig. 29).

Tabla 12. Distancia ano-genital y peso evaluados en crías hembras.

Grupo experimental		DMSO	25 BPA	250 BPA	25 mBPA
		Parámetro			
DAG (en mm)	DPN 1	2,1 ± 0,29	1,6 ± 0,13	1,9 ± 0,08	1,6 ± 0,18
	DPN 5	3,1 ± 0,21	2,9 ± 0,09	3,4 ± 0,27	2,8 ± 0,22
Peso (en g)	DPN 1	6,1 ± 0,36	5,7 ± 0,2	6,2 ± 0,56	6,1 ± 0,1
	DPN 5	10,0 ± 0,55	9,5 ± 0,49	11,5 ± 1,1	9,0 ± 0,63
	DPN 10	16,7 ± 0,99	14,8 ± 1,5	17,4 ± 1,7	17,0 ± 0,8
	DPN 15	23,7 ± 1,7	22,4 ± 1,1	26,1 ± 2,1	24,4 ± 0,6
	DPN 21	34,8 ± 2,2	35,6 ± 2,8	43,9 ± 5,9	36,9 ± 1,4
	DPN 30	46,3 ± 2,1	44,9 ± 3,2	46,1 ± 2,7	45,5 ± 2,2
	DPN 50	147,2 ± 2,06	133,4 ± 13,33	144,3 ± 6,84	141,0 ± 5,15
	DPN 110	209,3 ± 5,12	212,5 ± 6,61	207,3 ± 7,98	209,5 ± 6,99

Los resultados están expresados como la media ± SEM

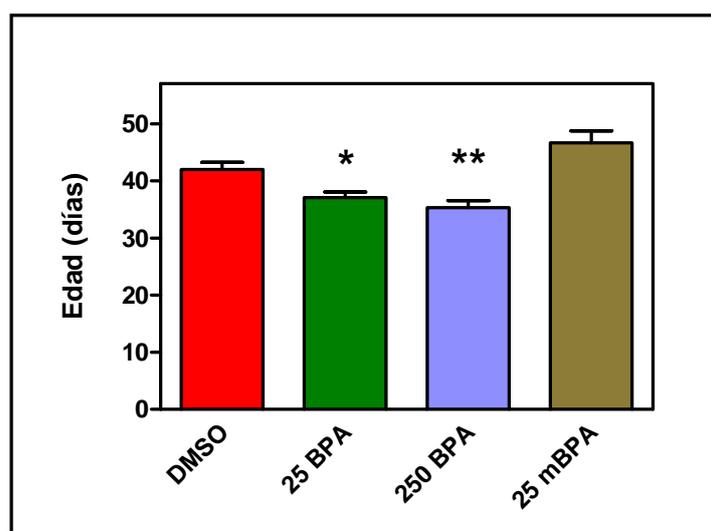


Figura 29. Inicio de la pubertad. El tratamiento *in utero* con 25 BPA y 250 BPA adelantó significativamente la edad a la cual ocurre la apertura vaginal. Las barras representan la media ± SEM. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$).

3. Desarrollo de la glándula mamaria

3.1. Proliferación y apoptosis

En las crías de DPN 30 no hubo diferencias significativas en el IP ni en el IA cuantificados en parénquima (Fig. 30 A, D y G) y estroma (Fig. 30 J, M y P) mamarios, entre los animales expuestos *in utero* a BPA y el grupo control.

En animales de DPN 50 (post-puberales), la exposición a 25 BPA y 250 BPA provocó un aumento significativo en el cociente proliferación/apoptosis (IP/IA) comparado con el grupo control (Fig. 30 B y K), tanto en parénquima como en estroma. Este cambio en el *turnover* celular no se observó en el grupo expuesto a la dosis más alta de BPA (25mBPA). La relación IP/IA no se vio modificada en hembras de DPN 110 (Fig. 30 C y L). Tampoco hubo cambios en el IP (Fig. 30 F y O) ni en el IA (Fig. 30 I y R) evaluados individualmente en ambos compartimientos.

3.2. Conductos hiperplásicos

El porcentaje de conductos hiperplásicos (o hiperplasias ductales) aumentó en los grupos expuestos a 25 BPA y 250 BPA, tanto en DPN 110 como en DPN 180 (Fig. 31 A; Tabla 13). En la glándula mamaria de las hembras tratadas con la mayor dosis del xenoestrógeno (25 mBPA), el porcentaje de conductos hiperplásicos no fue diferente del obtenido para el grupo control. Estructuras similares a conductos hiperplásicos se observaron en los animales del grupo control, en todas las edades evaluadas. Como este tipo de estructuras representaron siempre menos del 10 % de los conductos podrían considerarse artefactos del corte debido a la tortuosidad de los ductos.

El fenotipo epitelial de las células que rellenan los conductos hiperplásicos fue confirmado mediante la inmunotinción para CK8 (expresada por las células epiteliales lumbinales) y para p63 (que reconoce células mioepiteliales) (Fig. 31 G y H).

El análisis de la distribución de conductos hiperplásicos según se trate de una hiperplasia leve, moderada o florida (Tabla 13, Fig. 32) muestra que en DPN 110, el aumento de conductos hiperplásicos ocurre principalmente a expensas de un mayor porcentaje de conductos con hiperplasia moderada (5 capas de células epiteliales) independientemente de la dosis de BPA utilizada. Mientras que en DPN 180, la respuesta de la glándula mamaria difiere según la dosis de BPA. En 250 BPA el aumento en el porcentaje total de conductos hiperplásicos respondería a una mayor proporción de conductos con leve hiperplasia (4 capas). En cambio, en los animales del grupo 25 BPA el

engrosamiento del epitelio fue más pronunciado, con un elevado porcentaje de conductos que exhiben hiperplasia florida (más de 5 capas de células epiteliales).

Los resultados obtenidos hasta aquí, son compatibles con el comportamiento de tipo no-monotónico para la curva dosis-respuesta descrita para la mayoría de los PEs, según el cual los cambios provocados por la exposición a algún PE son más notorios a dosis bajas. Sin embargo, existe aún controversia sobre cuáles son las dosis que pueden considerarse “bajas”. Algunos comités establecen un cut-off de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ (la dosis segura de la EPA -<http://ntp-server.niehs.nih.gov/htdocs/liason/LowDoseWebPage.html>), mientras que otros lo establecen en 50 $\text{mg}/\text{kg}/\text{d}$ (la LOAEL de la EPA - Richter y col., 2007). Nuestra hipótesis propone estudiar el efecto de dosis bajas de BPA, en el rango comprendido entre la NOAEL (5 $\text{mg}/\text{kg}/\text{d}$) y la dosis diaria tolerable (50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ - Scientific Committee for Food, European Commission, 2002), razón por la cual, decidimos continuar y profundizar el estudio de las dos dosis más bajas de BPA: 25 y 250 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$.

3.3. Densidad de núcleos del estroma

En los animales de DPN 110 expuestos a BPA, se observaron cambios en el estroma mamario característicos de una reacción desmoplásica. Se observó una capa de estroma denso rodeando a las estructuras epiteliales mamarias mientras que el estroma adiposo, presente entre las estructuras epiteliales fue reemplazado por un estroma fibroblástico con abundantes células infiltrantes (Fig. 31 E-F). Acompañando a estos cambios, en DPN 110, se observó un aumento significativo en la densidad de núcleos del estroma mamario en ambas dosis de BPA. Aumento que se mantuvo hasta DPN 180 sólo en las hembras que recibieron la menor dosis de xenoestrógeno (25 BPA) (Fig. 31 D).

3.4. Infiltración de mastocitos

La densidad de volumen (Vv) de mastocitos en el estroma mamario mostró un incremento significativo en las hembras de DPN 110 y DPN 180, que *in utero* recibieron el xenoestrógeno BPA (Fig. 33 A). Una característica sobresaliente en la mayoría de las muestras evaluadas, fue la presencia de abundantes mastocitos rodeando a los conductos hiperplásicos. En la Figura 33 se muestran imágenes representativas que permiten comparar la densidad de mastocitos alrededor de un conducto normal del grupo control (Fig. 33 B) con la de un conducto hiperplásico (Fig. 33 C) perteneciente a uno de los grupos de BPA.

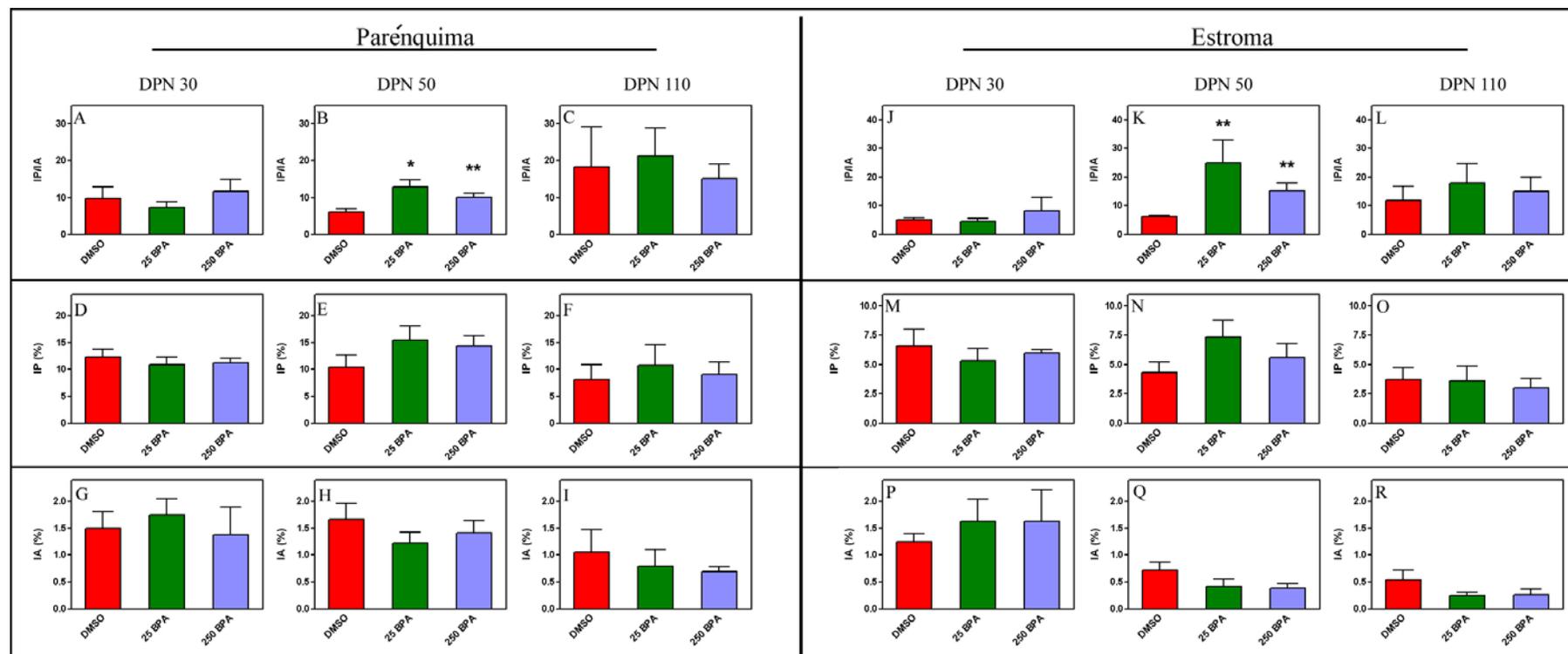


Figura 30. Proliferación, apoptosis y *turnover* celular. Los índices de proliferación (IP), de apoptosis (IA) y el *turnover* (IP/IA) celular fueron cuantificados en animales de DPN 30 (A, D, G, J, M, P); DPN 50 (B, E, H, K, N, Q) y DPN 110 (C, F, I, L, O, R) en el parénquima (A-I) y estroma (J-R) de la glándula mamaria, según se describió en M&M. Las barras representan la media \pm SEM. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$).

Tabla 13. Efecto de la exposición *in utero* a BPA sobre la incidencia de conductos hiperplásicos. Distribución de conductos hiperplásicos según el número de capas de células epiteliales.

Grupo		Conductos hiperplásicos (%)	Conductos hiperplásicos (%) clasificados según el número de capas de células epiteliales		
Tratamiento <i>in utero</i>	Edad		Hiperplasia leve (4 capas)	Hiperplasia moderada (5 capas)	Hiperplasia florida (> 5 capas)
DMSO	DPN 110	8,1 ± 1,47	NC	NC	NC
25 BPA	DPN 110	17,8 ± 3,8*	8,8 ± 1,86	5,1 ± 1,90	3,9 ± 1,53
250 BPA	DPN 110	18,3 ± 3,13*	10,4 ± 1,78	4,3 ± 0,94	3,09 ± 1,07
DMSO	DPN 180	3,2 ± 1,10	NC	NC	NC
25 BPA	DPN 180	16,5 ± 2,35**	7,6 ± 1,72	4,7 ± 1,27	4,2 ± 1,50
250 BPA	DPN 180	14,8 ± 2,27*	10,6 ± 0,78	2,5 ± 0,97	1,7 ± 0,81

NC: no corresponde

Los resultados están expresados como la media ± SEM. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas: * p<0,05; ** p<0,01.

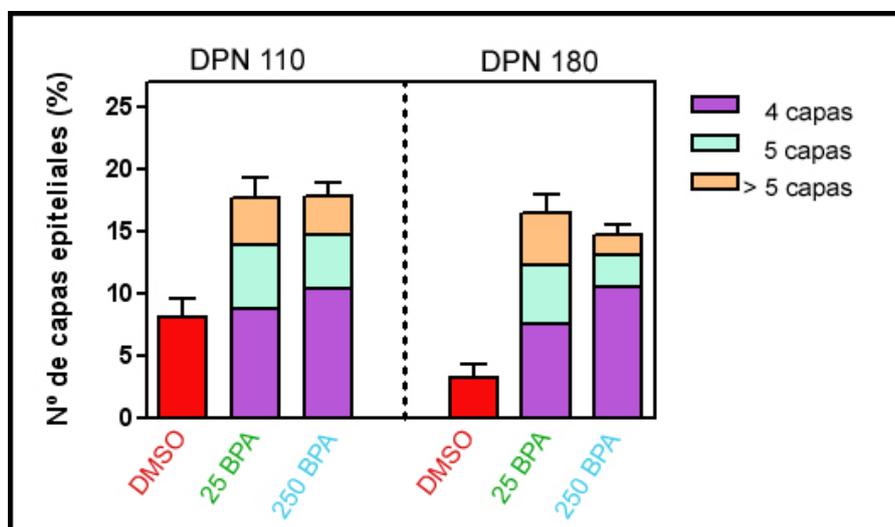


Figura 32. Distribución de conductos hiperplásicos clasificados según la magnitud de la hiperplasia. Cuantificados en hembras de DPN 110 y 180 expuestas *in utero* a DMSO o BPA, como se describió en M&M. Los distintos colores representan el porcentaje de cada tipo de conducto (con 4, 5 o más de 5 capas de células epiteliales) respecto del porcentaje total de conductos hiperplásicos.

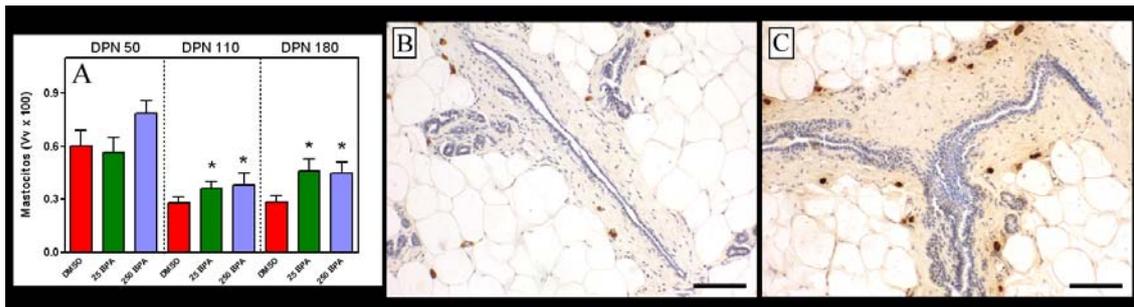


Figura 33. Infiltración de mastocitos. A. Representación gráfica mostrando que el tratamiento *in utero* con BPA indujo un aumento significativo en la infiltración de mastocitos en la glándula mamaria de animales de DPN 110 y DPN 180. Las barras representan la media \pm SEM. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). B y C. Imágenes representativas de la infiltración de mastocitos en el estroma que rodea a las estructuras del parénquima mamario. Cortes histológicos inmunomarcados con RMCP I y contracolorados con hematoxilina de Mayer. Barras negras: 85 μ m.

4. Ambiente endocrino

4.1. Niveles circulantes de hormonas esteroides ováricas

Mientras que los niveles séricos de E_2 no se modificaron por la exposición prenatal (Fig. 34) los niveles de Pg fueron significativamente menores en los animales de DPN 50 que *in utero* recibieron BPA. La disminución de los niveles Pg fue transitoria, los animales sacrificados en DPN 110 y 180 presentaron niveles de Pg semejantes a los del grupo control (Fig. 35).

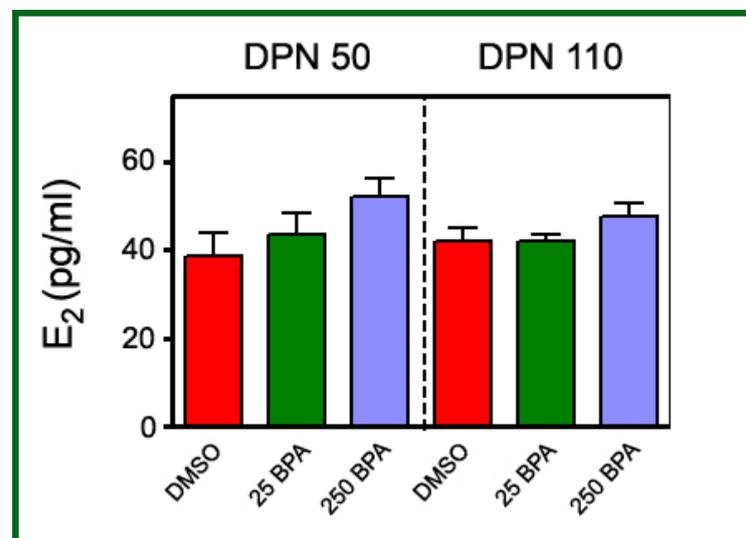


Figura 34. Niveles séricos de E_2 . Medidos en hembras en diestro de DPN 50 y 110 expuestas *in utero* a DMSO, 25 BPA o 250 BPA. Las barras representan la media \pm SEM.

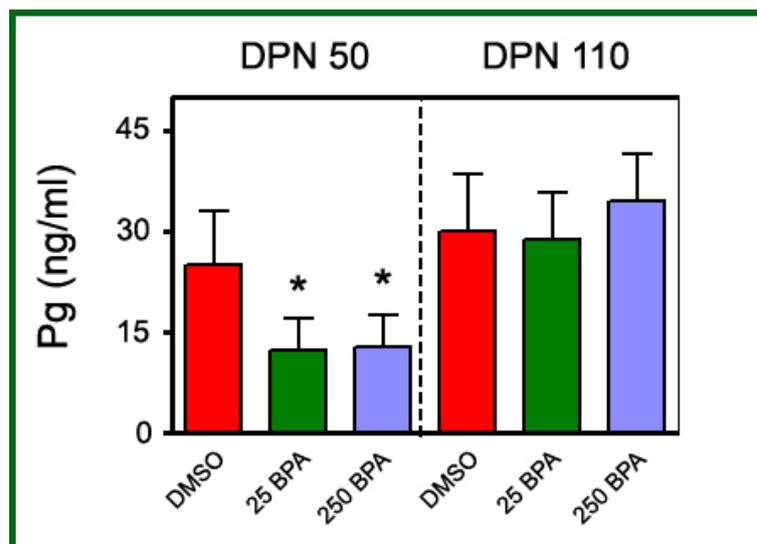


Figura 35. Niveles séricos de Pg. Medidos en hembras en diestro de DPN 50 y 110 expuestas *in utero* a DMSO, 25 BPA o 250 BPA. Las barras representan la media \pm SEM. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

4.2. Expresión de receptores hormonales y de co-reguladores

La evaluación del RE α , RP, SRC-3 y SMRT se realizó por inmunohistoquímica. Para cuantificar la expresión de cada una de estas proteínas en las células epiteliales de la glándula mamaria, se recurrió al análisis de las imágenes digitalizadas y se determinó la DOI, según se describió en M&M (sección 4.6.3.3).

4.2.1. Expresión del RE α

La exposición *in utero* a 250 BPA, aumentó significativamente la expresión de RE α en el parénquima mamario; tanto en animales de DPN 50 como de DPN 110 (Fig. 36 A). El aumento en la expresión se debió principalmente a un incremento en la intensidad de la tinción (Fig. 36 B-C).

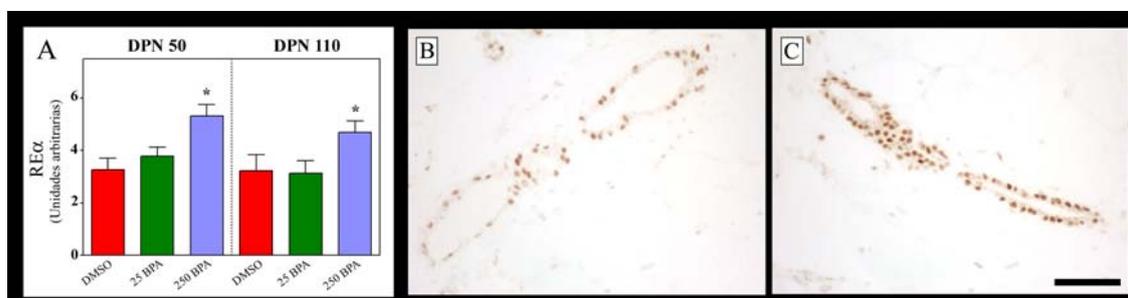


Figura 36. Expresión del RE α . (A) El tratamiento *in utero* con 250 BPA aumentó significativamente la expresión de este receptor tanto en DPN 50 como en DPN 110. Las barras representan la media \pm SEM. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). (B-C) Imágenes representativas de conductos mamarios RE α (+) de hembras que *in utero* fueron expuestas a DMSO o 250 BPA, respectivamente. Es importante notar la expresión nuclear del receptor. Cortes histológicos inmunomarcados sin contracoloración (cromógeno: DAB). La barra representa 50 μ m.

4.2.2. Expresión del RP

La expresión del RP no se vio modificada por el tratamiento *in utero* con BPA, independientemente de la dosis utilizada y de la edad de los animales en el momento de la evaluación (Fig. 37 A). No se observaron diferencias en el porcentaje de células que expresan el RP ni en la intensidad de la expresión (Fig. 37 B-C).

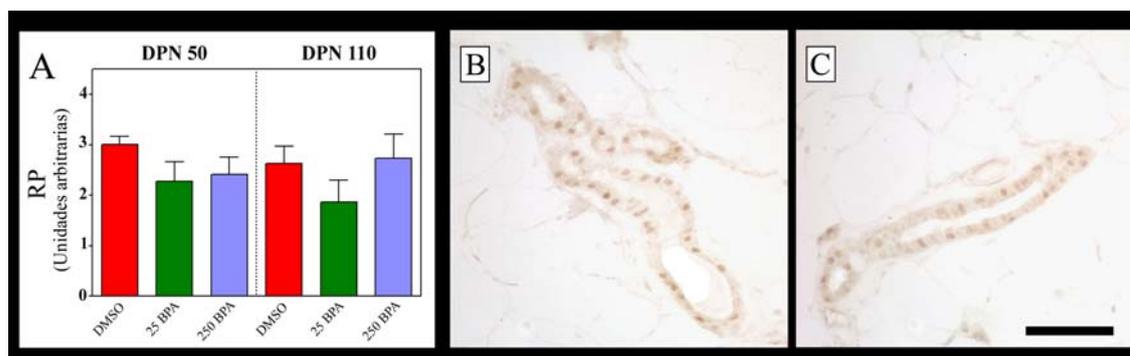


Figura 37. Expresión del RP. (A) El tratamiento *in utero* con BPA no modificó la expresión del RP, independientemente de la dosis utilizada y de la edad en la cual se evaluaron los animales (DPN 50 o DPN 110). Las barras representan la media \pm SEM. (B-C) Imágenes representativas de conductos mamarios que expresan el RP, de hembras que *in utero* fueron expuestas a DMSO o BPA, respectivamente. La localización del receptor es nuclear como se observa en las imágenes. Cortes histológicos inmunomarcados sin contracoloración (cromógeno: DAB). La barra representa 50 μ m.

4.2.3. Expresión de SRC-3 y de SMRT

Previo a la utilización de los anticuerpos anti-SMRT y anti-SRC-3 se procedió a su caracterización. La especificidad de los anticuerpos policlonales anti-SMRT y anti-SRC-3 fue probada mediante *western-blot*, tal como se describió previamente (ver M&M). En todas las muestras utilizadas (homogenatos de próstata, útero, cerebro y glándula mamaria) se detectó una banda específica para cada uno de los anticuerpos, como se muestra en la Figura 38.

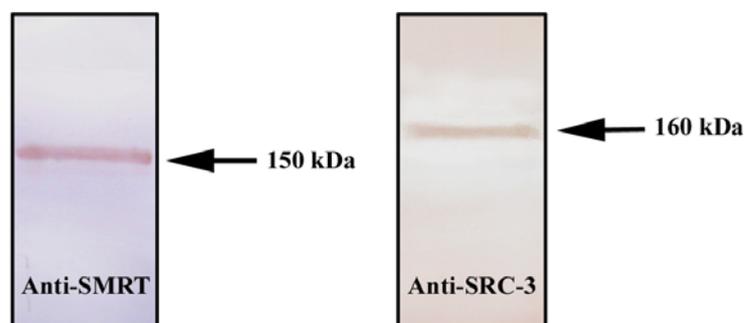


Figura 38. Western-blot para anti-SMRT y anti-SRC-3. Para cada anticuerpo utilizado una única banda específica fue detectada en el peso molecular esperado. Cromógeno: DAB.

4.2.4. Expresión de SRC-3 y co-localización con RE α

En todos los animales evaluados, detectamos expresión de SRC-3 en el parénquima mamario. Mientras que el tratamiento con 25 BPA no indujo cambios respecto del grupo control, el tratamiento con 250 BPA disminuyó significativamente la expresión de SRC-3 (Fig. 39 A). Esta disminución se debió e principalmente a una menor intensidad de la tinción (Fig. 39 B-C).

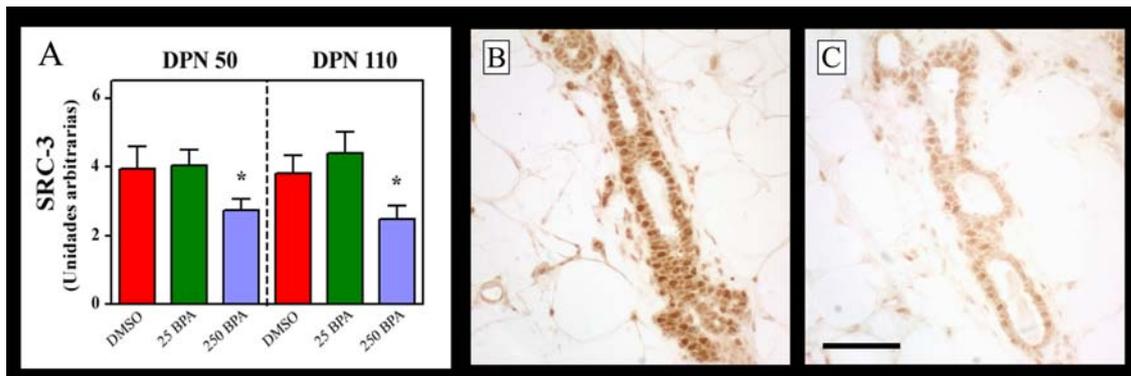


Figura 39. Expresión de SRC-3. (A) El tratamiento *in utero* con 250 BPA disminuyó significativamente la expresión de este co-regulador tanto en DPN 50 como en DPN 110. Las barras representan la media \pm SEM. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). (B-C) Imágenes representativas de conductos mamarios SRC-3 (+) de hembras que *in utero* fueron expuestas a DMSO o 250 BPA, respectivamente. Es importante destacar la expresión principalmente nuclear del co-regulador. Cortes histológicos inmunomarcados sin contracoloración (cromógeno: DAB). La barra representa 50 μ m.

La co-expresión de SRC-3 y el RE α se detectó en todos los conductos mamarios (Fig. 40). Debido a que SRC-3 y RE α son proteínas nucleares, en aquellas células en las cuales se detecta la co-expresión, el núcleo se observa de color amarillo, resultante de la superposición de la fluorescencia roja y verde. Los animales del grupo 250 BPA presentan mayor expresión de RE α asociado con menor expresión de SRC-3, respecto de los animales del grupo DMSO, independientemente de la edad de los mismos.

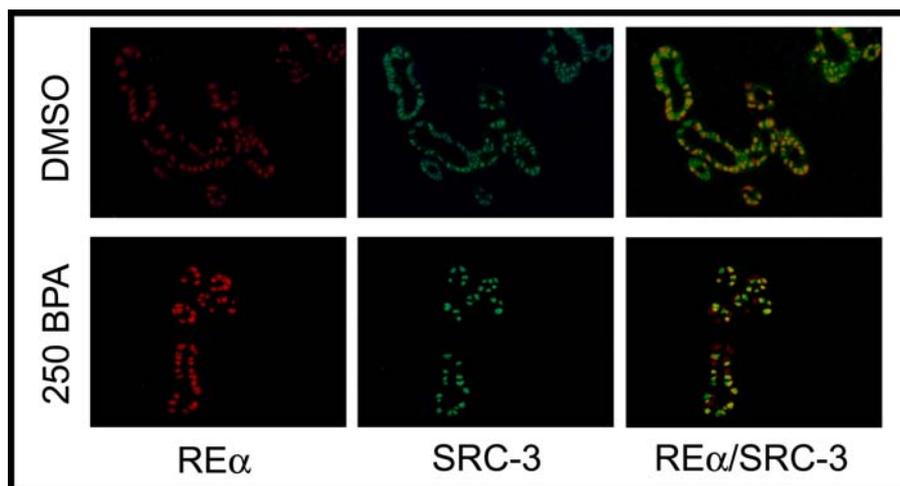


Figura 40. Co-localización de RE α y SRC-3 en conductos mamarios. Tinción inmunofluorescente para RE α (rojo) y SRC-3 (verde) en células epiteliales de conductos mamarios. Cuando las imágenes se superponen (RE α /SRC-3) las células que co-expresan ambas proteínas exhiben su núcleo de color amarillo. Magnificación 400X.

4.2.5. Expresión de SMRT y co-localización con RE α

La expresión de SMRT se detectó en todos los conductos de las glándulas mamarias analizadas, con una localización principalmente citoplasmática. En los animales del grupo control (DMSO) observamos una inducción en la expresión de SMRT en DPN 110, respecto de DPN 50 (Fig. 41 A y C). Un patrón idéntico se observó en los animales tratados prenatalmente con la menor dosis de BPA (25 BPA). Sin embargo, en los animales de 250 BPA, todas las muestras tuvieron expresión similar de SMRT, independientemente de la edad de los animales (Fig. 41 B y D).

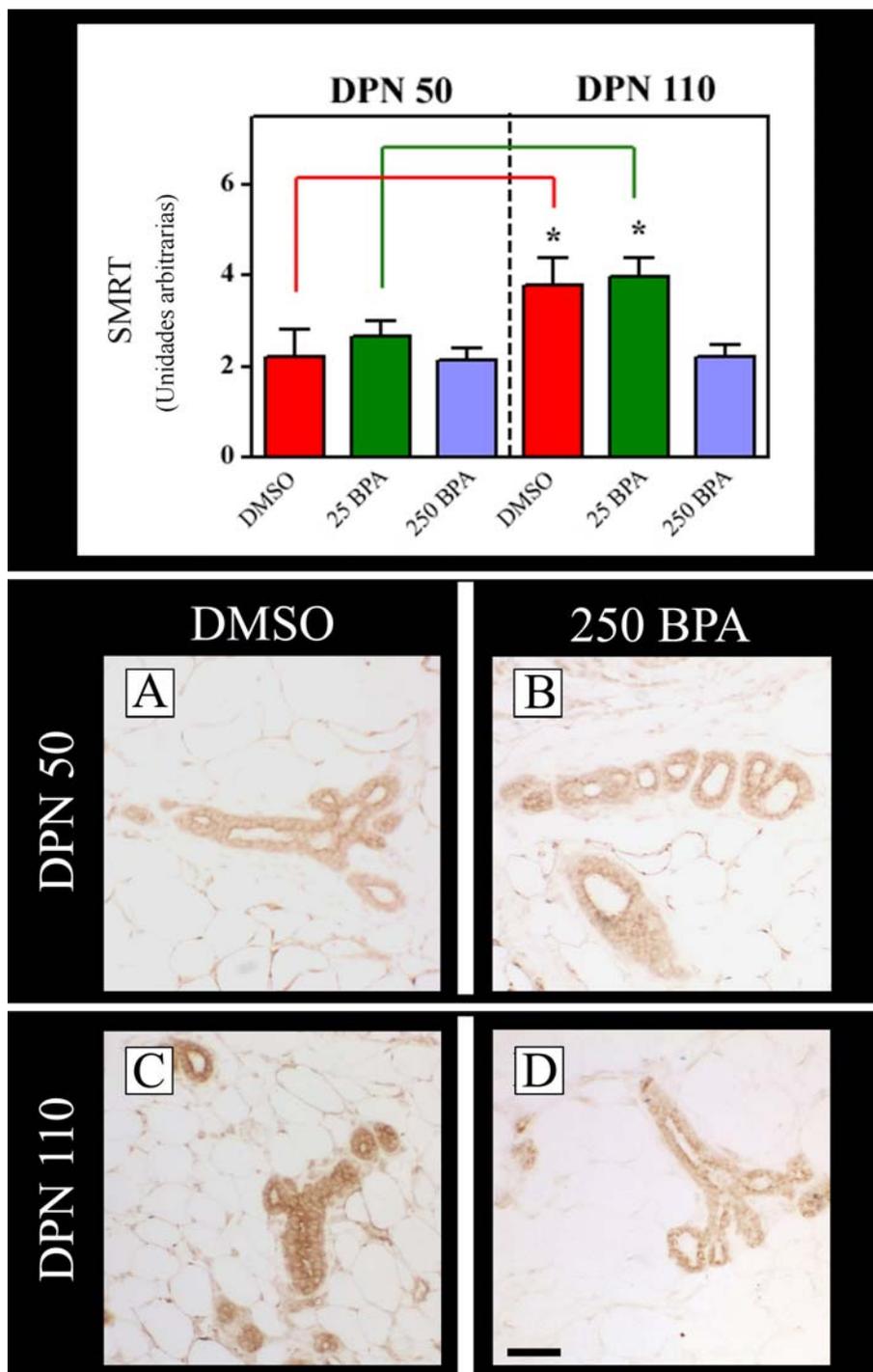


Figura 41. Patrón de expresión de SMRT. En los animales expuestos a DMSO o 25 BPA, la expresión de SMRT es mayor en DPN 110 vs DPN 50 (panel superior). Las barras representan la media \pm SEM. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). En el panel inferior se muestran imágenes representativas de conductos mamarios SMRT (+) de hembras de DPN 50: **A** y **B** y de DPN 110 **C** y **D**, que *in utero* fueron expuestas a DMSO o 250 BPA. Es importante notar la marcación principalmente citoplasmática del co-regulador y la expresión diferencial según la edad, en animales del grupo DMSO. Cortes histológicos inmunomarcados sin contracoloración (cromógeno: DAB). Todas las fotomicrografías se muestran en el mismo aumento, la barra representa 50 μ m.

Los animales que *in utero* fueron expuestos a 250 BPA, presentaron una disminución significativa de SMRT, respecto del grupo control en DPN 110 (Fig. 42).

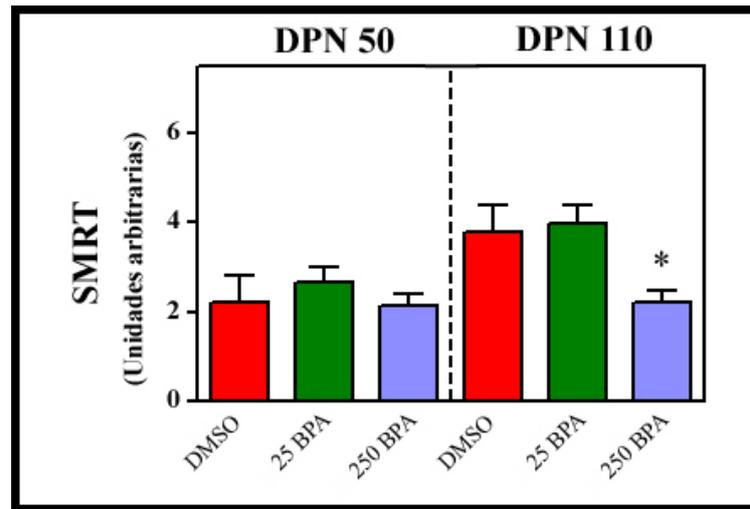


Figura 42. Expresión de SMRT. El tratamiento *in utero* con 250 BPA disminuyó significativamente la expresión de SMRT en DPN 110. Las barras representan la media \pm SEM. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

La expresión de SMRT se detectó casi en la totalidad de las células epiteliales de los conductos mamarios. Sin embargo, esta expresión no siempre estuvo acompañada por la del RE α . De este modo, si bien fue posible detectar células doblemente positivas (RE α + / SMRT+) también detectamos células que sólo expresan SMRT (Fig. 43). Sin embargo, en ningún caso observamos células RE α + / SMRT-.

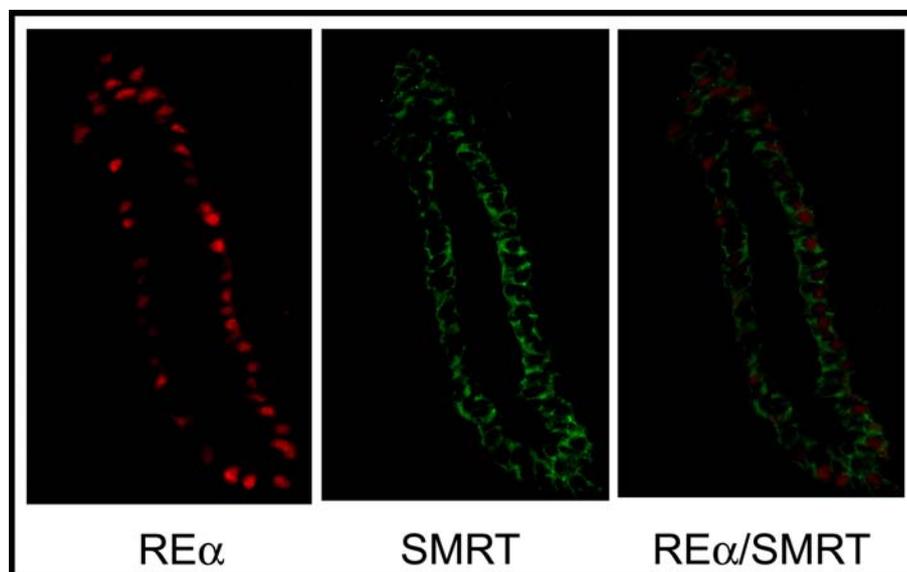


Figura 43. Co-localización de RE α y SMRT en conductos mamarios. Tinción inmunofluorescente para RE α (rojo) y SMRT (verde) en células epiteliales de conductos mamarios. Se observa que la expresión del RE α es nuclear, mientras que la de SMRT es citoplasmática. Magnificación 400x.

4.2.6. Expresión del VEGF

En los animales de DPN 50, el tratamiento *in utero* con 250 BPA produjo un incremento significativo en la expresión del VEGF (Fig. 44 A). En el grupo 25 BPA no hubo cambios en la expresión de esta proteína.

En DPN 110, ninguno de los grupos experimentales mostró diferencias significativas respecto del grupo control (Fig. 44 A). Como se observa en la fotomicrografía (Fig. 44 B), la expresión del VEGF fue principalmente citoplasmática.

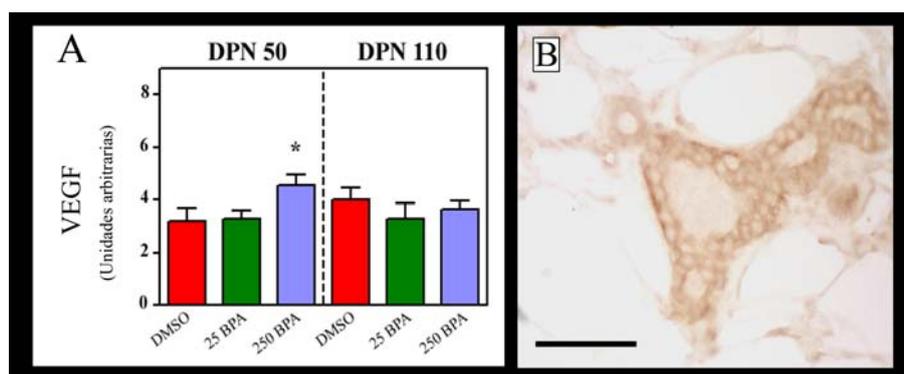


Figura 44. Expresión del VEGF. La expresión de este factor de crecimiento fue significativamente mayor en los animales del grupo 250 BPA, sólo en DPN 50 (A). Las barras representan la media \pm SEM. El asterisco indica diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). En todas las muestras evaluadas, la expresión del VEGF presenta una localización principalmente citoplasmática (B). La barra negra representa 50 μ m.

4.2.7. Área y densidad vascular

El área ocupada por vasos fue calculada como el cociente entre la suma de las secciones transversales correspondientes a vasos sanguíneos y el área estromal evaluada (según se describió en M&M). El grupo 250 BPA mostró un incremento significativo en este parámetro en las dos edades evaluadas. Mientras que para 25 BPA, el aumento ocurrió solamente en aquellos animales de DPN 110 (Fig. 45 A). Respecto a la densidad de vasos sanguíneos, calculada como el número de vasos presentes en 0,1 mm² de estroma (M&M), los animales expuestos a 250 BPA mostraron un incremento significativo comparados con el grupo control, tanto en DPN 50 como en DPN 110 (Fig. 45 B).