

LA EXPOSICIÓN A PROTECTORES SOLARES Y SU ACCIÓN SOBRE EL DESARROLLO DE LA PRÓSTATA EN RATONES PERI-PUBERALES.

Roldán González, Milagros¹

¹Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (UNL-CONICET)

Director/a: Dra. Altamirano, Gabriela A.

Codirector/a: Dra. Gómez, Ayelén L.

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: próstata, benzofenona-3, xenoestrógeno

INTRODUCCIÓN

El uso de productos de protección solar ha aumentado en los últimos años debido a la concientización de los efectos nocivos de la radiación ultravioleta (UV) en la piel, como el fotoenvejecimiento, daños en el ADN y el cáncer de piel. Uno de los filtros de rayos UV más utilizado en cremas protectoras solares es la benzofenona-3 (BP3). Además, también está presente en cosméticos, productos de cuidado personal, en telas, tintas y plásticos. Su uso genera inquietud debido a su capacidad de bioacumularse y ser absorbido por la piel pudiendo generar alteraciones endocrinas (Janjua y col., 2008). Este compuesto, ha sido clasificado como un xenoestrógeno (XE) debido a su demostrada actividad estrogénica en diversos ensayos *in vitro* e *in vivo*, afectando la reproducción tanto en hembras como en machos (Kim y Choi, 2014). Se ha evidenciado que la exposición *in útero* a sustancias con actividad estrogénica y/o antiandrogénica puede afectar el crecimiento, desarrollo y diferenciación normales de la próstata, lo que podría aumentar el riesgo de cáncer de próstata a largo plazo. El objetivo del presente estudio fue evaluar los efectos de la exposición dérmica a BP3 durante la gestación, un periodo de alta susceptibilidad, sobre el desarrollo prostático de las crías durante el período peri-puberal. Los resultados obtenidos buscarán describir los efectos en aspectos significativos como el desarrollo y el microambiente endocrino de la glándula prostática en ratones peri-puberales tras la exposición *in útero* al filtro UV BP3

OBJETIVOS

- Analizar si la exposición *in útero* al filtro UV BP3 resulta en alteraciones histológicas de la próstata ventral en ratones peri-puberales.
- Evaluar si la exposición *in útero* al filtro UV BP3 modifica el microambiente endócrino de la próstata en la etapa peri-puberal.



Título del proyecto: Efectos de la exposición al filtro UV benzofenona-3 sobre el desarrollo glandular peri-puberal en ratones hembras y machos.
Instrumento: PICT
Año convocatoria: 2019
Organismo financiador: Agencia I+D+i
Director/a: Dra. Altamirano, Gabriela A.

METODOLOGÍA

Diseño experimental y obtención de muestras

Ratones hembras C57BL/6 preñadas (F0) fueron expuestas por vía dérmica a partir del día 8.5 de gestación hasta el día del parto (día postnatal 19; DPN19) a vehículo (aceite de sésamo), 0.15 mg/kg/día y 50 mg/kg/día de benzofenona-3 (BP3). Se incluyeron 6-7 madres por cada grupo experimental. Luego del parto, las crías (F1) fueron pesadas y sexadas de acuerdo con la distancia ano-genital. Camadas de 4-6 crías por madre fueron mantenidas hasta el destete (DPN21) y las crías macho F1 fueron sacrificadas en DPN32 para la obtención de muestras experimentales. Las dosis de BP3 propuestas son equivalentes a las dosis encontradas en muestras de leche humana (0.15 mg/kg/día) (Prins y col., 2008) y a los niveles detectados de BP3 en sangre y orina humana luego de la aplicación de cremas solares (50 mg/kg/día) (Krstev y col., 2019).

Al momento del sacrificio, se diseccionó el complejo prostático/uretral junto con las vesículas seminales. Se registró el peso total del complejo prostático, el cual fue fijado en formol buffer al 4% para su posterior procesamiento histológico. Además, se recolectó sangre para la obtención de suero, que fue mantenido a -80°C hasta el dosaje de estradiol (E2) y testosterona (T). Una vez realizado el procesamiento de las muestras, se realizaron cortes histológicos de 5 µm de espesor, los cuales fueron destinados a tinciones con hematoxilina-eosina (H&E) y pruebas de inmunohistoquímica (IHQ).

Análisis histo-morfológico e inmunohistoquímica

Se realizó el análisis histo-morfológico de muestras de próstata ventral teñidas con H&E. Se capturaron imágenes a un aumento de 100X para evaluar el área luminal acinar y a un aumento de 400X para medir la altura epitelial. Se analizaron entre 20 y 40 acinos por muestra experimental, utilizando el programa ImageJ. Además, se evaluó la presencia de hiperplasias en el epitelio de los acinos prostáticos (Creasy y col., 2012; Oliveira y col., 2016).

Por otro lado, se realizaron ensayos de IHQ para evaluar la expresión de: a) Ki67 como marcador de proliferación celular, b) alfa-actina de músculo liso (α -SMA) para analizar el estroma periductal y, c) receptores de andrógenos (AR) y de estrógeno beta ($ER\beta$) para evaluar el microambiente endócrino. Para la cuantificación de Ki67, AR y $ER\beta$, se utilizó un microscopio Olympus con un aumento de 400X, contando 2000 células por corte histológico. Por otro lado, la expresión de α -SMA se cuantificó mediante densidad óptica integrada (DOI), utilizando el software ImageJ.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos en este estudio, se empleó el software GraphPad Prism. Se seleccionaron pruebas paramétricas, específicamente el análisis de varianza (ANOVA), así como pruebas no paramétricas, como el test de Kruskal-Wallis, de acuerdo con las características particulares de cada experimento.

RESULTADOS

Efectos de la exposición *in útero* a BP3 sobre el peso relativo de la próstata, la separación de prepucio (SP) y los niveles séricos hormonales de ratas macho peri-puberales

Tanto el peso corporal como el peso relativo de la próstata fueron similares entre los grupos experimentales. Aunque no existió diferencia significativa en la SP entre los grupos, algunas camadas tuvieron al menos un ratón que no presentó SP en DPN32 siendo más evidente en el grupo 50BP3 (Control: 1/7 (14%); 0.15BP3: 1/7 (14%); 50BP3:3/6 (50%)). No hubo diferencias significativas en los niveles séricos de E2 y T total entre los grupos experimentales.

Efectos de la exposición *in útero* a BP3 sobre el desarrollo de la próstata ventral de ratas macho peri-puberales

En los cortes histológicos de la próstata ventral, se evaluaron la altura del epitelio prostático (AEP), el área luminal acinar (ALA) y la presencia de hiperplasias. Tanto la AEP como el ALA fueron similares entre los grupos (Fig. 1), y la presencia de hiperplasias no mostró diferencia estadísticamente significativa (Control: 4/7 (57%); 0.15BP3: 5/6 (83%); 50BP3: 4/6 (67%)). Tampoco se observaron alteraciones en el área marcada por α -SMA evaluada en el estroma periductal.

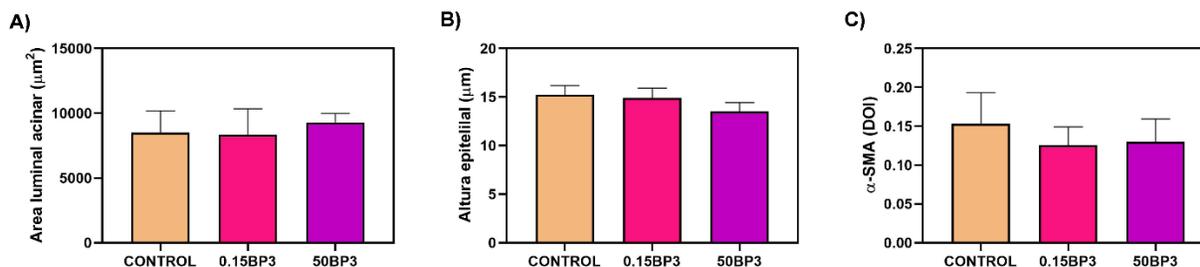


Figura 1. Análisis del desarrollo de la próstata ventral de ratas macho peripuberales expuestas *in útero* a BP3. Análisis morfométrico del (A) área luminal acinar y (B) altura del epitelio prostático en los cortes histológicos con H&E. Evaluación de la (C) densidad óptica integrada (DOI) del área marcada por α -SMA mediante IHQ. Las barras representan los valores medios \pm SEM de 5-6 ratas macho F1 por grupo.

Efectos de la exposición *in útero* a BP3 sobre la proliferación celular y la expresión proteica de los receptores de hormonas esteroideas en la próstata ventral de ratas macho peri-puberales

En la próstata ventral de ratas macho, se evaluó la proliferación celular mediante el marcador Ki67, así como la expresión proteica de ER β y AR, utilizando técnicas de inmunohistoquímica. Los resultados no mostraron diferencias significativas en ninguno de los marcadores evaluados entre el grupo control y los grupos expuestos a 0.15BP3 y 50BP3 (Fig. 2).

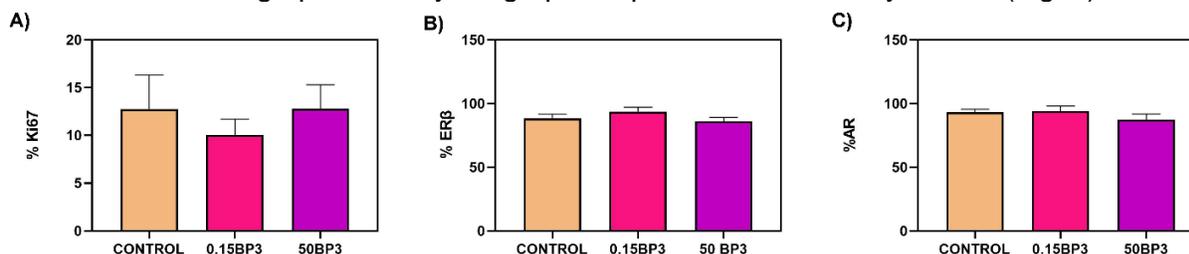


Figura 2. Análisis de la proliferación celular y expresión proteica de los receptores de hormonas esteroideas en la próstata ventral de ratas macho peripuberales expuestas in útero a BP3. Análisis de la (A) proliferación celular (porcentaje de células positivas para Ki67), y expresión de (B) ER β y (C) AR (porcentaje de células positivas). Las barras representan los valores medios \pm SEM de 4-5 ratas macho F1 por grupo.

CONCLUSIONES

En conclusión, no se observaron alteraciones histológicas en los grupos expuestos a BP3 en comparación con el grupo control. Asimismo, no hubo diferencias en la expresión de los distintos receptores evaluados en la próstata ventral. Algunas camadas presentaron al menos un ratón sin separación del prepucio en DPN32, aunque estas diferencias no fueron significativas entre los grupos experimentales. Podemos concluir que la exposición *in útero* a BP3 no altera el desarrollo de la próstata ventral en ratones peri-puberales, aunque podría inducir un retraso en la pubertad.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Creasy, D., Bube, A., de Rijk, E., Kandori, H., Kuwahara, M., Masson, R., Nolte, T., Reams, R., Regan, K., Rehm, S., Rogerson, P., & Whitney, K. (2012). Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse male reproductive system. *Toxicologic Pathology*, 40(6 Suppl), 40S-121S.
- Janjua, N. R., Kongshoj, B., Andersson, A. M., & Wulf, H. C. (2008). Sunscreens in human plasma and urine after repeated whole-body topical application. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 22(4), 456-461.
- Kim, S., & Choi, K. (2014). Occurrences, toxicities, and ecological risks of benzophenone-3, a common component of organic sunscreen products: A mini-review. *Environment International*, 70, 143-157.
- Krstev, S., & Knutsson, A. (2019). Occupational risk factors for prostate cancer: A meta-analysis. *Journal of Cancer Prevention*, 24(2), 91-111.
- Oliveira, D. S., Dzinic, S., Bonfil, A. I., Saliganan, A. D., Sheng, S., & Bonfil, R. D. (2016). The mouse prostate: A basic anatomical and histological guideline. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 16(1), 8-13.
- Prins, G. S. (2008). Endocrine disruptors and prostate cancer risk. *Endocrine-Related Cancer*, 15(3), 649-656.