

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**  
**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

**DESARROLLO DUCTAL Y DIFERENCIACIÓN FUNCIONAL  
DE LA GLÁNDULA MAMARIA MURINA LUEGO DE LA  
EXPOSICIÓN A BENZOFENONA-3 UTILIZANDO MODELOS  
*IN VIVO E IN VITRO***

**Lic. Gonzalo Schierano Marotti**

Directora de Tesis: Dra. Laura Kass

Co-directora de Tesis: Dra. Gabriela A. Altamirano

Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL; UNL-CONICET)  
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas  
Universidad Nacional del Litoral

**-2025-**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis directoras, la Dra. Laura Kass y a la Dra. Gabriela Altamirano, por abrirme las puertas del Laboratorio de Fisiopatología Glandular para realizar esta Tesis. Les agradezco por confiar en mí, por su guía académica y humana durante esta carrera, tanto en los aciertos como en las oportunidades para aprender y seguir mejorando, y por ser una fuente de inspiración a la superación y la resiliencia.

Agradezco al Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (UNL-CONICET), a quienes han sido sus directores, el Dr. Enrique Luque, la Dra. Mónica Muñoz-de-Toro, y el Dr. Horacio Rodríguez, y a mis compañeros de laboratorio, Letharios e Isaleros, por hacer del lugar de trabajo un ambiente de aprendizaje profesional, cálido, y humano.

Agradezco al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación (Agencia I+D+i), por haberme posibilitado hacer esta carrera como becario doctoral, y por los subsidios otorgados para financiar mi Tesis Doctoral.

Agradezco a la Universidad Nacional del Litoral, hija de la Reforma Universitaria del '18, y a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB), por permitirme formarme en sus tres pilares fundamentales: enseñanza, extensión, e investigación.

Agradezco a la Cátedra de Patología Humana de la FBCB por darme el lugar para iniciarme en la investigación y en la docencia, y por haber conocido a personas maravillosas.

Agradezco a mis padres, Néstor y Rosana, y toda mi gran familia (abuelos, hermanos, tíos, tíos-abuelos, primos, sobrinos, sobrinos-segundos), por sostenerme, ayudarme, y brindarme su apoyo todos estos años.

Agradezco a mis amistades Rulo y Anto; Rami, Emi, Pau; Sol, Cele, Amalita y Juanita; al Chino; a la Cheli; a Ani-Luz; a la Neko; y a mi amiga-hermana-concubina-compañera Nalu; a ustedes gracias por elegir compartir la vida conmigo.

Agradezco a Ofelia Nébula Imperia y a Ludovico Céfiro Rey, por sus maullidos y ronroneos, y por acompañarme en seis mudanzas en cinco años, y contando.

Agradezco a Ayma, Martín, y a Mario, que acompañan y me guían en cada paso.

*¡Gracias! ¡Gracias! ¡Gracias!*

## APORTES CIENTÍFICO-TECNOLÓGICOS

Los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis forman parte de las siguientes publicaciones:

- **Schierano-Marotti G**, Altamirano GA, Oddi S, Gomez AL, Meyer N, Muñoz-de-Toro M, Zenclussen AC, Rodríguez HA, Kass L. Branching morphogenesis of the mouse mammary gland after exposure to benzophenone-3. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 484; 2024:116868.
- Altamirano GA, Gomez AL, **Schierano-Marotti G**, Muñoz-de-Toro MM, Rodriguez HA, Kass L. Bisphenol A and benzophenone-3 exposure alters milk protein expression and its transcriptional regulation during functional differentiation of the mammary gland *in vitro*. *Environmental Research*, 191; 2020: 110185.

**ÍNDICE**

<b>ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS .....</b>	8
<b>RESUMEN .....</b>	10
<b>ABSTRACT .....</b>	14
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL .....</b>	18
<b>1   Desarrollo de la glándula mamaria murina .....</b>	19
1.1   Desarrollo embrionario y posnatal temprano de la glándula mamaria .....	20
1.2   Desarrollo ductal en la glándula mamaria puberal .....	20
1.2.1   Morfología y estructura de los TEBs .....	21
1.2.2   Control hormonal del desarrollo ductal durante la pubertad .....	23
1.2.2.1   Señalización del ESR1 e IGF-1 .....	23
1.2.2.2   Señalización de P4 y el RP .....	25
1.2.3   Morfogénesis ductal en organoides mamarios .....	25
1.3   La glándula mamaria adulta .....	26
1.4   Desarrollo mamario en la preñez y la lactancia.....	27
1.4.1   Diferenciación funcional.....	28
1.4.1.1   Fase proliferativa.....	28
1.4.1.2   Diferenciación secretora .....	29
1.4.1.3   Activación secretora .....	31
1.4.2   Diferenciación funcional en organoides mamarios .....	32
1.4.3   Proteínas de la leche .....	32
<b>2   Perturbadores endócrinos .....</b>	34
2.1   Benzofenona-3 .....	35
<b>OBJETIVOS .....</b>	38
<b>1   Objetivo general.....</b>	39
<b>2   Objetivos específicos .....</b>	39
<b>CAPÍTULO 1. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN DIRECTA A BENZOFENONA-3 SOBRE LA MORFOGÉNESIS DUCTAL Y DIFERENCIACIÓN FUNCIONAL EN ORGANOIDES MAMARIOS.....</b>	41
<b>1   INTRODUCCIÓN .....</b>	42
<b>2   OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	43

<b>3   MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	43
3.1   Preparación de soluciones y concentraciones a evaluar.....	43
3.2   Obtención de organoides mamarios .....	44
3.2.1   Animales.....	44
3.2.2   Mastectomía .....	44
3.2.3   Aislamiento de organoides mamarios .....	45
3.3   Cultivo 3D para evaluar ramificación ductal.....	45
3.3.1   Score de evaluación del desarrollo ductal.....	46
3.4   Cultivo 3D para evaluar diferenciación funcional .....	47
3.5   Obtención y procesamiento de muestras de organoides .....	47
3.6   Caracterización histológica y expresión de receptores hormonales .....	48
3.6.1   Análisis histomorfológico .....	48
3.6.2   Análisis de la organización tisular y expresión de receptores hormonales .....	49
3.7   Evaluación de marcadores de diferenciación funcional.....	49
3.8   Análisis de la expresión génica.....	50
3.8.1   Extracción de ácidos nucleicos .....	50
3.8.2   Transcripción reversa del ARN total.....	51
3.8.3   Diseño y evaluación de oligonucleótidos para qPCR .....	51
3.8.4   qPCR.....	52
3.8.5   Electroforesis en geles de agarosa .....	53
3.8.6   Evaluación de la expresión de los transcriptos.....	54
3.9   Análisis de la metilación del ADN .....	55
3.9.1   Bioinformática .....	55
3.9.2   Análisis de los sitios sensibles a metilación .....	56
3.10   Análisis estadístico .....	56
<b>4   RESULTADOS .....</b>	57
4.1   Efectos de la exposición directa a BP3 sobre la ramificación ductal en organoides mamarios .....	57
4.1.1   Evaluación morfológica de la ramificación ductal .....	57
4.1.2   Expresión de receptores hormonales y moléculas de señalización .....	58
4.2   Experimento de diferenciación funcional de organoides mamarios .....	59
4.2.1   Caracterización de los organoides diferenciados .....	59
4.2.1.1   Reorganización epitelial.....	59
4.2.1.2   Expresión de marcadores de diferenciación funcional y receptores hormonales .....	59

4.2.2   Efectos de la exposición directa a BP3 o BPA sobre la diferenciación funcional <i>in vitro</i> .....	60
4.2.2.1   Diferenciación alveolar.....	60
4.2.2.2   Expresión de receptores hormonales y pSTAT5a/b .....	61
4.2.2.3   Expresión de las proteínas lácteas .....	64
4.2.2.4   Metilación del ADN .....	65
<b>5   DISCUSIÓN.....</b>	<b>66</b>
<b>CAPÍTULO 2. EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A BENZOFENONA-3 DURANTE LA GESTACIÓN SOBRE LA MORFOGÉNESIS DUCTAL Y LA DIFERENCIACIÓN FUNCIONAL EN LA GLÁNDULA MAMARIA .....</b>	<b>75</b>
<b>1   INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>76</b>
<b>2   OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>77</b>
<b>3   MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>77</b>
3.1   Animales .....	77
3.2   Preparación de soluciones de trabajo y dosis experimentales .....	78
3.3   Diseño experimental del modelo de exposición gestacional .....	78
3.3.1   Aplicación dérmica de soluciones sobre ratonas preñadas .....	78
3.4   Experimento de desarrollo ductal mamario en la pubertad .....	80
3.4.1   Determinación de niveles séricos de E2 y P4 .....	81
3.4.2   Montaje completo ( <i>whole-mount</i> ) de la glándula mamaria y análisis morfométrico .....	81
3.4.3   Análisis histomorfológico e infiltración de eosinófilos y mastocitos.....	83
3.4.4   Análisis del índice de proliferación epitelial, y expresión de receptores hormonales .....	83
3.4.5   Análisis de la expresión de ARNm mediante qRT-PCR .....	84
3.5   Experimento de diferenciación funcional de la glándula mamaria lactante .....	84
3.5.1   Análisis histológico, morfometría alveolar y expresión de $\alpha$ -SMA .....	85
3.5.2   Análisis de la expresión de proteínas lácteas y moléculas de señalización de la vía del receptor de PRL.....	86
3.6   Experimento de diferenciación funcional <i>in vitro</i> de la glándula mamaria .....	87
3.6.1   Análisis de los explantos diferenciados <i>in vitro</i> .....	89
3.7   Análisis estadístico .....	89
<b>4   RESULTADOS .....</b>	<b>90</b>

4.1   Parámetros reproductivos del modelo de exposición a BP3 durante la gestación.....	90
4.2   Efectos de la exposición a BP3 durante la gestación: evaluación de la morfogénesis ductal de la glándula mamaria en la pubertad .....	90
4.2.1   Crecimiento y desarrollo de las crías F1 expuestas durante la gestación .....	90
4.2.2   Morfometría de las <i>whole-mounts</i> de glándula mamaria .....	91
4.2.3   Histoarquitectura de la glándula mamaria .....	93
4.2.4   Infiltración de células inmunes .....	94
4.2.5   Proliferación celular epitelial, expresión del ESR1, AREG, e IGF-1 .....	95
4.2.6   Expresión del RP, WNT4, RANKL y ELF5 .....	96
4.3   Efectos de la exposición a BP3 durante la gestación: evaluación de la glándula mamaria lactante.....	97
4.3.1   Gestación y lactancia.....	97
4.3.2   Histología general de la glándula mamaria lactante .....	98
4.3.3   Expresión de $\alpha$ -SMA y morfometría alveolar.....	99
4.3.4   Expresión de proteínas lácteas y moléculas de señalización .....	101
4.4   Efectos de la exposición a BP3 durante la gestación: evaluación de la diferenciación funcional <i>in vitro</i> de glándula mamaria .....	102
4.4.1   Desarrollo mamario luego de la administración de E2 y P4 .....	102
4.4.2   Explantes mamarios cultivados con estímulos lactogénicos .....	104
<b>5   DISCUSIÓN.....</b>	105
<b>CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	111
<b>ANEXOS .....</b>	115
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	118

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

α-SMA: α-actina de músculo liso.	EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.
β-cat: β-catenina.	Ef: eficiencia.
3D: tridimensional.	EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.
AB/S: alcian blue/safranina.	EGF: factor de crecimiento epidérmico.
ADNc: ADN complementario.	EGFR: receptor de EGF.
ADNg: ADN genómico.	ELF5: factor 5 similar al E74.
AMPc: adenosina monofosfato cíclica.	ESR1: receptor de estrógenos-α.
AREG: amfiregulina.	FBCB: Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.
ARNm: ARN mensajero.	FGF: factor de crecimiento fibroblástico.
BMPR1a: receptor 1a de la proteína morfogénica del hueso.	FGF-2: factor de crecimiento fibroblástico-2.
BP3: benzofenona-3.	FGFR2: receptor 2 de FGF.
BPA: bisfenol A.	GR: receptor de glucocorticoides.
CK8: citoqueratina-8.	H&E: hematoxilina de Mayer y eosina.
CO <sub>2</sub> : dióxido de carbono.	HEPES: hidroxietilopiperacina-etanosulfónico.
CONICET: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.	IBYME: Instituto de Biología y Medicina Experimental.
CRE: elemento de respuesta a AMPc.	IF: inmunofluorescencia.
CREB: proteína de unión a CRE.	IGF-1: factor de crecimiento similar a la insulina-1.
CSN2: β-caseína.	IHQ: inmunohistoquímica.
Ct: ciclo umbral.	ISAL: Instituto de Salud y Ambiente del Litoral.
CTMC: mastocitos del tejido conectivo.	ITS: insulina-transferrina-selenio.
DAB: diaminobencidina.	JAK2: quinasa Janus 2.
DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol dihidrocloruro.	LALBA: α-lactoalbúmina.
DL: día de lactancia.	MaSC: célula madre mamaria.
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium.	MMC: mastocito de la mucosa.
DOI: densidad óptica integrada.	M-MLV: Moloney Murine Leukemia Virus.
DPN: día postnatal.	MMP: metaloproteinasa.
E: día embrionario.	
E2: estradiol.	
ECM: matriz extracelular.	

MSRE-PCR: técnica combinada de digestión con enzimas de restricción sensibles a sitios de metilación seguida de PCR en tiempo real.

N<sub>2</sub>: nitrógeno.

NCBI: National Center for Bioinformatic Information.

NIH: National Institutes of Health.

NL: nódulo linfático.

OXT: oxitocina.

P4: progesterona.

pan-CK: citoqueratinas 1, 5, 10, y 14.

PBS: solución amortiguadora de fosfatos.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PE: perturbador endócrino.

Pen-Strep: penicilina-estreptomicina.

PFOA: ácido perfluorooctanoico.

PKA: proteína quinasa A.

PRL: prolactina.

PRLR: receptor de PRL.

pSTAT5a/b: STAT5a/b fosforilado.

qPCR: PCR en tiempo real.

RANK: receptor activador del factor nuclear kappa-B.

RANKL: ligando de RANK.

RP: receptor de progesterona.

RP-A: isoforma A del RP.

RP-B: isoforma B del RP.

RPMI: Roswell Park Memorial Institute.

RT: retro-transcripción.

SE: error estándar.

SEM: error estándar de la media.

SFB: suero fetal bovino.

SFB-reducido: SFB filtrado con carbón activado.

STAT5: transductor de señales y activador de la transcripción 5.

STAT5a: isoforma a de STAT5.

STAT5b: isoforma b de STAT5.

TCDD: 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina.

TCPOBOP: 1,4-bis [2-(3,5-dicloropiridiloxi)] benzeno.

TEBs: estructuras terminales bulbosas.

TIMP: inhibidor de MMP.

TSS: sitio de inicio de la transcripción.

UE: Unión Europea.

UNL: Universidad Nacional del Litoral.

UV: ultravioleta.

VEH: vehículo.

WAP: proteína acídica del suero.

WNT: familia de proteínas Wingless.

WNT4: miembro 4 de la familia de proteínas WNT.

## RESUMEN

Numerosas sustancias que se utilizan en productos comerciales de distinta índole no han sido adecuadamente evaluadas y consideradas seguras para la salud de las personas y de los ecosistemas. Una cantidad creciente de ellas demuestran actividad hormonal inadvertida, considerándolas como perturbadores endócrinos (PEs). La exposición a ellas se asocia a problemas crónicos de salud, incluyendo la afectación de la reproducción y a algunos tipos de tumores, principalmente en órganos hormono-sensibles como la glándula mamaria. El desarrollo mamario comienza en el periodo embrionario; sin embargo, su mayor crecimiento y desarrollo ocurre posnatalmente. El desarrollo ductal de la glándula se inicia en la pubertad, por acción hormonal y de factores de crecimiento como el estradiol (E2), la progesterona (P4), y el factor de crecimiento símil a la insulina-1 (IGF-1), permitiendo su crecimiento hasta alcanzar la adultez. Durante la preñez y la lactancia, principalmente por acción de la prolactina (PRL) la glándula completa su desarrollo, en conjunto con su diferenciación funcional hacia un fenotipo secretor especializado capaz de producir leche para la nutrición de las crías. Todas estas etapas del desarrollo mamario son ventanas críticas susceptibles a la exposición a PEs.

Las benzofenonas son un grupo de sustancias que actúan como filtro de rayos ultravioletas (UV), y se utilizan en coberturas plásticas, textiles, y envases de alimentos para prevenir la foto-degradación. Además, se agregan en las formulaciones de productos de uso personal como pantallas solares y cosméticos para proteger a la piel de la radiación UV, por lo que la vía dérmica es su principal ruta de exposición en humanos. Benzofenona-3 (BP3, oxibenzona, difenil cetona, o 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona) es la más utilizada entre ellas, su detección es ubicua en el ambiente y en animales, y es la benzofenona más ampliamente detectada en muestras biológicas humanas a nivel mundial. BP3 es el filtro UV detectado en mayor concentración en plasma y orina luego de la aplicación de protectores solares sobre la piel, y puede detectarse aún en días posteriores a su aplicación. También es el filtro UV detectado con mayor frecuencia en muestras pareadas materno-fetales, lo que indica su transferencia placentaria, y que podemos estar expuestos a él incluso desde el desarrollo embrionario. *In vitro*, BP3 ha demostrado actividad estrogénica al presentar afinidad por el receptor de estrógenos- $\alpha$  (ESR1), inducir la proliferación celular en una línea celular tumoral mamaria y en el ensayo uterotrópico, por lo que se lo considera un xenoestrógeno potencial. Estudios *in vivo* recientes muestran que la exposición oral a BP3 durante la preñez y la lactancia en ratones hembra, altera la

morfología de la glándula mamaria de las madres tratadas, y la de sus crías expuestas perinatalmente. Sin embargo, aún se desconoce si la aplicación dérmica de BP3 durante la preñez, afecta la glándula mamaria de la progenie. Más aún, tampoco se han estudiado los efectos de BP3 sobre la diferenciación funcional de la glándula mamaria, y su implicancia en la lactancia. Por lo tanto, **el objetivo de esta Tesis** fue analizar los efectos de la exposición a BP3 sobre el desarrollo ductal y la diferenciación funcional de la glándula mamaria murina utilizando modelos *in vivo* e *in vitro*.

En el Capítulo 1, evaluamos los efectos de la exposición directa a BP3 sobre la morfogénesis ductal y la diferenciación funcional *in vitro*, utilizando un modelo de cultivo primario tridimensional para reproducir estas etapas del desarrollo mamario. Aislamos organoides mamarios murinos y los cultivamos en matrices comerciales de composición similar a la matriz extracelular (ECM) del epitelio mamario. Para evaluar los efectos de la exposición directa a BP3 sobre la morfogénesis ductal, cultivamos los organoides mamarios en Geltrex y colágeno I, con factor de crecimiento fibroblástico 2. Los organoides fueron expuestos al vehículo (VEH, 0.01% etanol), o a tres concentraciones de BP3 basadas en: la concentración plasmática luego de una aplicación de pantalla solar en todo el cuerpo ( $1 \times 10^{-6}$  M), la concentración reportada en leche materna ( $1 \times 10^{-9}$  M), y una concentración experimental mil veces menor a esta última ( $1 \times 10^{-12}$  M). La morfología de los organoides expuestos al VEH progresó desde agregados simples de células con brotes epiteliales desde el cuerpo central, hacia estructuras ramificadas complejas con repolarización epitelial y conductos alargándose dentro de la ECM. Estas ramificaciones, al igual que lo que ocurre *in vivo* durante la pubertad, presentaron bordes suaves, sin protrusiones celulares. La menor concentración de BP3 aumentó la expresión del transcripto del IGF-1, crítico para el crecimiento ductal. Sin embargo, ninguna concentración de BP3 modificó la progresión de la ramificación ductal ni la expresión del ESR1. En cambio, las tres concentraciones de BP3 disminuyeron la expresión del transcripto del receptor de progesterona (RP), y los tratamientos con  $1 \times 10^{-9}$  M y  $1 \times 10^{-6}$  M de BP3 disminuyeron la expresión del transcripto de amfiregulina y RANKL, dos intermediarios de la vía de señalización del RP. Por otro lado, para evaluar los efectos de la exposición directa a BP3 sobre la diferenciación funcional, los organoides mamarios se cultivaron en Matrigel y se diferenciaron con estímulos lactogénicos. Los organoides se expusieron a las concentraciones de BP3 mencionadas en el experimento anterior, o a bisfenol A (BPA) como control positivo de perturbación endocrina. Los organoides diferenciados formaron estructuras epiteliales alveolares y expresaron las proteínas de la leche  $\beta$ -

caseína (CSN2),  $\alpha$ -lactoalbúmina (LALBA), y la proteína acídica del suero (WAP). Su perfil de expresión de receptores hormonales, de síntesis y de secreción de proteínas lácteas, fue congruente con un estado de diferenciación cercano al parto. La exposición directa a BP3 no modificó la morfología de los organoides, ni la expresión del receptor de glucocorticoides, o del receptor de PRL. Sin embargo, la concentración más baja de BP3 ( $1 \times 10^{-12}$  M) aumentó la expresión del ESR1, el RP (mediante la expresión de su isoforma RP-B), y la de STAT5a, además de inducir la traslocación nuclear del STAT5a/b fosforilado. Asimismo, los organoides tratados con esta misma concentración de BP3 presentaron un aumento en la expresión de CSN2, asociada a hipometilación de su promotor en un sitio de interacción con STAT5a. Todas estas alteraciones fueron similares a los efectos del tratamiento con BPA. Por su parte, la expresión de la WAP estuvo disminuida por el tratamiento con  $1 \times 10^{-6}$  M de BP3, ningún tratamiento con BP3 modificó la expresión de LALBA. En conjunto, estos resultados demuestran que la exposición directa a BP3 alteró la expresión de receptores hormonales, y vías de señalización críticas en la morfogénesis ductal y en la diferenciación funcional. Como consecuencia, BP3 alteró la expresión de las proteínas de la leche, siendo las modificaciones epigenéticas uno de sus mecanismos de acción. Asimismo, los efectos de BP3 fueron dependientes de la concentración utilizada, y de la etapa del desarrollo mamario estudiada, sugiriendo efectos diferentes según el microambiente hormonal mamario.

**En el Capítulo 2**, evaluamos los efectos de la exposición a BP3 durante la gestación sobre el desarrollo ductal y la diferenciación funcional *in vivo* de la glándula mamaria de la progenie. Para esto, a ratones hembra preñadas (F0) se les aplicó sobre la piel una solución de vehículo (aceite de sésamo, grupo control), o de BP3 desde el día de gestación (DG) 0.5 hasta el DG-18.5. Luego del parto, se mantuvieron a las madres F0 con sus crías F1 hasta el destete. Las dosis de BP3 utilizadas fueron 0.15 y 50 mg/kg de peso corporal/día (grupos 0.15-BP3, y 50-BP3, respectivamente). Estas dosis son equivalentes al nivel de BP3 detectado en leche materna (0.15-BP3), y a la dosis de BP3 a la que las personas están expuestas luego de la aplicación de pantallas solares sobre todo el cuerpo (50-BP3). Un grupo de crías F1 hembras fueron sacrificadas en el día posnatal 45, y se tomaron muestras de suero y de glándula mamaria para analizar el desarrollo ductal en la pubertad. Otro grupo de hembras F1 fueron preñadas, y en el día de lactancia 10 fueron sacrificadas y se tomaron muestras de glándula mamaria para evaluar la diferenciación funcional durante la lactancia. En la glándula mamaria puberal, la exposición a BP3 durante la gestación no modificó la histomorfología mamaria, la infiltración de mastocitos y eosinófilos, la proliferación celular epitelial, la

expresión del ESR1, o de IGF-1. BP3 tampoco modificó los niveles séricos de E2 y P4. Sin embargo, ambas dosis de BP3 disminuyeron la expresión del transcripto del RP, y el grupo 50-BP3 además presentó menor expresión de WNT4, intermediario de la vía de señalización del RP. Por otro lado, en la glándula mamaria lactante todos los grupos experimentales presentaron un extenso desarrollo lóbulo-alveolar. Sin embargo, el grupo 0.15-BP3 presentó alveolos de menor tamaño, y ambos grupos expuestos a BP3 durante la gestación presentaron menor expresión relativa de  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA). Sin embargo, BP3 no modificó la expresión de intermediarios de la señalización de PRL (STAT5a y ELF5), la expresión de las proteínas de la leche (CSN2, WAP, y LALBA), ni el peso corporal de las crías F2 lactantes. En conjunto, estos resultados demuestran que la exposición a BP3 durante la gestación disminuyó la expresión del RP y de WNT4, sin alterar el desarrollo ductal o la histoarquitectura mamaria durante la pubertad. En cambio, BP3 modificó la histología alveolar y la expresión de  $\alpha$ -SMA en las células mioepiteliales de la glándula mamaria lactante. Sin embargo, no modificó la síntesis de proteínas de la leche, y no causó alteraciones evidentes en la producción de leche de las madres F1, o la lactancia de las crías F2.

**En conclusión**, los resultados de esta Tesis evidencian que BP3 afecta el desarrollo ductal y la diferenciación funcional, provocando alteraciones menores en la glándula mamaria. Los efectos de BP3 son dependientes de la dosis o concentración utilizada, del modelo de exposición, y de la etapa del desarrollo mamario analizada, similar al comportamiento de otros PEs. Durante el desarrollo ductal, la vía de señalización de P4 es particularmente sensible a la acción de BP3; su exposición, tanto directa como durante la gestación, disminuye la expresión del RP y de los intermediarios de su vía de señalización, independientemente de la expresión del ESR1. Por otro lado, la exposición directa a concentraciones muy bajas de BP3 altera la diferenciación funcional, y modifica la expresión de proteínas lácteas. Además, la exposición a BP3 durante la gestación altera la organización alveolar de la glándula mamaria lactante, demostrando efectos persistentes que se pueden evidenciar a largo plazo luego de la exposición.

## ABSTRACT

Several chemical substances used in diverse commercial products have not been adequately evaluated or deemed safe for human health and ecosystems. An increasing number of these substances exhibit unintended hormonal activity and are classified as endocrine disruptors chemicals (EDCs). Exposure to EDCs has been associated with chronic health issues, including reproductive disorders and certain types of cancer, particularly in hormone-sensitive organs such as the mammary gland. Development of the murine mammary gland begins during the embryonic period; however, the most significant outgrowth occurs postnatally at distinct developmental stages. Ductal development begins at puberty and is driven by hormones and growth factors such as estrogens (estradiol, E2), progesterone (P4), and insulin-like growth factor 1 (IGF-1). During this stage, mammary ducts elongate and bifurcate until the gland reaches the boundaries of the fat pad. During pregnancy, E2, P4, and prolactin (PRL) promote extensive lateral-side branching and lobuloalveolar development. During lactation, PRL completes the gland's functional differentiation into a specialized secretory phenotype capable of producing milk to nourish offspring. Each of these developmental stages represents a critical window of susceptibility to EDC exposure.

Benzophenones are a group of compounds that act as ultraviolet (UV) filters and are therefore added to plastic coatings, textiles, and food packaging to prevent photodegradation. They are also included in personal care products such as sunscreens and cosmetics to protect the skin from UV radiation. Thus, dermal application is the primary route of human exposure. Benzophenone-3 (BP3, also known as oxybenzone, diphenyl ketone, or 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone) is the most widely used UV filter. It is ubiquitously detected in the environment and animals and is the most frequently detected benzophenone in human biological samples worldwide. BP3 is the UV-filter that reaches the highest concentrations in plasma and urine following sunscreen application and can still be detected days afterward. It is also commonly found in matched maternal–fetal samples, indicating its ability to cross the placental barrier. Therefore, exposure to BP3 may begin as early as the embryonic stage. *In vitro*, BP3 has demonstrated estrogenic activity through its affinity for estrogen receptor- $\alpha$  (ESR1) and its ability to induce cell proliferation in a tumoral mammary cell line and in the uterotrophic assay. Accordingly, it has been classified as a potential xenoestrogen. Recently, *in vivo* studies have shown that oral exposure to BP3 in mice during pregnancy and lactation alters mammary gland morphology in both the treated mothers and their perinatally exposed offspring. However, it remains

## Abstract

unknown whether dermal exposure to BP3 during pregnancy affects the mammary gland of the progeny. Further, the effects of BP3 exposure on the functional differentiation of the mammary gland—and its potential impact on lactation—have not yet been investigated. Therefore, **the aim of this Thesis** was to analyze the effects of BP3 exposure on ductal development and functional differentiation of the mouse mammary gland using both *in vivo* and *in vitro* models.

**Chapter 1** evaluates the effects of direct BP3 exposure on ductal morphogenesis and functional differentiation *in vitro* using a three-dimensional primary culture model, which replicates these stages of mammary development. Mice mammary organoids were isolated and cultured in commercial matrices mimicking the extracellular matrix (ECM) of the mammary epithelium. To assess the effects of BP3 on ductal development, organoids were cultured in Geltrex and collagen I with fibroblast growth factor 2 and exposed to vehicle (VEH, 0.01% ethanol) or three concentrations of BP3 based on: (1) plasma levels following whole-body sunscreen application ( $1 \times 10^{-6}$  M); (2) levels reported in breast milk ( $1 \times 10^{-9}$  M); and (3) an experimental concentration 1,000-fold lower ( $1 \times 10^{-12}$  M). VEH-treated organoids developed from simple cell aggregates with epithelial buds into complex branched structures with epithelial repolarization and ducts extending through the ECM. These branches had smooth edges without cellular protrusions, mimicking *in vivo* ductal elongation during puberty. While the lowest BP3 concentration increased IGF-1 transcript expression—critical for ductal growth—none of the BP3 treatments altered branching progression or ESR1 expression. However, all three concentrations reduced progesterone receptor (PR) transcript levels, and  $1 \times 10^{-9}$  M and  $1 \times 10^{-6}$  M treatments reduced amphiregulin and RANKL transcript expression, both key intermediates of PR signaling. To evaluate the effects of BP3 on functional differentiation, mammary organoids were cultured in Matrigel and differentiated by adding lactogenic stimuli. They were exposed to the same BP3 concentrations described above, or to bisphenol A (BPA) as a positive control for endocrine disruption. Differentiated organoids rearranged into alveolar-like epithelial structures which expressed the milk proteins  $\beta$ -casein (CSN2),  $\alpha$ -lactalbumin (LALBA) and whey acidic protein (WAP). Their hormone receptor expression profile, and milk protein synthesis and secretion, resembled those of a functionally differentiated mammary gland near parturition. Direct exposure to BP3 did not alter organoid morphology or the expression of glucocorticoid or PRL receptors. However, the lowest BP3 dose ( $1 \times 10^{-12}$  M) increased ESR1, PR (via the PR-B isoform), and STAT5a expression, and induced the nuclear translocation of phosphorylated STAT5a/b. Organoids treated with this dose also showed increased expression of CSN2, associated with hypomethylation at a

## Abstract

STAT5a-binding site in its promoter. These effects were similar to those observed with BPA treatment. Additionally, WAP expression was reduced following treatment with  $1 \times 10^{-6}$  M BP3, and none BP3 treatment modified LALBA expression. Taken together, these findings demonstrate that direct exposure to BP3 alters hormone receptor expression and critical signaling pathways during both ductal morphogenesis and functional differentiation. In consequence, BP3 altered the expression of milk proteins, and epigenetic mechanisms likely contribute to these effects. Furthermore, BP3 effects were concentration-dependent and varied according to the developmental stage analyzed, suggesting a context-dependent effect influenced by the mammary hormonal microenvironment.

**Chapter 2** investigates the *in vivo* effects of gestational BP3 exposure on ductal development and functional differentiation of the progeny's mammary gland. Pregnant mice (F0) were topically treated with vehicle (sesame oil, control group) or BP3 from gestation day (GD) 0.5 to GD 18.5. After delivery, F0 dams were housed with their F1 pups until weaning. The BP3 doses used were 0.15 and 50 mg/kg/day (0.15-BP3 and 50-BP3 groups, respectively). These doses correspond to BP3 levels reported in breast milk (0.15-BP3) and those achieved following a whole-body sunscreen application (50-BP3). One set of F1 female offspring were euthanized on postnatal day 45, and both serum and mammary gland samples were taken to analyze ductal development during puberty. Another set of F1 females were bred, euthanized on lactation day 10, and mammary gland samples were taken to analyze functional differentiation during lactation. In pubertal mammary glands, gestational BP3 exposure did not alter mammary histomorphology, mast cell or eosinophil infiltration, epithelial cell proliferation, ESR1 or IGF-1 expression, or serum E2 and P4 levels. However, both BP3 doses reduced PR transcript expression, and the 50-BP3 group also showed decreased expression of WNT4, a PR signaling intermediate. In lactating mammary glands, all groups exhibited extensive lobuloalveolar development. Nonetheless, the 0.15-BP3 group showed smaller alveoli, and both BP3-exposed groups exhibited a reduced relative expression of smooth muscle  $\alpha$ -actin ( $\alpha$ -SMA). BP3 did not affect the expression of PRL signaling intermediates (STAT5a and ELF5), milk proteins (CSN2, WAP, and LALBA), or the body weight of lactating F2 pups. Together, these findings indicate that gestational BP3 exposure decreases PR and WNT4 expression during puberty without affecting overall ductal development or mammary histoarchitecture. In contrast, gestational exposure to BP3 alters alveolar histology and  $\alpha$ -SMA expression of myoepithelial cells in the lactating mammary gland. In addition, gestational BP3

## *Abstract*

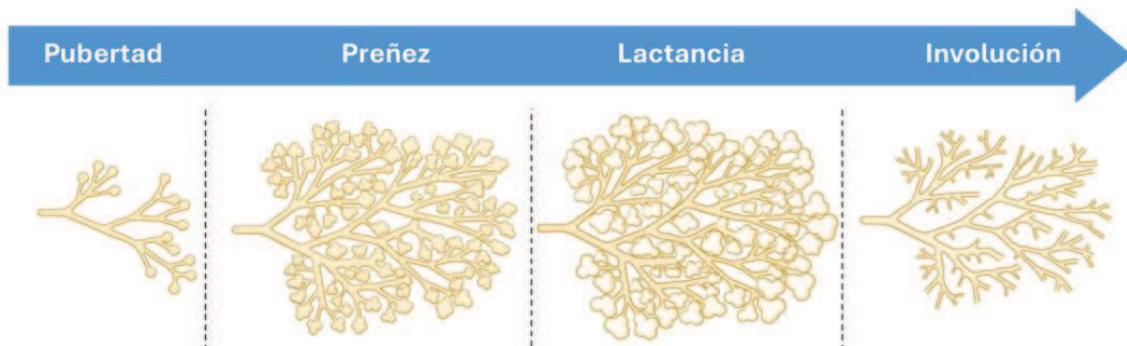
exposure unaffected milk protein synthesis, and caused no apparent adverse lactation outcomes.

**In conclusion**, this Thesis demonstrates that BP3 exert its action on ductal development and functional differentiation, causing minor impairments on the mammary gland. BP3 effects on the mammary gland are dependent on the dose or concentration used, the exposure model, and the analyzed development stage, resembling the behavior of other EDCs. P4 signaling during ductal development is particularly sensitive to BP3 action, both direct or gestational exposure to BP3 decrease the expression of PR and of its signaling intermediates, independently of ESR1 expression. At very low concentrations, direct BP3 exposure impair functional differentiation and milk protein expression. Additionally, gestational BP3 exposure leads to persistent alterations in the alveolar organization of the lactating mammary gland, evidencing long-term effects following prenatal exposure.

# **INTRODUCCIÓN GENERAL**

## 1 | Desarrollo de la glándula mamaria murina

La glándula mamaria es un órgano dinámico y altamente especializado que distingue a los mamíferos, debido a que produce y secreta la leche para la nutrición de las crías (Macias & Hinck, 2012). Su estructura está compuesta por un sistema ramificado de conductos epiteliales inmersos en un estroma rico en tejido adiposo y conectivo, que proporciona soporte mecánico y señales bioquímicas esenciales para su desarrollo (Hynes & Watson, 2010). Esta glándula experimenta profundos cambios morfológicos y funcionales a lo largo de la vida. En los roedores, su desarrollo comienza durante la vida embrionaria, pero alcanza su máxima complejidad en etapas posnatales, principalmente durante la pubertad, la gestación y la lactancia (Brisken & Ataca, 2015; Sternlicht et al., 2006a). En el embrión, el ectodermo forma las líneas mamarias que se convierten en las placas mamarias. Reguladas por interacciones epitelio-mesenquima, las placas mamarias descienden hacia el mesénquima subyacente y producen la estructura ductal rudimentaria de la glándula presente al nacer (Hens & Wysolmerski, 2005). Las etapas posteriores del desarrollo (crecimiento puberal, embarazo, lactancia e involución) ocurren después del nacimiento bajo regulación hormonal. En la pubertad, se inicia el desarrollo ductal para crear un árbol ductal ramificado dentro del estroma adiposo circundante (Sternlicht et al., 2006b). Durante la preñez surgen los alvéolos mamarios, que secretan leche durante la lactancia (Anderson et al., 2007). La falta de demanda de leche durante el destete inicia el proceso de involución, mediante el cual la glándula vuelve a su estado previo al embarazo (Watson, 2006) (Figura 1).



**Figura 1.** Etapas del desarrollo mamario posnatal. Figura modificada de Hannan et al. (2023).

Estos procesos requieren numerosas vías de señalización, que tienen funciones reguladoras distintas en las diferentes etapas del desarrollo glandular. Las vías de señalización también regulan una subpoblación especializada de células madre mamarias (MaSCs) que impulsan los cambios drásticos en el desarrollo glandular que ocurren con cada embarazo (Macias & Hinck, 2012).

### 1.1 | Desarrollo embrionario y posnatal temprano de la glándula mamaria

El desarrollo mamario inicia alrededor del día embrionario (E) 10.5 en ratones, con la formación de las líneas mamarias, bandas ectodérmicas bilaterales que se extienden desde las axilas hasta las regiones inguinales (Hens & Wysolmerski, 2005; Veltmaat et al., 2003). Estas estructuras dan origen a cinco pares de placas mamarias en posición ventrolateral, que posteriormente se invaginan hacia el mesénquima subyacente para formar los brotes mamarios primarios en los fetos hembra (E12.5-E15.5) (Hens & Wysolmerski, 2005). Durante este período, la interacción epitelio-mesénquima es crucial y está regulada por múltiples vías de señalización. Algunas de las principales son las de la familia de proteínas Wingless (WNTs), los factores de crecimiento fibroblástico (FGFs), y la proteína relacionada con la hormona paratiroidea. Estos actúan mediante la liberación de ligandos desde un compartimiento, por ejemplo, el epitelio, que se unen a su receptor en el otro compartimiento, por ejemplo, el estroma, o viceversa (Hens & Wysolmerski, 2005). Luego, estos brotes mamarios se ramifican formando un rudimento epitelial ramificado primitivo (un conducto primario, con unas 15-20 ramificaciones) rodeado por el estroma adiposo precursor (denominado parche adiposo o *fat pad*). Esta primera instancia de ramificación ductal, en la glándula mamaria embrionaria, ocurre de manera independiente a hormonas. El rudimento mamario permanece en estado quiescente hasta la pubertad, creciendo de manera isométrica con el resto del organismo (Hens & Wysolmerski, 2005).

### 1.2 | Desarrollo ductal en la glándula mamaria puberal

La pubertad marca el inicio de un extenso desarrollo ductal, un proceso orquestado por las hormonas ováricas, estrógenos y progesterona (P4), la hormona del crecimiento, y factores de crecimiento como el factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) (Sternlicht, et al., 2006a). En los ratones esto ocurre luego del destete, alrededor de las semanas 3-7 posnatales (Dawson & Visvader, 2021). Cerca del día postnatal (DPN) 26 ocurre la apertura del canal vaginal, un proceso mediado por apoptosis y comúnmente utilizado como indicador del inicio de la pubertad, que se asocia con un incremento en los niveles séricos de estradiol (E2) (Cora et al., 2015). Alrededor de 10 días posteriores a la apertura vaginal, ocurre la cornificación vaginal, seguida del primer proestro, estro, metaestro, y diestro, marcando el inicio de los ciclos estrales (Byers et al., 2012). En el inicio de la pubertad, mediante estimulación de los estrógenos, se forman las estructuras terminales bulbosas (TEBs), estructuras altamente proliferativas, en la punta de los conductos mamarios. Los TEBs dirigen el

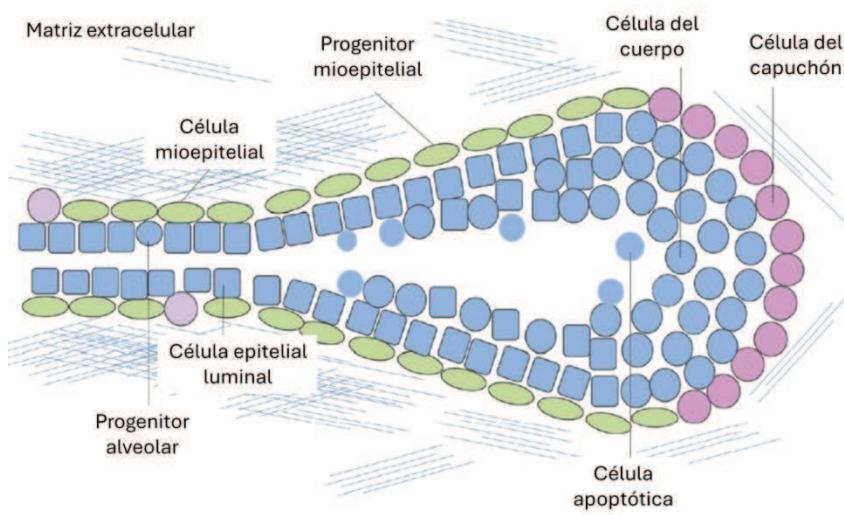
desarrollo mamario dentro del parche adiposo mediante la elongación ductal y la bifurcación de los mismos, formando la estructura ductal primaria (Hinck & Silberstein, 2005; Williams & Daniel, 1983). Cuando alcanzan los límites del parche adiposo, los TEBs regresionan y su estructura desaparece, dejando un extremo romo en la punta del conducto (Paine & Lewis, 2017). Asimismo, surgen ramificaciones secundarias que brotan lateralmente desde los conductos primarios, hasta que la glándula forma una estructura ramificada que ocupa hasta un 60 % del estroma adiposo, dejando lugar para la subsiguiente expansión epitelial que ocurre en la preñez (Macias & Hinck, 2012).

### 1.2.1 | Morfología y estructura de los TEBs

Los TEBs presentan una población heterogénea de células (Figura 2), elevados niveles de proliferación epitelial (60-90 %) y de apoptosis celular (5-15 %). Las células menos diferenciadas y más proliferativas se encuentran en la región más ancha, mientras que las más diferenciadas y menos proliferativas se encuentran en la región del cuello y cercanas al conducto mamario (Paine & Lewis, 2017). El compartimiento celular externo está formado por una sola capa epitelial de células del capuchón (*cap cells*) en el frente de crecimiento, unidas débilmente al TEB y en contacto directo con los adipocitos del estroma (Williams & Daniel, 1983). Estas células presentan características de MaSCs (Paine & Lewis, 2017), tienen la capacidad de autorrenovarse y de diferenciarse a células mioepiteliales maduras mientras el conducto se elonga (Williams & Daniel, 1983). Las células mioepiteliales presentan morfología alargada y forman el estrato epitelial basal de los conductos maduros mientras los TEBs invaden el parche adiposo (Dawson & Visvader, 2021; Williams & Daniel, 1983). El compartimiento celular interno es una multicapa celular compuesta por las células del cuerpo (*body cells*) (Williams & Daniel, 1983). Estas son células progenitoras de las estirpes luminales y alveolares que se diferencian a células epiteliales maduras (Neville et al., 2002; Paine & Lewis, 2017). Las células dentro del TEB se encuentran unidas entre sí débilmente, por lo que presentan movilidad y se van reubicando a medida que se van diferenciando mientras el conducto se elonga (Paine & Lewis, 2017).

La forma bulbosa del TEB es en parte debido a las diferencias en la fuerza de contracción que ejerce la matriz extracelular (ECM) a lo largo de su estructura (Dawson & Visvader, 2021; Paine & Lewis, 2017). En la región más ancha del TEB la lámina basal es delgada, mientras que en el cuello se vuelve más ancha y rígida (Fata

et al., 2004; Paine & Lewis, 2017) (Figura 2). La penetración de los TEBs dentro del estroma mamario requiere de la remodelación de la ECM mediante las metaloproteinasas (MMPs) y sus reguladores, los inhibidores de MMPs (TIMPs) (Fata et al., 2004; Howlin et al., 2006).



**Figura 2.** Organización celular en el TEB. Figura modificada de Paine & Lewis (2017).

En el estroma mamario se encuentran varios tipos celulares incluyendo adipocitos, fibroblastos, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, y células endoteliales (Gouon-Evans et al., 2000; Ingman et al., 2006; Zhang et al., 2014).

- Fibroblastos: se localizan alrededor del TEB y producen factores de crecimiento a nivel local, incluyendo FGFs, IGF-1, y factor de crecimiento hepatocitario, en respuesta a los estrógenos y la hormona del crecimiento (Kleinberg et al., 2000; Paine & Lewis, 2017; Sumbal et al., 2021). Además, los fibroblastos facilitan la producción de los componentes de la ECM, y la degradación de la misma mediante la regulación de las MMPs y los TIMPs (Paine & Lewis, 2017; Sumbal et al., 2021).
- Mastocitos: en la pubertad se movilizan hacia el estroma periductal y se los puede hallar en las cercanías de los TEBs y de los conductos maduros (Lilla & Werb, 2010), donde inducen la proliferación epitelial en ambas estructuras (Lilla & Werb, 2010; Paine & Lewis, 2017; Reed & Schwertfeger, 2010). La proliferación epitelial inducida por los mastocitos es dependiente de la liberación de sus gránulos de secreción, y no involucra el reclutamiento de macrófagos, ni la producción o remodelación del colágeno en la ECM (Lilla & Werb, 2010). La falta de mastocitos durante la pubertad reduce el número de TEBs y la elongación de los conductos, fenotipo que perdura incluso en la adultez (Lilla & Werb, 2010).

- Eosinófilos: son reclutados por la secreción de eotaxina hacia la punta de los TEBs, y son necesarios para la formación de los TEBs y la ramificación ductal (Gouon-Evans et al., 2000; Paine & Lewis, 2017; Reed & Schwertfeger, 2010).
- Macrófagos: los macrófagos reclutados a la región del cuello remodelan el colágeno I en paquetes fibrilares que se proyectan en dirección al frente de crecimiento (Brownfield et al., 2013; Ingman et al., 2006). Los macrófagos dentro del cuerpo del TEB fagocitan a las células apoptóticas (Gouon-Evans et al., 2000). Otros macrófagos se intercalan entre el epitelio luminal y basal de los conductos maduros donde promueven la ramificación ductal (Dawson et al., 2020; Dawson & Visvader, 2021; Gouon-Evans et al., 2000; Wilson et al., 2020).

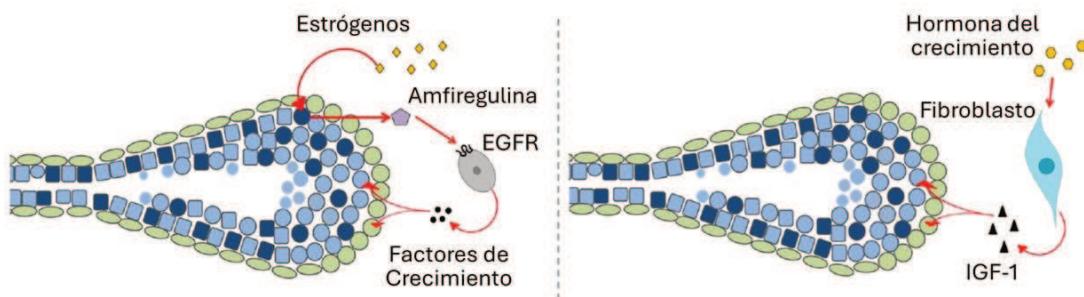
### **1.2.2 | Control hormonal del desarrollo mamario durante la pubertad**

Los estrógenos (principalmente el E2) y la P4 son dos reguladores fundamentales del desarrollo mamario en la pubertad. Ambas hormonas actúan a través de sus receptores intracelulares, que se translocan al núcleo para inducir la expresión de genes (Macias & Hinck, 2012). Existen dos isoformas del receptor de estrógenos, el receptor de estrógenos- $\alpha$  (ESR1), principal operador durante el desarrollo ductal mamario, y el receptor de estrógenos- $\beta$  (Macias & Hinck, 2012). Asimismo, también existen dos isoformas del receptor de progesterona (RP), la isoforma A (RP-A) y la isoforma B (RP-B) (Shyamala et al., 1990). La isoforma RP-A es más corta, mientras que el RP-B presenta 165 aminoácidos extras en el extremo N-terminal, con actividad transcripcional específica (Brisken & Scabia, 2020; Richert et al., 2000). Ambas isoformas se expresan de manera diferente a lo largo del desarrollo mamario. En la glándula mamaria puberal predomina la isoforma RP-A, mientras que la isoforma RP-B incrementa su expresión durante la preñez (Aupperlee et al., 2005). Solo una subpoblación de células epiteliales mamarias expresa receptores hormonales (células sensoras) (Hovey et al., 2001). En la pubertad, cerca del 60 % de las células epiteliales expresan al ESR1 y al RP (Aupperlee et al., 2005). Estas células son las epiteliales luminales en los conductos y las células del cuerpo de los TEBs (Aupperlee et al., 2005). En la glándula mamaria adulta, el porcentaje de células epiteliales sensoras disminuye a un 30 %.

#### **1.2.2.1 | Señalización del ESR1 e IGF-1**

El E2 en la pubertad induce la formación de los TEBs y estimula la proliferación epitelial (Aupperlee et al., 2013). Solo un tercio de las células epiteliales proliferativas

expresan receptores hormonales, lo que sugiere mecanismos de señalización paracrína que induzcan la proliferación (Aupperlee et al., 2005, 2013). La señalización del ESR1 (Figura 3) induce la expresión de amfiregulina (AREG) (Ciarloni et al., 2007), un miembro de la familia de factores de crecimiento epidérmico (EGFs). AREG se expresa como una proteína transmembrana (pro-AREG) que necesita ser clivada por la MMP de transmembrana ADAM17 (Howlin et al., 2006). Una vez liberada, AREG se une al receptor de EGF (EGFR) en el estroma (Luetteke et al., 1999; Sternlicht et al., 2006b). La señalización de EGFR en las células estromales libera factores de crecimiento que inducen la formación de los TEBs y la proliferación epitelial (Ciarloni et al., 2007; Howlin et al., 2006; Mallepell et al., 2006; Wiesen et al., 1999). Se desconoce con precisión cuál o cuáles factores de crecimiento liberados por el estroma son los que realmente inducen la proliferación epitelial en la pubertad, pudiendo ser una combinación entre varios (Macias & Hinck, 2012). Los FGFs son altamente expresados en el estroma y el receptor 2 de FGF (FGFR2) es necesario en el epitelio para la elongación ductal (Macias & Hinck, 2012).

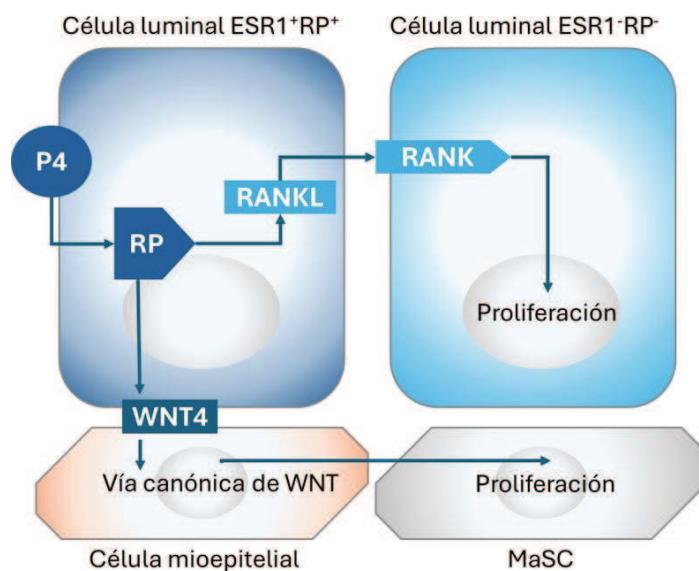


**Figura 3.** Señalización de estrógenos y de la hormona del crecimiento en el TEB. Los estrógenos actúan sobre las células epiteliales que expresan el ESR1 (indicadas en azul oscuro). La señalización del ESR1 induce la expresión de amfiregulina que se une al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en las células estromales. La hormona del crecimiento se une a su receptor en los fibroblastos estromales, los cuales liberan el factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1). Figura modificada de Paine & Lewis (2017).

Los efectos de la vía de señalización de E2/ESR1 potencian sinéricamente la estimulación del desarrollo ductal mediada por IGF-1 (Ruan & Kleinberg, 1999). La hormona del crecimiento se une a su receptor en los fibroblastos estromales e induce la producción de IGF-1 que actúa de manera paracrína en el epitelio mamario (Figura 3) al unirse a su receptor (Macias & Hinck, 2012). La señalización del IGF-1 promueve la formación de los TEBs, la proliferación epitelial y la elongación de los conductos (Kleinberg & Ruan, 2008; Ruan & Kleinberg, 1999). Además, el IGF-1 también es inducido en las células epiteliales de los TEBs, siendo fundamental para la bifurcación de los conductos (Loladze et al., 2006).

### 1.2.2.2 | Señalización de P4 y el RP

Si bien la señalización del RP no es esencial en la pubertad, contribuye a la formación de TEBs y a la proliferación epitelial (Aupperlee et al., 2013; Shi et al., 2004). Al igual que el E2, la señalización de la P4 a través del RP induce la expresión de AREG en el epitelio mamario (Aupperlee et al., 2013). Por otro lado, la señalización del RP (Figura 4) induce la expresión del miembro 4 de la familia de WNTs (WNT4) y del ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B (RANKL) (Brisken & Scabia, 2020). WNT4 activa la vía canónica de señalización de WNT en el mioepitelio, donde regula el nicho de MaSCs, fundamental para la capacidad regenerativa de la glándula mamaria (Lamb et al., 2020; Rajaram et al., 2015). RANKL actúa de manera paracrína en las células epiteliales que expresan su receptor (RANK), estimulando la proliferación epitelial en los conductos mamarios y en los TEBs (Aupperlee et al., 2013).



**Figura 4.** Señalización del receptor de progesterona (RP). La progesterona (P4) se une al RP en las células epiteliales luminales que expresan receptores hormonales. El RP induce la expresión de RANKL y de WNT4. Ambos intermediarios actúan de manera paracrína en células vecinas induciendo la proliferación epitelial y la expansión del nicho de células madre mamarias (MaSCs).

### 1.2.3 | Morfogénesis ductal en organoides mamarios

La elongación ductal dirigida por los TEBs se lleva a cabo por un proceso de migración epitelial colectiva (Ewald et al., 2008). Las células del cuerpo migran dentro del TEB, intercalándose radialmente hacia el estrato más basal, formando la capa epitelial luminal (Huebner et al., 2016). Si bien las células dentro del cuerpo del TEB emiten proyecciones y protrusiones en dirección hacia su desplazamiento, las células en los

bordes de los TEBs presentan una superficie lisa sin extensiones celulares (Ewald et al., 2012; Huebner et al., 2016). En modelos de organoides mamarios, la morfogénesis ductal y la elongación ocurre en diferentes etapas secuenciales, que comparten características similares a los TEBs *in vivo* (Ewald et al., 2008). Primero los organoides se reorganizan en una estructura circular formada por una bicapa epitelial polarizada con lumen central. Luego, el lumen se rellena de células epiteliales para formar estructuras complejas de multicapa epitelial. Finalmente, emergen brotes epiteliales que se elongan mediante proliferación epitelial, presentando bordes suaves sin protrusiones celulares. La región donde ocurre la elongación es siempre una multicapa epitelial, mientras que en las regiones adyacentes presentan una bicapa simple. A su vez, en los organoides en elongación se pueden observar eventos de bifurcación que ocurren en regiones con cubrimiento parcial de células mioepiteliales, mientras que la elongación cesa cuando estas células revisten por completo la ramificación del organoide (Ewald et al., 2008).

### 1.3 | La glándula mamaria adulta

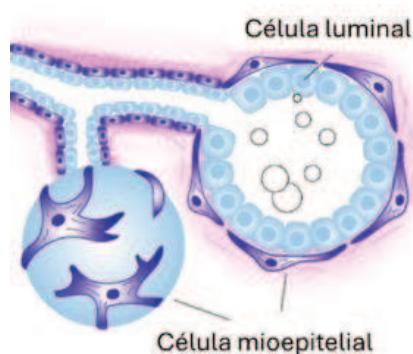
La glándula mamaria adulta atraviesa ciclos de proliferación, ramificación, y regresión en respuesta a los estímulos hormonales del ciclo estral (Fata et al., 2001; Macias & Hinck, 2012). Los niveles de E2 aumentan desde el proestro hasta alcanzar un pico en el estro, para luego declinar abruptamente en el metaestro con la ovulación. La morfología mamaria en estas fases es variable pudiendo presentar ramificaciones terciarias y precursores alveolares en menor o mayor medida (Fata et al., 2001). Por otro lado, los niveles de P4 aumentan durante el metaestro (luego de la ovulación), alcanzan el pico máximo en el diestro, y luego declinan para el proestro y el estro. En la fase diestro, la glándula presenta una extensa cantidad de ramificaciones terciarias y alveolos con lumen, coincidente con elevados niveles de proliferación de las células epiteliales alveolares (Fata et al., 2001). La apoptosis también es elevada en los conductos y los alveolos recién formados en esta fase, de modo que la glándula retorna a una morfología más simple para comenzar un nuevo ciclo, cuando la implantación no ocurre (Brisken & Scabia, 2020; Fata et al., 2001).

La función principal del E2 en la glándula mamaria adulta es inducir la expresión del RP para que promueva la proliferación epitelial cuando los niveles de P4 aumentan. Esta proliferación epitelial ocurre por dos mecanismos distintos (Brisken & Scabia, 2020; Wang et al., 1990). P4 induce la proliferación en algunas células que expresan el RP, mediante la inducción de la ciclina D1. A su vez, la señalización del RP

progresivamente induce la expresión de RANKL, que actúa de manera paracrina en las células epiteliales vecinas induciendo una extensa proliferación epitelial (Aupperlee et al., 2009; Beleut et al., 2010). Este segundo mecanismo es necesario para la ramificación lateral y la formación de los precursores alveolares tanto durante la fase de diestro, como en la preñez (Fernandez-Valdivia et al., 2009, Mukherjee et al., 2010).

#### 1.4 | Desarrollo mamario en la preñez y la lactancia

Durante la preñez, la glándula mamaria murina atraviesa una profunda remodelación morfológica y funcional que culmina con la formación de estructuras alveolares diferenciadas, capaces de sintetizar y secretar leche durante la lactancia (diferenciación funcional) (Macias & Hinck, 2012). Esta transformación está finamente regulada hormonal y molecularmente, e involucra la proliferación epitelial, la ramificación lateral y terciaria de los conductos, la alveogénesis y la maduración de los alveolos (Brisken et al., 1998; Brisken & Scabia, 2020; Lydon et al., 1995). En la glándula mamaria lactante, las estructuras lóbulo-alveolares ocupan casi por completo la glándula, desplazando al tejido adiposo y formando una red funcional dedicada a la síntesis y secreción de leche (Dawson & Visvader, 2021; Macias & Hinck, 2012). El epitelio alveolar se compone de células luminales altamente polarizadas y especializadas en la producción de leche, y por células mioepiteliales contráctiles, cuyas proyecciones rodean los alveolos (Figura 5) (Dawson & Visvader, 2021; Stevenson et al., 2020).



**Figura 5.** Organización celular del epitelio alveolar. Figura modificada de Holliday et al. (2021).

La producción copiosa de leche durante la lactancia se sostiene a demanda de las crías. La succión del pezón estimula la secreción de prolactina (PRL) y de oxitocina (OXT) (Neville et al., 2002; Rudolph et al., 2011). La PRL promueve la expresión de las proteínas de la leche, de genes involucrados en el metabolismo de la glucosa y de la

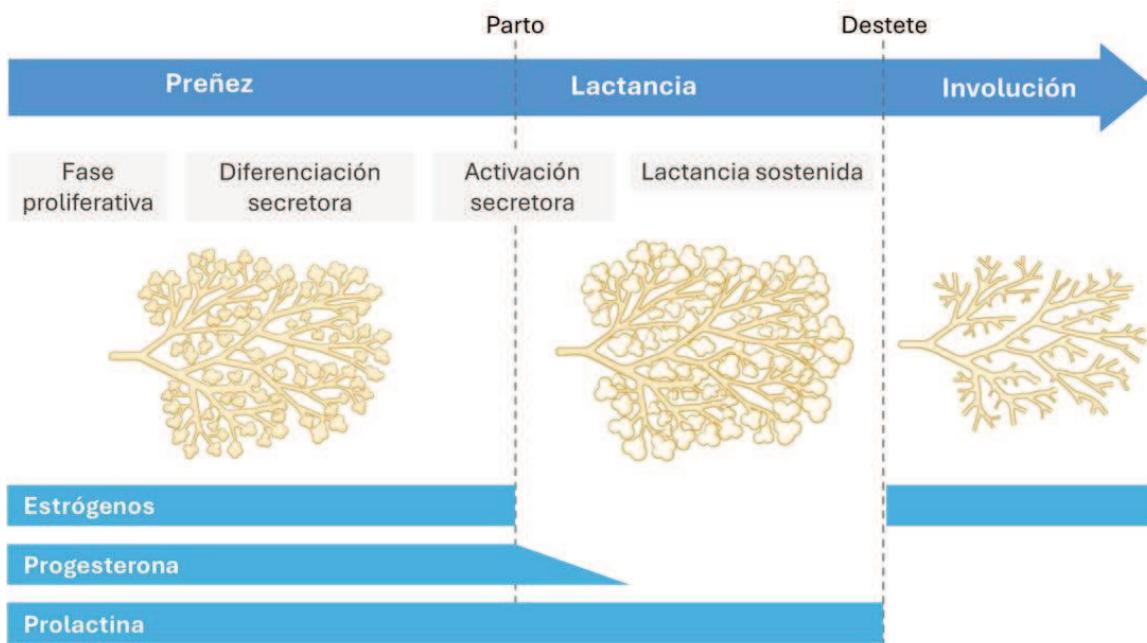
síntesis de lípidos, y evita la apoptosis de las células alveolares (Anderson et al., 2015). La OXT induce la contracción de las células mioepiteliales que expulsa la leche de los alveolos hacia los conductos, y de estos hacia el pezón. Si este proceso se bloquea, y se acumula leche en los alveolos o conductos, se desencadena la involución mamaria (Anderson et al., 2015). Finalizada la lactancia, las células epiteliales mueren por apoptosis, los alveolos colapsan, las células mioepiteliales retraen sus prolongaciones y la lámina basal es remodelada durante la involución (Hitchcock et al., 2020; Stewart et al., 2019; Watson, 2006).

### **1.4.1 | Diferenciación funcional**

La diferenciación funcional de la glándula mamaria murina se puede dividir en tres etapas: (a) la fase proliferativa al inicio de la preñez; (b) la diferenciación secretora que comienza a mediados de preñez, en la cual la glándula se torna competente para sintetizar y secretar los componentes de la leche; y (c) la activación secretora cerca del parto cuando comienza la secreción activa de leche (Anderson et al., 2015). Luego la producción de leche se sostiene por demanda de las crías hasta el destete, cuando la glándula comienza a involucionar y retorna a un estado pre-gestacional (Hannan et al., 2023). En la Figura 6 se muestran las etapas de un ciclo de preñez-lactancia-involución y las principales hormonas involucradas en su regulación.

#### **1.4.1.1 | Fase proliferativa**

Esta etapa inicia con la preñez y se caracteriza por una marcada proliferación epitelial que expande masivamente la población de células progenitoras alveolares (Hannan et al., 2023; Oakes et al., 2006; Yamaji et al., 2013). En esta etapa se promueve la ramificación lateral y terciaria, y la formación de precursores alveolares (Brisken & Scabia, 2020). La proliferación epitelial alcanza un pico máximo cerca del día de preñez 5 para luego ir disminuyendo gradualmente hasta ser prácticamente nula cerca del parto (Anderson et al., 2015).



**Figura 6.** Regulación hormonal en un ciclo de preñez-lactancia-involución. Figura modificada de Hannan et al. (2023).

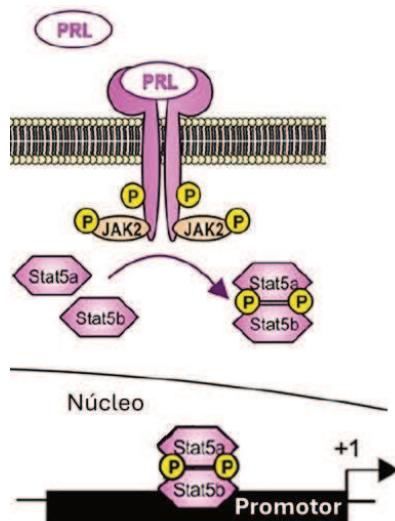
Los niveles elevados de E2 y P4 al inicio de la preñez son el principal estímulo para los procesos que ocurren en esta etapa (Ferreira Slepicka et al., 2021; Lydon et al., 1995). La señalización del ESR1 sostiene un alto nivel de expresión del RP (Cagnet et al., 2018; Hannan et al., 2023), cuya señalización es esencial para inducir la proliferación, la ramificación lateral y terciaria, la formación de precursores alveolares (Oakes et al., 2008a). El RP cumple estas funciones mediante sus intermediarios WNT4 y RANKL (Oakes et al., 2008b). WNT4 modula la actividad de las MaSCs en el epitelio basal (Asselin-Labat et al., 2010; Joshi et al., 2010; Rajaram et al., 2015), y si bien es esencial para la formación de precursores alveolares (Joshi et al., 2015), no es suficiente para inducir una alveogénesis completa (Kim et al., 2009). RANKL induce la proliferación epitelial, estimula la ramificación lateral, y la formación de los precursores alveolares, mediante los mecanismos descriptos anteriormente en la fase de diestro (Beleut et al., 2010; Fernandez-Valdivia et al., 2009; Mukherjee et al., 2010). En paralelo, RANKL induce la expresión del factor 5 similar al E74 (ELF5), intermediario de la vía de señalización de PRL, y un factor de transcripción clave en la diferenciación alveolar (Ferreira Slepicka et al., 2021; Lee et al., 2013).

#### 1.4.1.2 | Diferenciación secretora

Esta etapa comienza a mediados de preñez, se caracteriza por cambios bioquímicos que preparan a la glándula para la síntesis y secreción activa de los componentes de

la leche (Anderson et al., 2015; Neville et al., 2002). La señalización de PRL promueve la maduración alveolar y es el principal estímulo para la síntesis de los componentes de la leche, mientras que la insulina facilita la transición de una glándula proliferativa hacia una diferenciada (Neville et al., 2013). La expresión de las proteínas de la leche como  $\beta$ -caseína (CSN2),  $\alpha$ -lactoalbúmina (LALBA), y la proteína acídica del suero (WAP), incrementa progresivamente en esta etapa (Anderson et al., 2015). Además, incrementa la expresión de las enzimas de la síntesis de lípidos, y entre los días de preñez 8-10 se acumulan las gotas lipídicas citoplasmáticas en el epitelio alveolar luminal (McManaman et al., 2004; Rudolph et al., 2003, 2011; Schwertfeger et al., 2003). La proporción del tejido adiposo glandular disminuye a medida que la expansión lóbulo-alveolar avanza (Anderson et al., 2015; Rudolph et al., 2003). A finales de la preñez, la glándula comienza a producir pequeñas cantidades de secreción que se evidencia en el lumen alveolar (Nguyen et al., 2001). Los niveles circulantes de PRL aumentan considerablemente en el último tercio de la preñez, lo que se asocia con el incremento en la actividad de síntesis de los componentes de la leche (Neville et al., 2002).

La PRL actúa sobre el receptor de prolactina (PRLR) en la membrana de las células epiteliales luminales actuando directamente sobre ellas. La unión de PRL al PRLR induce su homodimerización y activación de la quinasa Janus 2 (JAK2), que se encuentra asociada constitutivamente al PRLR (Oakes et al., 2008b; Radhakrishnan et al., 2012). La JAK2 activada fosforila al dominio citoplasmático del PRLR, que induce el reclutamiento y fosforilación del transductor de señales y activador de la transcripción 5 (STAT5) (Oakes et al., 2008b; Radhakrishnan et al., 2012). El STAT5 se expresa en las isoformas a (STAT5a) y b (STAT5b), que comparten alrededor del 90% de identidad y difieren solo en su carboxilo terminal (Brisken & Rajaram, 2006). Estas moléculas fosforiladas se dimerizan (pSTAT5a/b) y se translocan al núcleo, donde se une a regiones específicas del ADN, activando la transcripción de genes involucrados en la diferenciación funcional, incluyendo a las proteínas de la leche (Figura 7) (Oakes et al., 2008b; Shin et al., 2019). Por otro lado, la señalización del PRLR también induce la expresión del factor de transcripción ELF5 que promueve la diferenciación de progenitores luminales hacia células alveolares completamente diferenciadas (Brisken et al., 1999; Oakes, et al., 2008a, 2008b; Ormandy et al., 2003). La pérdida de ELF5 conduce a una activación deficiente de STAT5 y a defectos en la alveologénesis (Oakes et al., 2008a, 2008b).



**Figura 7.** Vía de señalización de la PRL. Figura modificada de Altamirano et al. (2020).

#### 1.4.1.3 | Activación secretora

La activación secretora es el inicio de la secreción copiosa de la leche (Anderson et al., 2015). Durante la preñez, los niveles elevados de P4 no permiten el cierre de las uniones estrechas entre las células alveolares, y atenuan la expresión de las proteínas de la leche (Buser et al., 2007; Hannan et al., 2023). De esta manera, se mantiene inhibida la secreción activa de la leche previniendo la lactancia prematura (Anderson et al., 2015). En los ratones, cerca del parto caen los niveles plasmáticos de P4 mientras que aumentan los de PRL, lo que induce el cierre de las uniones estrechas de las células alveolares, aumenta la síntesis de las proteínas lácteas, e inicia la secreción copiosa de leche (Naylor et al., 2005; Hannan et al., 2023). Los glucocorticoides participan con la PRL en estos cambios, además de promover el desarrollo de organelas como el retículo endoplasmático rugoso en las células alveolares, necesario para alta demanda de síntesis proteica (Wintermantel et al., 2005). El incremento en la síntesis de lactosa establece un gradiente osmótico que arrastra gran cantidad de agua, lo que resulta en la secreción de cantidades copiosas de leche hacia el lumen alveolar (Anderson et al., 2007). La ausencia de gotas lipídicas citoplasmáticas en las células alveolares luminales evidencia que la activación secretora ha ocurrido (Anderson et al., 2007). La señalización de PRL actúa a través de la proteína de unión a elementos de respuesta a esteroles para regular la síntesis de lípidos (Anderson et al., 2007; Rudolph et al., 2011).

#### 1.4.2 | Diferenciación funcional en organoides mamarios

En las últimas décadas, los avances en modelos de cultivo tridimensionales han permitido estudiar la diferenciación funcional de la glándula mamaria en condiciones controladas (Mroue & Bissell, 2012). Los organoides mamarios, derivados de fragmentos epiteliales cultivados en matrices como colágeno I o Matrigel, reproducen con alta fidelidad la morfogénesis y diferenciación alveolar *in vivo* (Emerman et al., 1977; Simian et al., 2001; Sumbal et al., 2020a). Utilizando estímulos lactogénicos adecuados como PRL, glucocorticoides e insulina, se puede inducir la expresión de CSN2, LALBA, y WAP, utilizadas como marcadores de diferenciación funcional (Mroue & Bissell, 2012; Rosen et al., 1999). Estos modelos han demostrado que la rigidez de la matriz, la interacción con la ECM y la arquitectura tridimensional son elementos críticos para la adquisición de la funcionalidad epitelial (Ferreira Slepicka et al., 2021; Sumbal et al., 2020a).

#### 1.4.3 | Proteínas de la leche

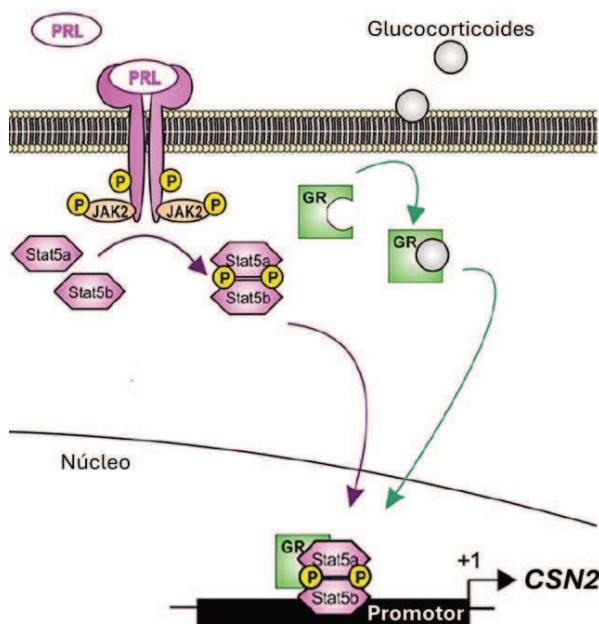
La leche se compone de proteínas (principalmente caseínas), lípidos (triglicéridos) hidratos de carbono (lactosa y oligosacáridos), vitaminas, minerales, factores de crecimiento, y agua (Anderson et al., 2015). La cantidad relativa de estas sustancias varía entre especies según el requerimiento de las crías (Anderson et al., 2015), y también varía en función de la etapa de la lactancia (Allen et al., 1991), y el estado nutricional de la madre (Wahlig et al., 2012). La variación inter-especie en la composición de la fracción proteica de la leche, y de los componentes proteicos relacionados con los demás nutrientes, sugiere que estas están reguladas transcripcional y/o post-transcripcionalmente (Anderson et al., 2015).

En los humanos el contenido proteico de leche inicia en un 3 %, pero desciende al 1.5 % para la segunda semana de lactancia (Allen et al., 1991). Las caseínas representan el 80 % del contenido proteico total, forman micelas insolubles que en su interior contienen grandes cantidades de calcio y fosfato (Anderson et al., 2015). Otras proteínas se encuentran en el suero (fracción soluble en agua), o se asocian a la membrana que rodea los glóbulos grasos de la leche. En los ratones, la leche contiene un 12 % de proteínas que incluyen a las caseínas, LALBA, WAP, lactoferrina e inmunoglobulina A secretora entre otras (Anderson et al., 2007).

La expresión de las proteínas de la leche varía durante la gestación y la lactancia (Anderson et al., 2015; Neville et al., 2002; Rudolph et al., 2003). La mayoría de las caseínas, incluyendo a CSN2, se expresan desde el inicio de la preñez, mientras que

la expresión del transcripto de WAP comienza entre los días de preñez 7-12. Al inicio de su expresión, estas proteínas presentan solo un 30 % del nivel que alcanzan para el día de preñez 17, y luego de la activación secretora su expresión aumenta moderadamente (Anderson et al., 2015). En cambio, la expresión de LALBA incrementa hasta unas 20 veces durante la activación secretora (Anderson et al., 2015). LALBA es un cofactor esencial de la galactosiltransferasa y juntas forman el complejo enzimático de la lactosa sintetasa, que sintetiza lactosa a partir de glucosa y UDP-galactosa. La presencia de LALBA es limitante para esta reacción, por lo que su baja expresión durante la preñez previene la síntesis prematura de lactosa, antes de que inicie la secreción copiosa de leche (Sadovnikova et al., 2021).

Los genes que codifican para las proteínas de la leche son regulados por las hormonas lactogénicas PRL, insulina e hidrocortisona, que junto con la cooperación de los factores de crecimiento locales y las interacciones célula-célula o célula-ECM activan factores de transcripción específicos, alteran la organización del citoesqueleto, y cambian el estado de la cromatina y estructuras nucleares (Rosen et al., 1999). La señalización del PRLR a través de STAT5 es crucial para la expresión de CSN2, WAP y LALBA (Reichenstein et al., 2011; Rosen et al., 1999). El receptor de glucocorticoides (GR) también participa como factor de transcripción de estas proteínas potenciando su expresión (Figura 8) (Rosen et al., 1999; Sadovnikova et al., 2021).



**Figura 8.** Inducción de la expresión de CSN2 por PRL y los glucocorticoides. Además de la señalización del receptor de PRL mediante STAT5a/b fosforilado, el receptor de glucocorticoides (GR) también actúa como factor de transcripción del promotor de CSN2. Figura modificada de Altamirano et al. (2020).

Además, en la expresión de WAP y CSN2 participan otros factores de transcripción, como el factor nuclear 1 y C/EBP $\beta$ , respectivamente (Rosen et al., 1999). La activación de STAT5 es potenciada por señales provenientes de la ECM, especialmente por la interacción entre las  $\beta$ -integrinas y lamininas en la lámina basal, que además establecen la polaridad apico-basal de las células alveolares (Asselin-Labat et al., 2007; Naylor et al., 2005; Rooney et al., 2016).

Las modificaciones epigenéticas constituyen otro mecanismo de regulación de la expresión de las proteínas lácteas en la diferenciación funcional (Rijnkels et al., 2010). La metilación del gen de CSN2 es menor en ratones hembra preñadas o en lactancia que en nulíparas, permitiendo la unión de factores de transcripción en sitios específicos que regulen su expresión (Rijnkels et al., 2013). En el caso de LALBA, el estado de metilación de sus histonas se asocia a una organización abierta de la cromatina (Rijnkels et al., 2013). La expresión de CSN2 también es regulada a nivel translacional, por ejemplo, por la poliadenilación de su transcripto y por la disponibilidad de aminoácidos (Rhoads & Grudzien-Nogalska, 2007).

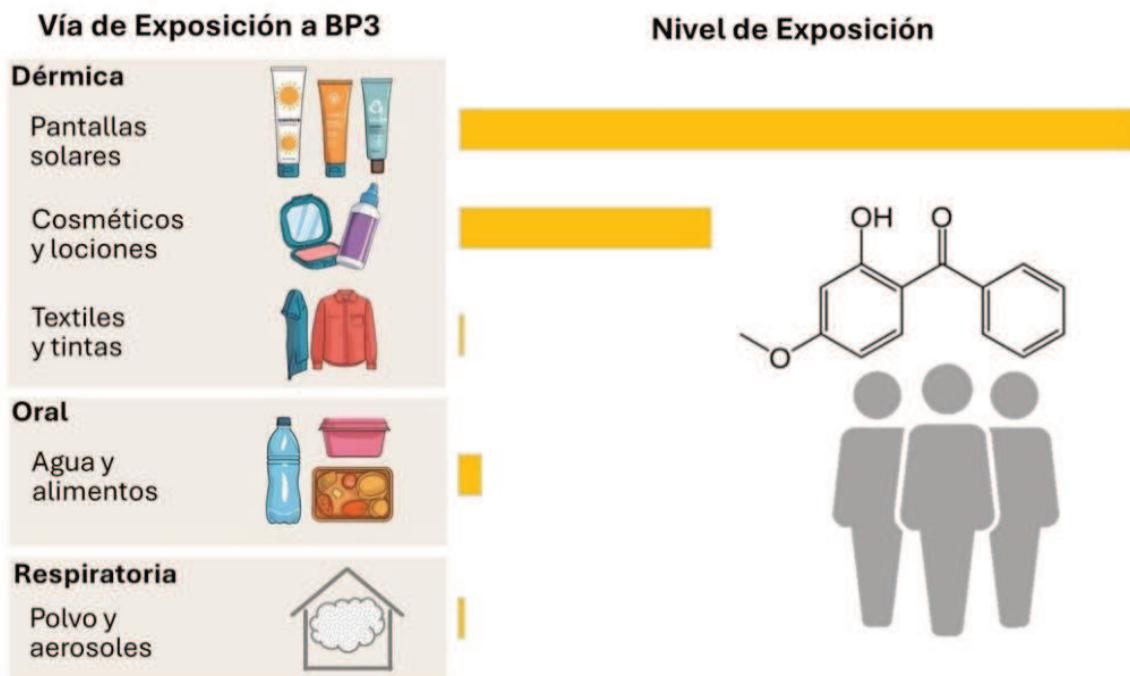
## 2 | Perturbadores endócrinos

El crecimiento de la industria de síntesis de sustancias químicas genera contaminantes ambientales que amenazan la salud humana y de los ecosistemas (Fuller et al., 2022; Johnson et al., 2020; Naidu et al., 2021; Stoker et al., 2008), siendo los países de bajos y medianos ingresos las regiones más vulnerables (Fuller et al., 2022; Woodruff et al., 2023). El uso de las sustancias químicas en la industria supone un beneficio para el desarrollo económico y la vida diaria de las personas. Sin embargo, solo una pequeña fracción de ellas ha sido adecuadamente evaluada y considerada segura para la salud de las personas y de los animales (Johnson et al., 2020; Naidu et al., 2021; Vandenberg, 2021). Una amplia variedad de estas sustancias ha sido catalogada como perturbadores endócrinos (PE) por poseer actividad hormonal inadvertida (Gore et al., 2015; La Merrill et al., 2020; Naidu et al., 2021). Los PE pueden interferir con la actividad y expresión de los receptores hormonales, la transducción de sus señales; el metabolismo de las hormonas; la proliferación, migración, diferenciación, o muerte celular; e inducir modificaciones epigenéticas (Gore et al., 2015; La Merrill et al., 2020; McLachlan, 2001; Naidu et al., 2021). Existen períodos críticos del desarrollo que son más vulnerables a los efectos de los PE como el gestacional, neonatal, o puberal. La exposición en estos períodos se asocia a un mayor riesgo de problemas crónicos de salud, incluyendo la obesidad, la reproducción,

y algunos tipos de cáncer como el testicular, cervical, uterino y mamario (Casals-Casas & Desvergne, 2011; Fuller et al., 2022; Ghassabian et al., 2022; Gore et al., 2015; La Merrill et al., 2020; Rochester, 2013; Soto et al., 2013; Terry et al., 2019; Vandenberg, 2021; Woodruff et al., 2023). La exposición a estas sustancias puede alterar el crecimiento de la glándula, el desarrollo alveolar, la diferenciación bioquímica y estructural de las células alveolares, y la síntesis y secreción de los componentes de la leche, afectando la calidad de la misma y la duración de la lactancia (Altamirano et al., 2015, 2017b; Criswell et al., 2020; Hannan et al., 2023; Kam et al., 2021; Kass et al., 2012; Kay et al., 2022).

## **2.1 | Benzofenona-3**

Las benzofenonas son un grupo de sustancias de producción masiva con capacidad de actuar como filtro de rayos ultravioletas (UV). Debido a esto, se adicionan en numerosos productos de uso personal para prevenir los efectos adversos de la radiación UV sobre la piel (Mustieles et al., 2023; Yao et al., 2024). Además, se utilizan como estabilizador para prevenir la fotodegradación en coberturas plásticas, materiales electrónicos y de construcción, tintas, textiles, y contenedores de alimentos (Yao et al., 2024). Particularmente, benzofenona-3 (BP3, oxibenzona, difenil cetona, o 2-hidroxi-4-metoxibenzofenone) es la más ampliamente utilizada en la composición de cremas protectoras solares y cosméticos (Mustieles et al., 2023), por lo que la vía dérmica es su principal ruta de exposición en humanos (Figura 9) (Janjua et al., 2008; Matta et al., 2020; Mustieles et al., 2023). Junto con otros bloqueantes solares ha demostrado actividad estrogénica al presentar afinidad por el ESR1 (Schreurs et al., 2002, 2005), inducir la proliferación celular en la línea mamaria tumoral MCF-7, y por ensayo uterotrópico (Schlumpf et al., 2001); por lo que puede catalogarse como xenoestrógeno. Debido a su detección ubicua en el ambiente y en muestras biológicas humanas, se ha puesto gran atención a los posibles efectos de BP3 sobre la salud (Mao et al., 2022; Mustieles et al., 2023; Wnuk et al., 2022; Yao et al., 2024). Es un compuesto altamente lipofílico, por lo que es capaz de bioacumularse afectando tanto a animales como a seres humanos (Yao et al., 2024). Ha sido detectado en cantidades significativas en la grasa de pescados en concentraciones similares a otros xenoestrógenos (Balmer et al., 2005; Schlumpf et al., 2001), en distintos ambientes acuáticos (Balmer et al., 2005; Cuderman & Heath, 2007; Loraine & Pettigrove, 2006), y en agua potable (Lorraine & Pettigrove, 2006; Stackelberg et al., 2004).



**Figura 9.** Vías de exposición a BP3 y esquema ilustrativo comparando el nivel de exposición según el origen. La vía dérmica es la principal vía de exposición en humanos, seguida de la exposición oral. La exposición a BP3 por el contacto de la ropa y tintas con la piel, al igual que con la vía respiratoria es despreciable en comparación con las demás fuentes de exposición.

BP3 es el filtro UV detectado en mayor concentración en plasma y orina luego de 1-4 horas posteriores a la aplicación de protectores solares sobre la piel (Janjua et al., 2008), y puede detectarse incluso días posteriores (Matta et al., 2020). Entre los diferentes filtros UV, BP3 ha sido ampliamente detectado en la orina a nivel global en estudios de biomonitorio (Huang et al., 2021), y el detectado con más frecuencia en muestras biológicas pareadas materno-fetales (suero, orina, placenta, líquido amniótico, y sangre de cordón umbilical) indicando transferencia placentaria en humanos (Song et al., 2020). También ha sido detectado en tejido mamario humano (Barr et al., 2018) y muestras de leche materna (Molins-Delgado et al., 2018; Schlumpf et al., 2010) indicando una posible transferencia a los bebés durante la lactancia. Se ha reportado que la exposición a BP3 o a otros filtros solares retrasan la pubertad masculina, modifican el peso de órganos reproductivos, alteran los niveles de expresión de genes dependientes de estrógenos y co-reguladores asociados en útero, glándula mamaria próstata y cerebro de ratas adultas, y perturban la conducta sexual y la regularidad del ciclo estral, entre otros efectos (Kariagina et al., 2020; LaPlante et al., 2018; Majhi et al., 2020; Mustieles et al., 2023; Schlecht et al., 2004).

Respecto a la glándula mamaria, estudios recientes indican que es un órgano blanco sensible a la acción de BP3 como perturbador endocrino. La exposición oral a BP3 durante la preñez y lactancia en ratones hembra BALB/c alteró la densidad ductal y

proliferación celular en la glándula mamaria, luego de la involución post-destete (LaPlante et al., 2018). Además, la glándula mamaria de sus crías hembras (expuestas perinatalmente a BP3) presentó mayor extensión de los conductos, menor expresión epitelial del RP y un incremento transitorio en la infiltración de mastocitos (Matouskova et al., 2020, 2022a).

En estudios previos *in vivo*, hemos demostrado que la exposición perinatal a bisfenol A (BPA), compuesto con actividad estrogénica y anti-androgénica, produce un retraso en el desarrollo mamario durante la gestación, modifica el contenido lipídico y la expresión de proteínas de la leche; especialmente CSN2, que se encuentra disminuida en la leche (Altamirano et al., 2015, 2017b; Kass et al., 2012). Teniendo en cuenta estos antecedentes, nuestra hipótesis de trabajo supone que la exposición a bajas concentraciones de BP3 durante períodos críticos de la organogénesis de la glándula mamaria modifica su desarrollo afectando a largo plazo la producción de la leche. Para poner a prueba esta hipótesis se evaluaron los efectos de la exposición a BP3 sobre el desarrollo puberal y la diferenciación funcional de la glándula mamaria utilizando modelos experimentales tanto *in vivo* como *in vitro*.

# OBJETIVOS

## 1 | Objetivo general

Evaluar los efectos de la exposición a BP3 sobre el desarrollo ductal y diferenciación funcional de la glándula mamaria de roedores utilizando modelos *in vivo* e *in vitro*.

## 2 | Objetivos específicos

Nuestra hipótesis de trabajo supone que la exposición a PEs en bajas concentraciones durante períodos críticos de la organogénesis de la glándula mamaria modifica su desarrollo afectando a largo plazo la producción de la leche. Para poner a prueba esta hipótesis, se evaluaron los efectos de la exposición a BP3 sobre el desarrollo ductal y la diferenciación funcional de la glándula mamaria, utilizando diferentes modelos *in vivo* e *in vitro*.

### 2.1 | Analizar los efectos de la exposición directa a BP3 sobre:

- **El desarrollo ductal mamario *in vitro*.** Analizar la morfología de la ramificación ductal y su regulación hormonal, en cultivos primarios de organoides mamarios murinos expuestos a BP3 durante la inducción de la morfogénesis ductal *in vitro*.
- **La diferenciación funcional mamaria *in vitro*.** Analizar la maduración alveolar, y la expresión y regulación hormonal de los marcadores de diferenciación funcional CSN2, LALBA y WAP, en cultivos primarios de organoides mamarios murinos expuestos a BP3 durante la inducción de la diferenciación funcional *in vitro*.

### 2.2 | Evaluar los efectos de la exposición a BP3 durante la gestación analizando:

- **El desarrollo ductal de la glándula mamaria *in vivo*.** Evaluar el crecimiento ductal a nivel morfológico, la histoarquitectura, y su regulación hormonal en muestras de glándula mamaria de ratones F1 hembra puberales, previamente expuestas a BP3 durante la gestación.
- **La diferenciación funcional de la glándula mamaria *in vivo*.** Evaluar la maduración alveolar, y la expresión de los marcadores de diferenciación funcional CSN2, LALBA y WAP, en muestras de glándula mamaria de ratones F1 hembra adultas, previamente expuestas a BP3 durante la gestación, que se encuentren lactando a sus crías F2.

## Objetivos

- **La diferenciación funcional de la glándula mamaria *in vitro*.** Evaluar la maduración alveolar y la expresión de marcadores de diferenciación funcional CSN2, LALBA y WAP analizando los mecanismos de acción implicados, en explantes mamarios diferenciados *in vitro*, obtenidos de ratones F1 hembra pre-puberales (previamente expuestas durante la gestación a BP3), estimuladas con E2 y P4 para inducir el desarrollo lóbulo-alveolar.

# **CAPÍTULO 1**

**EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN DIRECTA A BENZOFENONA-3  
SOBRE LA MORFOGÉNESIS DUCTAL Y LA DIFERENCIACIÓN  
FUNCIONAL DE ORGANOIDES MAMARIOS**

## 1 | INTRODUCCIÓN

La organización tridimensional (3D) de los tejidos, junto con la composición de la ECM, las interacciones célula-célula y célula-ECM, constituyen el microambiente esencial que regula la morfología, el comportamiento, la diferenciación y la función de las células (Kass et al., 2007; Sumbal et al., 2020b). En cultivos celulares, la presencia de señales provenientes de la ECM es fundamental para conservar las características fisiológicas del tejido de origen, incluidas la expresión génica y la polaridad celular (Lo et al., 2012). Por lo tanto, en comparación con otros modelos *in vitro*, los cultivos primarios de organoides mamarios en 3D representan una herramienta experimental altamente relevante. Este modelo se basa en la obtención de fragmentos epiteliales provenientes de la glándula mamaria, los cuales se cultivan en ECMs que simulan el microambiente *in vivo* (Simian & Bissell, 2017). A diferencia de los cultivos 2D, permiten preservar la arquitectura tisular, la organización celular, y la expresión de receptores hormonales clave como el ESR1 y el RP (Brisken & Scabia, 2020; Novaro et al., 2003).

Dependiendo de la composición de la matriz utilizada y otras condiciones de cultivo, se pueden reproducir distintos aspectos del desarrollo mamario. En matrices ricas en laminina los organoides mamarios se organizan en estructuras acinares con bicapa epitelial polarizada y lumen central, similares a los alvéolos mamarios (Mroue & Bissell, 2012). Por otro lado, en presencia del factor de crecimiento fibroblástico-2 (FGF-2), los organoides activan un programa estereotipado de morfogénesis ductal (Ewald et al., 2008). Los patrones de desarrollo ductal varían según la matriz utilizada. El colágeno tipo I promueve un crecimiento de tipo invasivo con extensas proyecciones ductales (Nguyen-Ngoc et al., 2012), mientras que su combinación con laminina induce la formación de múltiples brotes formados por una multicapa epitelial en su frente de crecimiento y una bicapa adyacente. Estos se asemejan a la organización epitelial de los TEBs *in vivo* (Nguyen-Ngoc & Ewald, 2013). Durante el desarrollo ductal de la glándula mamaria, la activación del ESR1 en las células epiteliales luminales induce la expresión de AREG, un mediador clave en la promoción del crecimiento ductal a través de los TEBs, junto con el IGF-1 (Sternlicht et al., 2006b). Por otro lado, la activación del RP también contribuye al crecimiento ductal mamario, en diferentes etapas del desarrollo, a través de la inducción de AREG, WNT4, y RANKL (Brisken & Scabia, 2020).

Los cultivos 3D, también permiten modelar la diferenciación funcional del epitelio mamario. En matrices ricas en laminina, los organoides se polarizan de manera baso-apical y forman uniones estrechas, lo que permite secretar las proteínas de la leche

vectorialmente hacia el lumen (Barcellos-Hoff et al., 1989; Streuli et al., 1991). Estas proteínas lácteas, principalmente CSN2, LALBA, y WAP, se inducen frente a estímulos lactogénicos como PRL, insulina e hidrocortisona (Chen & Bissell, 1989; Emerman et al., 1977). La presencia de laminina es indispensable para la síntesis de CSN2, mientras que para inducir la expresión de WAP es necesario que los organoides se organicen en estructuras acinares de tipo alveolar (Barcellos-Hoff et al., 1989; Streuli et al., 1991), condiciones que se garantizan al utilizar una matriz rica en laminina. Además, la señalización mediada por el PRLR y el GR se conserva en este modelo, y la activación de STAT5a por PRL es clave para la diferenciación funcional y la expresión de las proteínas de la leche (Liu et al., 1997).

Dado que los cultivos primarios 3D recapitulan con alta fidelidad los procesos de desarrollo ductal y diferenciación funcional de la glándula mamaria, constituyen un modelo adecuado para estudiar los efectos de los PEs. Previamente, demostramos que la exposición perinatal a BPA altera la diferenciación funcional de la glándula mamaria de la rata, afectando la expresión de proteínas de la leche y la regulación transcripcional de CSN2 (Altamirano et al., 2017b; Kass et al., 2012). En este capítulo se evaluarán los efectos de la exposición directa a BP3 sobre la morfogénesis ductal y la diferenciación funcional mamaria, utilizando cultivos 3D de glándula mamaria murina. Además, también se analizarán los efectos de BPA sobre la diferenciación funcional para comparar los mecanismos de acción de ambos PEs.

## 2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS

El objetivo de este Capítulo fue evaluar los efectos de la exposición directa a BP3 sobre el desarrollo ductal y la diferenciación funcional de la glándula mamaria murina utilizando modelos *in vitro* (sección 2.1 del apartado Objetivos, pág. 39).

## 3 | MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 | Preparación de soluciones y concentraciones a evaluar

Se utilizó BPA (99% pureza, CAS N°: 80-05-7, peso molecular: 228.29) y BP3 (98% pureza, CAS N°: 131-57-7, peso molecular: 228.24) adquiridos en Sigma-Aldrich (Argentina). Para cada sustancia, se realizó una solución madre de 2 mg/mL ( $9 \times 10^{-3}$  M) en etanol absoluto. Luego con medio de cultivo se preparó una solución intermedia de  $1 \times 10^{-4}$  M (1.2 % etanol). A partir de esta, por diluciones sucesivas con medio de cultivo se prepararon las soluciones de trabajo:  $1 \times 10^{-6}$  M y  $1 \times 10^{-9}$  M BPA, y  $1 \times 10^{-6}$

M,  $1 \times 10^{-9}$  M y  $1 \times 10^{-12}$  M BP3. En todas ellas el porcentaje de etanol fue igual o menor a 0.01 %. Esto se realizó para cada experimento. Como control negativo se utilizó una solución de 0.01 % de etanol absoluto en medio de cultivo (vehículo, VEH).

Las concentraciones utilizadas de BPA se basaron en niveles reportados en muestras biológicas provenientes de mujeres embarazadas: 2.86  $\mu\text{g}/\text{L}$  ( $1.2 \times 10^{-8}$  M) en orina,  $1.56 \mu\text{g}/\text{L}$  ( $6.8 \times 10^{-9}$  M) en suero y  $0.74 \mu\text{g}/\text{L}$  ( $3.2 \times 10^{-9}$  M) en leche materna (Lee et al., 2018). Respecto a las concentraciones de BP3 utilizadas, éstas se basaron en la concentración ambiental predictiva que no produce efectos: 1.32  $\mu\text{g}/\text{L}$  ( $5.8 \times 10^{-9}$  M) (Kim & Choi, 2014), niveles reportados en leche materna: 144.8 ng/g ( $1.7 \times 10^{-9}$  M; considerando una densidad promedio de la leche materna de  $27.5 \text{ kg/m}^3$ ) (Molins-Delgado et al., 2018), y las concentraciones plasmáticas de BP3 en el suero luego de una aplicación de crema solar en todo el cuerpo: 200  $\mu\text{g}/\text{L}$  ( $0.9 \times 10^{-6}$  M) (Janjua et al., 2008).

### **3.2 | Obtención de organoides mamarios**

#### **3.2.1 | Animales**

Se utilizaron ratones hembra de las cepas BALB/cCmedc y C57BL/6, provenientes del Centro de Medicina Comparada del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral [Universidad Nacional del Litoral (UNL) - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)] y del Centro Atómico de Ezeiza (Buenos Aires, Argentina), respectivamente. Luego de la llegada de los animales al bioriego del Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL; UNL-CONICET), se mantuvieron 15 días en condiciones controladas ( $20 \pm 2^\circ \text{C}$ ; 14 h de luz desde las 06 hasta las 20 h), tuvieron libre acceso a agua y comida (16-014,007 Rata-ratón, Nutrición Animal, Rafaela, Argentina), y se los manipuló lo más humanamente posible. El protocolo experimental fue diseñado de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos, y aprobado por el Comité de Ética y Seguridad de la Investigación de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB) - UNL, Santa Fe, Argentina (Protocolo #CE2019-36; 10/21/2019).

#### **3.2.2 | Mastectomía**

Se obtuvieron asépticamente las glándulas mamarias de ratones hembra nulíparas ( $n = 8-10$  animales por ensayo) de 8 semanas de edad, en diestro (determinado por

extendidos vaginales), siguiendo protocolo establecido en nuestro laboratorio y basado en bibliografía de referencia (Davis & Fenton, 2013; Kass et al., 2004; Rasmussen et al., 2000). Los animales se sacrificaron mediante cámara de CO<sub>2</sub> y posterior dislocación cervical. Los animales se colocaron con el abdomen hacia arriba sobre una tabla de disección, y se desinfectó el campo quirúrgico con etanol 70°. Se realizó una incisión por la línea media partiendo desde el pubis justo por encima del área genital, en dirección hacia el tórax hasta la altura de la tráquea, procurando cortar solo la piel, y no el músculo. Desde los extremos de la primera incisión, se realizaron nuevas incisiones en dirección oblicua hacia las extremidades superiores e inferiores. Esto permitió separar la piel del tejido muscular de los flancos izquierdo y derecho, estirarla y sujetarla sobre la tabla de disección. De esta manera, quedaron al descubierto las cadenas mamarias torácicas y abdominales de ambos lados, que permanecen adheridas a la piel. De las mismas se diseccionaron los pares mamarios N° 3 (torácico), 4 y 5 (abdominales), y se mantuvieron humedecidas con medio de cultivo estéril, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Invitrogen, Argentina), en una placa de Petri estéril hasta continuar con la digestión del tejido y el aislamiento de los organoides mamarios.

### **3.2.3 | Aislamiento de organoides mamarios**

Siguiendo los protocolos descriptos por Lo et al. (2012) y Nguyen-Ngoc (2015), las glándulas mamarias fueron disgregadas mecánicamente con bisturí en condiciones estériles, y luego enzimáticamente a 37 °C por 30 min con una solución de digestión compuesta por 0.1 % tripsina y colagenasa IV (ambas Sigma-Aldrich), 5 % suero fetal bovino (SFB, Sigma-Aldrich), 5 µg/mL insulina (Sigma-Aldrich) y 50 µg/mL gentamicina (Northia, Argentina). Luego de centrifugar a 1500 rpm por 10 min, se descartó el sobrenadante y el pellet se suspendió en solución de 40 U/mL DNAsa I (Sigma-Aldrich). Las soluciones utilizadas fueron preparadas en medio DMEM/F12 (Gibco). Posteriormente, se realizaron centrifugaciones diferenciales para remover las células aisladas y obtener el pellet enriquecido en *clusters* (agregados) de células epiteliales mamarias, denominados organoides mamarios.

### **3.3 | Cultivo 3D para evaluar ramificación ductal**

Los organoides mamarios destinados al experimento de ramificación ductal fueron obtenidos de ratones hembra BALB/cCmedc. Una vez aislados, se cultivaron embebidos en una ECM elaborada a partir de una mezcla de 50:50 Geltrex®

(Invitrogen) y colágeno I (BD Biosciences, Argentina) disuelto con medio basal: DMEM/F12 suplementado con 0.1 % insulina-transferrina-selenio (ITS; Gibco), 1 % penicilina-estreptomicina (Pen-Strep, Gibco), 50 µg/mL gentamicina (Northia) y 5 % SFB filtrado con carbón activado para reducir su concentración de hormonas y factores de crecimiento (SFB-reducido; Gibco). El cultivo se realizó en placas de 12 pocillos y se incubó por 24 h a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. Luego, el medio basal se reemplazó por medio de ramificación, de composición similar al anterior, pero con DMEM/F12 sin rojo fenol y suplementado con 2.5 nM FGF-2 (Gibco) para inducir la ramificación ductal (Nguyen-Ngoc et al., 2015). El cultivo con medio de ramificación se realizó durante 9 días, renovando el medio cada 48 h. Durante este periodo, los organoides fueron expuestos al VEH (0.01 % etanol) y a tres concentraciones de BP3 ( $1 \times 10^{-6}$  M,  $1 \times 10^{-9}$  M, o  $1 \times 10^{-12}$  M), preparadas según lo detallado en la sección 3.1 de este Capítulo. Las exposiciones se realizaron por duplicado.

Se obtuvieron imágenes digitales representativas de los tratamientos en los días 2, 5, 7 y 9 de inducción de la ramificación, utilizando una cámara de video Spot Insight V3.5 acoplada a un microscopio invertido de contraste de fase Olympus CK40 (Olympus Optical Co., Ltd., Japón). Además, en el día 9 se obtuvieron muestras de organoides ramificados para ensayos de biología molecular (Pinto et al., 2011). El experimento completo se realizó por duplicado.

### 3.3.1 | Score de evaluación del desarrollo ductal

Se realizó una evaluación semicuantitativa de la morfología de los organoides con un sistema de *score* (puntaje), según su grado de ramificación durante el experimento. Los criterios para otorgar el *score* se definieron considerando los pasos secuenciales de la inducción y progresión de la ramificación ductal en organoides (Ewald et al., 2008; Gray et al., 2010; Nguyen-Ngoc et al., 2015): **Grado 1**: organoides circulares (forma de quiste) organizados en una sola capa de células epiteliales rodeando un lumen central. **Grado 2**: organoides esferoidales compactos de bordes suaves, con o sin indicios de ramificación (protuberancias emergiendo desde el cuerpo central). **Grado 3**: organoides con ramificaciones elongando desde el cuerpo central. **Grado 4**: organoides ramificados con repolarización del epitelio en el cuerpo central o sus ramificaciones. La morfología fue analizada por tres evaluadores independientes sin conocer el día experimental ni el tratamiento.

### 3.4 | Cultivo 3D para evaluar diferenciación funcional

Los organoides mamarios destinados al experimento de diferenciación funcional fueron obtenidos de ratones hembra C57BL/6. Los organoides aislados se cultivaron sobre Matrigel® (Corning, EE. UU.) con medio DMEM/F12 sin rojo fenol suplementado con 0.1 % ITS, 1 % Pen-Strep, y 5 % SFB-reducido por 24 h a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. Los medios y reactivos mencionados se adquirieron de Gibco. Luego el medio de siembra fue reemplazado por medio de diferenciación: DMEM/F12 sin rojo fenol suplementado con hormonas lactogénicas (3 µg/mL PRL y 1 µg/mL hidrocortisona, ambas de Sigma-Aldrich), 0.1 % ITS, 1% Pen-Strep y 2 % de Matrigel (Lo et al., 2012). La exposición se realizó por 72 h junto con el cultivo en medio de diferenciación. Las soluciones de exposición utilizadas fueron el VEH (0.01 % etanol), BPA ( $1 \times 10^{-9}$  M, o  $1 \times 10^{-6}$  M) o BP3 ( $1 \times 10^{-12}$  M,  $1 \times 10^{-9}$  M, o  $1 \times 10^{-6}$  M). Se analizó la morfología de organoides estimulados con hormonas lactogénicas y de organoides no estimulados, utilizando un microscopio invertido de contraste de fase Olympus CK40 (Olympus Optical Co., Ltd., Japón) a las 24, 48 y 72 h de incubación. Además, a las 72 h del cultivo se obtuvieron muestras de los organoides diferenciados para ensayos de histología y de biología molecular (Pinto et al., 2011). El experimento completo se realizó por triplicado.

### 3.5 | Obtención y procesamiento de muestras de organoides

Se siguieron los protocolos descriptos por Pinto et al. (2011). Se recolectaron los geles (organoides en su ECM) de los cultivos de organoides ramificados y organoides diferenciados, de los pocillos destinados a ensayos de biología molecular en cada experimento. Los geles se disgregaron con solución de *buffer* (tampón) fosfato (PBS)-ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) pipeteando y descargando repetidas veces, hasta alcanzar homogeneidad (Mroue & Bissell, 2012). El contenido se traspasó a tubos cónicos, se agitaron suavemente 60 min a 4 °C, y se centrifugaron 5 min a 1154 × g a temperatura ambiente. Luego los pellets enriquecidos en organoides se lavaron rápidamente con PBS en tubos de 1.5 mL en hielo, centrifugándolos 5 min a máxima velocidad. Los pellets se disgregaron y homogeneizaron con reactivo TRIzol (Invitrogen, Argentina) utilizando jeringa y aguja de tuberculina 25 G. Durante este proceso, el reactivo mantiene la integridad del ARN por inhibición de la actividad de enzimas ARNasas. Los homogenatos de conservaron a -80 °C hasta continuar con la extracción de ácidos nucleicos.

Para los ensayos histológicos, se recolectaron los geles de los cultivos de organoides diferenciados, que se sellaron entre dos capas (tipo sándwich) de agarosa al 1.5 %.

Luego se fijaron en formol-buffer (10 % de formaldehído en PBS, pH: 7.5) 6 h a temperatura ambiente, se lavaron dos veces con PBS, y se conservaron en etanol 70° hasta continuar con el procesado histológico de rutina (Junqueira & Junqueira, 1983) adaptado para cultivos celulares (Anexo, Tabla A1). Brevemente, las muestras se deshidrataron en alcoholes de graduación creciente (etanol 96°, 100°), luego se realizó el aclaramiento utilizando BioClear (Biopack, Argentina) y se incluyeron en parafina fundida en estufa a 60 °C. Finalmente, las muestras impregnadas de parafina se colocaron en moldes plásticos que se llenaron con parafina fundida, y se dejaron enfriar toda la noche a temperatura ambiente. Los bloques de parafina con los organoides diferenciados se cortaron con micrótomo de rotación (Leica Jung RM2025, Leica Instruments GMT, Alemania) para obtener secciones histológicas de 5 µm de espesor, que se montaron en portaobjetos de vidrio previamente tratados con 3-aminopropil trietoxy-silano (Sigma-Aldrich) como adhesivo tisular, y luego se secaron en estufa a 37 °C toda la noche.

### **3.6 | Caracterización histológica y expresión de receptores hormonales**

Para corroborar el modelo de cultivo 3D de diferenciación funcional, e interpretar los resultados de la exposición directa a los PEs, se caracterizó la histomorfología, la organización tisular, y la expresión de receptores hormonales de los organoides diferenciados. En cada ensayo se analizó un mínimo de 10 organoides por tratamiento, seleccionados aleatoriamente, con una magnificación de 400X.

#### **3.6.1 | Análisis histomorfológico**

La caracterización histológica de los organoides diferenciados se realizó mediante la tinción histoquímica clásica de hematoxilina de Mayer y eosina (H&E; Anexo, Tabla A2). Brevemente, las secciones histológicas de los organoides se desparafinaron en solvente orgánico, se hidrataron en alcoholes de concentración decreciente, se tiñeron con H&E, se deshidrataron en alcoholes de graduación creciente, y se montaron con cubreobjetos utilizando bálsamo de Canadá (Sigma) como líquido de montaje permanente. La histología general se analizó con un microscopio óptico Olympus BH2 (Olympus Optical Co., Ltd., Japón). Se evaluó la formación del lumen central y la morfología de las células epiteliales. También se obtuvieron imágenes digitalizadas con una cámara color digital Spot Insight V3.5 acoplada al microscopio Olympus BH2 para evaluación morfométrica. En cada organoide se midió el área total y el área

luminal utilizando el programa ImageJ (National Institutes of Health -NIH-, EE. UU., [imagej.net/ij/](http://imagej.net/ij/)).

### 3.6.2 | Análisis de la organización tisular y expresión de receptores hormonales

En los organoides diferenciados, utilizando ensayos de inmunofluorescencia (IF) (Anexo, Tabla A3), se detectaron marcadores moleculares para identificar las estirpes celulares presentes en los organoides mamarios aislados, permitiendo diferenciar entre células epiteliales y estromales, y corroborar la correcta polarización celular. Se analizó la localización de  $\beta$ -catenina ( $\beta$ -cat), que se expresa en la membrana basolateral de las células epiteliales luminales; citoqueratina-8 (CK8), que se expresa en células epiteliales luminales; pan-CK (reconoce las CKs 1, 5, 10, y 14), que se expresa en células basales; y la expresión de los receptores hormonales ESR1 y RP. Brevemente, las secciones histológicas se desparafinaron, hidrataron, bloquearon con 10 mg/mL borohidruro de sodio para minimizar la autofluorescencia. La incubación con los anticuerpos primarios de interés (Tabla 1) se realizó toda la noche a 4 °C. Luego, se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes (Tabla 1) por 1 h a temperatura ambiente, los núcleos se marcaron con 4', 6-diamino-2-fenilindol dihidrocloruro (DAPI; Fluka, Sigma-Aldrich), se montaron con ProLong Gold (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Argentina), y se reservaron en oscuridad a 4 °C hasta ser evaluados, según protocolo descripto previamente en Altamirano et al. (2017b). Finalmente, se analizaron con un microscopio Olympus BX-51TRF equipado para detección epifluorescente y con los filtros apropiados (Olympus Optical Co., Ltd., Japón).

### 3.7 | Evaluación de marcadores de diferenciación funcional

En los organoides diferenciados se analizó por IF la expresión de los marcadores de diferenciación funcional CSN2, LALBA y WAP, y de pSTAT5a/b (Tabla 1). La intensidad relativa de la fluorescencia de CSN2, WAP, y LALBA se evaluó en el citoplasma de las células epiteliales y en el lumen alveolar de los organoides diferenciados por medio de la densidad integrada, mientras que la de pSTAT5a/b se evaluó en el citoplasma y el núcleo de las células epiteliales. Las mediciones de la intensidad de la fluorescencia se realizaron con el programa ImageJ. El valor medio de las lecturas de intensidad de la fluorescencia inespecífica en las regiones seleccionadas se substrajo del valor de la densidad integrada, para obtener el valor de la intensidad de fluorescencia total corregida, que se graficó como la intensidad de

fluorescencia relativa, en unidades de medida arbitrarias desde 0 a 500 (Jensen, 2013). Cada tratamiento se evaluó por triplicado, analizando un mínimo de 10 organoides seleccionados aleatoriamente por tratamiento y por ensayo, a una magnificación de 600X con un microscopio Olympus BX-51TRF equipado para detección de epifluorescencia y con los filtros apropiados (Olympus). Las imágenes se capturaron con una cámara color digital de alta resolución USB 2.0 (Qimaging® Go-3, Qimaging, Canadá).

**Tabla 1. Anticuerpos y diluciones empleadas en los ensayos de IF**

<b>Anticuerpo primario; dilución</b>	<b>Proveedor</b>	<b>Anticuerpo secundario; dilución</b>
Anti-β-Cat (clon E5); 1:1600	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, EE. UU.)	Anti-ratón Alexa Flúor 546 <sup>#</sup> ; 1:100
Anti-CK8; 1:1600	The Binding Site Ltd. (Reino Unido)	Anti-oveja (Sigma); 1:150
Anti-pan-CK basal (clon 34Be12); 1:100	Novocastra Lab., Ltd. (Reino Unido)	Anti-ratón Alexa Flúor 546, 1:100
Anti-RE $\alpha$ (clon 6-F11); 1:50	Novocastra Lab., Ltd. (Reino Unido)	Anti-ratón Alexa Flúor 546; 1:50
Anti-RP (clon A0098); 1:200	Dako Corp. (EE. UU.)	Anti-ratón Alexa Flúor 546; 1:400
Anti-RP (PR 130); 1:100	ISAL	Anti-conejo Alexa Flúor 488 <sup>#</sup> ; 1:100
Anti-pStat5a/b (Tyr 694); 1:20	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, EE. UU.)	Anti-conejo Alexa Flúor 488, 1:100
Anti-CSN2, 1:400	IBYME – CONICET <sup>*</sup>	Anti-conejo Alexa Flúor 488, 1:200
Anti-WAP (clon E8); 1:50	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, EE. UU.)	Anti-ratón Alexa Flúor 546, 1:100
Anti-LALBA, 1:400	IBYME – CONICET <sup>*</sup>	Anti-conejo Alexa Flúor 488, 1:200

<sup>\*</sup>: gentilmente provistos por el Dr. Leonardo Bussmann (IBYME – CONICET).

<sup>#</sup>: el proveedor de ambos anticuerpos fue Invitrogen.

### 3.8 | Análisis de la expresión génica

#### 3.8.1 | Extracción de ácidos nucleicos

Los homogenatos de organoides conservados en TRIzol se procesaron según las instrucciones del fabricante hasta obtener ARN total y ADN genómico (ADNg). Brevemente, los homogenatos se descongelaron a temperatura ambiente y se les agregó cloroformo. Luego, por centrifugación se separaron en una fase superior acuosa y translúcida que contiene el ARN, y otra fase inferior orgánica de color rosado que conserva el ADN y las proteínas. El ARN de la fase acuosa se precipitó con isopropanol, se lavó con etanol 80° para remover impurezas, y se solubilizó en agua libre de ARNasas. El ADN de la fase orgánica se precipitó con etanol 100°, se removieron las impurezas primero con citrato de sodio 0.1 M en etanol 100° (pH 8.5), y

luego con etanol 80°. El pellet de ADN se disgregó en agua estéril y se incubó 20 min en baño maría a 60-65 °C. Finalmente, el sobrenadante se traspasó a un tubo limpio.

Posteriormente, se midió la concentración de los ácidos nucleicos por lectura de la absorbancia a longitud de onda de 260 nm en espectrofotómetro NanoDrop Lite (Thermo-Scientific, EE. UU.). La pureza de estos se evaluó de manera indirecta según la relación entre la absorbancia a longitudes de onda de 260 nm (punto de máxima absorción de ácidos nucleicos) y 280 nm (punto de máxima absorción de proteínas). Solo se utilizaron muestras que presentaron una relación de absorbancia 260/280 > 1.9 para ARN, y > 1.7 para ADN. Las muestras de ARN total se conservaron a -80 °C y el ADNg a -14 °C hasta su posterior utilización.

### **3.8.2 | Transcripción reversa del ARN total**

A partir de 1 µg del ARN total extraído de cada muestra se realizó una retrotranscripción (RT) para obtener su ADN complementario (ADNc) correspondiente. La RT se realizó utilizando 200 U/µl de la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus, Promega, EE. UU.), 1 µg/µL de hexámeros de oligonucleótidos (Promega) como cebadores, 40 U/µL del inhibidor de ARNasas RNAout (Invitrogen), 10 nmol de una mezcla de desoxinucleótidos trifosfato, y cantidad necesaria de solución amortiguadora, provista por el fabricante de la enzima M-MLV, para alcanzar un volumen final de reacción de 30 µL. Las RTs se realizaron en un termociclador T18 (IVEMA, Argentina) en dos etapas. Primero a los tubos de reacción se les agregó el ARN y los oligonucleótidos, y se corrió un programa de reacción de 5 min y 30 s a 70 °C. Luego a los tubos se les adicionó el resto de los reactivos, y la reacción se continuó con un programa de 90 min a 37 °C, 15 min a 42 °C, 5 min a 80 °C, 30 s a 94 °C, y estabilización de la temperatura a 25 °C. El ADNc generado se diluyó con agua libre de ARNasas llevándolo a un volumen final de 30 µL, y se conservó a -20 °C hasta ser utilizado para ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real (qPCR). Como control negativo de la reacción se utilizó ARN incubado en las mismas condiciones, pero sin enzima transcriptasa reversa.

### **3.8.3 | Diseño y evaluación de oligonucleótidos para qPCR**

Para realizar las técnicas de qPCR se utilizaron oligonucleótidos diseñados previamente por nuestro laboratorio, y se diseñaron otros con el programa online de uso libre PrimerBLAST (National Center for Bioinformatic Information -NCBI-, NIH).

Para el diseño, se buscaron las secuencias de los genes de interés específicos para *Mus Musculus* en la base de datos de la biblioteca Nucleotide del NCBI ([ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/](http://ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/)); se identificaron los exones de estos, y se identificaron las secuencias de oligonucleótidos propuestos por el programa que eran complementarias a dos exones adyacentes, cuyo intrón intermedio fuese mayor a 1000 pb, para evitar la amplificación de productos inespecíficos, proveniente de secuencias de ADNg. De estas secuencias de oligonucleótidos identificadas, se analizaron sus propiedades: longitud de la secuencia y del amplicón resultante, temperatura de disociación con la cadena molde, y composición porcentual de las bases nucleotídicas, entre otras. De ser necesario, se identificaron otras secuencias manualmente cuando las propiedades de las propuestas por el programa no eran satisfactorias. Además, se analizaron las variantes de los genes de interés, si los oligonucleótidos eran complementarios en todas o algunas variantes más relevantes, y si amplificaban productos de otros genes. Las secuencias de los oligonucleótidos más satisfactorios se enviaron a sintetizar, y luego los viales liofilizados se reconstituyeron según las especificaciones de los fabricantes, se fraccionaron en alícuotas, y se almacenaron a -20 °C hasta ser utilizadas.

### 3.8.4 | qPCR

A partir del ADNc generado, se evaluó la expresión de ARN mensajero (ARNm) de los genes de interés, mediante qPCR utilizando un termociclador Applied Biosystems StepOne™ (Thermo Fischer Scientific). Esta técnica permite la detección y cuantificación ciclo a ciclo de un fluoróforo que se intercala entre las hebras de la doble cadena helicoidal del ADN. El fluorómetro del termociclador detecta y lee la intensidad de la fluorescencia emitida del fluoróforo utilizado a medida que transcurre la PCR. Las secuencias de oligonucleótidos utilizados se detallan en la Tabla 2. Las reacciones de amplificación se realizaron en tubos duplicados en cada corrida. Se utilizaron por tubo 2.5 µL de ADNc que se combinaron con HOT-FIRePol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Biocientífica, Argentina) y 5 pmol de cada oligonucleótido en un volumen final de 10 µL. Las condiciones de la reacción fueron: 1 fase inicial de activación de la polimerasa a 95 °C por 15 min, y 45 ciclos de: desnaturalización a 95 °C por 15 s, hibridación a la temperatura específica para cada oligonucleótido (53-60 °C) por 15 s, extensión a 72 °C por 15 s, y lectura de la fluorescencia a 83 °C por 10 s. La pureza de los amplicones (99-173 pb) se confirmó mediante curvas de disociación, y corridas electroforéticas en gel de agarosa de muestras elegidas al azar en cada corrida. Se incluyeron controles negativos sin ADNc

en todos los ensayos. Según el ensayo (ramificación ductal o diferenciación funcional) se evaluó la expresión de los receptores de hormonas ováricas, el ESR1, RP y de su isoforma RP-B; de las moléculas de la vía de señalización de estos receptores, WNT4, RANKL, AREG, y ELF5; del IGF-1; de las proteínas lácteas CSN2, LALBA, y WAP; de los receptores de hormonas lactogénicas GR, PRLR, y de STAT5a, que interviene en la vía de señalización del PRLR.

**Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en qPCR y condiciones de reacción**

Gen	Secuencia 5'—3'
L19	Sentido: ATCATCCGCAAGCCTGT Anti-sentido: TCCATGTGACCTCTCTGG
ESR1	Sentido: ACTACCTGGAGAACGAGGCC Anti-sentido: CCTTGGCAGACTCCATGATC
RP	Sentido: GACCAGTCTCAACCAACTAGGC Anti-sentido: ACACCATCAGGCTCATCCAG
RP-B	Sentido: TCCCCCTTGCTTGACCGCTT Anti-sentido: CGAGGAAAAAGCAGCCCCGTC
WNT4	Sentido: AGGAGTGCCAATACCAGTTCC Anti-sentido: CAGTTCTCCACTGCTGCATG
RANKL	Sentido: ACCAGCATAAAATCCCAAG Anti-sentido: AAGGGTTGGACACCTGAATG
AREG	Sentido: TGCTGTCGCTGCTGGTCTTA Anti-sentido: CAGAAACCACAAGTCCACCAGC
ELF5	Sentido: TGTGACCCCCCTGATGCCTTG Anti-sentido: GGTGCGAGCAGAATTGGAGC
IGF-1	Sentido: CTGGTGGATGCTCTTCAG Anti-sentido: CCACAATGCCTGCTTGAG
CSN2	Sentido: AAACATCCAGCCTATTGCTC Anti-sentido: CATCTGTTGTGCTTGGAA
LALBA	Sentido: AACGACAACGGCAGCACAGA Anti-sentido: GGATCTTCTGGCACACGCT
WAP	Sentido: TGCCTCATCAGCCTTGTCT Anti-sentido: TGGGAACATGGACTGAAGT
STAT5a	Sentido: TGGAGGAGATGCTGGCTGAG Anti-sentido: CCGCAAACCTGGCTGGTC
GR	Sentido: CTCCCAAACCTGCCTGGTG Anti-sentido: GTGCTGTCCTCCACTGCTC
PRLR	Sentido: AAAGTATCTTGTCCAGACTCGCTG Anti-sentido: AACAGATGACAGCAGAGAGAATG

### 3.8.5 | Electroforesis en geles de agarosa

Los productos de amplificación de las qPCR se corrieron en geles de agarosa de entre 1-3 % p/v, utilizando solución de Tris-acetato-EDTA como *buffer* de corrida. Se utilizaron patrones de peso molecular de entre 100 y 1000 pb (CienMarker, Biodynamics, Argentina), y el intercalante GelGreen® (Biotum, EE. UU.) como agente de contraste. Se agregó 1 µl de GelGreen 1000 X por mL de solución de agarosa en los geles. Las corridas se realizaron en una cuba electroforética horizontal Bio-Rad Power Pack 300 (Bio-Rad, EE. UU.) a 70 V hasta que el frente de corrida ingresara al

gel desde los pocillos, y luego se aumentó el voltaje a 80 V hasta finalizar la corrida. Los geles se revelaron en un transiluminador Fotodyne® Foto/UV® 1 (Fotodyne Inc., EE. UU.).

### 3.8.6 | Evaluación de la expresión de los transcriptos

Para el cálculo de la expresión de cada gen se determinó la intensidad de su fluorescencia por qPCR, utilizando el método del ciclo umbral (Ct, *cycle threshold*; Higuchi et al., 1993). Los valores de Ct se determinaron con el programa StepOne Software v2.3 (Applied Biosystem Inc.) con un umbral de ajuste automático de la fluorescencia inespecífica. La eficiencia (Ef) de reacción para cada gen se determinó mediante curvas estándar. Se realizaron corridas de amplificación para cada gen a partir de diluciones seriadas de ADNc, incluyendo alícuotas de 1-2  $\mu$ L de cada muestra, de todos los grupos experimentales. Luego se graficó el logaritmo de la concentración de ADNc vs su valor de Ct correspondiente, y se determinó la ecuación de la recta y el valor de  $R^2$  por medio de regresión lineal. Valores de  $R^2 > 0.985$  se consideraron satisfactorios. La Ef se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$Ef = 10^{(-1/m)-1}, \text{ siendo } m \text{ la pendiente de la recta.}$$

Dependiendo de las variaciones inherentes a cada corrida en particular, la Ef de reacción para cada gen varió entre 95-105 %. La expresión de ARNm del RP-A se calculó por diferencia entre el nivel de expresión del RP total y el del RP-B. Los valores de expresión de cada gen blanco se normalizaron por la expresión del gen que codifica para la proteína ribosomal L19, de expresión constitutiva (*housekeeping*), debido a que no se observaron diferencias significativas en los valores de Ct entre las muestras de los diferentes grupos experimentales.

En el ensayo de ramificación ductal la expresión relativa de cada gen blanco se calculó con el programa de uso libre Relative Expression Software Tool REST-MCS© beta v2 2006 ([gene-quantification.de/rest-mcs.html](http://gene-quantification.de/rest-mcs.html)) que se fundamenta en el método del cálculo de la relación de expresión (*expression ratio*) de Pfaffl (2001). Este método se basa en la corrección de las eficiencias de reacción exactas de cada gen blanco, y de expresión constitutiva, y el valor medio de la variación de Ct entre el grupo control y los demás grupos experimentales. Para el análisis de expresión de cada gen se deben ingresar en el programa la Ef de reacción y los valores de Ct de las muestras de los grupos experimentales. Luego, el programa analiza la significancia de los resultados de la expresión de los transcriptos evaluados, utilizando el método de aleatorizaciones Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test© (Pfaffl et al., 2002), y calcula la

estimación del error estándar (SE) utilizando un algoritmo basado en las series de Taylor ([gene-quantification.de/avery-rel-pcr-errors.pdf](http://gene-quantification.de/avery-rel-pcr-errors.pdf)).

En el ensayo de diferenciación funcional la evaluación de la expresión relativa de cada gen blanco se determinó por el método de la curva estándar (Čikoš et al., 2007). Similar a la determinación de la Ef de reacción, el análisis de la expresión de los genes blancos se realiza ingresando el valor de Ct de cada muestra para obtener su concentración correspondiente, que se normaliza por la expresión de L19 por el mismo procedimiento.

### 3.9 | Análisis de la metilación del ADN

#### 3.9.1 | Bioinformática

Se analizaron los genes que codifican para las proteínas lácteas CSN2, LALBA y WAP de ratón (*Mus musculus*) con el programa Methyl Primer Express v1.0 (Applied Biosystems, EE. UU.) para identificar regiones de islas CpG. Se definió como criterio que una isla CpG sea una secuencia de ADN igual o superior a 200 pb, con una proporción de GC mayor al 50 %, y un promedio de CpG observado mayor a 0.6 (Missaghian et al., 2009). En los genes evaluados no se encontraron regiones que cumplieran con este criterio. Por lo tanto, se analizaron las regiones promotoras de estos genes para identificar sitios de restricción para la enzima sensible a metilación *Tail* (*MaeII*). Los sitios de unión putativos a factores de transcripción se reconocieron utilizando el programa PROMO v3 (TRANSFAC v8.3; <http://alggen.lsi.upc.es>) (Farré et al., 2003; Messeguer et al., 2002). Los oligonucleótidos necesarios (Tabla 3) se diseñaron con el programa Vector NTI Suite v6.0 (Infomax Inc., USA). Además, para el control interno de los ensayos, se diseñaron oligonucleótidos para una región de ADN cercana al sitio de análisis, que no tuviera sitios para *Tail*.

**Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos de ensayos epigenéticos**

Oligonucleótido	Secuencia 5'—3'
Cl promotor CSN2	Sentido: AATGCTGGTCTCAATGCTGG Anti-sentido: ATGTCCTCCAGCCAAGTGA
<i>Tail</i> promotor CSN2	Sentido: AATGCTGGTCTCAATGCTGG Anti-sentido: ATGTCCTCCAGCCAAGTGA
Cl promotor LALBA	Sentido: GTGTTTCCAGTCACCTCCC Anti-sentido: CTCACTGGCTCTGGTAAACC
<i>Tail</i> (a) LALBA	Sentido: TGGCTAGGTTGGACAGACAA Anti-sentido: AGGGAGGTGACTGGAAAACA
<i>Tail</i> (b) LALBA	Sentido: AAGACATAGATGGCTATCAAGGC Anti-sentido: GAGGAGACAGAGAAGGAGGAGA

Cl: control interno.

### 3.9.2 | Análisis de los sitios sensibles a metilación

El estado de metilación del ADN de los genes que codifican para las proteínas lácteas se analizó utilizando la técnica combinada de digestión con enzimas de restricción sensibles a sitios de metilación, seguida de PCR en tiempo real (MSRE-PCR, *Methylation-Sensitive Restriction Enzymes – PCR*) (Altamirano et al., 2017b; Gomez et al., 2019). En todos los casos, 1 µg de ADNg previamente obtenido, se digirió con 5 U de *EcoRI* o *BamHI* (Promega, USA) para reducir el tamaño de las cadenas de ADN. Luego los fragmentos obtenidos se purificaron con fenol/cloroformo, seguido de precipitación con etanol 100°. Luego, 0.5 µg del ADN escindido se incubó con una solución de 1 U de *Tail* en el amortiguador provisto por el fabricante (Thermo Fischer Scientific Inc.) a 65 °C por 1 h. Posteriormente, los productos de digestión también se purificaron con el método de fenol/cloroformo. Para evaluar el nivel de metilación relativo de las regiones promotoras de los genes, se realizó un pool de 4 muestras por grupo experimental que se analizó por triplicado o duplicado por qPCR con los oligonucléotidos de la Tabla 3. La enzima de restricción sensible a metilación *Tail* es incapaz de cortar las secuencias en los sitios metilados, permitiendo la amplificación de los fragmentos. Una región sin sitios de restricción para *Tail* se amplificó como control interno. Si la región de interés está metilada, la digestión enzimática con *Tail* no es posible, permitiendo la amplificación del fragmento. En cambio, si no está metilada, *Tail* escinde el ADN y previene la amplificación del fragmento. El grado de metilación relativo de la región de interés se determinó graficando los valores de Ct contra el logaritmo del control interno, proporcionando curvas estándar para la cuantificación y evaluación del nivel relativo de metilación de las muestras incógnitas (Čikoš et al., 2007).

### 3.10 | Análisis estadístico

Se realizó en primer lugar un análisis exploratorio de los datos para evaluar la normalidad de la distribución (test de Shapiro-Wilk) y la homogeneidad de la varianza (test de Levene). Los datos se expresaron como la media ± SEM (error estándar de la media). El análisis del ensayo ADNme se realizó con el test U de Mann-Whitney. Los resultados provenientes de los ensayos de qPCR del experimento de ramificación se analizaron mediante el programa REST-MCS© beta v2 2006 (gene-quantification.de/rest-mcs.html) que utiliza el método de aleatorizaciones Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test© (Pfaffl et al., 2002). Los demás resultados de qPCR se evaluaron mediante el test paramétrico ANOVA de una vía para evaluar la

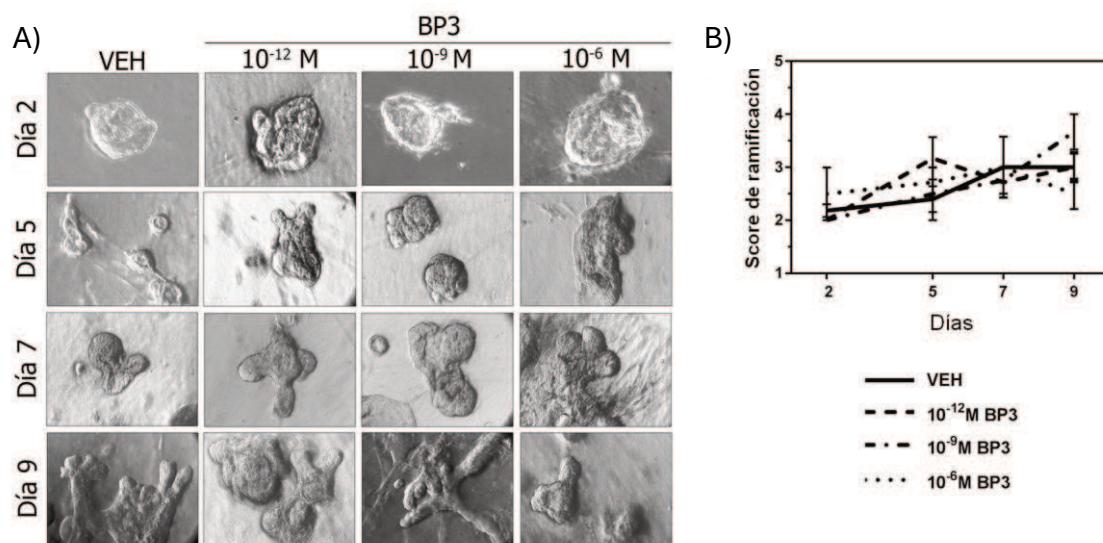
significancia general, seguido del test *post hoc* de Dunnet para comparar cada tratamiento contra el VEH; o el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del test *post hoc* de Dunn, según correspondiera. En todos los casos, un valor de  $p<0.05$  se consideró significativo.

## 4 | RESULTADOS

### 4.1 | Efectos de la exposición directa a BP3 sobre la ramificación ductal en organoides mamarios

#### 4.1.1 | Evaluación morfológica de la ramificación ductal

Los organoides mamarios cultivados en Geltrex y colágeno I respondieron satisfactoriamente al estímulo del FGF-2 adicionado en el medio de cultivo para inducir la ramificación ductal. A partir del día 2 con medio de ramificación no se observaron organoides de morfología cística (grado 1) en ninguno de los tratamientos. La morfología en el tratamiento con VEH progresó desde *clusters* simples de células epiteliales con indicios de protuberancias brotando desde el cuerpo central (grado 2) en el día 2, hacia estructuras más complejas con ramificaciones extendiéndose desde el centro (grado 3) en los días 5-7, y alcanzando la repolarización epitelial para formar lumen en sus ramificaciones y/o cuerpo central (grado 4) en el día 9 (Figura 10 A).

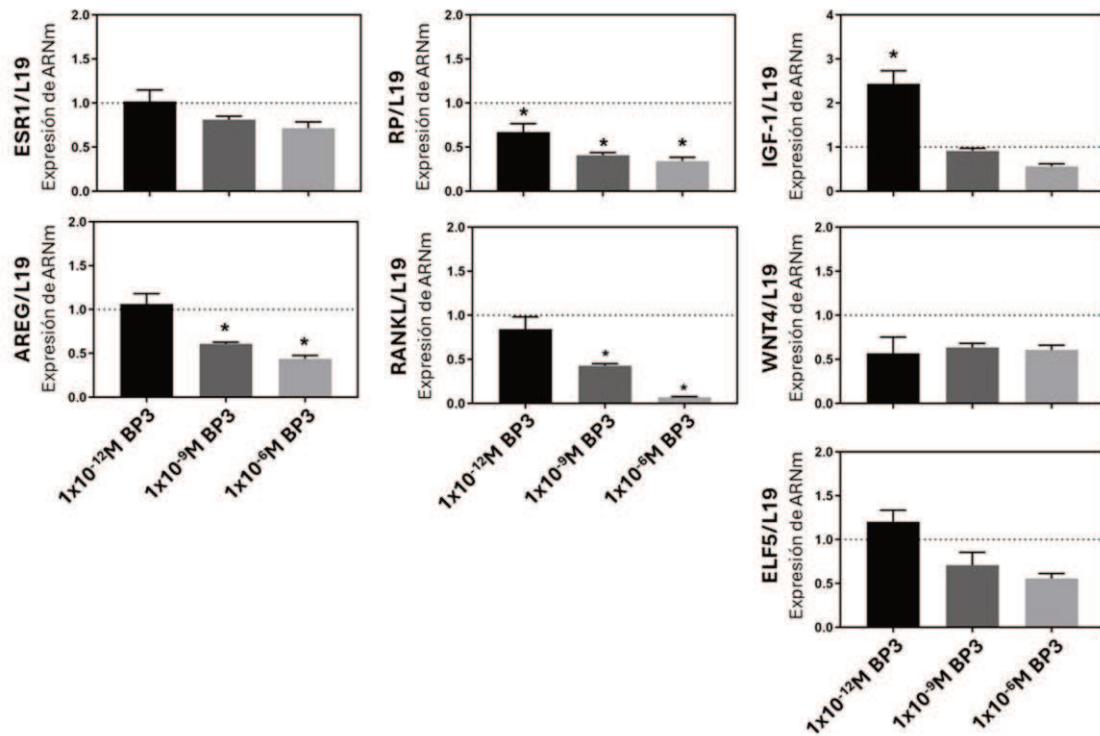


**Figura 10.** Ramificación ductal en organoides mamarios. A) Imágenes representativas de los organoides expuestos al vehículo (VEH) y a BP3, durante la inducción de la ramificación ductal. B) Score de ramificación evaluado los días 2, 5, 7, y 9 de cultivo. Cada punto representa la media  $\pm$  SEM de 5-11 organoides por día experimental. Magnificación: 600X.

La ramificación ductal en los organoides expuestos a BP3 progresó de manera similar a la del VEH a lo largo del experimento y no hubo diferencia estadística en el *score* morfológico en ninguno de los días evaluados (Figura 10 B).

#### 4.1.2 | Expresión de receptores hormonales y moléculas de señalización

La exposición directa a BP3 no modificó la expresión de ARNm del ESR1 en los organoides ramificados. Sin embargo, la expresión del RP se encontró disminuida en las tres concentraciones de BP3 evaluadas ( $p<0.05$ ) en comparación con el VEH. De manera similar, la exposición directa a  $1 \times 10^{-9}$  M y  $1 \times 10^{-6}$  M BP3 disminuyó la expresión de RANKL y AREG ( $p<0.05$ ). En cuanto a la expresión de IGF-1, ésta se encontró elevada solo en  $1 \times 10^{-12}$  M BP3 en comparación con el VEH. Por otro lado, ninguna de las concentraciones de BP3 modificó la expresión de WNT4 y ELF5. Estos resultados se muestran en la Figura 11.



**Figura 11.** Expresión de receptores hormonales y de sus moléculas de señalización. Expresión relativa de ARNm del ESR1, RP, IGF-1, AREG, RANKL, WNT4, y ELF5. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de 3 pools de organoides, de pocillos duplicados para cada tratamiento. La expresión de ARNm se normalizó por la expresión de L19 y por la del vehículo (línea de puntos). \* $p<0.05$ , análisis del programa REST-MCS®, cada tratamiento se comparó contra el vehículo.

## 4.2 | Experimento de diferenciación funcional en organoides mamarios

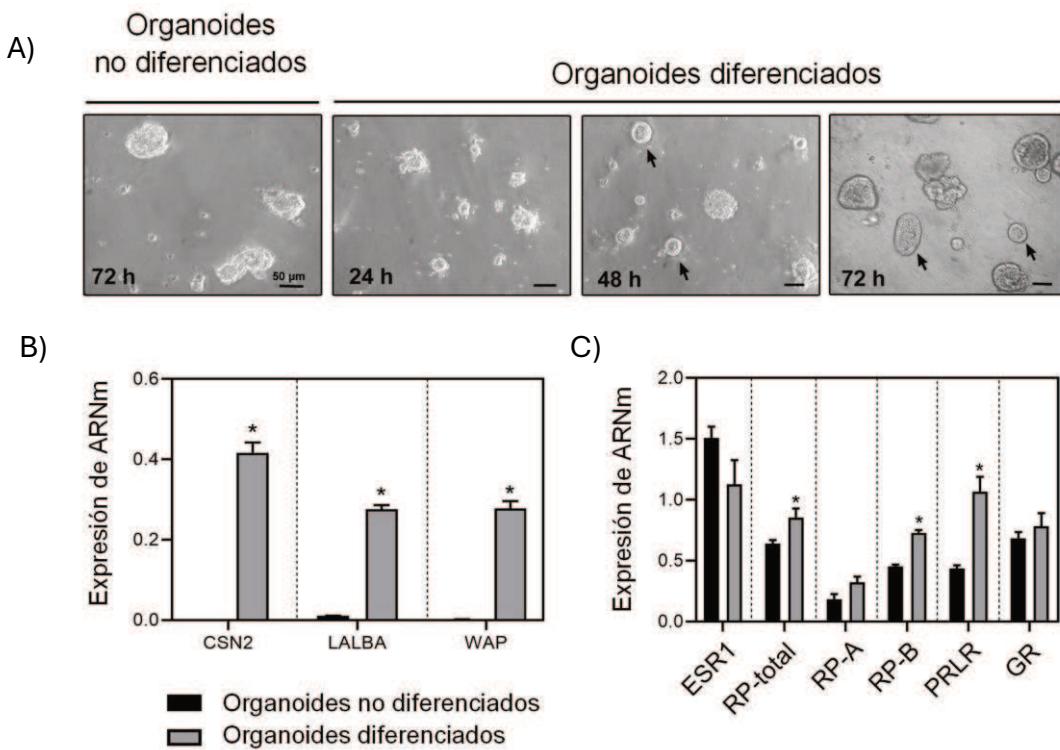
### 4.2.1 | Caracterización de los organoides diferenciados

#### 4.2.1.1 | Reorganización epitelial

Los organoides cultivados en Matrigel con medio de diferenciación se reorganizaron morfológicamente de forma esperada. Los organoides partieron de fragmentos irregulares cuyas células se encontraban dispuestas en multicapa (24 h). Durante el periodo de cultivo con estímulos lactogénicos (hormonas + EGF) formaron un epitelio bicapa con un lumen central (48 h), y adquirieron una forma más redondeada y uniforme (72 h). Por el contrario, los organoides cultivados sin estímulos lactogénicos mantuvieron durante todo el experimento una disposición de células multicapa y formas irregulares (Figura 12 A).

#### 4.2.1.2 | Expresión de marcadores de diferenciación funcional y receptores hormonales

Se evaluó la expresión de ARNm de las proteínas lácteas CSN2, LALBA, y WAP, como marcadores específicos de diferenciación funcional (Figura 12 B). Las tres proteínas lácteas se expresaron en los organoides diferenciados, mientras que en los organoides cultivados sin estímulos lactogénicos su expresión fue despreciable (LALBA) o prácticamente indetectable (CSN2 y WAP). En cuanto a la expresión de los receptores hormonales, la expresión relativa de ARNm del RP-total, RP-B, y PRLR fue mayor ( $p<0.05$ ) en los organoides diferenciados en comparación con los cultivados sin estímulos lactogénicos, mientras que la expresión del ESR1 y GR fue similar (Figura 12 C).

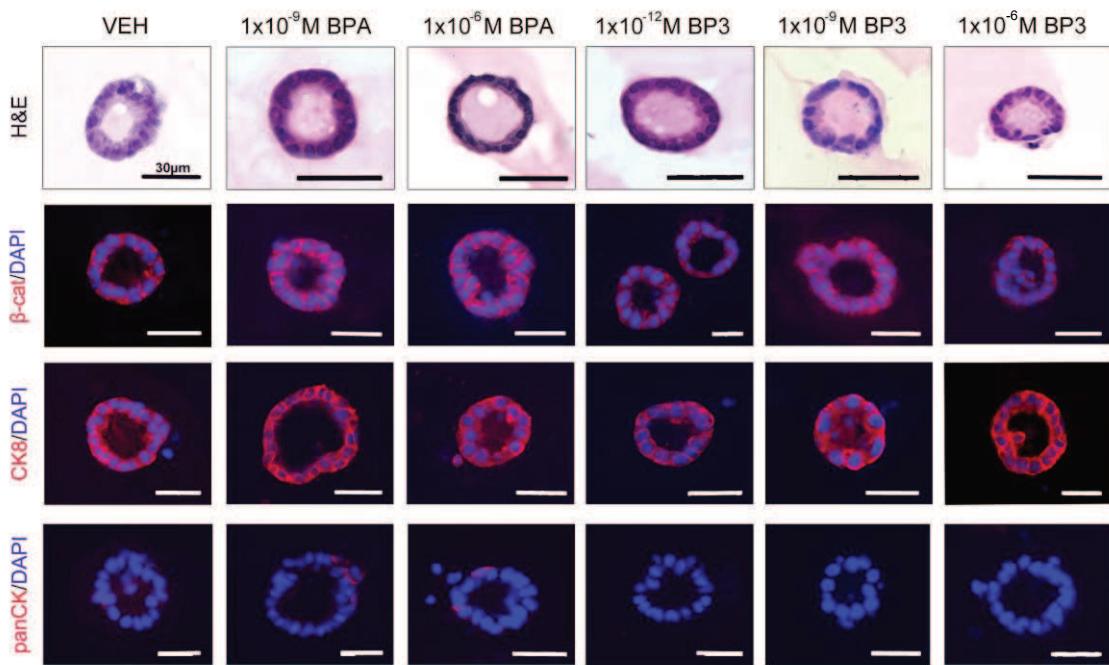


**Figura 12.** Caracterización de los organoides mamarios diferenciados. A) Imágenes representativas de organoides mamarios luego de 72 h de cultivo con medio basal, y de organoides cultivados con estímulos lactogénicos a las 24 h, 48 h, y 72 h de diferenciación. Flechas: organoides diferenciados. B) Expresión relativa de ARNm de ESR1, RP total, RP-A, RP-B, PRLR, y GR. C) Expresión relativa de ARNm de CSN2, LALBA y WAP. En B) y en C) las barras negras (organoides mamarios no diferenciados) y barras grises (organoides mamarios diferenciados) representan la media  $\pm$  SEM de la expresión relativa de ARNm a las 72 h, de tres experimentos independientes. La expresión de ARNm se relativizó a la expresión de L19. \*:  $p < 0.05$ , test U de Mann-Whitney.

#### 4.2.2 | Efectos de la exposición directa a BP3 o BPA sobre la diferenciación funcional *in vitro*

##### 4.2.2.1 | Diferenciación alveolar

Morfológicamente, los organoides diferenciados expuestos al VEH formaron estructuras redondeadas tipo alveolos, organizados en una sola capa de células epiteliales cuboidales, con un lumen central en el que se detectaron pocas células apoptóticas o detritus celulares. La expresión proteica de  $\beta$ -cat y CK8 se observó en todas las células, denotando su origen luminal, mientras que no hubo expresión de pan-CK, indicando ausencia de células basales. En general, los organoides diferenciados expuestos a BPA o BP3 no presentaron diferencias respecto al VEH, a excepción de la detección de algunas células positivas para pan-CK en los expuestos a BPA (Figura 13). Por otro lado, tanto el área total de los organoides como el área luminal alveolar fueron similares entre los tratamientos (Tabla 4).



**Figura 13.** Histomorfología de organoides mamarios diferenciados. Imágenes representativas de tinción de H&E e inmunomarcación de  $\beta$ -cat, CK8, y pan-CK, en organoides mamarios de los diferentes tratamientos.

**Tabla 4. Cuantificación del tamaño alveolar de organoides mamarios diferenciados**

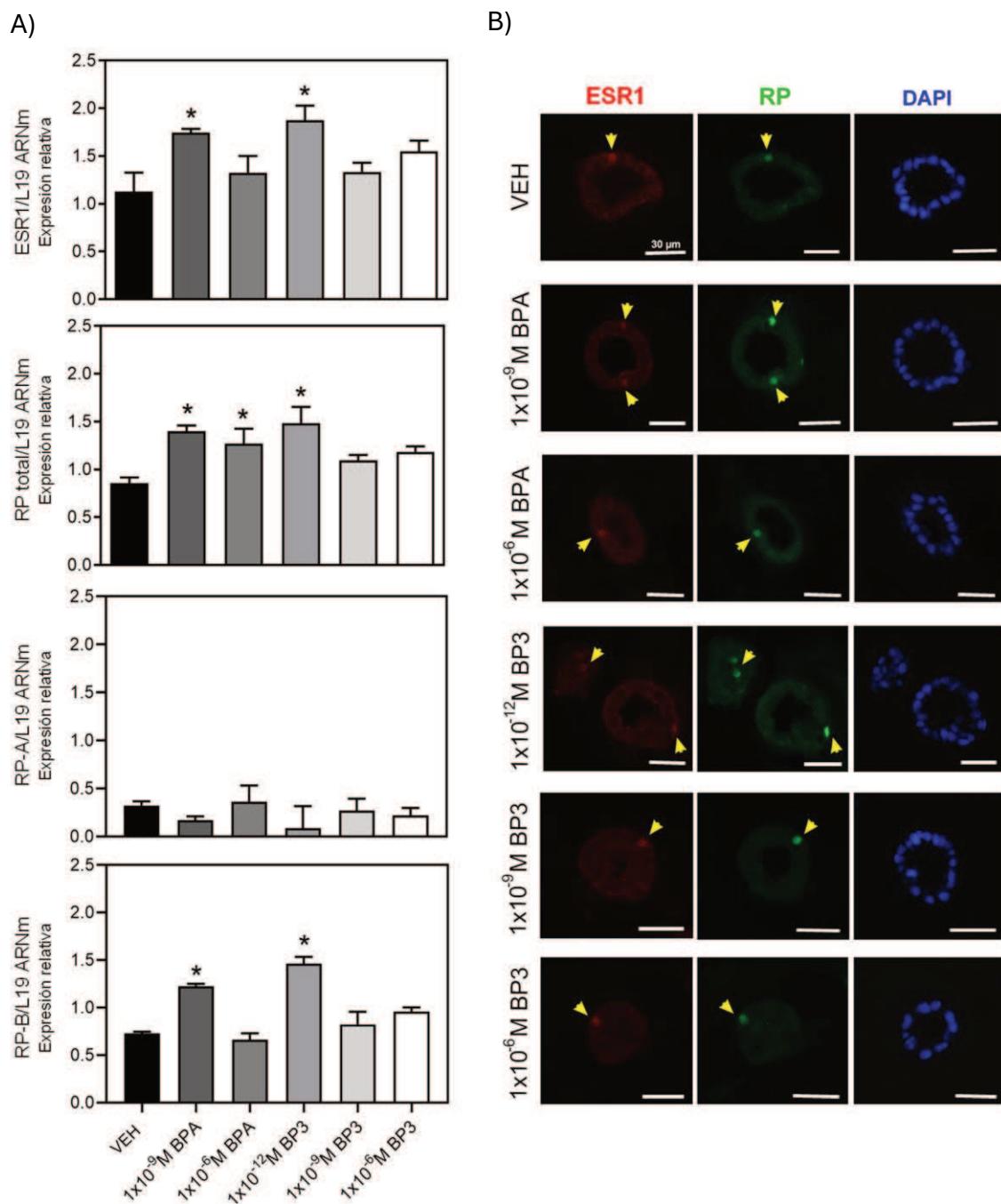
Tratamiento	Área total ( $\mu\text{m}^2$ )	Área luminal ( $\mu\text{m}^2$ )
VEH	$263.7 \pm 30.8$	$69.3 \pm 12.3$
$1 \times 10^{-9}$ M BPA	$295.0 \pm 62.4$	$60.9 \pm 13.8$
$1 \times 10^{-6}$ M BPA	$235.2 \pm 23.3$	$69.7 \pm 10.1$
$1 \times 10^{-12}$ M BP3	$222.0 \pm 19.0$	$57.7 \pm 4.7$
$1 \times 10^{-9}$ M BP3	$210.2 \pm 34.5$	$51.6 \pm 15.1$
$1 \times 10^{-6}$ M BP3	$263.3 \pm 27.8$	$69.1 \pm 10.3$

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM de 10-15 organoides por tratamiento. VEH: vehículo.

#### 4.2.2.2 | Expresión de receptores hormonales y pSTAT5a/b

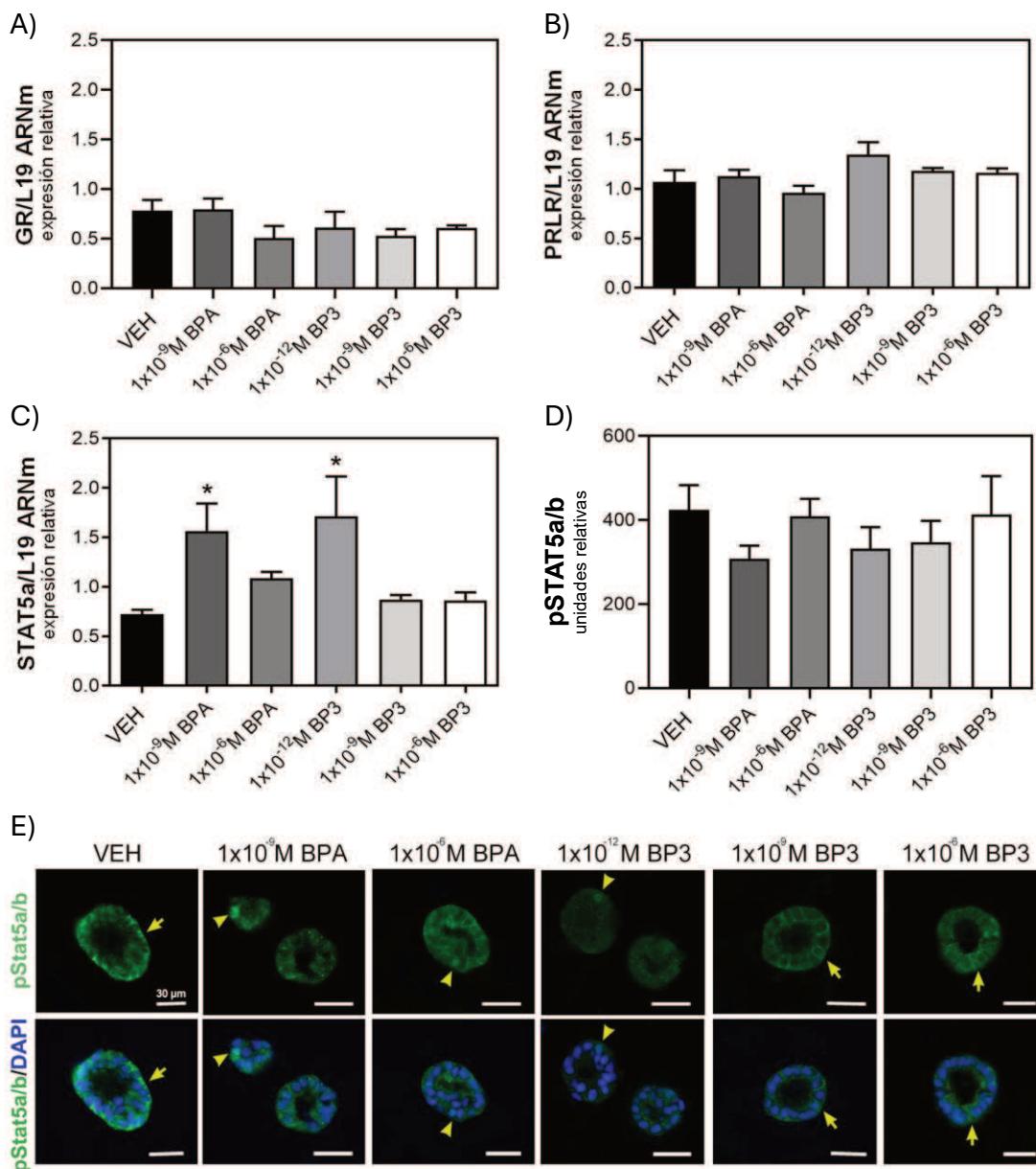
En cuanto a los receptores hormonales (Figura 14 A), la expresión de ARNm del ESR1 fue mayor luego de la exposición a  $1 \times 10^{-9}$  M de BPA o  $1 \times 10^{-12}$  M de BP3 en comparación con el VEH ( $p < 0.05$ ). De manera similar, la expresión del RP total estuvo incrementada luego de la exposición a ambas concentraciones de BPA o de  $1 \times 10^{-12}$  M de BP3 ( $p < 0.05$ ) debido a la mayor expresión del RP-B, que fue significativamente mayor en los tratamientos con  $1 \times 10^{-9}$  M de BPA y  $1 \times 10^{-12}$  M de BP3 ( $p < 0.05$ ). La expresión de ARNm del RP-A no mostró diferencias significativas entre los tratamientos. Respecto a la expresión proteica del ESR1 y RP (Figura 14 B), ambos se

localizaron principalmente en el núcleo, y en al menos una célula por organoide en todos los tratamientos. Solo en los tratamientos con  $1 \times 10^{-9}$  M BPA y  $1 \times 10^{-12}$  M BP3 se detectó más de una célula positiva por organoide.



**Figura 14.** Expresión del ESR1 y RP. A) Expresión relativa de ARNm del ESR1, RP total, RP-A, y RP-B en organoides mamarios diferenciados expuestos a BPA o BP3. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. La expresión de ARNm se relativizó por la expresión de L19. \*:  $p < 0.05$ , test de Kruskal-Wallis, seguido del post-test de Dunn. Los tratamientos de BPA y BP3 se compararon por separado contra el vehículo (VEH). B) Imágenes representativas de IF del ESR1 y RP. Flechas: células con expresión nuclear.

Por otro lado, la expresión de ARNm del GR y PRLR fue similar entre los tratamientos (Figura 15 A y B). En cambio, la expresión de ARNm de STAT5a (Figura 15 C), factor de transcripción debajo de la vía de señalización de PRLR, estuvo incrementada en los organoides expuestos a  $1 \times 10^{-9}$  M BPA y  $1 \times 10^{-12}$  M BP3 ( $p<0.05$ ).

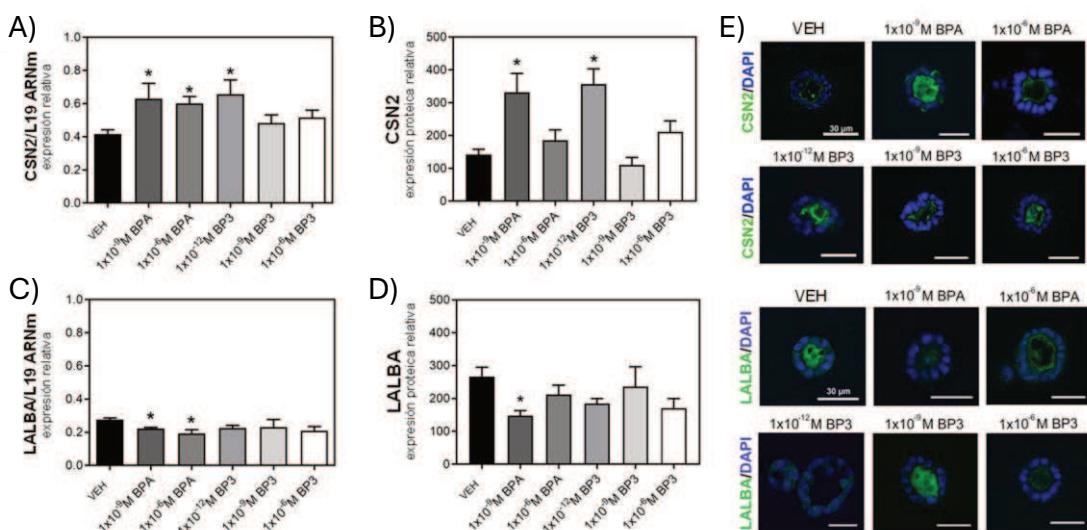


**Figura 15.** Expresión del GR, PRLR, y de la vía de señalización de PRLR. A), B), y C) Expresión relativa de ARNm del GR, PRLR, y STAT5a, respectivamente. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. La expresión de ARNm se normalizó por L19. \*:  $p<0.05$ , test de Kruskal-Wallis, seguido del post-test de Dunn. Los tratamientos de BPA y BP3 se compararon por separado contra el vehículo (VEH). D) Expresión proteica de pSTAT5a/b. La intensidad de fluorescencia se cuantificó en el citoplasma y en el núcleo de 10 organoides por tratamiento. Las barras representan la media  $\pm$  SEM en unidades relativas de fluorescencia, de tres experimentos independientes. \*:  $p<0.05$ , ANOVA de una vía, seguido del post-test de Dunnet. Los tratamientos de BPA y BP3 se compararon por separado contra el VEH. E) Imágenes representativas de IF de pSTAT5a/b. Flechas: expresión citoplasmática. Puntas de flecha: translocación nuclear.

Al analizar la expresión proteica de pSTAT5a/b, si bien no hubo diferencias cuantitativas entre los tratamientos (Figura 15 D), solo en los tratamientos con ambas concentraciones de BPA y con  $1 \times 10^{-12}$  M de BP3 se detectó su expresión nuclear (Figura 15 E).

#### 4.2.2.3 | Expresión de las proteínas lácteas

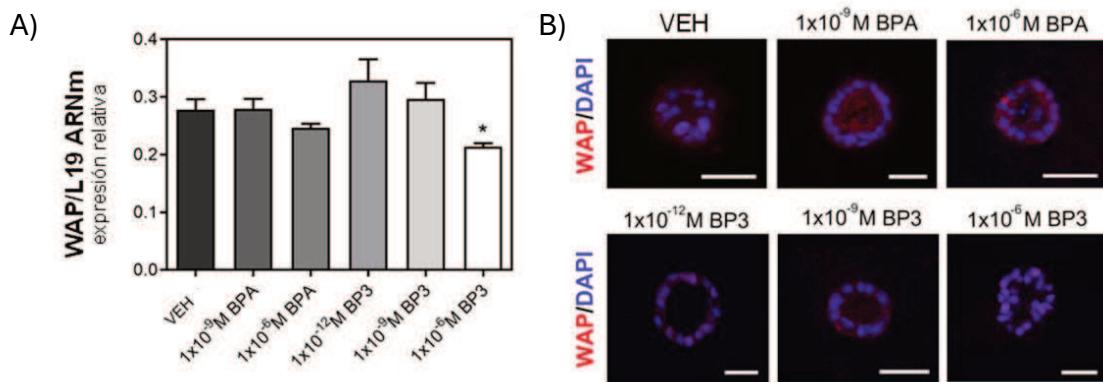
La expresión de ARNm de CSN2 estuvo incrementada en los organoides expuestos a ambas concentraciones de BPA o a  $1 \times 10^{-12}$  M de BP3 en comparación con el vehículo (Figura 16 A;  $p<0.05$ ), mientras que su expresión proteica fue mayor en los organoides expuestos a  $1 \times 10^{-9}$  M de BPA o a  $1 \times 10^{-12}$  M de BP3 (Figura 16 B;  $p<0.05$ ). En cambio, la expresión de ARNm de LALBA estuvo reducida en ambas concentraciones de BPA (Figura 16 C;  $p<0.05$ ), mientras que su expresión proteica solo fue menor en los organoides expuestos a  $1 \times 10^{-9}$  M de BPA (Figura 16 D;  $p<0.05$ ).



**Figura 16.** Expresión de CSN2 y LALBA. A) y C) Expresión relativa de ARNm de CSN2 y LALBA. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. La expresión de ARNm se normalizó por L19. \*:  $p<0.05$ , test de Kruskal-Wallis, seguido del post-test de Dunn. Los tratamientos de BPA y BP3 se compararon por separado contra el vehículo (VEH). B) y D) Expresión proteica de CSN2 y LALBA. La intensidad de fluorescencia se cuantificó en 10 organoides por tratamiento. Las barras representan la media  $\pm$  SEM en unidades relativas de fluorescencia, de tres experimentos independientes. \*:  $p<0.05$ , ANOVA de una vía, seguido del post-test de Dunnet. Los tratamientos de BPA y BP3 se compararon por separado contra el VEH. E) Imágenes representativas de IF de CSN2 y LALBA.

Con respecto a la expresión de WAP, su nivel relativo de ARNm estuvo reducido en los organoides expuestos a  $1 \times 10^{-6}$  M de BP3 (Figura 17 A;  $p<0.05$ ). De manera similar, se puede observar en la Figura 17 B una expresión citoplasmática

cuantitativamente menor de WAP en los organoides expuestos a  $1 \times 10^{-6}$  M de BP3 en comparación con el con los otros tratamientos. La expresión de las proteínas lácteas CSN2, LALBA y WAP se observó (Figuras 16 E y 17 B) en el citoplasma de las células epiteliales, en su borde apical, o dentro del lumen alveolar. Esto sugiere síntesis y secreción activa de las mismas por los organoides diferenciados, independientemente del tratamiento.

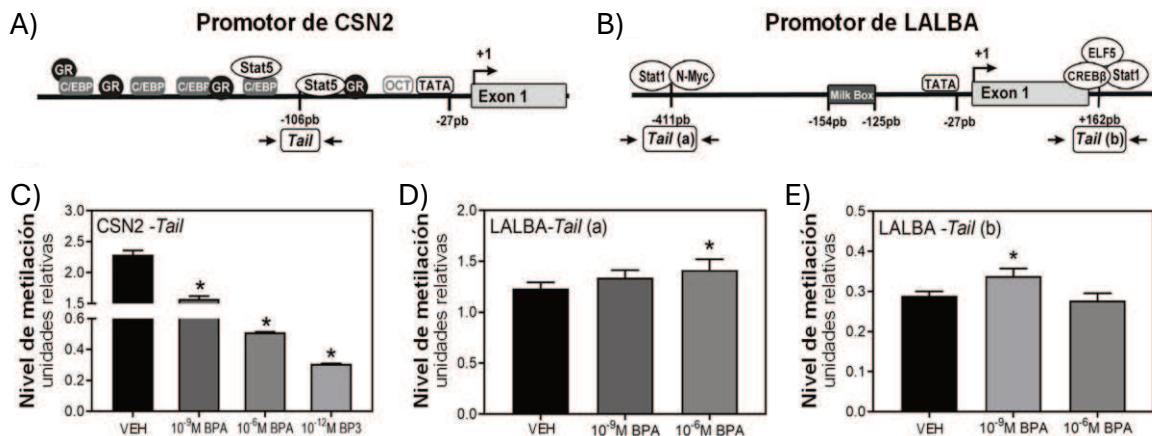


**Figura 17.** Expresión de WAP. A) Expresión relativa de ARNm de WAP. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes. La expresión de ARNm se normalizó por L19. \*:  $p<0.05$ , test de Kruskal-Wallis, seguido del post-test de Dunn. Los tratamientos de BPA y BP3 se compararon por separado contra el vehículo (VEH). B) Imágenes representativas de IF de WAP.

#### 4.2.2.4 | Metilación del ADN

En primer lugar, el análisis bioinformático reveló que ninguno de los genes evaluados (CSN2, LALBA, WAP) presentaba islas CpG. Por lo tanto, se analizaron las regiones del promotor y el amplificador de estos genes para identificar posibles sitios de restricción para *Tail* sensible a metilación. El único gen que no presentó sitios sensibles a metilación en estas regiones fue WAP. Respecto a CSN2, se encontró un sitio para *Tail* ubicado a -106 pb del promotor, asociado al factor de transcripción STAT5 (Figura 18 A). Además, se encontraron dos sitios para *Tail* en el gen de LALBA: uno en la región del promotor (-411 pb), que denominamos *Tail(a)*; y el otro en el primer exón (+162 pb), que denominamos *Tail(b)*, ambos asociados a diferentes factores de transcripción como ELF5, STAT1, CREB $\beta$  (Figura 18 B).

La exposición directa a ambas concentraciones de BPA o a  $1 \times 10^{-12}$  M de BP3 indujeron una disminución en el nivel de metilación del promotor de CSN2 (Figura 18 C;  $p<0.05$ ). En cambio, se observó un incremento en la metilación del sitio *Tail(a)* de LALBA en los organoides expuestos a  $1 \times 10^{-9}$  de BPA, y de *Tail(b)* en los expuestos a  $1 \times 10^{-6}$  M BPA (Figura 18 D y E;  $p <0.05$ ).



**Figura 18.** Modificaciones epigenéticas de CSN2 y LALBA. Esquemas ilustrativos del promotor de CSN2 (A) y LALBA (B), incluyendo al exón 1 y sus proteínas de unión. Se indican los sitios CG blancos de la digestión de la enzima de restricción sensible a sitios de metilación Tail, uno para CSN2 (-106 pb del exón 1), y dos para LALBA (-411 pb y +162 pb del exón 1). +1: sitio de inicio de la transcripción. Análisis del nivel de metilación del promotor de CSN2 (C), y LALBA (D y E). Las barras representan la media  $\pm$  SEM del nivel relativo de metilación de tres experimentos independientes. El nivel de metilación se relativizó a un control interno. \*:  $p < 0.05$ , test U de Mann-Whitney.

## 5 | DISCUSIÓN

En el presente capítulo utilizamos modelos de cultivo 3D para estudiar los efectos de la exposición directa a BP3 sobre dos procesos críticos del desarrollo de la glándula mamaria: la morfogénesis de la ramificación ductal, y la diferenciación funcional. En modelos *in vivo*, los PE inducen patrones de respuesta complejos, a través de un amplio rango de mecanismos de acción. Por ello, las técnicas *in vitro* son útiles para estudiar los mecanismos de acción de los PE en sistemas más simples, que posibilitan centrarse en procesos particulares, e independizarse de otros factores que estén interviniendo en las vías de señalización de interés (Lo et al., 2012; Sumbal, et al., 2020a; Wagner et al., 2017). Sin embargo, las señales de la ECM son necesarias para la expresión de genes específicos en el tejido (Lo et al., 2012). En las últimas décadas, el cultivo primario de organoides mamarios en matrices 3D ha logrado recapitular con gran precisión diferentes etapas del desarrollo mamario incluyendo la morfogénesis ductal y la diferenciación funcional (Lo et al., 2012; Nguyen-Ngoc et al., 2015; Sumbal, Chiche, et al., 2020b). En el presente capítulo, demostramos que la exposición directa a BP3 modificó la expresión de receptores hormonales, alteró vías de señalización críticas en el desarrollo mamario, y la expresión de las proteínas de la leche. También evaluamos los efectos de la exposición directa al reconocido xenoestrógeno BPA, como control positivo, sobre la diferenciación funcional, y observamos que en general los efectos de ambos compuestos se asemejaron, sugiriendo mecanismos comunes de acción. El rango de concentraciones testeadas para cada compuesto químico se

seleccionó considerando sus niveles detectados en muestras biológicas humanas y en el ambiente (Calafat et al., 2008a, 2008b; Janjua et al., 2008; Kim & Choi, 2014; Lee et al., 2018; Vandenberg et al., 2010). No se observaron cambios morfológicos en los organoides mamarios expuestos a BP3 durante la morfogénesis ductal, ni durante la diferenciación funcional. Sin embargo, BP3 alteró de manera distinta la expresión de receptores hormonales entre estas dos etapas del desarrollo mamario. Esto sugiere que los efectos de BP3 podrían ser dependientes de estadio del desarrollo mamario, el grado de diferenciación epitelial, y/o las condiciones del microambiente hormonal.

### *Efectos de BP3 sobre la morfogénesis ductal*

En el experimento de morfogénesis ductal, los organoides mamarios se ramificaron progresivamente para formar estructuras lobulares complejas de conductos elongados, con extremos redondeados y repolarización epitelial. La estimulación con E2 durante la morfogénesis ductal *in vitro* modifica la formación de los organoides retrasando los cambios morfológicos durante esta etapa (Lacouture et al., 2021). Incluso, la exposición a PEs altera el patrón de desarrollo morfológico y el grado de ramificación en organoides mamarios de ratón (Williams et al., 2016) y en cultivo 3D de tejido mamario humano (Winkler et al., 2022), en concentraciones similares a la de este estudio ( $2-1.5 \times 10^{-8}$  M). Sin embargo, la exposición directa a BP3 no modificó la morfología de los organoides durante este proceso, sugiriendo que no estaría afectando la señalización clásica de E2 como se ha demostrado con otros PEs (Williams et al., 2016; Winkler et al., 2022). Esta diferencia también puede deberse a que, en nuestro modelo, a diferencia de los trabajos citados, utilizamos una matriz rica en laminina con el agregado de colágeno I, que favorece la elongación en detrimento de la generación de nuevos conductos nacientes (Nguyen-Ngoc et al., 2015).

Los cultivos primarios 3D de tejido mamario conservan la expresión de los receptores hormonales ESR1 y RP, y sus vías de señalización dependientes de ligando (Lacouture et al., 2023; Tanos et al., 2013). En cuanto a la acción hormonal de BP3, estudios *in vitro* demostraron que BP3 puede actuar tanto como un agonista (Gomez et al., 2005; Schreurs et al., 2002; Suzuki et al., 2005; Watanabe et al., 2015) o como un antagonista del ESR1 (Molina-Molina et al., 2008), o como antagonista del RP (Schreurs et al., 2005). La exposición directa a BP3 no modificó la expresión de ARNm del ESR1, pero sí disminuyó la expresión del RP, lo que sugiere que BP3 podría estar actuando como antagonista de la transactivación del ESR1, o directamente inhibiendo la expresión del RP. Además de la vía de señalización hormonal clásica mediante la

interacción ligando-receptor, los PEs pueden afectar directamente las vías de transducción de señales (De Coster & Van Larebeke, 2012; La Merrill et al., 2020). Por ejemplo, en cultivo de queratinocitos, BP3 induce la expresión de la fosfodiesterasa 4 B que disminuye la concentración intracelular de adenosina monofosfato cíclica (AMPc), la activación de proteína quinasa A (PKA), y la fosforilación de los elementos de respuesta a AMPc (CREs) que pueden actuar como factores de transcripción (Kim et al., 2018). En la línea MCF7, la expresión del RP puede ser estimulada por los inductores de la concentración de AMPc, posiblemente mediante los CREs y a sus proteínas de unión (CREBs) (Cho et al., 1994). Así mismo, en el útero la disminución de las CREBs disminuye la actividad transcripcional del RP (Condon et al., 2003). En estudios futuros sería interesante evaluar los efectos de BP3 sobre la cascada de señalización de AMPc en las células epiteliales mamarias, y sus consecuencias en la expresión del RP y sobre su actividad transcripcional.

En la glándula mamaria la expresión de AREG es inducida por la actividad transcripcional tanto del ESR1 como del RP (Aupperlee et al., 2013; Ciarloni et al., 2007), mientras que el RP induce la expresión de RANKL, WNT4, y ELF5. Antagonistas del RP en cultivos mamarios inhiben la expresión de AREG, RANKL y WNT4 (Obr et al., 2013; Ranjan et al., 2021). En nuestro modelo, la exposición a BP3 disminuyó la expresión de AREG y RANKL, sin modificar WNT4 y ELF5. Estos resultados sugieren que BP3 podría estar actuando como antagonista de la expresión del ESR1 y/o del RP, afectando de manera diferencial la expresión de sus genes blanco, como ha sido descripto para otros PEs (Lacouture et al., 2023; Winkler et al., 2023). El RP regula la expresión de RANKL principalmente a nivel de maduración y estabilidad de su ARN, más que a nivel transcripcional (Tanos et al., 2013). Por lo tanto, es posible que en las muestras tratadas con BP3 esté favorecida la degradación de ARNm de RANKL. A pesar de no haberse observado cambios morfológicos en los organoides, las alteraciones producidas por la exposición directa a BP3 sobre la expresión de ARNm del RP y de moléculas blanco de su señalización, podría tener consecuencias críticas en el desarrollo mamario *in vivo*. En la glándula mamaria puberal, la disminución en la expresión de AREG podría afectar la formación de TEBs (Aupperlee et al., 2013), y la de RANKL la ramificación lateral y/o la alveogénesis (Fernandez-Valdivia et al., 2009). En cuanto a esto, recientemente se demostró que la exposición oral a BP3 en ratones hembra C57Bl/6 durante la pubertad provoca un retraso del desarrollo mamario en la adultez, indicado por la persistencia de TEBs en este periodo (Gao et al., 2025).

En nuestro experimento, solo la concentración más baja de BP3 ( $1 \times 10^{-12}$  M) indujo la expresión del IGF-1. Sin embargo, esto no estuvo asociado a cambios en la morfología de los organoides. Otros autores han demostrado que la exposición a filtros UV induce cambios en la expresión del IGF-1 de manera similar a los que produce E2 en tejidos hormono dependientes como son vagina y útero (Jarry et al., 2004; Zhan et al., 2021). Particularmente, BP3 incrementa la expresión del IGF-1 en peces (Zhang et al., 2023). Por lo tanto, es probable que, a bajas concentraciones, BP3 presente un efecto estrogénico leve que induce la expresión del IGF-1 durante la morfogénesis ductal mamaria *in vitro*.

#### *Efectos de BP3 sobre la diferenciación funcional*

Previamente, hemos demostrado que la exposición oral perinatal a BPA alteró la diferenciación funcional de la glándula mamaria de la rata durante la preñez y la lactancia, modificando el contenido proteico y perfil de ácidos grasos en la leche (Altamirano et al., 2015; Kass et al., 2012). En este trabajo, se observó que la exposición directa a BPA o BP3, altera la expresión del ESR1, RP, y la vía de señalización de PRL en organoides mamarios aislados de ratones hembra nulíparas. En consecuencia, ambos PEs modificaron la expresión de las proteínas lácteas y su regulación transcripcional, durante la diferenciación funcional *in vitro*.

En ausencia de estímulos lactogénicos los organoides mamarios presentaron formas irregulares con epitelio multicapa y sin lumen central. En cambio, luego de 72 h de estímulos lactogénicos se organizaron en estructuras semejantes a alveolos, con epitelio bicapa rodeando un lumen central. Este tipo de estructura es necesaria para la síntesis de las proteínas lácteas y la secreción de la leche dentro del lumen (Barcellos-Hoff et al., 1989). Además, los organoides expuestos a estímulos lactogénicos presentaron niveles de ARNm mucho más elevados de los marcadores de diferenciación CSN2, WAP y LALBA, y secreción activa de las proteínas lácteas dentro del lumen, indicando una correcta organización alveolar. Estas características nos indican que, en nuestro modelo los organoides mamarios en presencia de estímulos lactogénicos lograron diferenciarse a nivel morfológico, bioquímico, y funcional. Resultados similares en la expresión de los marcadores de diferenciación fueron reportados en organoides mamarios obtenidos de animales en el primer día de lactancia, en comparación con organoides obtenidos de ratones hembra adultas nulíparas (Rijkenkels et al., 2013). Esto nos sugiere que los organoides diferenciados en nuestro modelo se asemejan a la activación secretora en la lactancia temprana. Tanto

la señalización del ESR1 como del RP en el epitelio son necesarias, directa o indirectamente, para la ramificación ductal lateral y la alveogénesis durante la preñez (Brisken & O'Malley, 2010). Sin embargo, en la preñez disminuye la expresión epitelial del ESR1 y del RP hasta un 3-5% antes del parto (Shyamala et al., 2002), siendo la isoforma PR-B la de mayor expresión durante esta etapa (Aupperlee et al., 2005). En cambio, en la lactancia el RP no es detectable mientras que el ESR1 comienza a aumentar (Neville et al., 2002; Shyamala et al., 2002). En nuestro modelo de diferenciación detectamos baja expresión proteica tanto del ESR1 como del RP, del cual la isoforma PR-B presentó mucha mayor expresión que la isoforma PR-A a nivel de ARNm. Este patrón de expresión de receptores también nos sugiere que los organoides diferenciados en nuestro modelo se asemejan a un estadio avanzado de diferenciación, cercano a la lactancia temprana. En conjunto, estos resultados sugieren que un periodo de cultivo de 72 h con hormonas lactogénicas es suficiente y apropiado para permitir la alveogénesis mamaria y la activación secretoria de las proteínas lácteas dentro del lumen alveolar.

La organización histológica y el tamaño de los organoides mamarios diferenciados (área total y área luminal alveolar) fueron similares entre los tratamientos con los PEs luego de 72 h de cultivo. La mayoría de los organoides, independientemente del tratamiento, presentaron una sola capa de células epiteliales y formación completa del lumen con pocas células apoptóticas en algunos casos. Esto sugiere, que la exposición a BPA o BP3 no afectó la maduración alveolar a nivel morfológico u organizacional. A diferencia del experimento de morfogénesis ductal, la exposición a BP3 aumentó la expresión del ESR1 y RP en los organoides diferenciados, al igual que lo hizo BPA. La exposición a la concentración más baja de BPA ( $1 \times 10^{-9}$  M) o de BP3 ( $1 \times 10^{-12}$  M) incrementó la expresión de ARNm del ESR1 y del RP total. Además, estas concentraciones también incrementaron la expresión de la isoforma RP-B, sin modificar significativamente la expresión de RP-A. Esto indica que el aumento en la expresión del RP total es debido a la isoforma RP-B. Por otro lado, los organoides tratados con estas mismas concentraciones de BPA o BP3 presentaron expresión proteica nuclear del ESR1 y el RP en más de una célula por organoide, a diferencia del VEH y los demás tratamientos. Al contrario, la exposición a la concentración más alta de BPA ( $1 \times 10^{-6}$  M) incrementó la expresión de ARNm del RP total sin modificar la expresión de la isoforma RP-B ni del ESR1, ni la expresión proteica nuclear de ambos receptores. En la glándula mamaria adulta, la señalización del ESR1 induce la expresión del RP en las células epiteliales luminales (Haslam, 1989), tanto de la isoforma RP-A como RP-B (Schultz et al., 2003). Los resultados de este trabajo

sugieren que la exposición a las concentraciones más bajas de BPA o BP3, incrementan la expresión del ESR1, y que a través de su señalización inducen un aumento en la expresión del RP-B. Por lo tanto, los efectos de BPA y BP3 podrían estar mediando a través de la expresión y señalización genómica de estos receptores hormonales durante la diferenciación funcional.

La vía de señalización de PRL involucra la activación de los factores de transcripción STAT5a y STAT5b, y es necesaria para desarrollar una alveogénesis completa, y para la expresión de las proteínas lácteas a finales de la preñez y durante la lactancia (Miyoshi et al., 2001; Rosen et al., 1999). STAT5a es un regulador crucial del desarrollo de la glándula mamaria y para la lactogénesis, y se expresa en mayor cantidad que STAT5b (Liu et al., 1997; Teglud et al., 1998). En este experimento, la exposición a BPA o BP3 no modificó la expresión de ARNm del PRLR. Sin embargo, el tratamiento con la concentración más baja de BPA ( $1 \times 10^{-9}$  M) o BP3 ( $1 \times 10^{-12}$  M) incrementó la expresión de ARNm de STAT5a. Aunque ninguno de los tratamientos modificó la expresión proteica de pSTAT5a/b, las dos concentraciones de BPA evaluadas, y la más baja de BP3 indujeron su traslocación al núcleo. Estas alteraciones ocurrieron en ausencia de modificaciones en la expresión del PRLR. Previamente, en nuestro laboratorio demostramos que la exposición perinatal a BPA produjo alteraciones durante la activación secretora en la glándula mamaria de la rata, también por mecanismos independientes a la activación del PRLR (Altamirano et al., 2017b). En cuanto a esto, la señalización de P4 a través del RP puede activar JAK2, incrementar la expresión de STAT5a, e inducir la translocación de pSTAT5a/b al núcleo, posiblemente mediante la interacción entre RP y STAT5a/b (Leehy et al., 2018; Richer et al., 1998). Asimismo, la fosforilación del RP-B provoca su traslocación a regiones promotoras de STAT5a induciendo su expresión (Hagan et al., 2013; Leehy et al., 2018). Por lo tanto, es posible que el incremento en la expresión de ARNm de STAT5a, y de la localización nuclear de pSTAT5a/b en los tratamientos con  $1 \times 10^{-9}$  M BPA y  $1 \times 10^{-12}$  M BP3 se deban a las modificaciones en la expresión del RP-B en estos mismos tratamientos.

En este experimento, los genes de las proteínas lácteas CSN2, LALBA, y WAP fueron utilizados como marcadores moleculares representativos de diferenciación epitelial mamaria. Los tratamientos con la concentración más baja de BPA ( $1 \times 10^{-9}$  M) y BP3 ( $1 \times 10^{-12}$  M) aumentaron la expresión de ARNm y de la proteína de CSN2, mientras que  $1 \times 10^{-6}$  M BPA aumentó solo su transcripto. En cambio, la expresión de LALBA fue menor a nivel de transcripto y proteína en los organoides expuestos a  $1 \times 10^{-9}$  M BPA, mientras que  $1 \times 10^{-6}$  M BPA solo redujo su transcripto. En cuanto a WAP, solo

fue modificada por la concentración más alta de BP3 ( $1 \times 10^{-6}$  M) que disminuyó su expresión de ARNm y de proteína. Puesto que la inducción y activación de STAT5a están involucradas en la activación transcripcional del gen CSN2 (Rosen et al., 1999), el mayor nivel de expresión de ARNm de CSN2 podría estar asociado al incremento en la expresión de ARNm de STAT5a y la translocación al núcleo de pSTAT5a/b, presentes en las mismas concentraciones de BPA y BP3. Por otro lado, CSN2 puede ser inducida por el acoplamiento del GR con pSTAT5a/b, que interaccionan con sitios de elementos de respuesta a GR en su promotor, mientras que el RP, principalmente la isoforma RP-A, también puede unirse a estos sitios suprimiendo su expresión (Buser et al., 2007; Groner, 2002; Jacobsen & Horwitz, 2012). La exposición a BPA o BP3 no modificó la expresión del GR o del RP-A en los organoides diferenciados por lo que no estarían participando en el aumento de expresión de CSN2. Ahora bien, las concentraciones más bajas de BPA y BP3 que presentaron niveles de expresión de CSN2 elevados también presentaron un aumento en la expresión del RP-B. Sin embargo, en nuestro modelo este incremento pareciera estar más asociado a la inducción de ARNm de STAT5a que la inhibición de la expresión de CSN2.

Además de la señalización de las hormonas lactogénicas, las modificaciones epigenéticas constituyen otro mecanismo de regulación de la expresión de las proteínas lácteas en la diferenciación funcional (Rijnkels et al., 2010). La glándula mamaria de ratones hembra preñadas o en lactancia presenta niveles de metilación de CSN2 menores que la de hembras nulíparas (Rijnkels et al., 2013). En el trabajo de nuestro laboratorio mencionado anteriormente, demostramos que BPA disminuyó la expresión de CSN2 mediante mecanismos epigenéticos, entre otros (Altamirano et al., 2017b). El aumento de la expresión de CSN2 en los organoides expuestos a ambas concentraciones de BPA y la más baja de BP3 de este experimento, se asoció a hipometilación del promotor en el sitio de restricción de *Tail*. Esto sugiere que los efectos de BP3, al igual que de BPA, también podrían estar mediados por modificaciones epigenéticas en este modelo. Rijnkels et al. (2013) reportaron un menor nivel de metilación a -103 pb desde el sitio de inicio de la transcripción (TSS) de CSN2 en ratones hembra lactantes. Este sitio es muy próximo al que evaluamos en este experimento (-106 pb desde TSS) asociado al factor de transcripción STAT5a, crítico para la inducción y activación de CSN2 (Rosen et al., 1999). En conjunto, nuestros resultados sugieren que la exposición directa a la menor concentración de BPA o BP3 incrementa la expresión de CSN2 mediante: 1) el aumento en la expresión de ARNm de STAT5a; 2) la traslocación al núcleo de pSTAT5a/b; y 3) el menor nivel de metilación en uno de los sitios de interacción de STAT5a dentro del promotor.

Debido a que la expresión del PRLR y el GR no fueron modificados por BPA o BP3, es posible que el aumento de expresión en el RP-B esté involucrada al menos en las alteraciones de STAT5a.

A diferencia de CSN2, en este trabajo los organoides expuestos a BPA presentaron menor expresión de ARNm de LALBA, asociado a un incremento en el nivel de ADNme en sitios específicos de su promotor. Los sitios evaluados están relacionados a los factores de transcripción STAT1 y ELF5, involucrados en el desarrollo de la glándula mamaria durante la preñez y la lactancia (Boutinaud & Jammes, 2004; Watson & Neoh, 2008; Zhou et al., 2005). Esto sugiere que la metilación en los sitios evaluados del promotor de LALBA podría contribuir a la disminución en su expresión, mediante la interferencia de la unión con los factores de transcripción. Además, es posible que la transcripción del gen de LALBA esté alterada por otros mecanismos epigenéticos no evaluados en este estudio, tales como las modificaciones en las histonas. A diferencia de CSN2, el gen de LALBA presenta características epigenéticas (enriquecimiento en H2K4m2) asociadas a una organización abierta de la cromatina en la glándula mamaria de ratones hembra adultas desde antes de la preñez (Rijnkels et al., 2013). Incluso, en nuestro laboratorio demostramos que la exposición perinatal a BPA disminuye la expresión de CSN2 en la glándula mamaria de la rata a finales de la preñez, sin modificar la expresión de LALBA (Kass et al., 2012). Por lo tanto, el efecto opuesto de la exposición a BPA en la metilación de CSN2 y LALBA podría deberse a diferencias en la regulación transcripcional de estos genes, señaladas por Rijnkels et al. (2013). Por otro lado, las progestinas suprimen específicamente la síntesis y secreción de LALBA (Quirk et al., 1985), posiblemente mediante la interacción del RP con factores de transcripción relacionados con la vía de señalización del PRLR (Sankaran & Topper, 1988). En conjunto, tanto el incremento en la expresión del RP como en el ADNme del promotor de LALBA en los organoides expuestos a BPA, podrían ser responsables de la menor expresión de ARNm de LALBA en este modelo. A diferencia de la concentración más baja de BPA y BP3, el tratamiento con  $1 \times 10^{-6}$  M BPA incrementó la expresión del transcripto de CSN2 y disminuyó el de LALBA, sin modificar significativamente los niveles de expresión proteica. Es posible que este tratamiento afecte la regulación postranscripcional de ARNm de CSN2, e induzca modificaciones post-traslacionales en la proteína de LALBA. Durante la activación secretoria, se ha reportado que la regulación hormonal también afecta la regulación traslacional de las proteínas lácteas, tales como la poliadenilación de ARNm de CSN2 y la disponibilidad de aminoácidos (Rhoads & Grudzien-Nogalska, 2007). Además, diversos PEs con actividad estrogénica débil en

las vías genómicas, afectan las vías no-genómicas de forma mucho más potente (Wagner et al., 2017). Respecto a la expresión de WAP, el único tratamiento que modificó su expresión fue la mayor concentración de BP3 ( $1 \times 10^{-6}$  M), disminuyendo tanto su transcripto como su expresión proteica. El transcripto de WAP también se ha visto disminuido por la exposición a dioxinas, otro grupo de PEs (Vorderstrasse et al., 2004) Para la máxima expresión de WAP, es necesaria la cooperación entre el GR, STAT5a y el factor nuclear I (Mukhopadhyay et al., 2001; Rosen et al., 1999). Considerando que la exposición a la concentración más alta de BP3 no modificó la expresión del GR ni de STAT5a, y tampoco indujo la translocación al núcleo de pStat5a/b, sería importante analizar al factor nuclear I en futuros estudios.

En conjunto, la exposición directa a bajas concentraciones de BPA o BP3 alteró la diferenciación funcional de organoides mamarios, modificando la expresión de las proteínas lácteas y su regulación transcripcional a través de diferentes vías de regulación hormonal y/o el estado de metilación de la región promotora de sus genes. En cambio, la exposición a concentraciones más elevadas de BPA o BP3 no indujo diferencias significativas en la mayoría de los marcadores moleculares evaluados. Este patrón coincide con las curvas de dosis-respuesta no monotónicas características de las hormonas, y descriptas también para diversos PEs (Vandenberg et al., 2012). En cambio, en general los efectos más evidentes de BP3 durante la morfogénesis ductal se observaron con la mayor concentración. Otra diferencia notable de BP3 fue su efecto opuesto en la expresión de los receptores hormonales entre ambos experimentos. Durante la morfogénesis ductal BP3 no afectó al ESR1, pero disminuyó la expresión del RP, mientras que durante la diferenciación funcional aumentó la expresión de ambos receptores. Estos resultados sugieren que la exposición directa a BP3 podría alterar mecanismos diferentes en las etapas del desarrollo mamario evaluadas en estos experimentos.

# **CAPÍTULO 2**

**EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A BENZOFENONA-3 DURANTE  
LA GESTACIÓN SOBRE LA MORFOGÉNESIS DUCTAL Y LA  
DIFERENCIACIÓN FUNCIONAL EN LA GLÁNDULA MAMARIA**

## 1 | INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la glándula mamaria es un proceso dinámico que comienza durante la embriogénesis y continúa a lo largo de la vida posnatal (Brisken & Scabia, 2020). Al momento del nacimiento en los ratones, la estructura rudimentaria de la glándula permanece relativamente quiescente hasta la pubertad. A partir de entonces, bajo la influencia de las hormonas ováricas E2 y P4, se inicia el crecimiento alométrico de la glándula (Dawson & Visvader, 2021). En esta etapa, los TEBs, estructuras altamente proliferativas en la punta de los conductos, invaden el parche adiposo y dirigen la elongación y bifurcación de los conductos subyacentes, promoviendo la morfogénesis ductal (Brisken & Scabia, 2020; Ferreira Slepicka et al., 2021; Paine & Lewis, 2017). La señalización de E2 induce la expresión del RP, que se expresa extensamente en las células epiteliales luminales de los conductos mamarios y en las células del cuerpo de los TEBs durante la pubertad (Ismail et al., 2002; Seagroves et al., 2000). Tanto la señalización de E2 como de P4 inducen la expresión de AREG (Aupperlee et al., 2013) y actúan en sinergia con IGF-1 para promover la formación de los TEBs y la proliferación epitelial (Ruan et al., 2005; Ruan & Kleinberg, 1999). En esta etapa, el RP también induce la expresión de WNT4 que regula la población de células madre mamarias (Brisken et al., 2000; Rajaram et al., 2015; Ranjan et al., 2021). Además, durante la fase de diestro del ciclo estral, y durante la preñez, el RP induce la expresión de RANKL que promueve la proliferación epitelial necesaria para la ramificación lateral (Beleut et al., 2010; Fernandez-Valdivia et al., 2009), además de la alveogénesis mamaria (Brisken & Scabia, 2020). A su vez, RP induce la expresión de ELF5 en la preñez, esencial para la diferenciación de los progenitores epiteliales hacia un fenotipo secretor, promoviendo el desarrollo alveolar (Lee et al., 2013). Durante la etapa de diferenciación funcional, las células epiteliales alveolares adquieren la capacidad de sintetizar las proteínas de la leche, como CSN2, LALBA, y WAP (Hannan et al., 2023), mientras que las células mioepiteliales contráctiles adquieren una morfología estrellada cuyas proyecciones se conectan rodeando la capa epitelial luminal alveolar (Hannan et al., 2023). La señalización de PRL a través de su intermediario STAT5 es clave en la maduración alveolar durante la diferenciación funcional, y mantiene la síntesis de proteínas de la leche durante la lactancia (Hannan et al., 2023).

El desarrollo de la glándula mamaria durante etapas tempranas de la vida es vulnerable a la acción de los PEs, que intervienen con la actividad y regulación de los procesos hormonales, que pueden impactar en la lactancia o incrementar la susceptibilidad a enfermedades como el cáncer (Fenton, 2006; Gore et al., 2015; Terry

et al., 2019). Particularmente, la exposición oral a BP3 en ratones hembra durante la preñez y lactancia induce alteraciones morfológicas mamarias a largo plazo (LaPlante et al., 2018). Incluso, las crías de esos ratones, expuestas perinatalmente a BP3, también presentan alteraciones en la glándula mamaria durante la pubertad y la adultez, asociadas a modificaciones en la expresión de receptores hormonales (Matouskova et al., 2020, 2022a).

En el Capítulo 1 de esta tesis demostramos que la exposición directa a BP3 interfiere con la regulación hormonal en organoides mamarios, principalmente del RP durante la morfogénesis ductal y la diferenciación funcional *in vitro*, alterando la expresión de las proteínas de la leche. Si bien varios estudios experimentales han evaluado los efectos de la exposición oral a BP3 en diferentes etapas del desarrollo mamario *in vivo* (Busch et al., 2005; Kariagina et al., 2020; LaPlante et al., 2018; Matouskova et al., 2020, 2022a; Morozova et al., 2024), la principal ruta de exposición en humanos es a través de la aplicación dérmica de productos que contienen BP3 en sus formulaciones (Krause et al., 2012). Por lo tanto, en este capítulo, nuestro objetivo fue evaluar los efectos de la exposición a BP3 durante la gestación sobre la morfogénesis ductal y la diferenciación funcional mamaria, en ratones hembra a cuyas madres se les aplicó BP3 sobre la piel durante la preñez.

## 2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS

El objetivo de este Capítulo fue evaluar los efectos de la exposición a BP3 durante la gestación sobre el desarrollo ductal y la diferenciación funcional de la glándula mamaria murina utilizando modelos *in vivo* (sección 2.2 del apartado Objetivos, pág. 39).

## 3 | MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 | Animales

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 criados en el ISAL (UNL-CONICET). Los animales fueron mantenidos en condiciones controladas ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ; 14 h de luz desde las 06 hasta las 20 h) y tuvieron libre acceso a agua y comida (Nutrición Animal, Rafaela, Argentina). Los animales fueron tratados lo más humanamente posible y se tomaron las precauciones necesarias para aliviarlos del dolor cuando hizo falta. El protocolo experimental fue diseñado de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos y aprobado por el Comité de Ética y Seguridad de la Investigación, FBCB-UNL.

### 3.2 | Preparación de soluciones de trabajo y dosis experimentales

Se preparó una solución madre de 100 mg/mL BP3 (especificaciones descriptas en el Capítulo 1) en aceite de sésamo (Sol Azteca, Argentina). BP3 primero fue disuelto en etanol absoluto, y luego se llevó a volumen con aceite de sésamo hasta la concentración final, agitando en baño maría hasta alcanzar homogeneidad. Luego, por diluciones consecutivas se preparó una solución de trabajo de 50 mg/mL y otra de 0.15 mg/mL en aceite de sésamo (<10 % de etanol absoluto). Como control se utilizó una solución de <10 % de etanol en aceite de sésamo. Las dosis que se utilizaron son equivalentes a la concentración de BP3 encontrada en muestras de leche humana (0.15 mg/kg/día) (Molins-Delgado et al., 2018); y a la cantidad de BP3 a la que se exponen las personas luego de una aplicación de protectores solares en todo el cuerpo (50 mg/kg/día) (Janjua et al., 2008).

### 3.3 | Diseño experimental del modelo de exposición gestacional

Se ha reportado que la exposición a BP3 desde el inicio de la preñez tiene efectos deletéreos en las placas y los fetos, y puede causar un fenotipo similar a la restricción del crecimiento uterino (Santamaria et al., 2020) o la pérdida fetal (Han et al., 2022). Por lo tanto, el periodo de exposición, entre DG-8.5 y DG-18.5, se seleccionó para evitar estas complicaciones; para que inicie previo al desarrollo embrionario de la glándula mamaria (DG-10.5; Biswas et al., 2022); y para que finalice el día previo al parto esperado (DG-18.5 para esta cepa) para reducir el estrés de la madre, y favorecer la conducta materna. Además, se seleccionó la vía de exposición dérmica en los ratones F0 debido a que es la que más se asemeja a la aplicación de pantallas solares y cosméticos sobre la piel, la principal vía de exposición a BP3 en humanos (Krause et al., 2012).

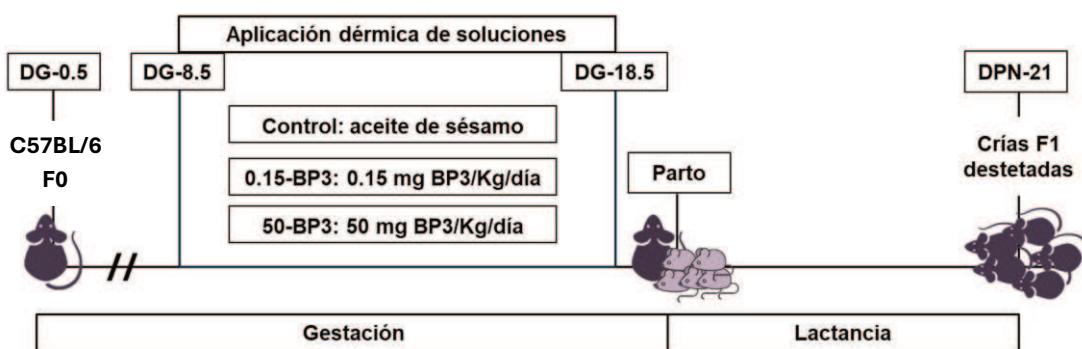
#### 3.3.1 | Aplicación dérmica de soluciones

Ratones hembra C57BL/6 (F0), nulíparas, adultas (8 semanas de edad) fueron colocadas en jaulas con ratones macho C57BL/6 de fertilidad comprobada a última hora de la tarde para ser preñadas. Luego, diariamente por la mañana se inspeccionaron las hembras para corroborar la presencia del tapón vaginal, que confirmara actividad sexual con el macho. El día en el que se encontró el tapón vaginal se designó DG-0.5, las hembras fueron separadas del macho, y se aislaron en jaulas individuales. Puesto que, en esta cepa la presencia del tapón vaginal tiene una sensibilidad variable cercana al 50% para garantizar preñez, la confirmación se

complementó con el método propuesto por Heyne et al. (2015) evaluando la ganancia de peso corporal entre DG-0.5 y DG-7.5. Este método propone que un aumento de peso corporal de 1.75 g o más en ese periodo, cuenta con una sensibilidad del 89.5% para garantizar la preñez.

En DG-7.5 los animales F0 preñados se asignaron aleatoriamente en tres grupos experimentales (Control, 0.15-BP3, y 50-BP3, según la dosis de BP3 a aplicar), asegurando una distribución equitativa del peso corporal promedio de los animales entre los grupos. Luego los animales fueron rasurados cuidadosamente en una zona de aproximadamente 1.5 cm<sup>2</sup> de área en la nuca con una afeitadora eléctrica (Philips, MG3730/15, Argentina) evitando causar irritación. Se seleccionó la región de la nuca para evitar conductas de acicalado, por contacto en esta zona con sus miembros delanteros u hocico. A partir del DG-8.5 y hasta el DG-18.5, por la mañana, a los animales se les aplicó sobre la zona de piel desnuda una solución de vehículo (aceite de sésamo), 0.15 o 50 mg BP3/kg/día, según se tratara del grupo Control, 0.15-BP3, o 50-BP3, respectivamente (Figura 19). Los animales se colocaron en una jaula limpia sin viruta, se les aplicó lentamente la dosis correspondiente según su grupo experimental, evitando que la solución entre en contacto con el pelaje del animal. Se esperó entre 5-10 min hasta corroborar visualmente que la solución fue absorbida por la piel antes de devolverlas a su jaula original. Los animales fueron pesados diariamente para ajustar el volumen de la solución a aplicar, y que garantice las dosis mencionadas. El volumen aplicado varió entre 20-50 µL, según el peso del animal durante la preñez.

Luego del parto, las crías (F1) fueron pesadas y sexadas de acuerdo con la distancia anogenital en el DPN-4 y camadas de 4-6 crías por madre fueron mantenidas hasta el destete (DPN-21). Los machos no utilizados fueron destinados a otros experimentos que se desarrollaron en el Instituto. Las crías hembras F1 destetadas fueron inspeccionadas diariamente para determinar el día de la apertura vaginal como indicador del inicio de la pubertad.



**Figura 19.** Diseño experimental de exposición gestacional. BP3: benzofenona-3. DG: día gestacional. DPN: día posnatal.

### 3.4 | Experimento de desarrollo ductal mamario en la pubertad

Un grupo de hembras F1 (expuestas durante la gestación) fue sacrificado en DPN-45 (periodo puberal; Figura 20), durante la fase de diestro del ciclo estral, determinado por extendidos vaginales. La eutanasia y mastectomía de los animales se realizó como se indica en el Capítulo 1, sección 3.2.2 de esta Tesis. Se recogió sangre troncal para la obtención de suero que fue mantenido a -80 °C hasta el dosaje de E2 y P4 (Gomez et al., 2019; Kass et al., 2012), y se diseccionaron ambas cadenas mamarias inguinales (pares 4 y 5). La cadena izquierda fue procesada para montaje completo (*whole-mount*) de la glándula (Kass et al., 2015), como se describe más adelante. En la cadena contralateral (derecha), la glándula mamaria N° 4 fue fijada en formol *buffer* al 10% y procesada hasta su inclusión en parafina (ver Capítulo 1, sección 3.2.2, y Anexo, Tabla A1), y la glándula mamaria N° 5 fue congelada en N<sub>2</sub> líquido y almacenada a -80 °C hasta la realización de qRT-PCR (Altamirano et al., 2017b). Se obtuvieron secciones histológicas de 5 µm de espesor de cada taco de parafina obtenido, y las mismas fueron destinadas para técnicas histoquímicas y de inmunohistoquímica (IHQ).

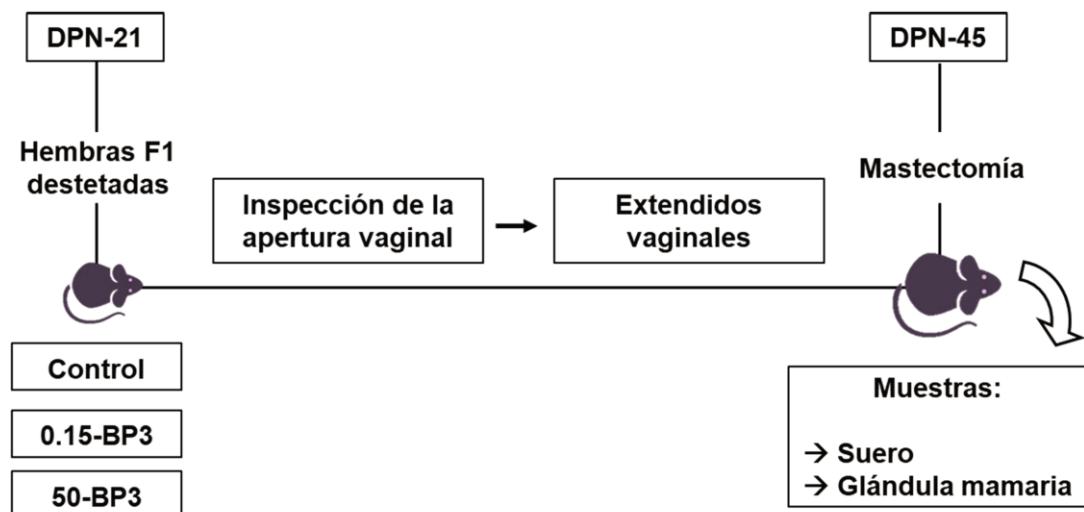


Figura 20. Experimento de desarrollo ductal mamario en la pubertad. DPN: día posnatal.

### 3.4.1 | Determinación de niveles séricos de E2 y P4

La determinación de E2 y P4 en las muestras de suero se realizó por inmunoensayo de electroquimioluminiscencia (ECLIA-Roche, Argentina), previa extracción de esteroides con éter dietílico (Tavalieri et al., 2024). Debido a que este método requiere partir de un volumen mínimo de 250 µL por determinación, fue necesario realizar pools del suero de 4-6 animales del mismo grupo experimental para alcanzar ese volumen. Se pudieron realizar dos determinaciones por grupo experimental para cada hormona. Los valores límites de detección del método fueron 5 pg/mL para E2 y 0.05 ng/mL para P4.

### 3.4.2 | Montaje completo (*whole-mount*) de la glándula mamaria y análisis morfométrico

Esta técnica permite estudiar el crecimiento y desarrollo de la glándula, analizando su morfología completa. Se realizó siguiendo el protocolo establecido en nuestro laboratorio según bibliografía de referencia (Davis & Fenton, 2013; Kass et al., 2004; Rasmussen et al., 2000). La cadena abdominal diseccionada (glándula mamaria N° 4 y 5) de animales en DPN-45 se colocó y estiró en un portaobjetos previamente rotulado y se dejó secar a temperatura ambiente sobre mesada. Luego se fijó en solución de Carnoy (60 % etanol absoluto, 30 % cloroformo, 10 % ácido acético glacial (Rassmussen et al., 2000) toda la noche. Esta solución no solo fija el tejido, sino que contribuye a remover el contenido lipídico del parche adiposo, y mejora la posterior tinción de los núcleos. Luego se hidrató en alcoholes de concentración decreciente

(100°, 96°, 70°), se tiñó con colorante carmín-alúmina (solo tiñe los núcleos), se deshidrató en alcoholes de concentración creciente (70°, 96°, 100°), y se aclaró en xilol. El epitelio mamario (de alta densidad nuclear) se puede visualizar incluso a simple vista. El aclaramiento en xilol disuelve los lípidos remanentes tornando el tejido glandular más transparente. Por último, se colocaron en bolsas plásticas transparentes (Kapak Seal PAK pouches, KAPAK Corporation, EE. UU.) rellenas con salicilato de metilo (Sigma-Aldrich), y se sellaron por calor. De esta manera, se conservan a largo plazo, y se posibilita su inspección con instrumentos ópticos debido a que el salicilato de metilo presenta un índice de refracción de la luz muy cercano al del tejido.

El análisis morfométrico de las *whole-mounts* se realizó según protocolos descriptos por nuestro laboratorio (Altamirano et al., 2017a, 2018). Se obtuvieron imágenes digitalizadas de las *whole-mounts* de DPN-45 con una cámara color digital Spot Insight V3.5 acoplada a estereomicroscopio Stemi 305 (Zeiss, Argentina). Las imágenes se analizaron con el programa de uso libre ImageJ. Para calibrar las unidades de medida, se utilizó una regla como referencia para convertir a milímetros la distancia en pixeles. Las evaluaciones se realizaron en la glándula mamaria N° 4. Se midió el área glandular, el perímetro glandular, el crecimiento longitudinal, el área epitelial relativa, y el N° y tamaño de los TEBs.

- Área y perímetro glandular: se utilizó la herramienta de selección de polígono, utilizando la punta de los conductos más externos como vértices para delimitar la silueta de la glándula.
- Crecimiento longitudinal: se determinó la distancia de elongación de los conductos más allá del nódulo linfático (NL). Se trazaron dos líneas paralelas, una tangente al NL sobre el extremo más próximo al frente de crecimiento de la glándula, y otra tangente a la punta del conducto más alejado del NL, y se midió la distancia perpendicular entre ambas líneas.
- Área epitelial relativa: se superpuso sobre la imagen una grilla de líneas perpendiculares de 0.05 mm de distancia entre sí, y se determinó la densidad de volumen según la fórmula descripta por Weibel (1969):  $Vv = Pi / P$ ; donde Vv es la fracción de volumen estimada del objeto de interés (área epitelial), Pi es el número de puntos de la grilla coincidentes con las estructuras epiteliales, y P es el número de puntos totales incidentes dentro del área de la glándula. No se tuvieron en consideración para el conteo los puntos que coincidían con el NL, y los que se encontraban fuera del área glandular. El resultado se expresó como área epitelial relativa ( $Vv \times 100$ ).

- TEBs: se definieron como estructuras bulbosas en la punta de los conductos en crecimiento, que presentaron un tamaño de  $0.03 \text{ mm}^2$  o superior (Matouskova et al., 2022b). Se cuantificó el número de estos por muestra y se midió el área de cada uno.

### 3.4.3 | Análisis histomorfológico e infiltración de eosinófilos y mastocitos

Las secciones histológicas de muestras de glándula mamaria de animales de DPN-45 se colorearon con H&E y se analizaron por microscopía óptica como se describe en el Capítulo 1, sección 3.6.1. Se analizaron las características histológicas de los conductos mamarios, los TEBs, y el estroma mamario. Además, se realizaron tinciones con rojo sirio alcalino (Luque et al., 1996), o con alcian blue/safranina (AB/S) (Purnell et al., 1974) para identificar eosinófilos y mastocitos en los cortes histológicos, respectivamente (Anexo, Tabla A4). En el caso de los mastocitos, según la composición de las sustancias bioactivas en sus gránulos de secreción pueden teñirse azul (AB positivos) si predominan glucosaminoglucanos como condroitín sulfato o heparina pobremente sulfatada; o rojos si predomina heparina completamente sulfatada (S positivos). Según su afinidad tintorial, los mastocitos pueden clasificarse como mastocitos de las mucosas (MMC, *mucosal mast cells*) si son AB-positivos, o mastocitos del tejido conectivo (CTMC, *connective tissue mast cells*) si son S-positivos (Ribatti, 2018). Los mastocitos activos (liberando sustancias vasoactivas) se identificaron como aquellos con gránulos secretados en el espacio extracelular o con espacios en blanco en su citoplasma (Varayoud et al., 2004). La evaluación se realizó utilizando el microscopio óptico Olympus BH2 (Olympus Optical., Ltd.). Solo se consideraron los mastocitos en el tejido conectivo peri-ductal, no así del estroma o los próximos a vasos sanguíneos (Lilla & Werb, 2010). Para ambas determinaciones, se evaluaron todas las estructuras epiteliales de una sección histológica por muestra. Los resultados se expresaron como el promedio de mastocitos o eosinófilos por conducto.

### 3.4.4 | Análisis del índice de proliferación epitelial, y expresión de receptores hormonales

Por ensayos de IHQ se determinó la expresión del marcador de proliferación Ki67 (1:1500, anti-Ki67; ISAL, Gomez et al., 2020), y de los receptores hormonales ESR1 y RP total (Tabla 1, Capítulo 1, sección 3.6.2). La técnica de IHQ se realizó siguiendo un protocolo previamente publicado (Muñoz-de-Toro et al., 1998), con ligeras modificaciones para optimizar la inmunomarcación con los anticuerpos utilizados. Secciones histológicas de 5  $\mu\text{m}$  de espesor de muestras de glándula mamaria fueron

incubadas con anticuerpos primarios a 4 °C toda la noche. El sistema de revelado se realizó con anticuerpos secundarios biotilinados, y el complejo estreptavidina peroxidasa (Sigma-Aldrich), con diaminobencidina (DAB, Sigma-Aldrich) como sustrato cromogénico. Luego se contra-colorearon ligeramente con hematoxilina de Mayer antes de realizar el montaje permanente con bálsamo de Canadá. En todos los casos se realizaron controles negativos sustituyendo el anticuerpo primario por suero no inmune, y controles positivos en muestras de tejidos con inmunoreactividad previamente demostrada. Los anticuerpos secundarios biotilinados fueron generados en el ISAL. Se cuantificó el porcentaje de células epiteliales positivas para Ki67, ESR1, y RP, respecto del total de células epiteliales, utilizando un microscopio óptico Olympus BH2 (Olympus Optical Co., Ltd). Para cada determinación, se evaluaron todas las estructuras epiteliales de dos secciones histológicas por muestra, promediando sus valores.

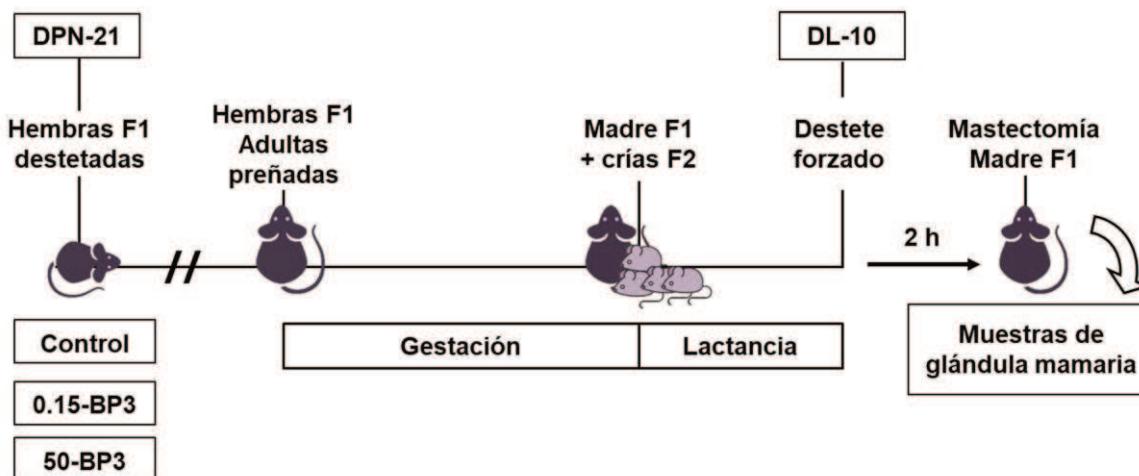
### **3.4.5 | Análisis de la expresión de ARNm mediante qRT-PCR**

Se extrajo ARN total de las muestras de glándula mamaria conservadas a -80 °C, provenientes de animales en DPN-45. Se utilizó un homogeneizador Ultra Turrax® T25 Basic (IKA – Werke GMBH & Co., KG, Alemania) para homogenizar las muestras en el reactivo TRIzol (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se cuantificó la concentración y pureza del ARN extraído (espectrofotómetro NanoDrop Lite, Thermo-Scientific). Se realizó una RT de 1 µg del ARN total extraído de cada muestra para obtener su ADNc correspondiente (termociclador T18, IVEAMA). El ADNc se utilizó para cuantificar la expresión de ESR1, RP, IGF-1, WNT4, AREG, RANKL, ELF5 (Tabla 2) por qPCR (termociclador Applied Biosystems StepOne™, Thermo Fischer Scientific). La evaluación de la expresión de los transcriptos se realizó con el programa REST-MCS© beta v2 2006 ([gene-quantification.de/rest-mcs.html](http://gene-quantification.de/rest-mcs.html)). Los valores de expresión de cada gen blanco se normalizaron por la expresión del gen *housekeeping* L19, debido a que no se observaron diferencias significativas en los valores de Ct de L19 entre las muestras de los diferentes grupos experimentales. Los detalles de las técnicas se detallan en el Capítulo 1, sección 3.8.

## **3.5 | Experimento de diferenciación funcional de la glándula mamaria lactante**

Otro grupo las crías hembras F1 expuestas durante la gestación, se mantuvieron en condiciones controladas de bioterio hasta alcanzar la madurez reproductiva (8 semanas de edad). En ese momento se pusieron a preñar con ratones macho

C57BL/6 de fertilidad comprobada, no expuestos experimentalmente a BP3. Luego del parto, se las dejó lactar a sus crías F2 hasta el día de lactancia (DL) 10 (Figura 21), y se registró el peso corporal. Luego, se aislaron las madres F1 dos horas antes de realizar la mastectomía para homogenizar la producción láctea de los animales de todos los grupos experimentales. La cadena mamaria izquierda fue congelada en N<sub>2</sub> líquido y mantenida a -80°C para realizar técnicas de biología molecular, y la cadena contralateral fue fijada y procesada hasta su inclusión en parafina. Las técnicas se detallan en el Capítulo 1, secciones 3.2.2 y 3.5.



**Figura 21.** Experimento de diferenciación funcional mamaria en la lactancia. DPN: día posnatal. DL: día de lactancia.

### 3.5.1 | Análisis histológico, morfometría alveolar y expresión de $\alpha$ -SMA

Las secciones histológicas de muestras de glándula mamaria de animales en DL-10 se colorearon con H&E y se analizaron por microscopía óptica como se describe en el Capítulo 1, sección 3.6.1. Se analizaron las características histológicas del desarrollo lóbulo-alveolar y del epitelio mamario secretor.

Por otro lado, se realizó inmunomarcación de  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA, clone asm-1; 1:50, Novocastra Laboratories Ltd.) por IHQ (ver sección 3.4.4 de este Capítulo). Se utilizó anti-ratón biotilinado (1:100) como anticuerpo secundario, y estreptavidina-peroxidasa (1:150) para el revelado. Luego se obtuvieron imágenes digitalizadas de la inmunomarcación de  $\alpha$ -SMA, y se analizaron con el programa ImageJ.

- Morfometría alveolar: al ser un marcador de células mioepiteliales, la inmunodetección de  $\alpha$ -SMA permitió delimitar de manera precisa el límite exterior de los alveolos mamarios, utilizando la herramienta de trazo libre. Se analizaron todos los

alveolos mamarios de 20 imágenes por sección histológica, y se midió el área y perímetro de los mismos. Se analizaron dos secciones histológicas por muestra. Además, se utilizó la mediana del área alveolar del grupo control ( $6851 \mu\text{m}^2$ ) como valor de corte para clasificar a los alveolos como pequeños (contraídos) o grandes (dilatados), y se cuantificó el porcentaje de los mismos por muestra.

- Expresión de  $\alpha$ -SMA: se midió el área y perímetro de la inmunomarcación de  $\alpha$ -SMA en el estrato de células mioepiteliales de 20 imágenes por sección histológica, analizando dos secciones histológicas por muestra. Estas determinaciones se realizaron siguiendo un procedimiento similar al descripto por Gomez et al. (2024) con el programa ImageJ. Brevemente, se realizó una deconvolución del color (Ruirok & Jhonston, 2001) para descomponer las imágenes en tres canales. La imagen del canal hematoxilina, conserva los píxeles azules de los núcleos celulares. El canal DAB conserva los píxeles marrones DAB positivos (inmunomarcación). El canal verde conserva los píxeles inespecíficos que el programa no puede clasificar en los otros canales. Sobre la imagen del canal DAB (píxeles inmunomarcados  $\alpha$ -SMA positivos) se transpusieron los contornos de los alveolos delimitados en el procedimiento anterior (morfometría alveolar). Luego, en cada alveolo se midió el área y perímetro de la inmunomarcación de  $\alpha$ -SMA, y se determinó el área relativa de expresión de  $\alpha$ -SMA para cada alveolo (área alveolar / área inmunomarcada de  $\alpha$ -SMA).

### **3.5.2 | Análisis de la expresión de proteínas lácteas y moléculas de señalización de la vía del receptor de PRL**

- Expresión proteica: se evaluó la expresión de CSN2 y LALBA por IHQ. Se utilizaron anti-CSN2 y anti-LALBA (ambos 1:400; Tabla 1, Capítulo 1, sección 3.6.2), anti-conejo biotilinado (1:400, ISAL) y estreptavidina-peroxidasa (1:300). Los detalles de la técnica se describen en la sección 3.4.4 de este Capítulo. Luego se obtuvieron imágenes digitalizadas y que se analizaron con el programa ImageJ como se describe en Gomez et al. (2023). Brevemente, se realizó una deconvolución del color (Ruirok & Jhonston, 2001) para descomponer las imágenes de inmunomarcación de las proteínas lácteas en tres canales. La imagen con el canal de DAB (solo la inmunomarcación) se convirtió a escala de grises y se midió la cantidad e intensidad de los píxeles inmunopositivos. Se calculó la densidad óptica integrada (DOI) como la combinación lineal del valor de intensidad medio y el área relativa de la inmunomarcación alveolar (Ramos et al., 2002). Para cada determinación se evaluaron 20 imágenes por sección histológica,

analizando dos secciones histológicas por muestra. La expresión proteica calculada de CSN2 y LALBA se expresó en unidades arbitrarias de DOI.

- Expresión de ARNm: se evaluó la expresión del transcripto de CSN2, LALBA y WAP por qRT-PCR como se describió anteriormente en la sección 3.4.5 de este Capítulo, y en la sección 3.8 del Capítulo 1. El cálculo de la expresión de cada gen blanco se determinó por el método de la curva estándar (Čikoš et al., 2007), y se relativizó por la expresión de L19, que se utilizó como gen *housekeeping*. De manera similar, se evaluó la expresión relativa del transcripto de STAT5a y ELF5, moléculas de señalización de la vía del PRLR.

### 3.6 | Experimento de diferenciación funcional *in vitro* de la glándula mamaria

Se utilizaron ratones F1 hembra pre-púberes (recién destetadas) que fueron expuestas durante la gestación al vehículo (aceite de sésamo) o a BP3. Se las estimuló hormonalmente para alcanzar un desarrollo mamario similar al de la glándula mamaria en la preñez. Luego se diseccionaron las glándulas mamarias para obtener explantos mamarios que se diferenciaron *in vitro* con hormonas lactogénicas para analizar marcadores de diferenciación funcional.

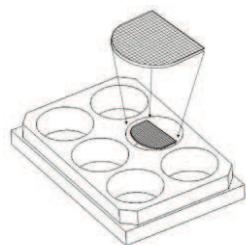
- Exposición gestacional: se realizó como se indica en las secciones 3.3 de este Capítulo. Ratones F0 hembra preñadas (C57BL/6) fueron tratadas dérmicamente con aceite de sésamo como control (CON), o con 50 mg BP3/kg peso corporal/día (BP3) desde DG-8.5 hasta DG-18.5. Luego del parto, se les permitió lactar a sus camadas F1 hasta el DPN-21, en el que solo las crías hembras continuaron el experimento.
- Estimulación del desarrollo mamario: ratones F1 hembra de los grupos CON y BP3 fueron inyectadas diariamente vía subcutánea desde DPN-21 hasta DPN-30 con aceite de sésamo (A), o con 1 µg/0.1 mL de E2 + 1 mg/0.1 mL de P4 (EP, Sigma-Aldrich) para inducir el desarrollo lóbulo-alveolar semejante al de mitad de preñez (Ginsburg & Vonderhaar, 2000; Terry et al., 1977). De esta manera, según la exposición durante la gestación y el tratamiento posnatal durante el periodo peri-puberal, los animales F1 conformaron los siguientes grupos experimentales: CON+A (control negativo, n=2), CON-EP (control positivo, n=2), BP3+A (n=4), BP3+EP (n=4), como se detalla en la Tabla 5.

**Tabla 5. Tratamiento de animales para obtención de explantes mamarios**

Exposición gestacional y tratamiento posnatal		Grupo experimental
Gestación	Peri-pubertad	
Aceite de sésamo	Aceite de sésamo	CON+A
Aceite de sésamo	1 µg/0.1 mL E2 + 1 mg/0.1 mL P4/día	CON+EP
50 mg BP3/kg/día	Aceite de sésamo	BP3+A
50 mg BP3/kg/día	1 µg/0.1 mL E2 + 1 mg/0.1 mL P4/día	BP3+EP

BP3: benzofenona-3. E2: estradiol. P4: progesterona.

- Mastectomía: los animales F1 en DPN-31 fueron sacrificados y se diseccionaron sus glándulas mamarias, como se indica en la sección 3.2.2 del Capítulo 1. Los pares mamarios N° 4 (sin el NL) y N° 5 se diseccionaron asépticamente y se cortaron en fragmentos de aproximadamente  $2 \times 2 \times 2 = 8 \text{ mm}^3$  (explantes mamarios), que luego fueron cultivados como se detalla más adelante. Además, se obtuvo la glándula torácica N° 3 que se fijó, procesó, e incluyó en parafina para evaluar el desarrollo mamario alcanzado durante la estimulación hormonal. Para ello se realizaron coloraciones con H&E para analizar la histomorfología mamaria y ensayos de IHQ para evaluar la proliferación celular epitelial (inmunomarcación de Ki67). Los procedimientos de las técnicas se detallan en las secciones 3.5 y 3.6.1 del Capítulo 1, y en la sección 3.4.4 de este Capítulo.
- Diferenciación *in vitro*: Los explantes mamarios se cultivaron en placas de 6 pocillos y se mantuvieron a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> durante todo el experimento. Para el cultivo, los explantes se colocaron sobre una tela de algodón, como base de apoyo, que se encontraba sujetada firmemente a un bastidor plástico estéril dentro de cada pocillo. De esta manera, los explantes permanecían parcialmente sumergidos en el medio de cultivo basal, facilitando el intercambio gaseoso (Figura 22).



**Figura 22.** Esquema de bastidor en placa de cultivo. Este sistema de soporte se utilizó para el cultivo de explantes mamarios, de manera que los explantes permanezcan parcialmente sumergidos en el medio de cultivo, facilitando el intercambio gaseoso.

Se cultivaron 4 explantes del mismo grupo experimental por pocillo. El medio basal se preparó con medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Gibco) sin rojo fenol y se

suplementó con 5 µg/mL insulina, 0.1 µg/mL aldosterona, 0.1 µg/mL hidrocortisona, 0.02 mg/mL ácido ascórbico, 0.1 mg/mL albúmina sérica bovina, 20 mM ácido hidroxietilopiperacina-etanosulfónico (HEPES), 50 µL/mL gentamicina, y 100 X Antibótico-Antimicótico (solución de 10000 U/mL de penicilina, 10000 U/mL de estreptomicina, y 25 µg/mL de anfotericina B; Gibco). Luego de 24 h, el medio basal se remplazó con medio de diferenciación, de composición similar al anterior, con el agregado de 1 µg/mL PRL, y 0.06 µg/mL EGF (Sigma-Aldrich). El medio de diferenciación en cada pocillo se renovó diariamente hasta el día 6 de diferenciación. Luego los explantes diferenciados se recolectaron y se fijaron, procesaron e incluyeron en parafina para ser analizados por histoquímica e IHQ (ver secciones 3.5 y 3.6.1 del Capítulo 1, y sección 3.4.4 de este Capítulo).

### 3.6.1 | Análisis de los explantes diferenciados *in vitro*

Se obtuvieron secciones histológicas de 5 µm de espesor de los explantes mamarios cultivados 6 días con medio de diferenciación. La histomorfología se analizó por tinción con H&E, y la integridad del tejido mamario se analizó por IHQ mediante la inmunomarcación de CK8. En ambos ensayos los preparados histológicos se analizaron con un microscopio óptico Olympus BH2 (Olympus Optical Co., Ltd). Debido a que la mayoría de los explantes mamarios presentaron indicios de inflamación y/o muerte celular, no fue posible realizar otros ensayos planificados para analizar la proliferación epitelial (Ki67 mediante IHQ), la expresión de los marcadores de diferenciación funcional CSN2, LALBA o WAP (mediante IHQ y qRT-PCR) y la vía de señalización del PRLR (mediante qRT-PCR).

### 3.10 | Análisis estadístico

Se realizó en primer lugar un análisis exploratorio de los datos para evaluar la normalidad de la distribución (test de Shapiro-Wilk) y la homogeneidad de la varianza (test de Levene). Los datos se expresaron como la media ± SEM (error estándar de la media). Los resultados de los ensayos de qPCR de muestras obtenidas en DPN-45 se analizaron mediante el programa REST-MCS© beta v2 2006 ([gene-quantification.de/rest-mcs.html](http://gene-quantification.de/rest-mcs.html)) que utiliza el método de aleatorizaciones Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test© (Pfaffl et al., 2002). Los demás resultados se evaluaron mediante el test paramétrico ANOVA de una vía para evaluar la significancia general, seguido del test *post hoc* de Dunnet para comparar cada tratamiento contra el VEH; o el test no paramétrico de Kruskal-Wallis seguido del test *post hoc* de Dunn,

según correspondiera. En todos los casos, un valor de  $p<0.05$  se consideró significativo.

## 4 | RESULTADOS

### 4.1 | Parámetros reproductivos del modelo de exposición a BP3 durante la gestación

La aplicación dérmica de BP3 en las madres F0 durante la preñez no provocó cambios en los parámetros de conducta materna, observados en el grupo control: construcción y mantenimiento del nido, acarreo de las crías al nido, postura de amamantamiento durante la lactancia. Tampoco presentaron diferencias con el grupo control respecto a los parámetros reproductivos evaluados (Tabla 6). El peso corporal promedio durante la gestación y la lactancia, el número de crías por camada, la relación de hembras/machos por camada, y la duración de la gestación ( $19.5 \pm 0.5$  días) fue similar entre los grupos experimentales.

**Tabla 6. Parámetros reproductivos del modelo de exposición gestacional**

Ratones hembra F0	Control	0.15-BP3	50-BP3
Peso corporal (g)	$30.2 \pm 0.7$	$31.0 \pm 0.9$	$30.9 \pm 0.5$
Crías por camada (n)	$6.1 \pm 1.0$	$6.3 \pm 0.8$	$5.7 \pm 0.9$
Relación crías hembras/machos	$0.9 \pm 0.2$	$1.4 \pm 0.5$	$1.1 \pm 0.3$

La tabla muestra la media  $\pm$  SEM de 5-7 animales F0 por grupo experimental.

Por otro lado, no se observaron signos evidentes de toxicidad en las madres F0 ni en las crías F1, de ninguno de los grupos experimentales.

### 4.2 | Efectos de la exposición a BP3 durante la gestación: evaluación de la morfogénesis ductal de la glándula mamaria en la pubertad

#### 4.2.1 | Crecimiento y desarrollo de las crías F1 expuestas durante la gestación

Respecto al crecimiento y desarrollo de las crías F1, no se observaron diferencias en el peso corporal durante la lactancia (DPN-4 y al destete). En cuanto a las hembras F1, la edad (DPN) a la que se observó apertura vaginal (control:  $28.6 \pm 1.1$ ; 0.15-BP3:  $27.0 \pm 0.6$ ; 50-BP3:  $27.1 \pm 0.4$ ), y el peso corporal el día de la misma fueron similares entre los grupos experimentales. Tampoco hubo diferencias en el peso corporal y los valores séricos de hormonas esteroideas de las hembras F1 puberales al momento del

sacrificio (DPN-45). Los niveles de E2 de los grupos expuestos a BP3 se encontraron dentro del rango del grupo control, y los niveles P4 fueron del mismo orden de magnitud entre los grupos experimentales (Tabla 7).

**Tabla 7. Peso corporal y niveles séricos de hormonas esteroideas de las crías F1**

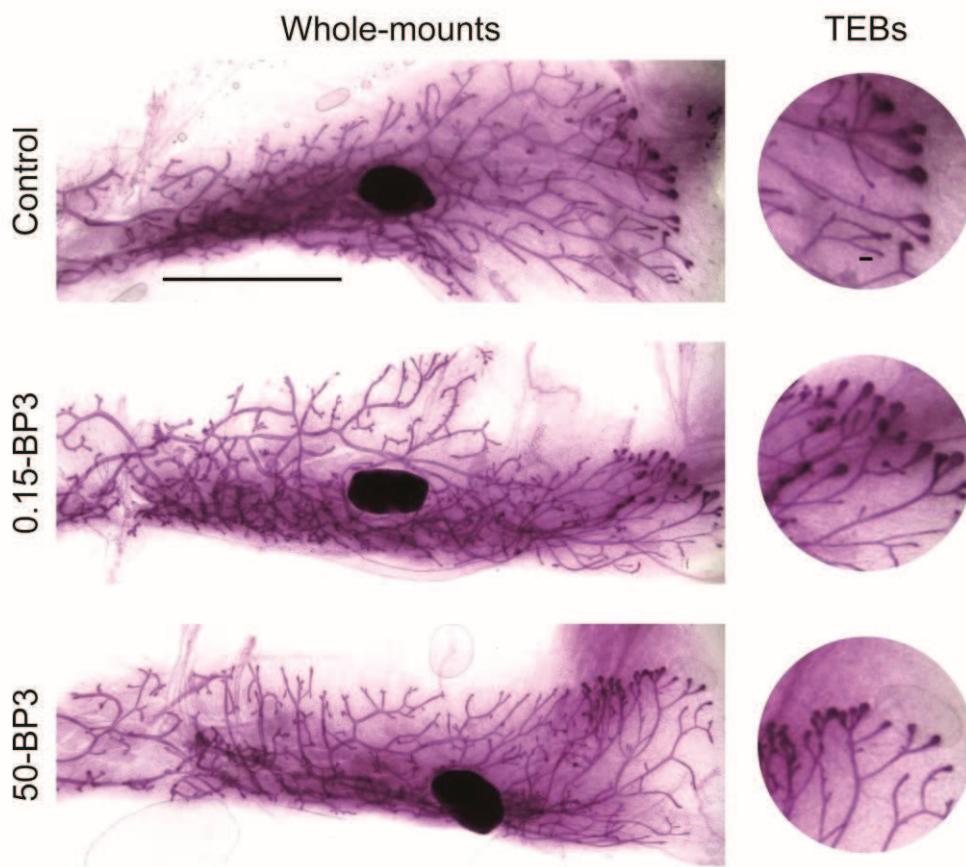
	Control	0.15-BP3	50-BP3
Peso corporal en DPN-4 (g)	2.5 ± 0.1	2.8 ± 0.2	2.6 ± 0.1
Peso corporal al destete (g)	10.8 ± 0.7	10.6 ± 0.4	9.6 ± 0.8
Peso corporal en apertura vaginal (g)	14.1 ± 0.6	13.0 ± 0.5	13.0 ± 0.8
Peso corporal en DPN-45 (g)	18.7 ± 0.5	18.2 ± 0.5	17.8 ± 0.3
E2 sérico en DPN-45 (pg/mL)*	21.1 (14.9-27.3)	15.7 (11.7-19.6)	15.0 (13.5-16.5)
P4 sérica en DPN-45 (ng/mL)*	4.2 (3.8-4.5)	5.3 (3.7-6.8)	8.8 (7.7-9.8)

DPN: día posnatal. E2: estradiol. P4: progesterona. La tabla muestra la media ± SEM de o 7-12 hembras F1 por grupo experimental, excepto por los valores séricos de hormonas esteroideas.

\*: los valores de E2 y P4 corresponden al nivel de hormona detectado en dos pools de suero de 4-6 hembras F1 por grupo experimental, que se expresan como el promedio de los dos valores obtenidos (valor mínimo-valor máximo).

#### 4.2.2 | Morfometría de las *whole-mounts* de glándula mamaria

El desarrollo ductal de la glándula mamaria puberal en DPN-45 no se modificó por la exposición a BP3 durante la gestación. En todos los grupos experimentales los conductos mamarios se extendieron más allá del NL, y algunos aún presentaban TEBs (Figura 23). No se observaron diferencias en el área y perímetro glandular, en la elongación ductal, ni en el porcentaje de área epitelial relativa. El número de TEBs y el tamaño de estos también fue similar entre los grupos experimentales (Tabla 8).



**Figura 23.** Morfología de glándula mamaria puberal. Imágenes representativas de las *whole-mounts* (izquierda) de glándula mamaria en DPN-45 de los grupos experimentales (barra: 5 mm), e *insets* a mayor aumento del frente de crecimiento (derecha) donde se aprecian los TEBs (barra: 0.2 mm).

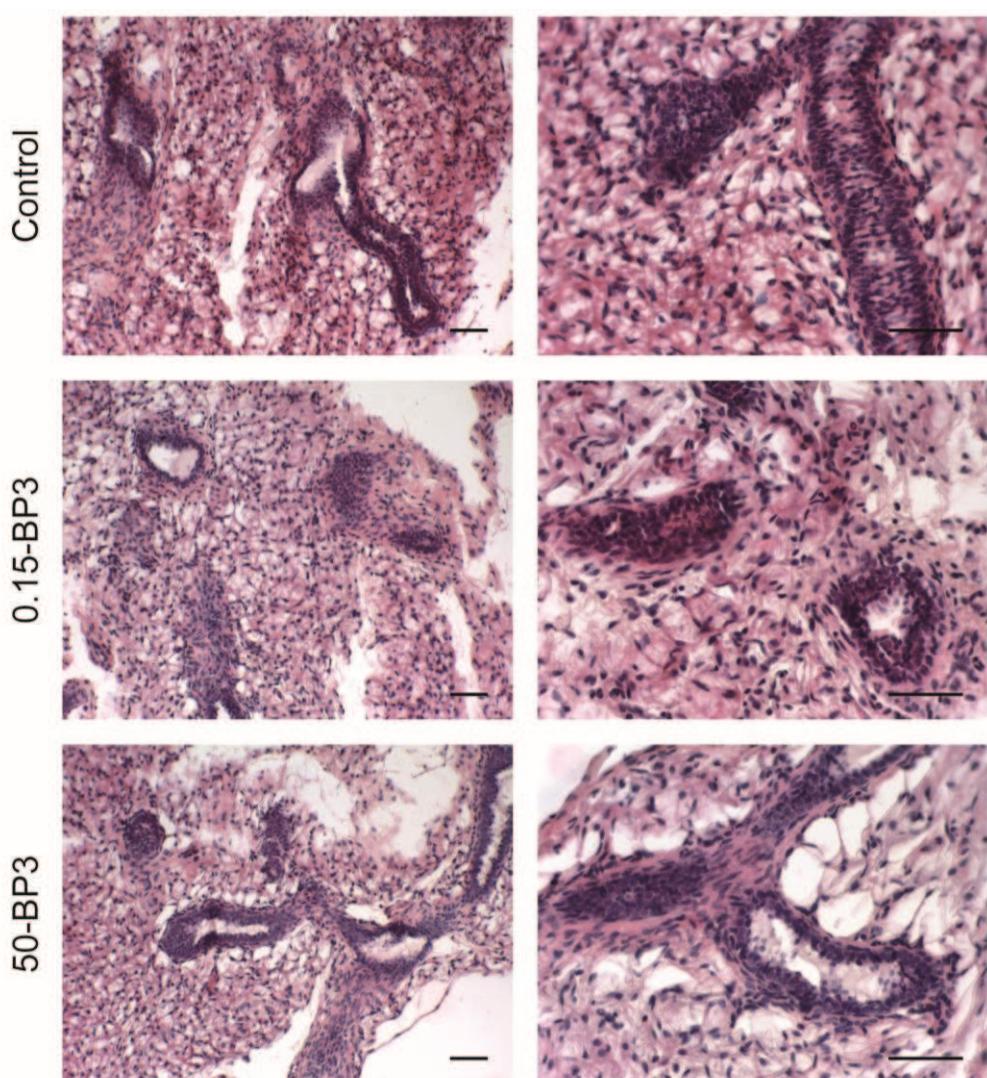
**Tabla 8. Análisis morfométrico de las *whole-mounts***

	Control	0.15-BP3	50-BP3
Área glandular (mm <sup>2</sup> )	97.2 ± 11.8	85.6 ± 5.6	91.9 ± 12.7
Perímetro glandular (mm)	49.4 ± 3.1	48.8 ± 2.1	50.6 ± 0.6
Elongación ductal (mm)	10.0 ± 1.0	7.9 ± 0.7	9.2 ± 1.4
Área epitelial relativa (%VV)	38.6 ± 3.9	36.0 ± 2.4	34.1 ± 3.3
TEBs (N°)	8.0 ± 3.0	9.5 ± 1.7	8.0 ± 2.2
Tamaño de los TEBs (mm <sup>2</sup> )	0.05 ± 0.0	0.06 ± 0.1	0.04 ± 0.0

La tabla muestra la media ± SEM de 4-6 animales por grupo.

#### 4.2.3 | Histoarquitectura de la glándula mamaria

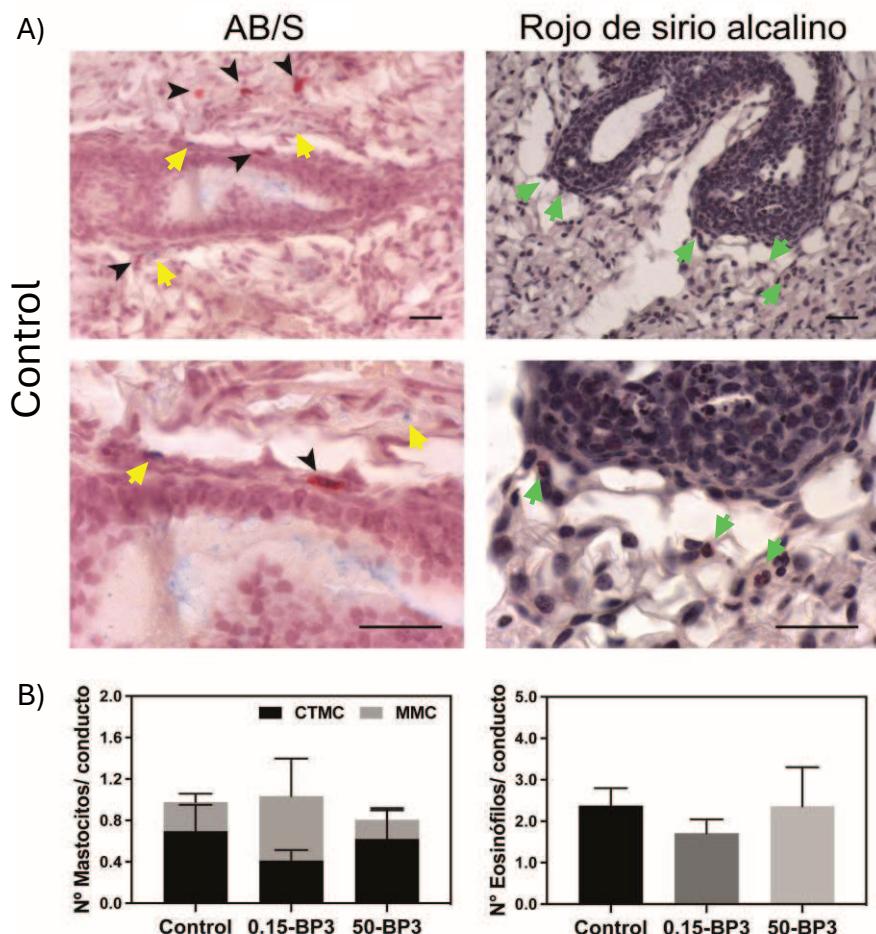
En secciones histológicas de glándula mamaria en DPN-45 (H&E) se observaron conductos mamarios conformados por una bicapa de células epiteliales formando un lumen central, y TEBs con multicapa epitelial con y sin lumen en formación. Estas estructuras epiteliales se encontraron rodeadas por un estroma peri-ductal de tejido conectivo laxo, e inmersas en un estroma altamente celular, con abundantes fibroblastos. Los adipocitos maduros, con alto contenido lipídico, se encontraron en regiones distales de la glándula, más allá del frente de crecimiento ductal, o sectorizados algunas regiones, próximos a los conductos mamarios. No se observaron características histológicas diferentes al grupo control en los grupos expuestos a BP3 durante la gestación (Figura 24).



**Figura 24.** Histoarquitectura de la glándula mamaria puberal. Imágenes representativas de secciones histológicas de glándula mamaria en DPN-45 de los grupos experimentales, teñidas con H&E. Las imágenes de cada columna presentan la misma magnificación; barra 50  $\mu$ m.

#### 4.2.4 | Infiltración de células inmunes

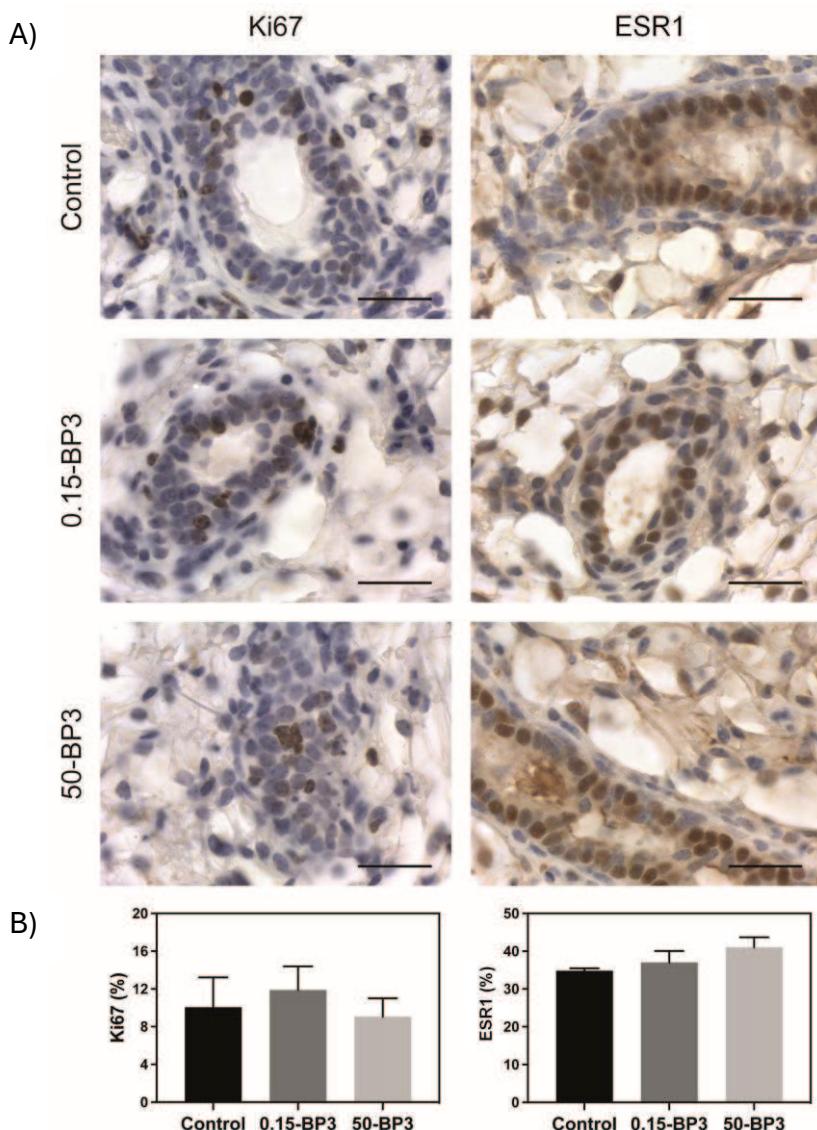
Se analizó la población de eosinófilos y mastocitos por conducto mamario, mediante tinción de rojo de sirio alcalino o AB/S, respectivamente (Figura 25 A). Los mastocitos se clasificaron como CTMC (mastocitos del tejido conectivo) si eran solo S-positivos, o MMC (mastocitos de la mucosa) si presentaban gránulos AB-positivos, o combinación de ambos colorantes. Además, se analizó la población de mastocitos activos que se encontraban liberando sus gránulos de secreción. No se encontraron diferencias en la cantidad de eosinófilos, mastocitos CTMC, o MMC (Figura 25 B), ni en los mastocitos liberando gránulos de secreción (control:  $0.3 \pm 0.1$ ; 0.15-BP3:  $0.4 \pm 0.2$ ; 50-BP3:  $0.2 \pm 0.1$ ), entre los grupos experimentales.



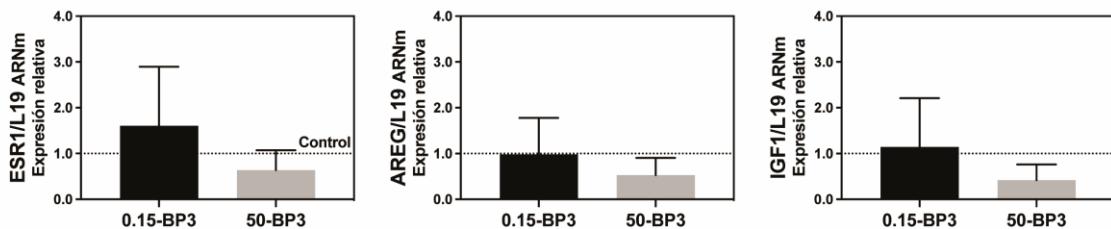
**Figura 25.** Mastocitos y eosinófilos infiltrantes en la glándula mamaria puberal. A) Imágenes representativas de tinción de alcian blue/safranina (AB/S) y de rojo sirio alcalino en la glándula mamaria del grupo control. Fotomicrografías inferiores muestran a mayor aumento una sección de las fotomicrografías superiores. Flechas negras: CTMC (mastocitos del tejido conectivo), S positivos. Flechas amarillas: MMC (mastocitos de la mucosa), AB positivos. Flechas verdes: eosinófilos. Barra: 25  $\mu$ m. B) Cuantificación de mastocitos y eosinófilos asociados a las estructuras epiteliales. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de 5-7 animales por grupo en la cuantificación de mastocitos, y 5-6 animales por grupo en la cuantificación de eosinófilos.

#### 4.2.5 | Proliferación celular epitelial y expresión del ESR1, AREG, e IGF-1

A diferencia de los TEBs, la mayoría de los conductos mamarios presentaron un bajo porcentaje de inmunomarcación epitelial para Ki67, indicando un bajo índice proliferativo (Figura 26 A). Por otro lado, la expresión proteica epitelial del ESR1 fue cercana al 50 %, encontrándose en el estrato luminal. No hubo diferencias en el porcentaje de expresión epitelial de Ki67 o del ESR1 entre los grupos experimentales (Figura 26 B). De manera esperable, se observó inmunomarcación tanto de Ki67 como del ESR1 en células estromales. Por otro lado, tampoco hubo diferencias en el nivel de expresión relativa de ARNm del ESR1, AREG, e IGF-1 (Figura 27).



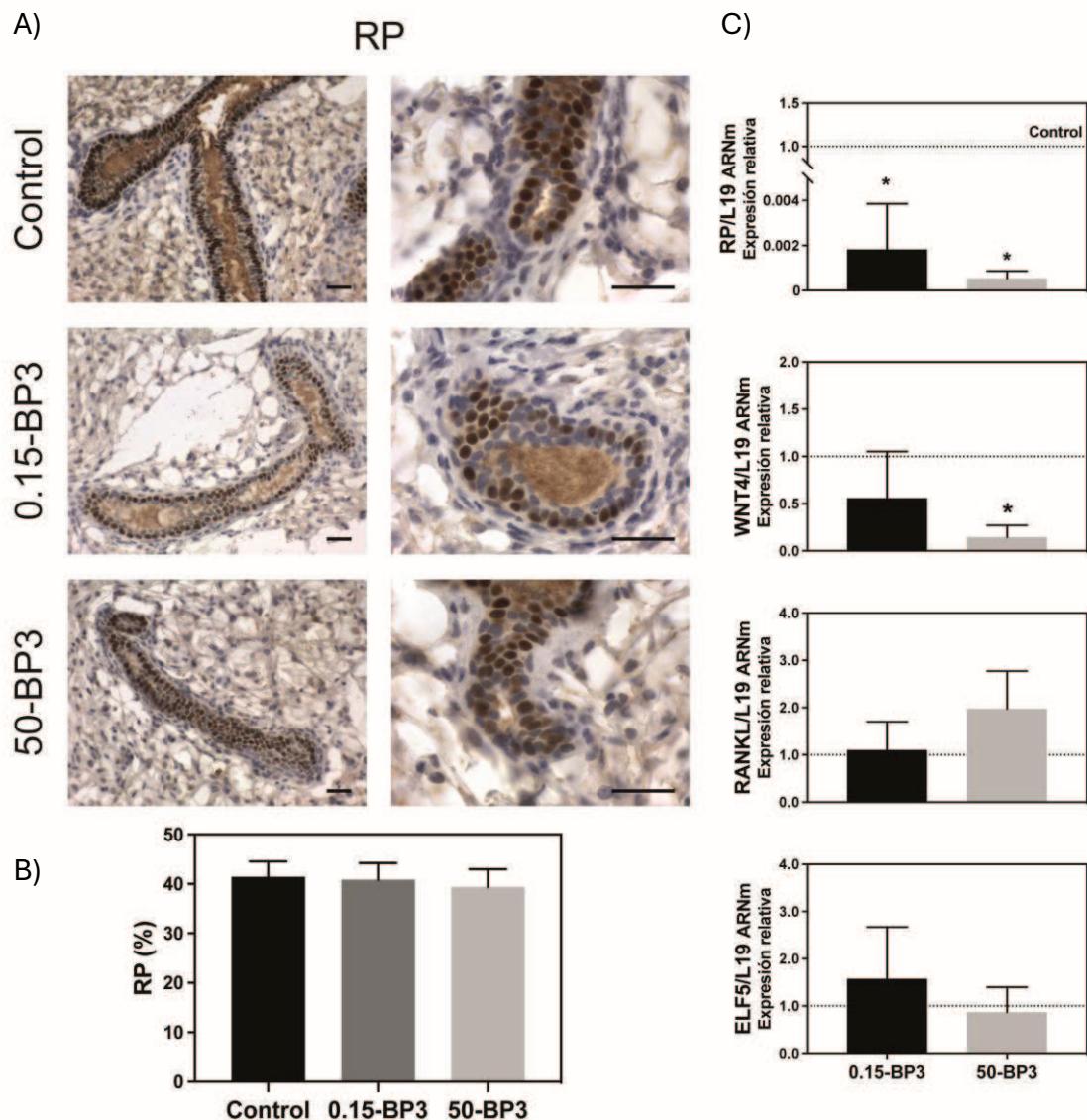
**Figura 26.** Proliferación celular y expresión del ESR1. A) Imágenes representativas de la inmunomarcación de Ki67 y del ESR1 en la glándula mamaria puberal de los grupos experimentales. Barra: 25  $\mu$ m. B) Cuantificación del porcentaje de células epiteliales positivas para Ki67 y del ESR1. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de 5-7 animales por grupo.



**Figura 27.** Expresión relativa de ARNm del ESR1, AREG, e IGF-1. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de 6-7 animales por grupo. La expresión de ARNm se relativizó a la expresión de L19 y a la del grupo control, según el programa REST-MCS®. Línea de puntos: expresión de ARNm del grupo control.

#### 4.2.6 | Expresión del RP, WNT4, RANKL y ELF5

De manera esperable, la expresión proteica del RP solo se observó en las células epiteliales mamarias. El patrón de expresión del RP en los conductos mamarios fue mayormente homogéneo (Figura 28 A). En promedio, el porcentaje de expresión epitelial del RP fue similar al de ESR1. Los grupos expuestos a BP3 durante la gestación no mostraron diferencias en la expresión del RP respecto al grupo control (Figura 28 B). Sin embargo, la exposición a BP3 durante la gestación disminuyó la expresión relativa de ARNm del RP ( $p<0.05$ ) en comparación con el grupo control, siendo más acentuada la disminución en el grupo 50-BP3 (Figura 28 C). De manera similar, la expresión del transcripto de WNT4 fue menor en los grupos expuestos a BP3 durante la gestación, alcanzando la diferencia significativa en el grupo de 50-BP3 ( $p<0.05$ ). Por otro lado, no hubo diferencias en el nivel de expresión relativa de RANKL y ELF5 entre los grupos experimentales (Figura 28 C).



**Figura 28.** Expresión del RP, WNT4, RANKL, y ELF5. A) Inmunomarcación del RP en la glándula mamaria puberal en los grupos experimentales. Barra: 25  $\mu$ m. B) Cuantificación del porcentaje de células epiteliales positivas para el RP. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de 5-7 animales por grupo. C) Expresión relativa de ARNm del RP, WNT4, RANKL, y ELF5. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de 6-7 animales por grupo. La expresión de ARNm se relativizó a la expresión de L19 y a la del grupo control (línea de puntos), según el programa REST-MCS $\odot$ . \*:  $p < 0.05$ , análisis del programa REST-MCS $\odot$ , cada grupo de BP3 se compara contra el control.

#### 4.3 | Efectos de la exposición a BP3 durante la gestación: evaluación de la glándula mamaria lactante

##### 4.3.1 | Gestación y lactancia

En las madres F1, la exposición gestacional a BP3 no produjo modificaciones en los parámetros de conducta materna como construcción y mantenimiento del nido, acarreo de las crías al nido, postura de amamantamiento. Tampoco hubo diferencias

en la duración de la gestación, el número de crías por camada, ni en el peso corporal de las madres F1 durante la gestación y la lactancia (Tabla 9). Por otro lado, se observó leche en el estómago de las crías F2 neonatas, y el peso corporal en DL-10 fue similar entre los grupos experimentales (Tabla 9).

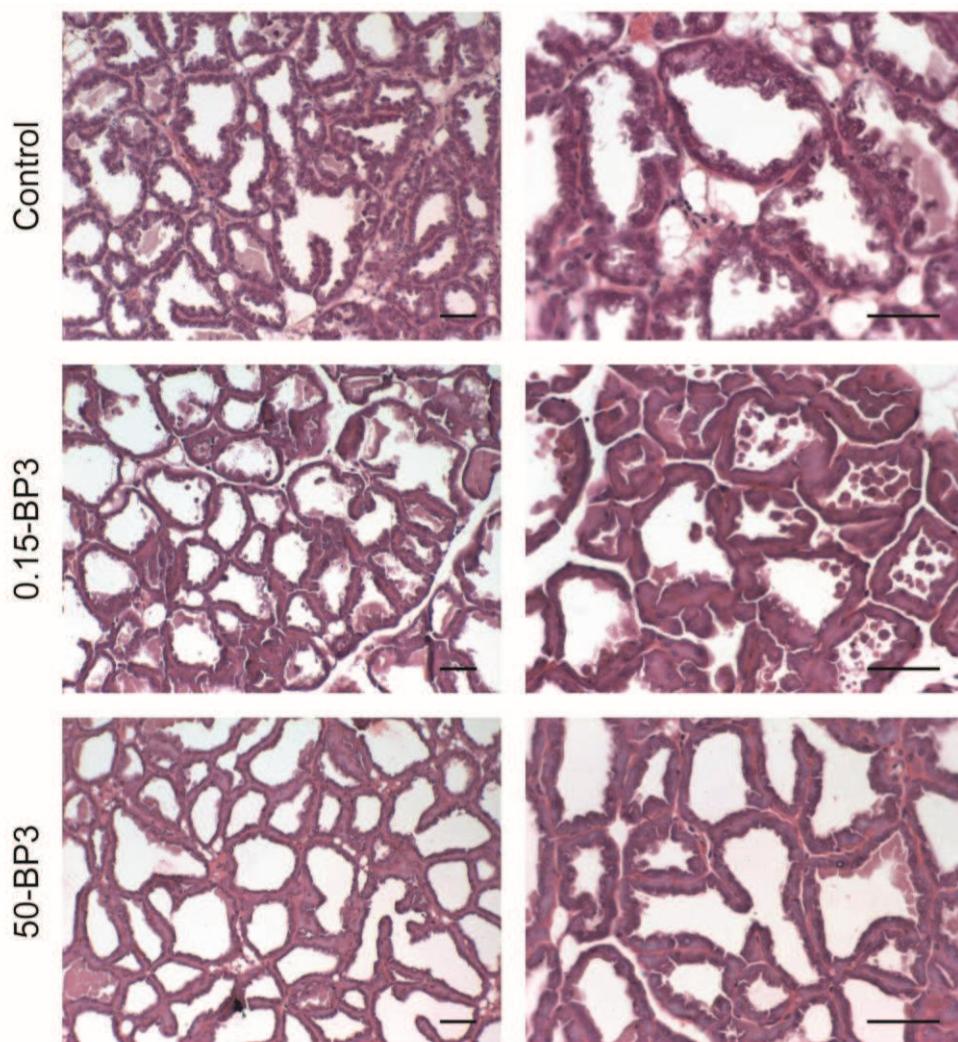
**Tabla 9. Peso corporal de madres F1 y crías F2 en día de lactancia 10**

Peso corporal	Control	0.15-BP3	50-BP3
Madres F1 (g)	33.6 ± 0.7	35.3 ± 1.5	32.4 ± 0.8
Crías F2 (g)	6.0 ± 0.3	6.3 ± 0.3	5.5 ± 0.3

La tabla muestra la media ± SEM de 5-6 animales por grupo.

#### 4.3.2 | Histología general de la glándula mamaria lactante

En secciones histológicas de glándula mamaria en DL-10 se observó un extenso desarrollo lóbulo-alveolar. Los alveolos presentes en diversos tamaños, junto con los conductos mamarios, ocupaban casi la totalidad del tejido glandular. En menor proporción, el tejido conectivo se observó separando los alveolos entre sí y las estructuras lobulares. Este tejido conectivo se observó altamente vascularizado con pocos adipocitos en algunos campos de observación. En el epitelio alveolar se observó el estrato luminal fuertemente eosinófilo evidenciando el alto grado de síntesis proteica, con prominentes núcleos en el extremo basal de las células. La altura del epitelio fue variable según el contenido de secreción en el lumen alveolar. En algunos campos de observación el epitelio se presentaba difuso con límites no bien definidos dada la gran cantidad de vesículas de secreción liberándose del citoplasma. No se observaron gotas lipídicas en el epitelio luminal. En el estrato basal del epitelio alveolar, se observaron núcleos más ovoides, aplanados, y distantes entre sí, que corresponden a las células mioepiteliales. El desarrollo glandular y las características histológicas en los grupos expuestos durante la gestación a BP3 fueron similares al grupo control (Figura 29).

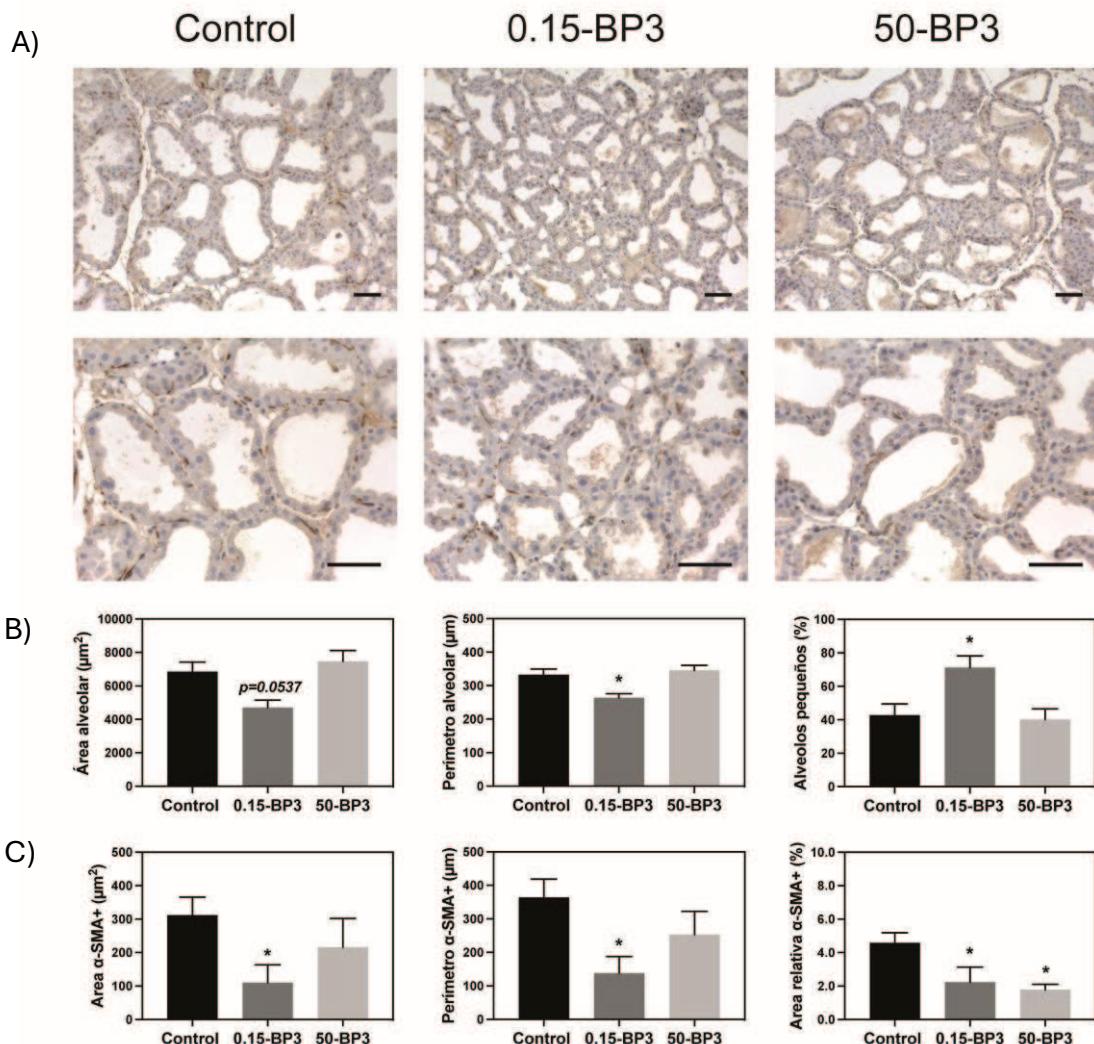


**Figura 29.** Histología de la glándula mamaria lactante. Imágenes representativas de secciones histológicas de glándula mamaria de los grupos experimentales en DL-10 teñidas con H&E. Las imágenes en cada columna presentan la misma magnificación; barra 50  $\mu\text{m}$ .

#### 4.3.3 | Expresión de $\alpha$ -SMA y morfometría alveolar

A partir de la inmunomarcación de  $\alpha$ -SMA en la glándula mamaria lactante (Figura 30 A) se analizó el tamaño alveolar. Si bien el área alveolar fue significativamente diferente entre los grupos experimentales ( $p<0.05$ .), ninguno de los grupos expuestos a BP3 durante la gestación alcanzó diferencia significativa en comparación con el grupo control ( $p>0.05$ ). Sin embargo, el grupo 0.15-BP3 presentó una tendencia hacia un menor tamaño alveolar respecto al grupo control ( $p=0.054$ ). Debido a esto, se analizó el porcentaje de alveolos pequeños ( $<6851 \mu\text{m}^2$ ) para evaluar si esta tendencia era un efecto general o particular de algunas regiones o lóbulos. En comparación con el grupo control, el grupo 0.15-BP3 presentó mayor porcentaje de alveolos pequeños ( $p<0.05$ ). En cambio, el grupo de 50-BP3 no presentó diferencias en cuanto al área y perímetro alveolar, o porcentaje de alveolos pequeños, en comparación con el grupo

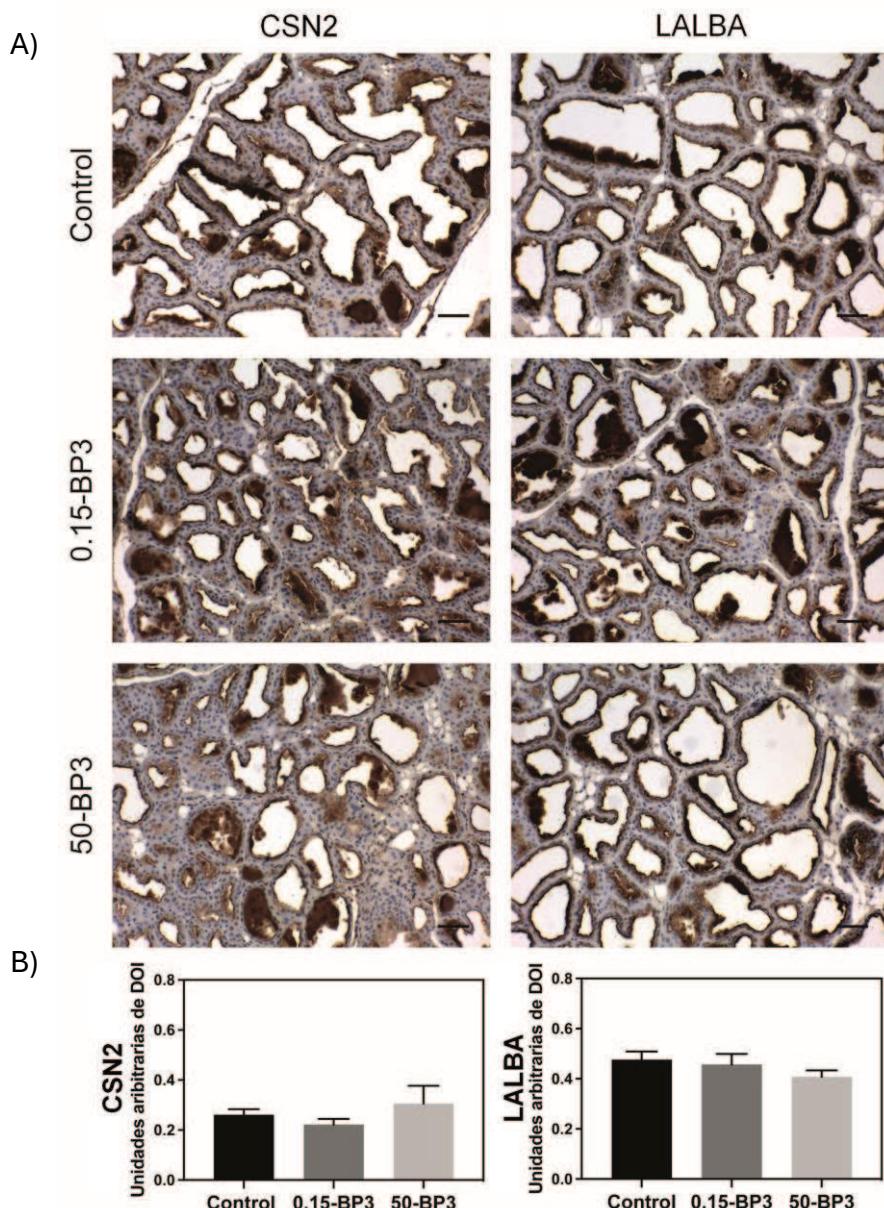
control (Figura 30 B). Debido a que las células mioepiteliales separan al epitelio alveolar del estroma circundante, y que la principal proteína contráctil de éstas es  $\alpha$ -SMA, se analizó la expresión de ésta. Tanto el área y perímetro de la inmunomarcación de  $\alpha$ -SMA en las células mioepiteliales de los alveolos estuvieron disminuidas en el grupo 0.15-BP3 en comparación con el grupo control ( $p<0.05$ ). Además, la expresión relativa de  $\alpha$ -SMA también fue menor en ambos grupos expuestos a BP3 durante la gestación ( $p<0.05$ ) respecto al grupo control (Figura 30 C).



**Figura 30.** Expresión de  $\alpha$ -SMA y morfometría alveolar. A) Imágenes representativas de la inmunomarcación de  $\alpha$ -SMA de la glándula mamaria de los grupos experimentales en DL-10. Las imágenes en cada fila presentan la misma magnificación; barra 50  $\mu\text{m}$ . B) Cuantificación de los parámetros de la morfometría alveolar: área alveolar, perímetro alveolar, y porcentaje de alveolos pequeños. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de 5-8 animales por grupo. \*:  $p<0.05$ , ANOVA de una vía seguido de post test de Dunnett. C) Cuantificación de la inmunomarcación de  $\alpha$ -SMA: área, perímetro, y área relativa de (área  $\alpha$ -SMA positiva / área alveolar). Las barras representan la media  $\pm$  SEM de 4-8 animales por grupo. \*:  $p<0.05$ , test de Kruskal-Wallis seguido del post-test de Dunn.

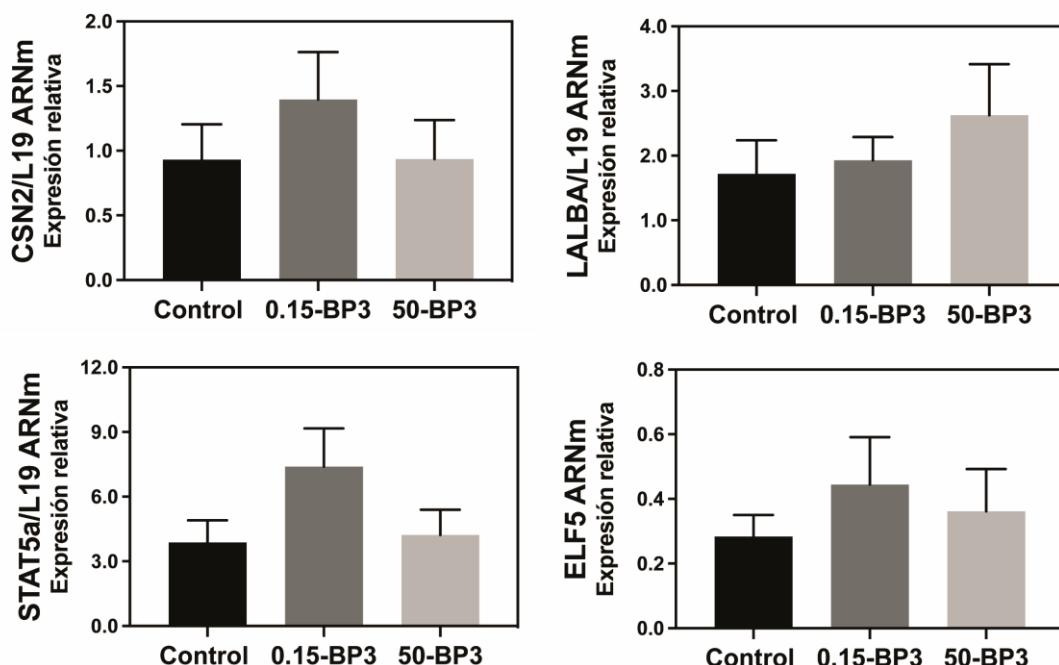
#### 4.3.4 | Expresión de proteínas lácteas y moléculas de señalización

Además de utilizarse como marcadores de diferenciación funcional, la síntesis y secreción de las proteínas de la leche en el lumen alveolar es otro factor que puede influir en el tamaño de los alveolos mamarios. Por lo tanto, se analizó la expresión CSN2, LALBA y WAP. Se observó inmunomarcación de CSN2 y LALBA tanto en el epitelio luminal, principalmente en el borde apical, como dentro del lumen alveolar (Figura 31 A), y se cuantificó la expresión proteica de las mismas por densidad óptica integrada (DOI).



**Figura 31.** Expresión proteica de CSN2 y LALBA A) Imágenes representativas de la inmunomarcación de CSN2 y LALBA en la glándula mamaria lactante de los grupos experimentales. Barra: 50  $\mu$ m. B) Cuantificación de la inmunomarcación de CSN2 y LALBA. Las barras representan la media ± SEM de 4-5 animales por grupo, en unidades arbitrarias de densidad óptica integrada (DOI).

La exposición gestacional a BP3 no modificó la expresión proteica de CSN2 y LALBA (Figura 31 B), y tampoco la expresión de su transcripto (Figura 32) en la glándula mamaria lactante. A nivel de ARNm, tampoco hubo diferencias en la expresión relativa de WAP (control:  $1.6 \pm 0.3$ ; 0.15-BP3:  $1.3 \pm 0.3$ ; 50-BP3:  $1.6 \pm 0.3$ ) entre los grupos experimentales. Por otro lado, la exposición a BP3 durante la gestación tampoco modificó la expresión de ARNm de los factores de transcripción STAT5a y ELF5, pertenecientes a la vía de señalización de PRL (Figura 32).



**Figura 32.** Expresión relativa de ARNm de CSN2, LALBA, STAT5a, y ELF5. Las barras representan la media  $\pm$  SEM de 4-6 animales por grupo experimental. Se utilizó la expresión de L19 para normalizar los valores de expresión de los transcriptos evaluados.

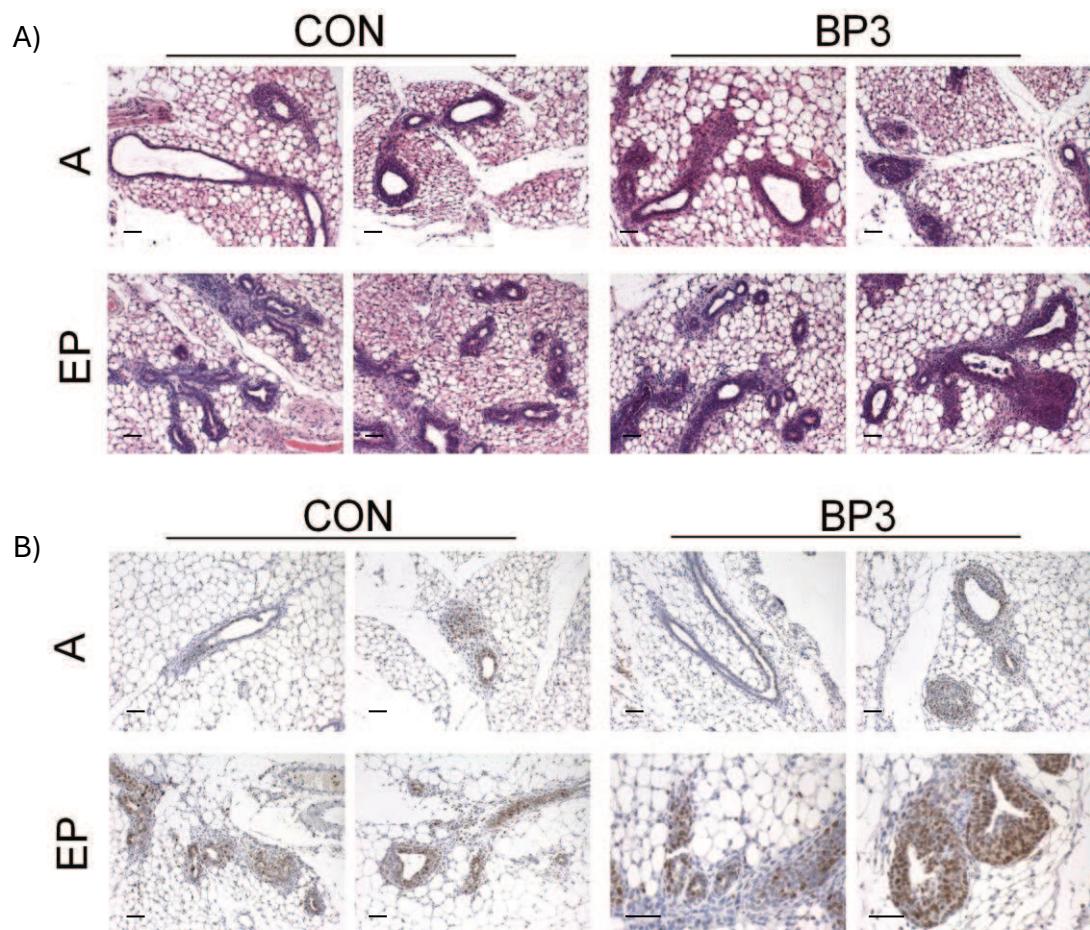
#### 4.4 | Efectos de la exposición a BP3 durante la gestación: evaluación de la diferenciación funcional *in vitro* de glándula mamaria

##### 4.4.1 | Desarrollo mamario luego de la administración de E2 y P4

Se evaluó el desarrollo mamario de animales expuestos durante la gestación a BP3 (50 mg/kg/día) o al vehículo (CON), que luego fueron inyectados diariamente con E2 y P4 (EP) o con aceite (A) desde DPN-21 hasta DPN-30.

En secciones histológicas de glándula mamaria de CON+A y BP3+A teñidas con H&E se observaron conductos mamarios y TEBs, estructuras características de la edad de los animales (DPN-31), inmersos en un estroma abundante en adipocitos. La exposición gestacional a BP3 no produjo diferencias en la histoarquitectura mamaria

(Figura 33 A). Por otro lado, la extensión del árbol ductal en muestras de CON+EP y BP3+EP no ocupó la totalidad del estroma adiposo (Figura 33 A). Si bien fue mayor que en los animales sólo expuestos a aceite, solo algunos conductos presentaron ramificaciones laterales y alveolar-buds (precursores de alveolos mamarios). Algunos conductos presentaban fragmentos de epitelio en el interior de ellos, indicando formación de lumen incompleta. Además, no solo no se observaron alveolos mamarios propiamente dichos, sino que algunas muestras de ambos grupos aún presentaban TEBs.



**Figura 33.** Inducción del desarrollo lóbulo-alveolar con E2 y P4 exógenas. A) Imágenes representativas de tinción de H&E de muestras de glándula mamaria de animales peripuberales expuestos durante la gestación al vehículo (CON) o a BP3, inyectados con aceite (A), o estradiol y progesterona (EP). B) Imágenes representativas de inmunomarcación de Ki67 en muestras de glándula mamaria de animales CON+A, BP3+A, CON+EP, y BP3+EP. Barras en A y B): 50  $\mu$ m.

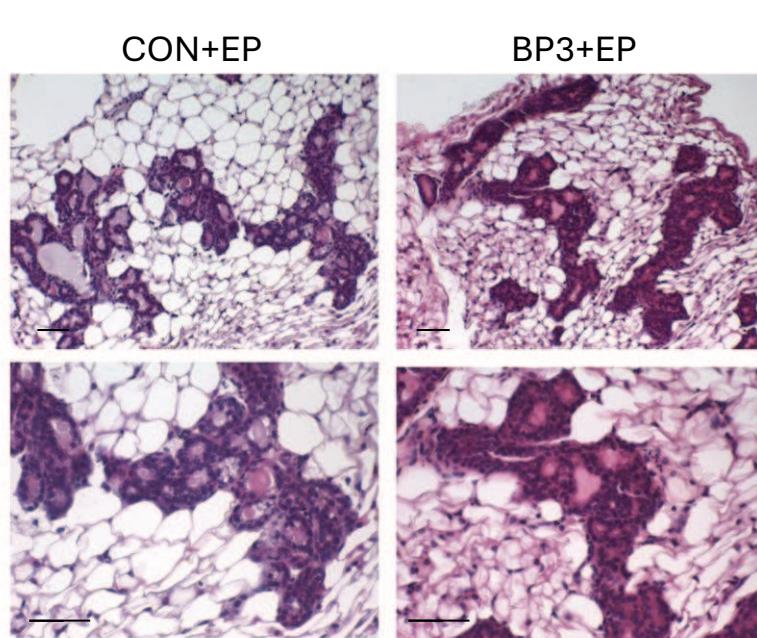
En cuanto a la proliferación celular epitelial (Figura 33 B), el porcentaje de células Ki67 positivas en los conductos mamarios de animales inyectados con aceite fue cercano entre los animales CON+A (15.2 %, n=2) y BP3+A (20.3  $\pm$  2.1 %, n=2). La

administración exógena de hormonas ováricas aumentó la proliferación celular epitelial en los conductos mamarios aproximadamente al doble: CON+EP,  $38.6 \pm 2.8\%$  (n=5); BP3+EP,  $39.7 \pm 3.4\%$  (n=5). Sin embargo, la exposición gestacional a BP3 no produjo cambios en el porcentaje de células epiteliales positivas para Ki67 respecto a los animales control.

En conjunto, estas observaciones indican que el esquema de estimulación del desarrollo lóbulo-alveolar con hormonas esteroideas no fue suficiente para alcanzar el extenso desarrollo epitelial mamario esperado, característico de la preñez, en el que el desarrollo lóbulo-alveolar ocupa prácticamente toda la extensión de la glándula. A pesar de esto, la exposición a BP3 durante la gestación a BP3 no produjo alteraciones en la histoarquitectura o en el porcentaje de proliferación epitelial en la glándula mamaria de animales peri-puberales estimulados o no con E2 y P4.

#### 4.4.2 | Explantes mamarios cultivados con estímulos lactogénicos

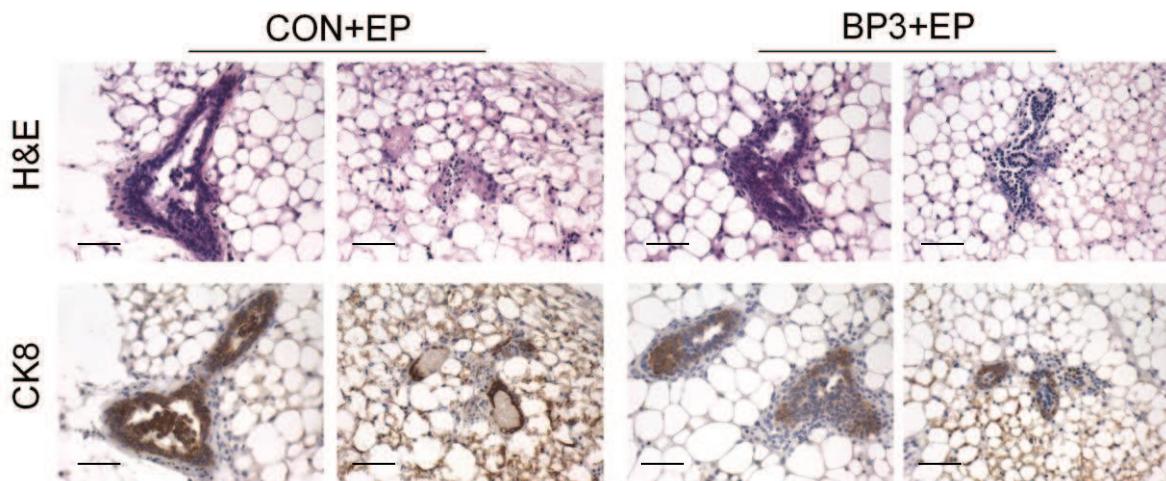
Los explantes mamarios cultivados en presencia de hormonas lactogénicas presentaron un desarrollo del árbol ductal similar al de las muestras obtenidas previo al cultivo, pero en el que sí se desarrolló la alveogénesis. Se observaron grupos de alveolos mamarios con abundante secreción eosinófila en el lumen, formando pequeños lóbulos rodeados de tejido adiposo (Figura 34).



**Figura 34.** Desarrollo alveolar en explantes mamarios. Imágenes representativas de tinción de H&E de explantes mamarios de animales CON+EP y BP+EP, cultivados con estímulos lactogénicos. Las imágenes inferiores muestran con mayor aumento una sección de las superiores. Barras: 50  $\mu\text{m}$ .

No se observaron gotas lipídicas en el epitelio alveolar, y tampoco en el lumen. Los explantes provenientes de animales expuestos a BP3 durante la gestación no presentaron diferencias en la histoarquitectura alveolar.

Por otro lado, en la mayoría de los explantes se observaron estructuras epiteliales con indicios de muerte celular en el epitelio. En secciones histológicas teñidas con H&E estas estructuras se observaron con mayor o menor grado de eosinofilia, dentro de las que se ven núcleos picnóticos o fragmentos nucleares (Figura 35). En secciones histológicas inmunomarcadas para CK8 y contra-coloreadas con hematoxilina, las estructuras epiteliales con muerte celular presentaron escasa o nula expresión de CK8 y remanentes nucleares basófilos (Figura 35).



**Figura 35.** Muerte celular en explantes mamarios. Imágenes representativas de tinción de H&E e inmunomarcación de CK8 en secciones histológicas de explantes mamarios CON+EP y BP3+EP. Para ambos grupos se muestran imágenes de H&E y CK8 con estructuras sin (izquierda) y con indicios de muerte celular (derecha). Barras: 50  $\mu$ m.

## 5 | DISCUSIÓN

En el modelo *in vivo* utilizado en esta Tesis, ratones hembra preñadas fueron expuestas dérmicamente a BP3 para analizar la glándula mamaria de su progenie durante el desarrollo mamario en la pubertad y en la lactancia. Se utilizó este modelo para simular la aplicación sobre la piel de protectores solares y productos cosméticos, principal vía de exposición humana a BP3 (Krause et al., 2012). En ratones hembra preñadas, tras la aplicación tópica de 50 mg/kg de peso/día de BP3, se detectaron concentraciones de este compuesto en el plasma ( $22.4 \pm 2.3$  ng/mL) y en el líquido amniótico ( $22.6 \pm 10.8$  ng/mL) (Santamaría et al., 2020). En nuestro modelo, esta misma dosis de BP3 disminuyó la expresión de ARNm del RP y de WNT4 durante la pubertad, y la expresión relativa de  $\alpha$ -SMA en los alveolos mamarios durante la

lactancia. Esta dosis representa el valor del rango inferior (28–392 ng/mL) del nivel plasmático de BP3 detectado en humanos, luego de la aplicación de una loción de 10 % p/p de BP3 en todo el cuerpo (Janjua et al., 2008). Recientemente, la Unión Europea (UE) redujo la cantidad de BP3 permitida en protectores solares de aplicación corporal a solo el 2.2 % en sus formulaciones (UE, Comisión Europea, 2022). Por lo tanto, actualmente la aplicación tópica de protectores solares en todo el cuerpo podría representar niveles séricos de BP3 menores que los reportados previamente (Janjua et al., 2008; Krause et al., 2018; Matta et al., 2020).

La exposición dérmica a BP3 durante la preñez no causó alteraciones en la ganancia de peso de las madres F0, el número de crías por camada, la relación hembras:macho de las crías F1, el cuidado de las mismas, o su peso corporal hasta el destete. Tampoco hubo diferencias en los parámetros reproductivos evaluados en las crías F1 adultas. En concordancia con nuestros resultados, LaPlante et al. (2018) no observaron cambios en el peso corporal de las madres, ni en el número de crías por camada cuando administraron BP3 por vía oral a ratones durante toda la preñez y lactancia. Asimismo, Nakamura et al. (2015) no encontraron signos clínicos de toxicidad, ni cambios en los parámetros reproductivos cuando evaluaron los efectos de la administración de BP3 a través de la comida en ratas durante la preñez y lactancia (dosis estimadas desde 70 a 3500 mg/kg/día).

La exposición a PEs durante la gestación, como el BPA, puede modificar el peso corporal y acelerar la apertura vaginal (Honma et al., 2002). Sin embargo, en el presente trabajo, el crecimiento y desarrollo de las crías F1 hembras expuestas a BP3 durante la gestación fue similar al de los animales controles, sin presentar cambios en el día de la apertura vaginal o la concentración sérica de E2 y P4. A su vez, la exposición a BP3 durante la gestación no modificó el desarrollo ductal mamario en el periodo puberal analizado. No hubo diferencias en la extensión del crecimiento del árbol ductal, el N° y tamaño de los TEBs, la histoarquitectura mamaria, la población de mastocitos y eosinófilos asociados a las estructuras epiteliales, el porcentaje de proliferación epitelial, o la expresión del ESR1 (proteica y de ARNm) y del RP (proteica). En contraste a nuestros resultados, Matouskova et al. (2020, 2022a) reportaron un aumento en el peso corporal, y alteraciones menores en la glándula mamaria puberal de crías F1 expuestas a BP3 a través de la madre. Entre estas alteraciones se encuentran un incremento en la elongación ductal y el número de TEBs, disminución de las células epiteliales positivas para el RP, y un incremento transitorio en la infiltración de mastocitos en la glándula mamaria (Matouskova et al., 2020, 2022b). Las diferencias metodológicas en los modelos experimentales pueden

explicar las diferencias en los resultados, teniendo en cuenta que utilizaron otra cepa de ratones, la exposición fue vía oral, y durante toda la preñez y la lactancia, y la glándula mamaria se estudió al inicio de la pubertad (DPN 32-35).

En ratones, durante la pubertad, la expresión del promotor del RP, así como su expresión proteica inducida por la señalización de E2, se encuentra restringida a las células del cuerpo de los TEBs y a la mayoría de las células epiteliales luminales. En cambio, en la adultez, la expresión del RP se atenúa por la acción combinada de la señalización hormonal de E2 y P4 (Ismail et al., 2002; Seagroves et al., 2000). En el Capítulo anterior demostramos que la exposición directa a BP3 disminuyó la expresión del RP durante la morfogénesis ductal *in vitro*, sin modificar la expresión del ESR1. De manera similar, la exposición a BP3 durante la gestación no modificó los niveles séricos de las hormonas esteroideas, la expresión del ESR1, el patrón de expresión proteica del RP, ni la proporción de células epiteliales positivas para el RP en la glándula mamaria de ratones hembra puberales. Sin embargo, la disminución en la expresión de ARNm del RP en estos animales sugiere que la transcripción de dicho receptor podría constituir un blanco de los efectos de BP3. Luego de una exposición perinatal a BP3, Matouskova et al. (2020) reportaron una disminución en la proporción de células epiteliales positivas para el RP en la glándula mamaria puberal. Esta diferencia con nuestros resultados puede atribuirse a que la cepa BALB/c utilizada en su estudio presenta una mayor sensibilidad a la señalización de P4 que la cepa C57BL/6 (Aupperlee et al., 2009). Por otro lado, los cambios en la expresión del RP en su estudio y en el nuestro no estuvieron acompañados por modificaciones en la expresión del ESR1. Por lo tanto, es posible que la exposición a BP3 podría alterar otros mecanismos de regulación de la expresión del RP, como modificaciones post-traslacionales que regulan su actividad transcripcional y su degradación (Abdel-Hafiz & Horwitz, 2014).

A diferencia de los efectos observados tras la exposición directa a BP3 *in vitro*, la disminución en la expresión del RP luego de la exposición a BP3 durante la gestación estuvo acompañada por una disminución en la expresión de ARNm de WNT4, y no de los demás efectores de la señalización del RP evaluados como AREG y RANKL. Esto sugiere que la exposición a BP3 durante la gestación no solo podría alterar la expresión del RP a nivel transcripcional, sino que también afectar de manera diferencial los efectores de su vía de señalización, al igual que otros PEs como bisfenoles y otros polímeros utilizados en plásticos (Lacouture et al., 2023; Winkler et al., 2022). Durante la pubertad, la señalización canónica de WNT4 en el mioepitelio induce la remodelación de la ECM por proteasas, y regula el nicho de MaSCs en el

epitelio basal, controlando el potencial regenerativo del epitelio mamario, necesario para las transiciones entre las distintas etapas del desarrollo mamario (Rajaram et al., 2015). Recientemente, se demostró que las MaSCs son blanco de los efectos de la exposición a BP3 durante la pubertad (Gao et al., 2025). Este autor administró por vía oral una de las dosis evaluadas en este trabajo (50 mg/kg/día) y reportó una disminución en la fracción epitelial de MaSCs basales, y en la proliferación, diferenciación, y capacidad regenerativa de la misma. Esto sugiere que la disminución en la expresión de WNT4 en la glándula mamaria puberal en nuestro trabajo, podría ser un indicador temprano de alteraciones morfológicas en la preñez debido a un efecto de BP3 sobre el nicho de MaSCs.

Las alteraciones en el desarrollo mamario, en la diferenciación epitelial, y/o en la regulación hormonal, pueden ocasionar una lactancia defectuosa que afecte la producción de leche, sus componentes nutricionales, y en consecuencia se altere el crecimiento de las crías (Hannan et al., 2023; Kay et al., 2022; Rayner et al., 2005; Stewart & Davis, 2020). La exposición a PEs durante la preñez altera el desarrollo y diferenciación de la glándula mamaria, generando defectos en la lactancia, como se ha comprobado para la exposición a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) (Vorderstrasse et al., 2004), 1,4-bis [2-(3,5-dicloropiridiloxi)] benzeno, (TCPOBOP) (Pan et al., 2023), o el ácido perfluorooctanoico (PFOA) (White et al., 2007). Las consecuencias pueden ser letales para las crías, en el caso de TCDD y TCPOBOP, o solo disminuir su ganancia de peso durante la lactancia, como ocurre con el PFOA. En este Capítulo analizamos los efectos de la exposición a BP3 durante la gestación sobre la diferenciación funcional de la glándula mamaria a mitad de lactancia. Se eligió evaluar este periodo, posterior a la activación secretora, debido a que se caracteriza por una producción copiosa de leche (Anderson et al., 2007), coincidente con la etapa de mayor expresión de CSN2 (Baruch et al., 1995) y LALBA (Grigor et al., 1990). Previamente, en nuestro laboratorio demostramos que la exposición perinatal a BPA retrasa la maduración alveolar al final de la preñez, disminuye la expresión y síntesis de CSN2, y la producción de leche de la glándula mamaria lactante (Altamirano et al., 2017b; Kass et al., 2012). Durante la lactancia, no detectamos anomalías en la conducta de las madres expuestas a BP3 durante la gestación, y tampoco en la succión de sus crías. Estas últimas presentaban leche en sus estómagos al ser inspeccionadas, y no presentaron diferencia en su peso corporal en comparación con el grupo control. Estos hallazgos sugieren que la exposición gestacional a BP3 no modificó la producción de leche en la glándula mamaria lactante de la madre F1. En este trabajo, tanto los grupos expuestos a BP3 como el grupo control presentaron un

extenso desarrollo lóbulo-alveolar mamario, abundantes alveolos dilatados, y otros con características de secreción activa en el epitelio luminal. Sin embargo, el grupo 0.15-BP3 presentó alveolos de menor área y perímetro que el grupo control, lo que significó en un elevado porcentaje de alveolos pequeños. Esto contrasta con los resultados obtenidos previamente en el modelo *in vitro* en el que la exposición directa a BP3 no modificó el tamaño alveolar en los organoides mamarios. Sin embargo, nuestros resultados *in vivo* coinciden con un estudio sobre la exposición a PFOA durante la gestación. En ese estudio la glándula mamaria lactante de las madres F1 mostró un retraso en el desarrollo lóbulo-alveolar en DL-10, que desapareció al destete y no afectó la succión o el peso de las crías (White et al., 2011). Por otro lado, en este trabajo ambas dosis de BP3 disminuyeron la expresión relativa de  $\alpha$ -SMA, sugiriendo, en conjunto, que la exposición a BP3 durante la gestación modifica el desarrollo y/u organización alveolar en la glándula mamaria lactante. La expresión de  $\alpha$ -SMA forma parte del aparato contráctil de las células mioepiteliales, y defectos en la misma pueden ocasionar estasis del contenido de leche en el lumen alveolar y desencadenar una involución mamaria precoz (Haaksma et al., 2011). Asimismo, la menor expresión relativa de  $\alpha$ -SMA puede ser sugerente de un estado contraído de las células mioepiteliales, o de defectos en la relajación post contracción (Raymond et al., 2011). Sin embargo, no detectamos indicios de estasis láctea o involución en el análisis histológico, y la similitud en el peso corporal de las crías F2 nos sugieren que no hubo defectos en la lactancia *per se* (eyección y calidad de la leche) durante el periodo analizado. Por lo tanto, es posible que la menor expresión de  $\alpha$ -SMA se deba a una menor cantidad de células mioepiteliales o una disminución en la prolongación de sus proyecciones. A diferencia de los efectos de la exposición directa a BP3 en los organoides mamarios, en este modelo *in vivo* no observamos diferencia en la expresión proteica o de ARNm de las proteínas lácteas, y tampoco en la expresión de ARNm de los intermediarios de la vía de señalización de PRL evaluados, STAT5a y ELF5. Estos resultados sugieren que la exposición a BP3 durante la gestación no modificó la vía de señalización de PRL. Por lo tanto, las alteraciones en la organización alveolar podrían deberse a otros mecanismos de regulación del desarrollo alveolar, que podrían haberse originado incluso antes de la preñez. En la pubertad, la exposición a BP3 durante la gestación disminuyó la expresión de WNT4, regulador crítico del nicho basal de MaSCs (Rajaram et al., 2015). En el trabajo mencionado anteriormente de Gao et al. (2025), se reportó una disminución en la expresión de  $\alpha$ -SMA en organoides mamarios obtenidos de las MaSCs basales de animales expuestos a BP3, y una disminución en la formación de colonias de células bipotentes (expresión positiva para CK8 y  $\alpha$ -SMA), indicando alteraciones en la

diferenciación. Por lo tanto, es probable que los efectos de BP3 en la organización alveolar de la glándula mamaria lactante sean debido a alteraciones en la proliferación y diferenciación de las MaSCs basales de la glándula mamaria, posiblemente asociadas a la disminución en la expresión de WNT4 como detectamos en la pubertad, o a su señalización. Respecto a esto, uno de los roles de WNT4 durante la preñez es estabilizar la proteína SP1 (Ataca et al., 2020; Cai et al., 2014; Rajaram et al., 2015) encargada de la inducción del receptor 1a de la proteína morfogénica del hueso (BMPR1a) en las células mioepiteliales (Shao et al., 2021). La señalización de BMPR1a es necesaria para la correcta organización alveolar (Yan et al., 2021), para mantener el linaje de las células mioepiteliales y evitar la alveogénesis precoz (Shao et al., 2021).

Previamente, demostramos que el retraso en la maduración alveolar durante la preñez luego de la exposición perinatal a BPA (Altamirano et al., 2015; Kass et al., 2012) puede ser remitido por mecanismos compensatorios a mitad de lactancia (Altamirano et al., 2015). A su vez, la delección génica de las subunidades de integrinas  $\alpha 3$  y  $\alpha 6$ , necesarias para la función de las MaSCs (Romagnoli et al., 2020), retrasa el desarrollo mamario y la diferenciación alveolar en la preñez (Romagnoli et al., 2020). Si bien el desarrollo y diferenciación se recupera en la lactancia temprana, sus consecuencias se vuelven evidentes luego del DL-14 en la disminución de la expresión de proteínas lácteas, el peso de las crías, y una involución acelerada (Romagnoli et al., 2020). En uno de los objetivos de esta Tesis nos propusimos evaluar los efectos de la exposición a BP3 durante la gestación sobre la diferenciación funcional *in vitro* utilizando explantes mamarios. Sin embargo, el diseño experimental no fue óptimo para analizar los marcadores de diferenciación propuestos. La administración exógena de E2 y P4 estimula el desarrollo mamario induciendo la ramificación lateral y la formación de precursores alveolares (*alveolar buds*) (Anderson et al., 2007), procesos caracterizados por una marcada proliferación epitelial en la primera etapa de la preñez (Traurig, 1967). Sin embargo, la exposición a BP3 durante la gestación no modificó la proliferación epitelial mamaria en los animales estimulados con E2 y P4, lo que sugiere que BP3 podría actuar sobre otras etapas como la expansión lóbulo-alveolar que comienza a mitad de preñez (Anderson et al., 2007) o la maduración alveolar a finales de preñez (Jones & Stern, 1999). En futuros estudios sería importante analizar los efectos de BP3 sobre el desarrollo y maduración alveolar durante la preñez avanzada, y durante la activación secretoria en la lactancia temprana (DL2-DL4).

# **CONCLUSIONES**

## **GENERALES**

## CONCLUSIONES GENERALES

En esta Tesis utilizamos cultivos primarios 3D de organoides mamarios y demostramos que la exposición directa a BP3 modificó la expresión de receptores hormonales, alteró vías de señalización críticas involucradas en la extensión del crecimiento ductal y en la diferenciación epitelial de la glándula mamaria, con consecuencias en la expresión de las proteínas de la leche frente a estímulos lactogénicos. Particularmente, en el modelo de morfogénesis ductal, la exposición directa a BP3 disminuyó la expresión del RP, y de dos intermediarios en su vía de señalización, AREG y RANKL. Por otro lado, en el modelo de diferenciación funcional BP3 aumentó la expresión del ESR1, RP, y de STAT5a, además de inducir la traslocación nuclear de pSTAT5a/b, junto con un incremento en la expresión de CSN2, y una disminución de la expresión de WAP. En ambos experimentos, la morfología de los organoides no estuvo alterada por la exposición directa a BP3. Además, demostramos que, en la glándula mamaria puberal, la exposición a BP3 durante la gestación disminuyó la expresión de ARNm del RP y de WNT4, otro intermediario en su vía de señalización, sin modificar la extensión del crecimiento ductal, o la histoarquitectura mamaria. A mitad de lactancia, la exposición a BP3 durante la gestación alteró la organización alveolar, disminuyendo el tamaño de los alveolos y la expresión de  $\alpha$ -SMA. Sin embargo, BP3 no modificó la expresión de intermediarios de la señalización de PRL como STAT5a o ELF5, la expresión y síntesis de las proteínas de la leche, ni el peso corporal de las crías lactantes. Considerando estos resultados, podemos decir que BP3 afecta el desarrollo y diferenciación de la glándula mamaria, causando efectos diferenciales según la dosis utilizada, y la etapa de exposición, al igual que otros PEs (Hannan et al., 2023).

- *In vitro*, la exposición directa a BP3 presentó efectos sugerentes de mecanismos estrogénicos, anti-estrogénicos o anti-progestágenos, al igual que lo demostrado en otros estudios mecanicistas (Gomez et al., 2005; Molina-Molina et al., 2008; Schreurs et al., 2002, 2005; Suzuki et al., 2005; Watanabe et al., 2015). Estos efectos hormonales, se presentaron de manera diferencial según la concentración utilizada, la etapa del desarrollo mamario analizada, y posiblemente según el microambiente hormonal. Por ejemplo, a muy bajas concentraciones ( $1 \times 10^{-12}$  M), BP3 estimuló la expresión de IGF-1 durante la morfogénesis ductal, e indujo la expresión de ESR1 y de su gen blanco, RP, durante la diferenciación funcional, coincidente con un efecto estrogénico. Incluso, esta concentración de BP3 presentó efectos similares a los del BPA durante la diferenciación funcional. En cambio,  $1 \times 10^{-6}$  M BP3 disminuyó la

expresión del RP y de los efectores de su vía de señalización, AREG y RANKL, durante la morfogénesis ductal, sugiriendo un efecto anti-estrogénico o anti-progestágeno.

- Durante la morfogénesis ductal, en ambos modelos experimentales BP3 disminuyó la expresión del RP y de los efectores de su vía de señalización, sin alterar la expresión del ESR1. Esto demuestra que la expresión del RP es particularmente sensible a la acción de BP3 en esta etapa del desarrollo, independientemente del modelo de exposición. Además, BP3 podría interferir directamente sobre las vías de transducción de señales mediadas por el ESR1, sin alterar su nivel de expresión (De Coster & Van Larebeke, 2012; La Merrill et al., 2020). También podría actuar sobre otros mecanismos de regulación de la expresión y transactivación del RP, independientes de ESR1 (Abdel-Hafiz & Horwitz, 2014). Por otro lado, también demostramos que la disminución en la expresión del RP afecta diferencialmente la expresión de los efectores de su vía de señalización, como ocurre para otros PEs (Lacouture et al., 2023; Winkler et al., 2022).
- Durante la diferenciación funcional, los efectos de BP3 fueron diferentes según el modelo de exposición. Nuestro modelo *in vitro* presentó características similares a la diferenciación funcional mamaria en la etapa cercana al parto, y la exposición directa a BP3 alteró la vía de señalización de PRL y la expresión de las proteínas de la leche. En contraste, estos efectos no estuvieron presentes en la glándula mamaria lactante de animales expuestos a BP3 durante la gestación, cuando estas variables se analizaron a mitad de lactancia. Además, si bien BP3 alteró la histomorfología mamaria *in vivo*, no detectamos indicios de defectos en la lactancia, según las variables analizadas.
- La exposición a BP3 durante la gestación disminuyó la expresión de WNT4 en la pubertad, y la expresión relativa de  $\alpha$ -SMA de las células mioepiteliales en la lactancia. Esto demuestra que las células epiteliales basales, donde además se encuentra el nicho de MaSCs, son un blanco sensible a los efectos de BP3, tal como lo demuestra Gao et al. (2025). Desconocemos las implicancias que estos resultados podrían tener sobre el potencial regenerativo de la glándula mamaria luego de gestaciones sucesivas, o sobre la inducción de lesiones neoplásicas, debido a que escapan a los objetivos de esta Tesis.

En conjunto, los resultados de esta Tesis indican que BP3 se comportaría como PE, considerando las características propuestas por otros autores (De Coster & Van Larebeke, 2012; La Merrill et al., 2020). Asimismo, demostramos que la glándula

## Conclusiones generales

mamaria murina es sensible a los efectos de su exposición, tanto de manera directa *in vitro*, como *in vivo* durante la gestación. Además, los modelos de cultivo primario 3D de organoides mamarios que utilizamos, no solo lograron imitar con precisión diferentes etapas del desarrollo mamario (Lo et al., 2012; Nguyen-Ngoc et al., 2015; Sumbal et al., 2020b), sino que demostraron ser sensibles para estudiar los efectos de la exposición a PEs, reduciendo el uso de animales de experimentación. Por otro lado, aunque la exposición a BP3 durante la gestación, en general, provocó cambios menores, a largo plazo se evidenciaron alteraciones morfológicas en la glándula mamaria lactante. Esto demuestra que la exposición a BP3 presenta efectos persistentes que se evidencian en diferentes etapas del desarrollo. Finalmente, la mayoría de los efectos de BP3 se observaron en los grupos expuestos a  $1 \times 10^{-6}$  M o a 50 mg/kg/día, representativos de la exposición a BP3 luego de la aplicación de pantallas solares sobre la piel.

Estos hallazgos alertan sobre el uso de BP3 en formulaciones comerciales de productos de uso personal, particularmente durante la gestación, y deberían ser considerados por los organismos regulatorios. En este sentido, recientemente la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha bajado el porcentaje de BP3 permitido en las formulaciones comerciales a 2.2 % (UE, Comisión Europea, 2022). No es nuestra intención desaconsejar el uso estos productos, como por ejemplo los protectores solares, debido a la protección que brindan sobre los efectos deletéreos de la radiación solar sobre la piel. Sin embargo, al igual que otros autores (Wnuk et al., 2022), consideramos que hasta que se diluciden los efectos de BP3 sobre la salud humana, otras alternativas de protección pueden ser relevantes como moderar el tiempo de exposición solar, evitar los horarios de mayor intensidad de los rayos UV, o fomentar el uso de indumentaria especial, entre otras.

**ANEXOS****Tabla A1. Protocolo de procesado histológico**

<b>Deshidratación</b>	
Etanol 96° I	1 h
Etanol 96° II	2 h
Etanol 100° I	1 h
Etanol 100° II	1 h
Etanol 100° III	Toda la noche
<b>Aclaramiento</b>	
BioClear I	2 h
BioClear II	2 h
BioClear III	2 h
<b>Inclusión en parafina (60 °C)</b>	
Parafina I	Toda la noche
Parafina II	1 h
Parafina III	1 h
<b>Entacado en bloques de parafina</b>	Dejar atemperar toda la noche

**Tabla A2. Protocolo de tinción con H&E**

<b>Desparafinación e hidratación</b>	
Solvete orgánico (BioClear)	3 pasajes, 5 min c/u
Etanol 100°, 96°, 70°	1 pasaje c/u, 3 min c/u
Agua	3 min
<b>Tinción con H&amp;E</b>	
Hematoxilina de Mayer	2 min
Agua	30 s
Solución de hidróxido de sodio	15 s
Agua	1 min
Eosina	3 min
Agua	1 pasaje rápido
<b>Deshidratación</b>	
Estufa a 37 °C	Toda la noche
Solvete orgánico (BioClear)	2 pasajes, 5 min c/u.
<b>Montaje permanente</b>	
Cubreobjeto con Bálsamo de Canadá	Dejar secar toda la noche

**Tabla A3. Protocolo de inmunofluorescencia**

<b>Desparafinación e hidratación</b>	
Solvente orgánico (BioClear)	3 pasajes, 5 min c/u
Etanol 100°, 96°, 70°	1 pasaje c/u, 3 min c/u
PBS	5 min
<b>Bloqueo de tejido adiposo</b>	
Borohidruro de sodio en PBS (10 mg/mL)	40 min
PBS	5 min
<b>Recuperación antigénica</b>	
Calentamiento en horno microondas con <i>buffer</i> citrato de sodio 0.01 M, pH 6.	5 min a 100% de potencia sin portas
Tratamiento suave o fuerte según el antígeno y anticuerpo.	1 min a 100% de potencia con portas
	14 min a 40% de potencia con portas
	20 min apagado
	<b>Tratamiento suave</b>
	3 min a 100% de potencia sin portas
	5 min a 100% de potencia con portas
	3 min a 100% de potencia con portas
	3 min a 100% de potencia con portas
	20 min apagado
PBS	5 min
<b>Tratamiento fuerte</b>	
<b>Bloqueo de uniones no específicas</b>	
Suero normal 1:20 en PBS con 1.5% de leche descremada	1 h a temperatura ambiente, en cámara húmeda.
<b>Incubación con anticuerpo primario</b>	
Anticuerpo en solución BC-11	4 °C toda la noche
Atemperar	15 min
PBS	15 min
<b>Incubación con anticuerpo secundario</b>	
Alexa flúor, específico para cada anticuerpo primario, disuelto en BSA 1 % en PBS.	1 h a temperatura ambiente, en cámara húmeda y en oscuridad.
PBS	15 min
<b>Sistema de revelado</b>	
Solución de DAPI en PBS (1:1000)	5 min a temperatura ambiente, en oscuridad.
PBS	5 min
<b>Montaje permanente</b>	
Cubreobjeto con ProLong Gold	Dejar secar toda la noche a temperatura ambiente, en oscuridad
Sellado de bordes con esmalte	

BC-11: ácido carbamimidotioico (4-boronofenil) metil ester hydrobromido. BSA: albúmina sérica bovina (*bovine serum-albumin*). DAPI: 4', 6-diamino-2-fenilindol dihidrocloruro. PBS: solución de *buffer* fosfato.

**Tabla A4. Tinciones histoquímicas para eosinófilos y para mastocitos**

<b>Desparafinación e hidratación</b>	
Solvente orgánico (BioClear)	3 pasajes, 5 min c/u
Etanol 100°, 96°, 70°	1 pasaje c/u, 3 min c/u
Agua	5 min
<b>Rojo sirio alcalino (eosinófilos)</b>	
Hematoxilina de Mayer	10 min
Agua destilada	30 s
Etanol 70°	1 pasaje
Sirio rojo 0.5 %, pH 10.5	1 h
Agua corriente	10 min
Deshidratación y montaje de rutina	
<b>Alcian blue/safranina (mastocitos)</b>	
Ácido acético 3 % pH 2.4	3 min
Alcian blue 8 GX 1% en ácido acético 3 %, pH 2.4	2 h
Agua destilada	Pasaje
Safranina 0.25 % en HCl 0.125 N	30 min
Agua destilada	Pasaje
Hematoxilina de Gill	3 min
Agua destilada	Pasaje
Deshidratación y montaje de rutina	

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Hafiz, H. A., & Horwitz, K. B. (2014). Post-translational modifications of the progesterone receptors. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 140, 80-89. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.12.008>
- Allen, J. C., Keller, R. P., Archer, P., & Neville, M. C. (1991). Studies in human lactation: milk composition and daily secretion rates of macronutrients in the first year of lactation. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 54(1), 69-80. <https://doi.org/doi.org/10.1093/ajcn/54.1.69>
- Altamirano, G. A., Delconte, M. B., Gomez, A. L., Alarcón, R., Bosquiazzo, V. L., Luque, E. H., Muñoz-de-Toro, M., & Kass, L. (2017a). Early postnatal exposure to endosulfan interferes with the normal development of the male rat mammary gland. *Toxicology Letters*, 281, 102-109. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.09.012>
- Altamirano, G. A., Delconte, M. B., Gomez, A. L., Ingaramo, P. I., Bosquiazzo, V. L., Luque, E. H., Muñoz-de-Toro, M., & Kass, L. (2018). Postnatal exposure to a glyphosate-based herbicide modifies mammary gland growth and development in Wistar male rats. *Food and Chemical Toxicology*, 118, 111-118. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.05.011>
- Altamirano, G. A., Gomez, A. L., Schierano-Marotti, G., Muñoz-de-Toro, M., Rodriguez, H. A., & Kass, L. (2020). Bisphenol A and benzophenone-3 exposure alters milk protein expression and its transcriptional regulation during functional differentiation of the mammary gland *in vitro*. *Environmental Research*, 191, 110185. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110185>
- Altamirano, G. A., Muñoz-de-Toro, M., Luque, E. H., Gomez, A. L., Delconte, M. B., & Kass, L. (2015). Milk lipid composition is modified by perinatal exposure to bisphenol A. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 411, 258-267. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.05.007>
- Altamirano, G. A., Ramos, J. G., Gomez, A. L., Luque, E. H., Muñoz-de-Toro, M., & Kass, L. (2017b). Perinatal exposure to bisphenol A modifies the transcriptional regulation of the  $\beta$ -Casein gene during secretory activation of the rat mammary gland. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 439, 407-418. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.09.032>
- Anderson, S. M., MacLean, P. S., McManaman, J. L., & Neville, M. C. (2015). Lactation and its Hormonal Control. En T. M. Plant & A. J. Zeleznik (Eds.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: Two-Volume Set* (4th ed., Vol. 2, pp. 2055-2105). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00046-6>
- Anderson, S. M., Rudolph, M. C., McManaman, J. L., & Neville, M. C. (2007). Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: It's not just about milk protein synthesis! *Breast Cancer Research*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/bcr1653>
- Asselin-Labat, M. L., Sutherland, K. D., Barker, H., Thomas, R., Shackleton, M., Forrest, N. C., Hartley, L., Robb, L., Grosveld, F. G., van der Wees, J., Lindeman, G. J., & Visvader, J. E. (2007). Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nature Cell Biology*, 9(2), 201-209. <https://doi.org/10.1038/ncb1530>

- Asselin-Labat, M. L., Vaillant, F., Sheridan, J. M., Pal, B., Wu, D., Simpson, E. R., Yasuda, H., Smyth, G. K., Martin, T. J., Lindeman, G. J., & Visvader, J. E. (2010). Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. *Nature*, 465, 798-802. <https://doi.org/10.1038/nature09027>
- Ataca, D., Aouad, P., Constantin, C., Laszlo, C., Beleut, M., Shamseddin, M., Rajaram, R. D., Jeitziner, R., Mead, T. J., Caikovski, M., Bucher, P., Ambrosini, G., Apte, S. S., & Brisken, C. (2020). The secreted protease Adamts18 links hormone action to activation of the mammary stem cell niche. *Nature Communications*, 11(1571). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15357-y>
- Aupperlee, M. D., Drolet, A. A., Durairaj, S., Wang, W., Schwartz, R. C., & Haslam, S. Z. (2009). Strain-specific differences in the mechanisms of progesterone regulation of murine mammary gland development. *Endocrinology*, 150(3), 1485-1494. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1459>
- Aupperlee, M. D., Leipprandt, J. R., Bennett, J. M., Schwartz, R. C., & Haslam, S. Z. (2013). Amphiregulin mediates progesterone-induced mammary ductal development during puberty. *Breast Cancer Research*, 15(3). <https://doi.org/10.1186/bcr3431>
- Aupperlee, M. D., Smith, K. T., Kariagina, A., & Haslam, S. Z. (2005). Progesterone receptor isoforms A and B: Temporal and spatial differences in expression during murine mammary gland development. *Endocrinology*, 146(8), 3577-3588. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0346>
- Balmer, M. E., Buser, H. R., Müller, M. D., & Poiger, T. (2005). Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss lakes. *Environmental Science and Technology*, 39(4), 953-962. <https://doi.org/10.1021/es040055r>
- Barcellos-Hoff, M. H., Aggeler, J., Ram, T. G., & Bissell, M. J. (1989). Functional differentiation and alveolar morphogenesis of primary mammary cultures on reconstituted basement membrane. *Development*, 105(2), 223-235. <https://doi.org/doi.org/10.1242/dev.105.2.223>
- Barr, L., Alamer, M., & Darbre, P. D. (2018). Measurement of concentrations of four chemical ultraviolet filters in human breast tissue at serial locations across the breast. *Journal of Applied Toxicology*, 38(8), 1112-1120. <https://doi.org/10.1002/jat.3621>
- Baruch, A., Shani, M., Hurwitz, D. R., & Barash, I. (1995). Developmental regulation of the ovine  $\beta$ -lactoglobulin/human serum albumin transgene is distinct from that of the  $\beta$ -lactoglobulin and the endogenous  $\beta$ -casein genes in the mammary gland of transgenic mice. *Developmental Genetics*, 16(3), 241-252. <https://doi.org/10.1002/dvg.1020160304>
- Beleut, M., Rajaram, R. D., Caikovski, M., Ayyanan, A., Germano, D., Choi, Y., Schneider, P., & Brisken, C. (2010). Two distinct mechanisms underlie progesterone-induced proliferation in the mammary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(7), 2989-2994. <https://doi.org/10.1073/pnas.0915148107>
- Biswas, S. K., Banerjee, S., Baker, G. W., Kuo, C., & Chowdhury, I. (2022). The Mammary Gland: Basic Structure and Molecular Signaling during Development. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(7), 3883. <https://doi.org/doi.org/10.3390/ijms23073883>

- Boutinaud, M., & Jammes, H. (2004). Growth hormone increases Stat5 and Stat1 expression in lactating goat mammary gland: A specific effect compared to milking frequency. *Domestic Animal Endocrinology*, 27(4), 363-378. <https://doi.org/10.1016/j.domanied.2004.04.002>
- Brisken, C., & Ataca, D. (2015). Endocrine hormones and local signals during the development of the mouse mammary gland. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 4(3), 181-195. <https://doi.org/10.1002/wdev.172>
- Brisken, C., Heineman, A., Chavarria, T., Elenbaas, B., Tan, J., Dey, S. K., McMahon, J. A., McMahon, A. P., & Weinberg, R. A. (2000). Essential function of Wnt-4 in mammary gland development downstream of progesterone signaling. *Genes and Development*, 14, 650-654.
- Brisken, C., Kaur, S., Chavarria, T. E., Binart, N., Sutherland, R. L., Weinberg, R. A., Kelly, P. A., & Ormandy, C. J. (1999). Prolactin Controls Mammary Gland Development via Direct and Indirect Mechanisms. *Developmental Biology*, 210(1), 96-106. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9271>
- Brisken, C., & O'Malley, B. (2010). Hormone action in the mammary gland. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2, a003178. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013086>
- Brisken, C., Park, S., Vass, T., Lydon, J. P., O'malley, B. W., & Weinberg, R. A. (1998). A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development. *Developmental Biology*, 95(9), 5076-5081. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.9.507>
- Brisken, C., & Rajaram, R. D. (2006). Alveolar and lactogenic differentiation. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 11(3-4), 239-248. <https://doi.org/10.1007/s10911-006-9026-0>
- Brisken, C., & Scabia, V. (2020). 90 YEARS OF PROGESTERONE: Progesterone receptor signaling in the normal breast and its implications for cancer. *Journal of Molecular Endocrinology*, 65(1), T81-T94. <https://doi.org/10.1530/JME-20-0091>
- Brownfield, D. G., Venugopalan, G., Lo, A., Mori, H., Tanner, K., Fletcher, D. A., & Bissell, M. J. (2013). Patterned collagen fibers orient branching mammary epithelium through distinct signaling modules. *Current Biology*, 23(8), 703-709. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.03.032>
- Busch, C., Kariagina, A., Morozova, E., Borin, M. A., & Schwartz, R. C. (2005). Adult withdrawal of long-term Benzophenone-3 treatment induces regression of mammary ductal branching in a diet-dependent manner. *Food and Chemical Toxicology*, 197, 115251. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2025.115251>
- Buser, A. C., Gass-Handel, E. K., Wyszomierski, S. L., Doppler, W., Leonhardt, S. A., Schaack, J., Rosen, J. M., Watkin, H., Anderson, S. M., & Edwards, D. P. (2007). Progesterone receptor repression of prolactin/signal transducer and activator of transcription 5-mediated transcription of the  $\beta$ -casein gene in mammary epithelial cells. *Molecular Endocrinology*, 21(1), 106-125. <https://doi.org/10.1210/me.2006-0297>
- Byers, S. L., Wiles, M. V., Dunn, S. L., & Taft, R. A. (2012). Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS ONE*, 7(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035538>
- Cagnet, S., Ataca, D., Sfliomos, G., Aouad, P., Schuepbach-Mallepell, S., Hugues, H., Krust, A., Ayyanan, A., Scabia, V., & Brisken, C. (2018). Oestrogen receptor  $\alpha$  AF-1

- and AF-2 domains have cell population-specific functions in the mammary epithelium. *Nature Communications*, 9(1), 4723. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07175-0>
- Cai, C., Yu, Q. C., Jiang, W., Liu, W., Song, W., Yu, H., Zhang, L., Yang, Y., & Zeng, Y. A. (2014). R-spondin1 is a novel hormone mediator for mammary stem cell self-renewal. *Genes and Development*, 28(20), 2205-2218. <https://doi.org/10.1101/gad.245142.114>
- Calafat, A. M., Wong, L. Y., Ye, X., Reidy, J. A., & Needham, L. L. (2008a). Concentrations of the sunscreen agent benzophenone-3 in residents of the United States: National Health and Nutrition Examination Survey 2003-2004. *Environmental Health Perspectives*, 116(7), 893-897. <https://doi.org/10.1289/ehp.11269>
- Calafat, A. M., Ye, X., Wong, L. Y., Reidy, J. A., & Needham, L. L. (2008b). Exposure of the U.S. population to Bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environmental Health Perspectives*, 116(1), 39-44. <https://doi.org/10.1289/ehp.10753>
- Casals-Casas, C., & Desvergne, B. (2011). Endocrine disruptors: From endocrine to metabolic disruption. *Annual Review of Physiology*, 73, 135-162. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-012110-142200>
- Chen, L.-H., & Bissell, M. J. (1989). A novel regulatory mechanism for whey acidic protein gene expression. *Cell Regulation*, 1(1), 45-54. <https://doi.org/doi.org/10.1091/mbc.1.1.45>
- Cho, H., Aronica, S. M., & Katzenellenbogen, B. S. (1994). Regulation of progesterone receptor gene expression in MCF-7 breast cancer Cells: a comparison of the effects of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, estradiol, insulin-like growth factor-I, and serum factors. *Endocrinology*, 134(2), 658-664. <https://doi.org/10.1210/endo.134.2.7507831>
- Ciarloni, L., Mallepell, S., & Brisken, C. (2007). Amphiregulin is an essential mediator of estrogen receptor function in mammary gland development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(13), 5455-5460. <https://doi.org/doi.org/10.1073/pnas.061164710>
- Čikoš, Š., Bukovská, A., & Koppel, J. (2007). Relative quantification of mRNA: Comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Molecular Biology*, 8, 1-14. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-8-113>
- Condon, J. C., Jeyasuria, P., Faust, J. M., Wilson, J. W., & Mendelson, C. R. (2003). A decline in the levels of progesterone receptor coactivators in the pregnant uterus at term may antagonize progesterone receptor function and contribute to the initiation of parturition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 9518-9523. <https://doi.org/doi.org/10.1073/pnas.1633616100>
- Cora, M. C., Kooistra, L., & Travlos, G. (2015). Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicologic Pathology*, 43(6), 776-793. <https://doi.org/10.1177/0192623315570339>
- Criswell, R., Crawford, K. A., Bucinca, H., & Romano, M. E. (2020). Endocrine-disrupting chemicals and breastfeeding duration: a review. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*, 27(6), 388-395. <https://doi.org/10.1097/MED.0000000000000577>

- Cuderman, P., & Heath, E. (2007). Determination of UV filters and antimicrobial agents in environmental water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(4), 1343-1350. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0927-y>
- Davis, B., & Fenton, S. (2013). Mammary Gland. En W. M. Haschek, C. G. Rousseaux, & M. A. Wallig (Eds.), *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology, Third Edition: Volume 1-3* (3.<sup>a</sup> ed., Vols. 1-3, pp. 2665-2694). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415759-0.00061-3>
- Dawson, C. A., Pal, B., Vaillant, F., Gandolfo, L. C., Liu, Z., Bleriot, C., Ginhoux, F., Smyth, G. K., Lindeman, G. J., Mueller, S. N., Rios, A. C., & Visvader, J. E. (2020). Tissue-resident ductal macrophages survey the mammary epithelium and facilitate tissue remodelling. *Nature Cell Biology*, 22(5), 546-558. <https://doi.org/10.1038/s41556-020-0505-0>
- Dawson, C. A., & Visvader, J. E. (2021). The Cellular Organization of the Mammary Gland: Insights From Microscopy. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 26(1), 71-85. <https://doi.org/10.1007/s10911-021-09483-6>
- De Coster, S., & Van Larebeke, N. (2012). Endocrine-disrupting chemicals: Associated disorders and mechanisms of action. *Journal of Environmental and Public Health*, 1, 713696. <https://doi.org/10.1155/2012/713696>
- Emerman, J. T., Enami, J., Pitelka, D. R., & Nandi, S. (1977). Hormonal effects on intracellular and secreted casein in cultures of mouse mammary epithelial cells on floating collagen membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(10), 4466-4470. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.10.4466>
- Ewald, A. J., Brenot, A., Duong, M., Chan, B. S., & Werb, Z. (2008). Collective Epithelial Migration and Cell Rearrangements Drive Mammary Branching Morphogenesis. *Developmental Cell*, 14(4), 570-581. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.03.003>
- Ewald, A. J., Huebner, R. J., Palsdottir, H., Lee, J. K., Perez, M. J., Jorgens, D. M., Tauscher, A. N., Cheung, K. J., Werb, Z., & Auer, M. (2012). Mammary collective cell migration involves transient loss of epithelial features and individual cell migration within the epithelium. *Journal of Cell Science*, 125(11), 2638-2654. <https://doi.org/10.1242/jcs.096875>
- Farré, D., Roset, R., Huerta, M., Adsuara, J. E., Roselló, L., Albà, M. M., & Messeguer, X. (2003). Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3651-3653. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg605>
- Fata, J. E., Chaudhary, V., & Khokha, R. (2001). Cellular Turnover in the Mammary Gland Is Correlated with Systemic Levels of Progesterone and Not 17-Estradiol During the Estrous Cycle. *Biology of Reproduction*, 65, 680-688. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.3.680>
- Fata, J. E., Werb, Z., & Bissell, M. J. (2004). Regulation of mammary gland branching morphogenesis by the extracellular matrix and its remodeling enzymes. *Breast Cancer Research*, 6, 1-11. <https://doi.org/10.1186/bcr634>
- Fenton, S. E. (2006). Endocrine-disrupting compounds and mammary gland development: Early exposure and later life consequences. *Endocrinology*, 147(6). <https://doi.org/10.1210/en.2005-1131>
- Fernandez-Valdivia, R., Mukherjee, A., Ying, Y., Li, J., Paquet, M., DeMayo, F. J., & Lydon, J. P. (2009). The RANKL signaling axis is sufficient to elicit ductal side-branching and alveogenesis in the mammary gland of the virgin mouse.

- Developmental Biology*, 328(1), 127-139.  
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.01.019>
- Ferreira Slepicka, P., Somasundara, A., & dos Santo, C. (2021). The molecular basis of mammary gland development and epithelial differentiation. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 114, 93-112.  
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.09.014>.
- Fuller, R., Landigan, P. J., Balakrishnan, K., Bathan, G., Bose-O'Reilly, S., Brauer, M., Caravanos, J., Chiles, T., Cohen, A., Corra, L., Cropper, M., Ferraro, G., Hanna, J., Hanrahan, D., Hu, H., Hunter, D., Janata, G., Kupka, R., Lanphear, B., ... Yan, C. (2022). Pollution and health: a progress update. *The Lancet Planetary Health*, 6(535-547). [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(22\)00090-0](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(22)00090-0)
- Gao, H., Yang, X., Pan, P., Liu, X., Ma, Y., Chen, Y., Liu, Y., Sun, Y., Cao, S., Tian, Y., & Yang, Y. (2025). Pubertal low dose exposure to benzophenone-3 (BP-3) alters murine mammary stem cell functions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 292. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2025.117982>
- Ghassabian, A., Vandenberg, L., Kannan, K., & Trasande, L. (2022). Endocrine-Disrupting Chemicals and Child Health. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 62, 573-594. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-021921-093352>
- Ginsburg, Erika., & Vonderhaar, B. K. (2000). Whole organ culture of the mouse mammary gland. En M. M. Ip & B. B. Asch (Eds.), *Methods in mammary gland biology and breast cancer research* (pp. 147-154). Kluwer Academic / Plenum Publishers.
- Gomez, A. L., Altamirano, G. A., Alcaraz, M. R., Montemurro, M., Schierano-Marotti, G., Oddi, S. L., Culzoni, M. J., Muñoz-de-Toro, M., Bosquiazzo, V. L., & Kass, L. (2023). Mammary gland development in male rats perinatally exposed to propiconazole, glyphosate, or their mixture. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 101(104184). <https://doi.org/10.1016/j.etap.2023.104184>
- Gomez, A. L., Altamirano, G. A., Leturia, J., Bosquiazzo, V. L., Muñoz-de-Toro, M., & Kass, L. (2019). Male mammary gland development and methylation status of estrogen receptor alpha in Wistar rats are modified by the developmental exposure to a glyphosate-based herbicide. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 481(August 2018), 14-25. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.11.005>
- Gomez, A. L., Altamirano, G. A., Tschopp, M. V., Bosquiazzo, V. L., Muñoz-de-Toro, M., & Kass, L. (2020). Exposure to a Glyphosate-based Herbicide Alters the Expression of Key Regulators of Mammary Gland Development on Pre-pubertal Male Rats. *Toxicology*, 439, 152477. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2020.152477>
- Gomez, E., Pillon, A., Fenet, H., Rosain, D., Duchesne, M. J., Nicolas, J. C., Balaguer, P., & Casellas, C. (2005). Estrogenic activity of cosmetic components in reporter cell lines: Parabens, UV screens, and musks. *Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A*, 68(4), 239-251. <https://doi.org/10.1080/15287390590895054>
- Gore, A. C., Chappell, V. A., Fenton, S. E., Flaws, J. A., Nadal, A., Prins, G. S., Toppari, J., & Zoeller, R. T. (2015). EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocrine Reviews*, 36(6), 1-150. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1010>

- Gouon-Evans, V., Rothenberg, M. E., & Pollard, J. W. (2000). Postnatal mammary gland development requires macrophages and eosinophils. *Development*, 127(11), 2269-2282. <https://doi.org/10.1242/dev.127.11.2269>
- Gray, R. S., Cheung, K. J., & Ewald, A. J. (2010). Cellular Mechanisms Regulating Epithelial Morphogenesis and Cancer Invasion. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(5), 640-650. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.08.019>
- Grigor, M. R., McDonald, F. J., Latta, N., Richardson, C. L., & Tate, W. P. (1990). Transferrin-gene expression in the rat mammary gland Independence of maternal iron status. *Biochemical Journal*, 267(3), 815-819. <https://doi.org/doi.org/10.1042/bj2670815>
- Groner, B. (2002). Transcription factor regulation in mammary epithelial cells. *Domestic Animal Endocrinology*, 23(1-2), 25-32. [https://doi.org/doi.org/10.1016/S0739-7240\(02\)00142-X](https://doi.org/doi.org/10.1016/S0739-7240(02)00142-X)
- Haaksma, C. J., Schwartz, R. J., & Tomasek, J. J. (2011). Myoepithelial cell contraction and milk ejection are impaired in mammary glands of mice lacking smooth muscle alpha-actin. *Biology of Reproduction*, 85(1), 13-21. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.090639>
- Hagan, C. R., Knutson, T. P., & Lange, C. A. (2013). A common docking domain in progesterone receptor-B links DUSP6 and CK2 signaling to proliferative transcriptional programs in breast cancer cells. *Nucleic Acids Research*, 41(19), 8926-8942. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt706>
- Han, X., Lu, T., Hu, Y., Duan, J., Guan, Y., Huang, X., Zhou, J., Huang, R., Tang, M., Sun, R., Wang, Y., Song, L., Xia, Y., Wang, X., Chen, M., & Chen, T. (2022). A metabolomic study on the effect of prenatal exposure to Benzophenone-3 on spontaneous fetal loss in mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 233, 113347. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113347>
- Hannan, F. M., Elajnaif, T., Vandenberg, L. N., Kennedy, S. H., & Thakker, R. V. (2023). Hormonal regulation of mammary gland development and lactation. *Nature Reviews Endocrinology*, 19(1), 46-61. <https://doi.org/10.1038/s41574-022-00742-y>
- Haslam, S. Z. (1989). The Ontogeny of Mouse Mammary Gland Responsiveness to Ovarian Steroid Hormones. *Endocrinology*, 125(5), 2766-2772. <https://doi.org/doi.org/10.1210/endo-125-5-2766>
- Hens, J. R., & Wysolmerski, J. J. (2005). Key stages of mammary gland development: Molecular mechanisms involved in the formation of the embryonic mammary gland. *Breast Cancer Research*, 7(5), 220-224. <https://doi.org/10.1186/bcr1306>
- Heyne, G. W., Plisch, E. H., Melberg, C. G., Sandgren, E. P., Peter, J. A., & Lipinski, R. J. (2015). A simple and reliable method for early pregnancy detection in inbred mice. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 54(4), 368-371.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1983). Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Nature Biotechnology*, 11, 1026-1030. <https://doi.org/doi.org/10.1038/nbt0993-1026>
- Hitchcock, J. R., Hughes, K., Harris, O. B., & Watson, C. J. (2020). Dynamic architectural interplay between leucocytes and mammary epithelial cells. *FEBS Journal*, 287(2), 250-266. <https://doi.org/10.1111/febs.15126>
- Holliday, H., Roden, D., Junankar, S., Wu, S. Z., Baker, L. A., Krisp, C., ... & Swarbrick, A. (2021). Inhibitor of Differentiation 4 (ID4) represses mammary myoepithelial

- differentiation via inhibition of HEB. *Isclerosis*, 24(2). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.102072>
- Honma, S., Suzuki, A., Buchanan, D. L., Katsu, Y., Watanabe, H., & Iguchi, T. (2002). Low dose effect of in utero exposure to bisphenol A and diethylstilbestrol on female mouse reproduction. *Reproductive Toxicology*, 16(2), 117-122. [https://doi.org/doi.org/10.1016/S0890-6238\(02\)00006-0](https://doi.org/doi.org/10.1016/S0890-6238(02)00006-0)
- Hovey, R. C., Trott, J. F., Ginsburg, E., Goldhar, A., Sasaki, M. M., Fountain, S. J., Sundararajan, K., & Vonderhaar, B. K. (2001). Transcriptional and Spatiotemporal Regulation of Prolactin Receptor mRNA and Cooperativity with Progesterone Receptor Function During Ductal Branch Growth in the Mammary Gland. *Developmental Dynamics*, 222, 192-205. <https://doi.org/10.1002/dvdy.1179>
- Howlin, J., McBryan, J., & Martin, F. (2006). Pubertal mammary gland development: Insights from mouse models. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 11(3-4), 283-297. <https://doi.org/10.1007/s10911-006-9024-2>
- Huang, Y., Law, J. C., Lam, T., & Leung, K. S. (2021). Risks of organic UV filters: a review of environmental and human health concern studies. *Science of the Total Environment*, 755(142486). <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142486>
- Huebner, R. J., Neumann, N. M., & Ewald, A. J. (2016). Mammary epithelial tubes elongate through MAPK-dependent coordination of cell migration. *Development (Cambridge)*, 143(6), 983-993. <https://doi.org/10.1242/dev.127944>
- Hynes, N. E., & Watson, C. J. (2010). Mammary gland growth factors: roles in normal development and in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(8), a003186. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003186>
- Ingman, W. V., Wyckoff, J., Gouon-Evans, V., Condeelis, J., & Pollard, J. W. (2006). Macrophages promote collagen fibrillogenesis around terminal end buds of the developing mammary gland. *Developmental Dynamics*, 235(12), 3222-3229. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20972>
- Ismail, P., Li, J., DeMayo, F., O'Malley, B., & Lydon, J. (2002). A Novel LacZ Reporter Mouse Reveals Complex Regulation of the Progesterone Receptor Promoter During Mammary Gland Development. *Molecular Endocrinology*, 16(11), 2475-2489. <https://doi.org/10.1210/me.2002-0169>
- Jacobsen, B. M., & Horwitz, K. B. (2012). Progesterone receptors, their isoforms and progesterone regulated transcription. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 357(1-2), 18-29. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.016>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2007.02492.x>
- Jarry, H., Christoffel, J., Rimoldi, G., Koch, L., & Wuttke, W. (2004). Multi-organic endocrine disrupting activity of the UV screen benzophenone 2 (BP2) in ovariectomized adult rats after 5 days treatment. *Toxicology*, 205(1-2 SPEC. ISS.), 87-93. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.06.040>
- Jensen, E. C. (2013). Quantitative Analysis of Histological Staining and Fluorescence Using ImageJ. *Anatomical Record*, 296(3), 378-381. <https://doi.org/10.1002/ar.22641>

- Johnson, A. C., Jin, X., Nakada, N., & Sumpter, J. P. (2020). Learning from the past and considering the future of chemicals in the environment. *Science*, 367(6476), 384-387. <https://doi.org/doi.org/10.1126/science.aay6637>
- Jones, F. E., & Stern, D. F. (1999). Expression of dominant-negative ErbB2 in the mammary gland of transgenic mice reveals a role in lobuloalveolar development and lactation. *Oncogene*, 18, 3481-3490. <https://doi.org/doi.org/10.1038/sj.onc.1202698>
- Joshi, P. A., Jackson, H. W., Beristain, A. G., Di Grappa, M. A., Mote, P. A., Clarke, C. L., Stingl, J., Waterhouse, P. D., & Khokha, R. (2010). Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. *Nature*, 465(7299), 803-807. <https://doi.org/10.1038/nature09091>
- Joshi, P. A., Waterhouse, P. D., Kannan, N., Narala, S., Fang, H., Grappa, M. A. Di, Jackson, H. W., Penninger, J. M., Eaves, C., & Khokha, R. (2015). RANK Signaling Amplifies WNT-Responsive Mammary Progenitors through R-SPONDIN1. *Stem Cell Reports*, 5(1), 31-44. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.05.012>
- Junqueira, L. C. U., & Junqueira, L. M. M. S. (1983). *Técnicas básicas de citología e histologia* (3.<sup>a</sup> ed., Vol. 8). Santos.
- Kam, R. L., Bernhardt, S. M., Ingman, W. V., & Amir, L. H. (2021). Early Human Development Modern, exogenous exposures associated with altered mammary gland development: A systematic review. *Early Human Development*, 156(February), 105342. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2021.105342>
- Kariagina, A., Morozova, E., Hoshyar, R., Aupperlee, M. D., Borin, M. A., Haslam, S. Z., & Schwartz, R. C. (2020). Benzophenone-3 promotion of mammary tumorigenesis is diet-dependent. *Oncotarget*, 11(48), 4465-4478. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.27831>
- Kass, L., Altamirano, G. A., Bosquiazzo, V. L., Luque, E. H., & Muñoz-de-Toro, M. (2012). Perinatal exposure to xenoestrogens impairs mammary gland differentiation and modifies milk composition in Wistar rats. *Reproductive Toxicology*, 33(3), 390-400. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.02.002>
- Kass, L., Durando, M., Altamirano, G. A., Manfroni-Ghibaudo, G. E., Luque, E. H., & Muñoz-de-Toro, M. (2015). Prenatal Bisphenol A exposure delays the development of the male rat mammary gland. *Reproductive Toxicology*, 54, 37-46. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.02.001>
- Kass, L., Durando, M., Ramos, J. G., Varayoud, J., Powell, C. E., Luque, E. H., & Muñoz-De-Toro, M. (2004). Association of increased estrogen receptor  $\beta$ 2 expression with parity-induced alterations in the rat mammary gland. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 91(1-2), 29-39. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2004.02.001>
- Kass, L., Erler, J. T., Dembo, M., & Weaver, V. M. (2007). Mammary epithelial cell: Influence of extracellular matrix composition and organization during development and tumorigenesis. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(11), 1987-1994. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.06.025>
- Kay, J. E., Cardona, B., Rudel, R. A., Vandenberg, L. N., Soto, A. M., Christiansen, S., Birnbaum, L. S., & Fenton, S. E. (2022). Chemical Effects on Breast Development, Function, and Cancer Risk: Existing Knowledge and New Opportunities. *Current Environmental Health Reports*, 9(4), 535-562. <https://doi.org/10.1007/s40572-022-00376-2>

- Kim, H., Lee, E., Lee, M., Ahn, S., & Kim, J. (2018). Phosphodiesterase 4B plays a role in benzophenone-3-induced phototoxicity in normal human keratinocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 338(October 2017), 174-181. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2017.11.021>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.05.015>
- Kim, Y. C., Clark, R. J., Pelegri, F., & Alexander, C. M. (2009). Wnt4 is not sufficient to induce lobuloalveolar mammary development. *BMC Developmental Biology*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/1471-213X-9-55>
- Kleinberg, D. L., Feldman, M., & Ruan, W. (2000). IGF-I: An Essential Factor in Terminal End Bud Formation and Ductal Morphogenesis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 5(1), 7-17. <https://doi.org/doi.org/10.1023/A:1009507030633>
- Kleinberg, D. L., & Ruan, W. (2008). IGF-I, GH, and sex steroid effects in normal mammary gland development. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 13(4), 353-360. <https://doi.org/10.1007/s10911-008-9103-7>
- Krause, M., Frederiksen, H., Sundberg, K., Jørgensen, F. S., Jensen, L. N., Nørgaard, P., Jørgensen, C., Ertberg, P., Juul, A., Drzewiecki, K. T., Skakkebaek, N. E., & Andersson, A. M. (2018). Presence of benzophenones commonly used as UV filters and absorbers in paired maternal and fetal samples. *Environment International*, 110, 51-60. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.10.005>
- Krause, M., Klit, A., Blomberg Jensen, M., Søeborg, T., Frederiksen, H., Schlumpf, M., Lichtensteiger, W., Skakkebaek, N. E., & Drzewiecki, K. T. (2012). Sunscreens: Are they beneficial for health? An overview of endocrine disrupting properties of UV-filters. *International Journal of Andrology*, 35(3), 424-436. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2012.01280.x>
- La Merrill, M. A., Vandenberg, L. N., Smith, M. T., Goodson, W., Browne, P., Patisaul, H. B., Guyton, K. Z., Kortenkamp, A., Cogliano, V. J., Woodruff, T. J., Rieswijk, L., Sone, H., Korach, K. S., Gore, A. C., Zeise, L., & Zoeller, R. T. (2020). Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nature Reviews Endocrinology*, 16(1), 45-57. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0273-8>
- Lacouture, A., Breton, Y., Weidmann, C., Goulet, S. M., Germain, L., Pelletier, M., & Audet-Walsh, É. (2023). Estrogens and endocrine-disrupting chemicals differentially impact the bioenergetic fluxes of mammary epithelial cells in two- and three-dimensional models. *Environment International*, 179. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.108132>
- Lacouture, A., Jobin, C., Weidmann, C., Berthiaume, L., Bastien, D., Laverdière, I., Pelletier, M., & Audet-Walsh, É. (2021). A FACS-Free Purification Method to Study Estrogen Signaling, Organoid Formation, and Metabolic Reprogramming in Mammary Epithelial Cells. *Frontiers in Endocrinology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.672466>
- Lamb, C. A., Fabris, V. T., & Lanari, C. (2020). Progesterone and breast. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 69, 85-94. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2020.04.001>

- LaPlante, C. D., Bansal, R., Dunphy, K. A., Jerry, D. J., & Vandenberg, L. N. (2018). Oxybenzone alters mammary gland morphology in mice exposed during pregnancy and lactation. *Journal of the Endocrine Society*, 2(8), 903-921. <https://doi.org/10.1210/JS.2018-00024>
- Lee, H. J., Gallego-Ortega, D., Ledger, A., Schramek, D., Joshi, P., Szwarc, M. M., Cho, C., Lydon, J. P., Khokha, R., Penninger, J. M., & Ormandy, C. J. (2013). Progesterone drives mammary secretory differentiation via RankL-mediated induction of Elf5 in luminal progenitor cells. *Development (Cambridge)*, 140(7), 1397-1401. <https://doi.org/10.1242/dev.088948>
- Lee, J., Choi, K., Park, J., Moon, H. B., Choi, G., Lee, J. J., Suh, E., Kim, H. J., Eun, S. H., Kim, G. H., Cho, G. J., Kim, S. K., Kim, S., Kim, S. Y., Kim, S., Eom, S., Choi, S., Kim, Y. D., & Kim, S. (2018). Bisphenol A distribution in serum, urine, placenta, breast milk, and umbilical cord serum in a birth panel of mother–neonate pairs. *Science of the Total Environment*, 626, 1494-1501. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.042>
- Leehy, K. A., Truong, T. H., Mauro, L. J., & Lange, C. A. (2018). Progesterone receptors (PR) mediate STAT actions: PR and prolactin receptor signaling crosstalk in breast cancer models. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 176, 88-93. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.04.011>
- Lilla, J. N., & Werb, Z. (2010). Mast cells contribute to the stromal microenvironment in mammary gland branching morphogenesis. *Developmental Biology*, 337(1), 124-133. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.10.021>
- Liu, X., Robinson, G. W., Wagner, K.-U., Garrett, L., Wynshaw-Boris, A., & Hennighausen, L. (1997). Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis. *Genes & Development*, 11, 179-186. <https://doi.org/10.1101/gad.11.2.179>
- Lo, A. T., Mori, H., Mott, J., & Bissell, M. J. (2012). Constructing Three-Dimensional Models to Study Mammary Gland Branching Morphogenesis and Functional Differentiation. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 17, 103-110. <https://doi.org/10.1007/s10911-012-9251-7>
- Loladze, A. V., Stull, M. A., Rowzee, A. M., DeMarco, J., Lantry, J. H., Rosen, C. J., LeRoith, D., Wagner, K. U., Hennighausen, L., & Wood, T. L. (2006). Epithelial-specific and stage-specific functions of insulin-like growth factor-I during postnatal mammary development. *Endocrinology*, 147(11), 5412-5423. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0427>
- Lorraine, G. A., & Pettigrove, M. E. (2006). Seasonal variations in concentrations of pharmaceuticals and personal care products in drinking water and reclaimed wastewater in Southern California. *Environmental Science and Technology*, 40(3), 687-695. <https://doi.org/10.1021/es051380x>
- Luetteke, N. C., Qiu, T. H., Fenton, S. E., Troyer, K. L., Riedel, R. F., Chang, A., & Lee, D. C. (1999). Targeted inactivation of the EGF and amphiregulin genes reveals distinct roles for EGF receptor ligands in mouse mammary gland development. *Development*, 126(12), 2739-2750. <https://doi.org/10.1242/dev.126.12.2739>
- Luque, E. H., Ramos, J. G., Rodriguez, H. A., & Muñoz De Toro, M. M. (1996). Dissociation in the control of cervical eosinophilic infiltration and collagenolysis at the end of pregnancy or after pseudopregnancy in ovariectomized steroid-treated rats. *Biology of Reproduction*, 55(6), 1206-1212. <https://doi.org/10.1095/biolreprod55.6.1206>

- Lydon, J. P., Demayo, F. J., Funk, C. R., Mani, S. K., Hughes, A. R., Montgomery, C. A., Shyamala, G., Conneely, O. M., & O'malley, B. W. (1995). Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes & development*, 9. <https://doi.org/10.1101/gad.9.18.2266>
- Macias, H., & Hinck, L. (2012). Mammary gland development. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 1(4), 533-557. <https://doi.org/10.1002/wdev.35>
- Majhi, P. D., Sharma, A., Roberts, A. L., Daniele, E., Majewski, A. R., Chuong, L. M., Black, A. L., Vandenberg, L. N., Schneider, S. S., Dunphy, K. A., & Jerry, D. J. (2020). Effects of Benzophenone-3 and Propylparaben on Estrogen Receptor-Dependent R-Loops and DNA Damage in Breast Epithelial Cells and Mice. *Environmental Health Perspectives*, 128(1). <https://doi.org/doi.org/10.1289/EHP5221>
- Mallepell, S., Krust, A. E., Chambon, P., & Brisken, C. (2006). Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 13(7), 2196-2201. <https://doi.org/doi.org/10.1073/pnas.0510974103>
- Mao, J. F., Li, W., Ong, C. N., He, Y., Jong, M. C., & Gin, K. Y. H. (2022). Assessment of human exposure to benzophenone-type UV filters: A review. *Environment International*, 167, 107405. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107405>
- Matouskova, K., Bugos, J., Schneider, S. S., & Vandenberg, L. N. (2022a). Exposure to Low Doses of Oxybenzone During Perinatal Development Alters Mammary Gland Stroma in Female Mice. *Frontiers in Toxicology*, 4, 1-12. <https://doi.org/10.3389/ftox.2022.910230>
- Matouskova, K., Jerry, D. J., & Vandenberg, L. N. (2020). Exposure to low doses of oxybenzone during perinatal development alters mammary gland morphology in male and female mice. *Reproductive Toxicology*, 92, 66-77. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2019.08.002>
- Matouskova, K., Szabo, G. K., Daum, J., Fenton, S. E., Christiansen, S., Soto, A. M., Kay, J. E., Cardona, B., & Vandenberg, L. N. (2022b). Best practices to quantify the impact of reproductive toxicants on development, function, and diseases of the rodent mammary gland. *Reproductive Toxicology*, 112, 51-67. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2022.06.011>
- Matta, M. K., Florian, J., Zusterzeel, R., Pilli, N. R., Patel, V., Volpe, D. A., Yang, Y., Oh, L., Bashaw, E., Zineh, I., Sanabria, C., Kemp, S., Godfrey, A., Adah, S., Coelho, S., Wang, J., Furlong, L. A., Ganley, C., Michele, T., & Strauss, D. G. (2020). Effect of Sunscreen Application on Plasma Concentration of Sunscreen Active Ingredients: A Randomized Clinical Trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association*, 323(3), 256-267. <https://doi.org/10.1001/jama.2019.20747>
- McLachlan, J. A. (2001). Environmental signaling: What embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocrine Reviews*, 22(3), 319-341. <https://doi.org/10.1210/edrv.22.3.0432>
- McManaman, J. L., Palmer, C. A., Anderson, S., Schwertfeger, K., & Neville, M. C. (2004). Regulation of Milk Lipid Formation and Secretion in the Mouse Mammary Gland. En L. K. Pickering, A. L. Morrow, G. M. Ruiz-Palacios, & R. J. Schanler (Eds.), *Protecting Infants through Human Milk. Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 554, pp. 263-279). Kluwer Academic / Plenum Publishers. [https://doi.org/doi.org/10.1007/978-1-4757-4242-8\\_22](https://doi.org/doi.org/10.1007/978-1-4757-4242-8_22)

- Meseguer, X., Escudero, R., Farré, D., Núñez, O., Martínez, J., & Albà, M. M. (2002). PROMO: Detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics*, 18(2), 333-334. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/18.2.333>
- Missaghian, E., Kempná, P., Dick, B., Hirsch, A., Alikhani-Koupaei, R., Jégou, B., Mullis, P. E., Frey, B. M., & Flück, C. E. (2009). Role of DNA methylation in the tissue-specific expression of the CYP17A1 gene for steroidogenesis in rodents. *Journal of Endocrinology*, 202(1), 99-109. <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0353>
- Miyoshi, K., Shillingford, J. M., Smith, G. H., Grimm, S. L., Wagner, K. U., Oka, T., Rosen, J. M., Robinson, G. W., & Hennighausen, L. (2001). Signal transducer and activator of transcription (Stat) 5 controls the proliferation and differentiation of mammary alveolar epithelium. *Journal of Cell Biology*, 155(4), 531-542. <https://doi.org/10.1083/jcb.200107065>
- Molina-Molina, J. M., Escande, A., Pillon, A., Gomez, E., Pakdel, F., Cavaillès, V., Olea, N., Aït-Aïssa, S., & Balaguer, P. (2008). Profiling of benzophenone derivatives using fish and human estrogen receptor-specific *in vitro* bioassays. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 232(3), 384-395. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.07.017>
- Molins-Delgado, D., Olmo-Campos, M. del M., Valeta-Juan, G., Pleguezuelos-Hernández, V., Barceló, D., & Díaz-Cruz, M. S. (2018). Determination of UV filters in human breast milk using turbulent flow chromatography and babies' daily intake estimation. *Environmental Research*, 161, 532-539. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.11.033>
- Morozova, E., Kariagina, A., Busch, C., & Schwartz, R. C. (2024). Benzophenone-3 alters expression of genes encoding vascularization and epithelial-mesenchymal transition functions during Trp53-null mammary tumorigenesis. *Food and Chemical Toxicology*, 186, 114540.
- Mroue, R., & Bissell, M. J. (2012). Three-Dimensional Cultures of Mouse Mammary Epithelial cells. En S. Randell & M. Fulcher (Eds.), *Epithelial Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology* (Vol. 945, pp. 221-250). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-125-7>
- Mukherjee, A., Soyal, S. M., Li, J., Ying, Y., He, B., Demayo, F. J., & Lydon, J. P. (2010). Targeting RANKL to a specific subset of murine mammary epithelial cells induces ordered branching morphogenesis and alveogenesis in the absence of progesterone receptor expression. *The FASEB Journal*, 24(11), 4408-4419. <https://doi.org/10.1096/fj.10-157982>
- Mukhopadhyay, S. S., Wyszomierski, S. L., Gronostajski, R. M., & Rosen, J. M. (2001). Differential Interactions of Specific Nuclear Factor I Isoforms with the Glucocorticoid Receptor and STAT5 in the Cooperative Regulation of WAP Gene Transcription. *Molecular and Cellular Biology*, 21(20), 6859-6869. <https://doi.org/10.1128/mcb.21.20.6859-6869.2001>
- Muñoz-de-Toro, M. M., Maffini, M. V., Kass, L., & Luque, E. H. (1998). Proliferative activity and steroid hormone receptor status in male breast carcinoma. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.*, 67(4), 333-339. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(98\)00124-1](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(98)00124-1)
- Mustieles, V., Balogh, R. K., Axelstad, M., Montazeri, P., Márquez, S., Vrijheid, M., Draskau, M. K., Taxvig, C., Peinado, F. M., Berman, T., Frederiksen, H., Fernández, M. F., Marie Vinggaard, A., & Andersson, A. M. (2023). Benzophenone-3: Comprehensive review of the toxicological and human evidence with meta-

- analysis of human biomonitoring studies. *Environment International*, 173, 107739. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.107739>
- Naidu, R., Biswas, B., Willett, I. R., Cribb, J., Kumar Singh, B., Paul Nathanail, C., Coulon, F., Semple, K. T., Jones, K. C., Barclay, A., & John Aitken, R. (2021). Chemical pollution: A growing peril and potential catastrophic risk to humanity. *Environment International*, 156(106616). <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106616>
- Nakamura, N., Inselman, A. L., White, G. A., Chang, C. W., Trbojevich, R. A., Sephr, E., Voris, K. L., Patton, R. E., Bryant, M. S., Harrouk, W., McIntyre, B. S., Foster, P. M. D., & Hansen, D. K. (2015). Effects of maternal and lactational exposure to 2-hydroxy-4-methoxybenzone on development and reproductive organs in male and female rat offspring. *Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology*, 104(1), 35-51. <https://doi.org/10.1002/bdrb.21137>
- Naylor, M. J., Li, N., Cheung, J., Lowe, E. T., Lambert, E., Marlow, R., Wang, P., Schatzmann, F., Wintermantel, T., Schüetz, G., Clarke, A. R., Mueller, U., Hynes, N. E., & Streuli, C. H. (2005). Ablation of  $\beta 1$  integrin in mammary epithelium reveals a key role for integrin in glandular morphogenesis and differentiation. *Journal of Cell Biology*, 171(4), 717-728. <https://doi.org/10.1083/jcb.200503144>
- Neville, M. C., McFadden, T. B., & Forsyth, I. (2002). Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 7(1), 49-66. <https://doi.org/10.1023/A:1015770423167>
- Neville, M. C., Webb, P., Ramanathan, P., Mannino, M. P., Pecorini, C., Monks, J., Anderson, S. M., & MacLean, P. (2013). The insulin receptor plays an important role in secretory differentiation in the mammary gland. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 305(9). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00337.2013>.-Insulin
- Nguyen, D. A., Parlow, A. F., & Neville, M. C. (2001). Hormonal regulation of tight junction closure in the mouse mammary epithelium during the transition from pregnancy to lactation. *Journal of Endocrinology*, 170(2), 347-356. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1700347>
- Nguyen-Ngoc, K.-V., Cheung, K. J., Brenot, A., Shamir, E. R., Gray, R. S., Hines, W. C., Yaswen, P., Werb, Z., & Ewald, A. J. (2012). ECM microenvironment regulates collective migration and local dissemination in normal and malignant mammary epithelium. *Proceedings of the National Academy of Science*, 109(39), E2595-E2604. <https://doi.org/10.1073/pnas.1212834109>
- Nguyen-Ngoc, K.-V., & Ewald, A. J. (2013). Mammary ductal elongation and myoepithelial migration are regulated by the composition of the extracellular matrix. *Journal of Microscopy*, 251(3), 212-223. <https://doi.org/10.1111/jmi.12017>
- Nguyen-Ngoc, K.-V., Shamir, E. R., Huebner, R. J., Beck, J. N., Cheung, K. J., & Ewald, A. J. (2015). 3D Culture Assays of Murine Mammary Branching Morphogenesis and Epithelial Invasion. *Methods in Molecular Biology*, 1189, 1-350. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1164-6>
- Novaro, V., Roskelley, C. D., & Bissell, M. J. (2003). Collagen-IV and laminin-1 regulate estrogen receptor  $\alpha$  expression and function in mouse mammary epithelial cells. *Journal of Cell Science*, 116(14), 2975-2986. <https://doi.org/10.1242/jcs.00523>
- Oakes, S. R., Hilton, H. N., & Ormandy, C. J. (2006). Key stages in mammary gland development: The alveolar switch: Coordinating the proliferative cues and cell fate

- decisions that drive the formation of lobuloalveoli from ductal epithelium. *Breast Cancer Research*, 8(2). <https://doi.org/10.1186/bcr1411>
- Oakes, S. R., Naylor, M. J., Asselin-Labat, M. L., Blazek, K. D., Gardiner-Garden, M., Hilton, H. N., Kazlauskas, M., Pritchard, M. A., Chodosh, L. A., Pfeffer, P. L., Lindeman, G. J., Visvader, J. E., & Ormandy, C. J. (2008a). The Ets transcription factor Elf5 specifies mammary alveolar cell fate. *Genes and Development*, 22(5), 581-586. <https://doi.org/10.1101/gad.1614608>
- Oakes, S. R., Rogers, R. L., Naylor, M. J., & Ormandy, C. J. (2008b). Prolactin regulation of mammary gland development. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 13(1), 13-28. <https://doi.org/10.1007/s10911-008-9069-5>
- Obr, A. E., Grimm, S. L., Bishop, K. A., Wesley Pike, J., Lydon, J. P., & Edwards, D. P. (2013). Progesterone receptor and Stat5 signaling cross Talk through RANKL in mammary epithelial cells. *Molecular Endocrinology*, 27(11), 1808-1824. <https://doi.org/10.1210/me.2013-1077>
- Ormandy, C. J., Naylor, M., Harris, J., Robertson, F., Horseman, N. D., Lindeman, G. J., Visvader, J., & Kelly, P. A. (2003). Investigation of the Transcriptional Changes Underlying Functional Defects in the Mammary Glands of Prolactin Receptor Knockout Mice. *Recent Progress in Hormone Research*, 58, 297-323. <https://doi.org/10.1210/rp.58.1.297>
- Paine, I. S., & Lewis, M. T. (2017). The Terminal End Bud: the Little Engine that Could. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 22(2), 93-108. <https://doi.org/10.1007/s10911-017-9372-0>
- Pan, S., Guo, Y., Yu, W., Hong, F., Qiao, X., Zhang, J., Xu, P., & Zhai, Y. (2023). Environmental chemical TCPOBOP disrupts milk lipid homeostasis during pregnancy and lactation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 249, 114463. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.114463>
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), E45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pfaffl, M. W., Horgan, G. W., & Dempfle, L. (2002). Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9), e36. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>
- Pinto, M. P., Jacobsen, B. M., & Horwitz, K. B. (2011). An immunohistochemical method to study breast cancer cell subpopulations and their growth regulation by hormones in three-dimensional cultures. *Frontiers in Endocrinology*, 2(15), 1-6. <https://doi.org/10.3389/fendo.2011.00015>
- Purnell, D. M., Combs, J. W., & Saggers, G. C. (1974). Cell proliferation in mammary epithelium and correlated histochemical fluctuations in mast cells during the estrous cycle. *Journal of the National Cancer Institute*, 53(6), 1691-1697. <https://doi.org/10.1093/jnci/53.6.1691>
- Quirk, S. J., Gannell, J. E., Fullerton, M. J., & Funder, J. W. (1985). Progestins specifically suppress  $\alpha$ -lactalbumin synthesis and secretion. *J. steroid Biochem*, 23(6 Part 1), 901-905. [https://doi.org/doi.org/10.1016/0022-4731\(85\)90045-7](https://doi.org/doi.org/10.1016/0022-4731(85)90045-7)
- Radhakrishnan, A., Raju, R., Tuladhar, N., Subbannayya, T., Thomas, J. K., Goel, R., Telikicherla, D., Palapetta, S. M., Rahiman, B. A., Venkatesh, D. D., Urmila, K. K., Harsha, H. C., Mathur, P. P., Prasad, T. S. K., Pandey, A., Shemanko, C., & Chatterjee, A. (2012). A pathway map of prolactin signaling. *Journal of Cell*

- Communication and Signaling*, 6(3), 169-173. <https://doi.org/10.1007/s12079-012-0168-0>
- Rajaram, R. D., Buric, D., Caikovski, M., Ayyanan, A., Rougemont, J., Shan, J., Vainio, S. J., Yalcin-ozuysal, O., & Brisken, C. (2015). Progesterone and Wnt4 control mammary stem cells via myoepithelial crosstalk. *The EMBO Journal*, 34(5), 641-652.
- Ramos, J. G., Varayoud, J., Bosquiazzo, V. L., Luque, E. H., & Muñoz-de-Toro, M. (2002). Cellular turnover in the rat uterine cervix and its relationship to estrogen and progesterone receptor dynamics. *Biology of Reproduction*, 67(3), 735-742. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.101.002402>
- Ranjan, M., Lee, O., Cottone, G., Mehrabad, E. M., Spike, B. T., Zeng, Z., Yadav, S., Chatterton, R., Kim, J. J., Clare, S. E., & Khan, S. A. (2021). Progesterone receptor antagonists reverse stem cell expansion and the paracrine effectors of progesterone action in the mouse mammary gland. *Breast Cancer Research*, 23(78), 1-17. <https://doi.org/10.1186/s13058-021-01455-2>
- Rasmussen, S. B., Young, L. J. T., & Smith, G. H. (2000). Preparing Mammary Gland Whole Mounts from Mice. En M. Ip & B. Asch (Eds.), *Methods in Mammary Gland Biology and Neoplasia* (1.<sup>a</sup> ed., pp. 75-86). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4295-7\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-4295-7_7)
- Raymond, K., Cagnet, S., Kreft, M., Janssen, H., Sonnenberg, A., & Glukhova, M. A. (2011). Control of mammary myoepithelial cell contractile function by  $\alpha 3\beta 1$  integrin signalling. *The EMBO Journal*, 30, 1896-1906. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.113>
- Rayner, J. L., Enoch, R. R., & Fenton, S. E. (2005). Adverse effects of prenatal exposure to atrazine during a critical period of mammary gland growth. *Toxicological Sciences*, 87(1), 255-266. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi213>
- Reed, J. R., & Schwertfeger, K. L. (2010). Immune cell location and function during post-natal mammary gland development. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 15(3), 329-339. <https://doi.org/10.1007/s10911-010-9188-7>
- Reichenstein, M., Rauner, G., & Barash, I. (2011). Conditional repression of STAT5 expression during lactation reveals its exclusive roles in mammary gland morphology, milk-protein gene expression, and neonate growth. *Molecular Reproduction and Development*, 78(8), 585-596. <https://doi.org/10.1002/mrd.21345>
- Rhoads, R. E., & Grudzien-Nogalska, E. (2007). Translational regulation of milk protein synthesis at secretory activation. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 12(4), 283-292. <https://doi.org/10.1007/s10911-007-9058-0>
- Ribatti, D. (2018). The Staining of Mast Cells: A Historical Overview. *International Archives of Allergy and Immunology*, 176(1), 55-60. <https://doi.org/10.1159/000487538>
- Richer, J. K., Lange, C. A., Manning, N. G., Owen, G., Powell, R., & Horwitz, K. B. (1998). Convergence of Progesterone with Growth Factor and Cytokine Signaling in Breast Cancer: PROGESTERONE RECEPTORS REGULATE SIGNAL TRANSDUCERS AND ACTIVATORS OF TRANSCRIPTION EXPRESSION AND ACTIVITY. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(47), 31317-31326. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.47.31317>

- Richert, M. M., Schwertfeger, K. L., Ryder, J. W., & Anderson, S. M. (2000). An atlas of mouse mammary gland development. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 5(2), 227-241. <https://doi.org/10.1023/A:1026499523505>
- Rijnkels, M., Freeman-Zadrowski, C., Hernandez, J., Potluri, V., Wang, L., Li, W., & Lemay, D. G. (2013). Epigenetic Modifications Unlock the Milk Protein Gene Loci during Mouse Mammary Gland Development and Differentiation. *PLoS ONE*, 8(1), e53270. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053270>
- Rijnkels, M., Kabotyanski, E., Montazer-Torbat, M. B., Beauvais, C. H., Vassetzky, Y., Rosen, J. M., & Devinoy, E. (2010). The epigenetic landscape of mammary gland development and functional differentiation. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 15(1), 85-100. <https://doi.org/10.1007/s10911-010-9170-4>
- Rochester, J. R. (2013). Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Reproductive Toxicology*, 42, 132-155. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.08.008>
- Romagnoli, M., Bresson, L., Di-Cicco, A., Pérez-Lanzón, M., Legoix, P., Baulande, S., De La Grange, P., De Arcangelis, A., Georges-Labouesse, E., Sonnenberg, A., Deugnier, M. A., Glukhova, M. A., & Faraldo, M. M. (2020). Laminin-binding integrins are essential for the maintenance of functional mammary secretory epithelium in lactation. *Development (Cambridge)*, 147(4). <https://doi.org/10.1242/dev.181552>
- Rooney, N., Wang, P., Brennan, K., Gilmore, A. P., & Streuli, C. H. (2016). The Integrin-Mediated ILK-Parvin-αPix Signaling Axis Controls Differentiation in Mammary Epithelial Cells. *Journal of Cellular Physiology*, 231(11), 2408-2417. <https://doi.org/10.1002/jcp.25390>
- Rosen, J. M., Wyszomierski, S. L., & Hadsell, D. (1999). REGULATION OF MILK PROTEIN GENE EXPRESSION. *Annual Review of Nutrition*, 19, 407-443. <https://doi.org/doi.org/10.1146/annurev.nutr.19.1.407>
- Ruan, W., & Kleinberg, D. L. (1999). Insulin-like growth factor I is essential for terminal end bud formation and ductal morphogenesis during mammary development. *Endocrinology*, 140(11), 5075-5081. <https://doi.org/10.1210/endo.140.11.7095>
- Ruan, W., Monaco, M. E., & Kleinberg, D. L. (2005). Progesterone stimulates mammary gland ductal morphogenesis by synergizing with and enhancing insulin-like growth factor-I action. *Endocrinology*, 146(3), 1170-1178. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1360>
- Rudolph, M. C., McManaman, J. L., Hunter, L., Phang, T., & Neville, M. C. (2003). Functional development of the mammary gland: Use of expression profiling and trajectory clustering to reveal changes in gene expression during pregnancy, lactation, and involution. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 8(3), 287-307. <https://doi.org/10.1023/B:JOMG.0000010030.73983.57>
- Rudolph, M. C., Russell, T. D., Webb, P., Neville, M. C., & Anderson, S. M. (2011). Prolactin-mediated regulation of lipid biosynthesis genes *in vivo* in the lactating mammary epithelial cell. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 300, 1059-1068. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00083.2011.-Prolactin>
- Ruifrok, A. C., & Johnston, D. A. (2001). Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Analytical and quantitative cytology and histology*, 23(4), 291-299. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11531144/>

- Sadovnikova, A., Garcia, S. C., & Hovey, R. C. (2021). A Comparative Review of the Cell Biology, Biochemistry, and Genetics of Lactose Synthesis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 26(2), 181-196. <https://doi.org/10.1007/s10911-021-09490-7>
- Sankaran, L., & Topper, Y. J. (1988). Progesterone and prolactin are both required for suppression of the induction of rat  $\alpha$ -lactalbumin activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 155(2), 1038-5. [https://doi.org/doi.org/10.1016/S0006-291X\(88\)80601-6](https://doi.org/doi.org/10.1016/S0006-291X(88)80601-6)
- Santamaria, C. G., Meyer, N., Schumacher, A., Zenclussen, M. L., Teglia, C. M., Culzoni, M. J., Zenclussen, A. C., & Rodriguez, H. A. (2020). Dermal exposure to the UV filter benzophenone-3 during early pregnancy affects fetal growth and sex ratio of the progeny in mice. *Archives of Toxicology*, 94(8), 2847-2859. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02776-5>
- Schlecht, C., Klammer, H., Jarry, H., & Wuttke, W. (2004). Effects of estradiol, benzophenone-2 and benzophenone-3 on the expression pattern of the estrogen receptors (ER) alpha and beta, the estrogen receptor-related receptor 1 (ERR1) and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in adult ovariectomized rats. *Toxicology*, 205(1-2 SPEC. ISS.), 123-130. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.06.044>
- Schlumpf, M., Cotton, B., Conscience, M., Haller, V., Steinmann, B., & Lichtensteiger, W. (2001). *In vitro* and *in vivo* estrogenicity of UV screens. *Environmental Health Perspectives*, 109(3), 239-244. <https://doi.org/10.1289/ehp.01109239>
- Schlumpf, M., Kypke, K., Wittassek, M., Angerer, J., Mascher, H., Mascher, D., Vökt, C., Birchler, M., & Lichtensteiger, W. (2010). Exposure patterns of UV filters, fragrances, parabens, phthalates, organochlor pesticides, PBDEs, and PCBs in human milk: Correlation of UV filters with use of cosmetics. *Chemosphere*, 81(10), 1171-1183. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.09.079>
- Schreurs, R., Lanser, P., Seinen, W., & Van der Burg, B. (2002). Estrogenic activity of UV filters determined by an *in vitro* reporter gene assay and an *in vivo* transgenic zebrafish assay. *Archives of Toxicology*, 76(5-6), 257-261. <https://doi.org/10.1007/s00204-002-0348-4>
- Schreurs, R., Sonneveld, E., Jansen, J. H. J., Seinen, W., & van der Burg, B. (2005). Interaction of polycyclic musks and UV filters with the estrogen receptor (ER), androgen receptor (AR), and progesterone receptor (PR) in reporter gene bioassays. *Toxicological Sciences*, 83(2), 264-272. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfi035>
- Schultz, J. R., Petz, L. N., & Nardulli, A. M. (2003). Estrogen receptor  $\alpha$  and Sp1 regulate progesterone receptor gene expression. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 201(1-2), 165-175. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(02\)00415-X](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(02)00415-X)
- Schwertfeger, K. L., McManaman, J. L., Palmer, C. A., Neville, M. C., & Anderson, S. M. (2003). Expression of constitutively activated Akt in the mammary gland leads to excess lipid synthesis during pregnancy and lactation. *Journal of Lipid Research*, 44(6), 1100-1112. <https://doi.org/10.1194/jlr.M300045-JLR200>
- Seagroves, T., Lydon, J., Hovey, R., Vonderhaar, B., & Rosen, J. (2000). C/EBP $\beta$  (CCAAT/Enhancer Binding Protein) Controls Cell Fate Determination during Mammary Gland Development. *Molecular Endocrinology*, 14(3), 359-368. <https://doi.org/10.1210/mend.14.3.0434>.
- Shao, C., Lou, P., Liu, R., Bi, X., Li, G., Yang, X., Sheng, X., Xu, J., Lv, C., & Yu, Z. (2021). Hormone-Responsive BMP Signaling Expands Myoepithelial Cell Lineages

- and Prevents Alveolar Precocity in Mammary Gland. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 691050. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.691050>
- Shi, H. Y., Lydon, J. P., & Zhang, M. (2004). Hormonal defect in maspin heterozygous mice reveals a role of progesterone in pubertal ductal development. *Molecular Endocrinology*, 18(9), 2196-2207. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0052>
- Shin, H. Y., Hennighausen, L., & Yoo, K. H. (2019). STAT5-Driven Enhancers Tightly Control Temporal Expression of Mammary-Specific Genes. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 24(1), 61-71. <https://doi.org/10.1007/s10911-018-9418-y>
- Shyamala, G., Chou, Y. C., Louie, S. G., Guzman, R. C., Smith, G. H., & Nandi, S. (2002). Cellular expression of estrogen and progesterone receptors in mammary glands: Regulation by hormones, development and aging. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 80(2), 137-148. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(01\)00182-0](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(01)00182-0)
- Shyamala, G., Schneider, W., & Schott, D. (1990). Developmental Regulation of Murine Mammary Progesterone Receptor Gene Expression. *Endocrinology*, 126(6), 2882-2889. <https://doi.org/doi.org/10.1210/endo-126-6-2882>
- Simian, M., & Bissell, M. J. (2017). Organoids: A historical perspective of thinking in three dimensions. *Journal of Cell Biology*, 216(1), 31-40. <https://doi.org/10.1083/jcb.201610056>
- Simian, M., Hirai, Y., Navre, M., Werb, Z., Lochter, A., & Bissell, M. J. (2001). The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. *Development*, 128(16), 3117-3131. <https://doi.org/doi.org/10.1242/dev.128.16.3117>
- Song, S., He, Y., Huang, Y., Huang, X., Guo, Y., Zhu, H., Kannan, K., & Zhang, T. (2020). Occurrence and transfer of benzophenone-type ultraviolet filters from the pregnant women to fetuses. *Science of the Total Environment*, 726, 138503. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.138503>
- Soto, A. M., Briskin, C., Schaeberle, C., & Sonnenschein, C. (2013). Does cancer start in the womb? Altered mammary gland development and predisposition to breast cancer due to in utero exposure to endocrine disruptors. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 18(2), 199-208. <https://doi.org/10.1007/s10911-013-9293-5>
- Stackelberg, P. E., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Zaugg, S. D., Henderson, A. K., & Reissman, D. B. (2004). Persistence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant. *Science of the Total Environment*, 329(1-3), 99-113. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2004.03.015>
- Sternlicht, M. D., Kouros-Mehr, H., Lu, P., & Werb, Z. (2006a). Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis. *Differentiation*, 74(7), 365-381. <https://doi.org/10.1111/j.1432-0436.2006.00105.x>
- Sternlicht, M. D., Sunnarborg, S. W., Kouros-Mehr, H., Yu, Y., Lee, D. C., & Werb, Z. (2006b). Erratum: Mammary ductal morphogenesis requires paracrine activation of stromal EGFR via ADAM17-dependent shedding of epithelial amphiregulin (Development vol. 132 (3923-3933)). En *Development* (Vol. 133, Número 6, p. 1203). <https://doi.org/10.1242/dev.02314>

- Stevenson, A. J., Vanwalleghem, G., Stewart, T. A., Condon, N. D., Lloyd-Lewis, B., Marino, N., Putney, J. W., Scott, E. K., Ewing, A. D., & Davis, F. M. (2020). Multiscale imaging of basal cell dynamics in the functionally mature mammary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(43), 26822-26832. <https://doi.org/10.1073/pnas.2016905117/-/DCSupplemental>
- Stewart, T. A., & Davis, F. M. (2020). Got Milk? Identifying and Characterizing Lactation Defects in Genetically-Engineered Mouse Models. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 25, 255-272. <https://doi.org/10.1007/s10911-020-09467-y>
- Stewart, T. A., Hughes, K., Hume, D. A., & Davis, F. M. (2019). Developmental Stage-Specific Distribution of Macrophages in Mouse Mammary Gland. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 7, 1-12. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00250>
- Stoker, C., Beldoménico, P. M., Bosquiazzo, V. L., Zayas, M. A., Rey, F., Rodríguez, H., Muñoz-de-Toro, M., & Luque, E. H. (2008). Developmental exposure to endocrine disruptor chemicals alters follicular dynamics and steroid levels in *Caiman latirostris*. *General and Comparative Endocrinology*, 156(3), 603-612. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.02.011>
- Streuli, C. H., Bailey, N., & Bissell, M. J. (1991). Control of Mammary Epithelial Differentiation: Basement Membrane Induces Tissue-specific Gene Expression in the Absence of Cell-Cell Interaction and Morphological Polarity. *The Journal of Cell Biology*, 115(5), 1383-1395. <https://doi.org/doi.org/10.1083/jcb.115.5.1383>
- Sumbal, J., Belisova, D., & Koledova, Z. (2021). Fibroblasts: The grey eminence of mammary gland development. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 114, 134-142. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.10.012>
- Sumbal, J., Budkova, Z., Gunnhildur, & Traustadóttir, Á., & Koledova, Z. (2020a). Mammary Organoids and 3D Cell Cultures: Old Dogs with New Tricks. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 25, 273-288. <https://doi.org/doi.org/10.1007/s10911-020-09468-x>
- Sumbal, J., Chiche, A., Charifou, E., Koledova, Z., & Li, H. (2020b). Primary mammary organoid model of lactation and involution. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00068>
- Suzuki, T., Kitamura, S., Khota, R., Sugihara, K., Fujimoto, N., & Ohta, S. (2005). Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 203(1), 9-17. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2004.07.005>
- Tanios, T., Sfliomos, G., Echeverria, P. C., Ayyanan, A., Gutierrez, M., Delaloye, J., Raffoul, W., Fiche, M., Dougall, W., Schneider, P., Yalcin-ozuysal, O., & Brisken, C. (2013). Progesterone/RANKL Is a Major Regulatory Axis in the Human Breast. *Science Translational Medicine*, 5(182), 182ra55. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3005654>
- Tavalieri, Y., Alarcón, R., Tschopp, M., Luque, E., Muñoz-de-Toro, M., & Galoppo, G. (2024). Exposure to atrazine and endosulfan alters oviductal adenogenesis in the broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*). *Environmental Science and Pollution Research*, 31(24), 35927-35937. <https://doi.org/10.1007/s11356-024-33662-7>
- Teglund, S., Mckay, C., Schuetz, E., Van Deursen, J. M., Stravopodis, D., Wang, D., Brown, M., Bodner, S., Grosveld, G., & Ihle, J. N. (1998). Stat5a and Stat5b Proteins Have Essential and Nonessential, or Redundant, Roles in Cytokine Responses. *Cell*, 93(5), 841-850. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81444-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81444-0)

- Terry, M. B., Michels, K. B., Brody, J. G., Byrne, C., Chen, S., Jerry, D. J., Malecki, K. M. C., Martin, M. B., Miller, R. L., Neuhausen, S. L., & Silk, K. (2019). Environmental exposures during windows of susceptibility for breast cancer: a framework for prevention research. *Breast Cancer Research*, 21(96), 1-16. <https://doi.org/10.1186/s13058-019-1168-2>
- Terry, P. M., Banerjee, M. R., & Lui, R. M. (1977). Hormone inducible casein messenger RNA in a serum free organ culture of whole mammary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(6), 2441-2445. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.6.2441>
- Traurig, H. H. (1967). A Radioautographic Study of Cell Proliferation in the Mammary Gland of the Pregnant Mouse. *The Anatomical Record*, 159(2), 239-247. <https://doi.org/doi.org/10.1002/ar.1091590213>
- Unión Europea, Comisión Europea. Commission Regulation (UE) 2022/1176 Amending Regulation (EC) No 1223/2009 of the European Parliament and of the Council as Regards the Use of Certain UV Filters in Cosmetic Products, 2022. European Union, European Commission.
- Vandenberg, L. N. (2021). Endocrine disrupting chemicals: strategies to protect present and future generations. *Expert Review of Endocrinology and Metabolism*, 16(3), 135-146. <https://doi.org/10.1080/17446651.2021.1917991>
- Vandenberg, L. N., Chahoud, I., Heindel, J. J., Padmanabhan, V., Paumgartten, F. J. R., & Schoenfelder, G. (2010). Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environmental Health Perspectives*, 118(8), 1055-1070. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901716>
- Vandenberg, L. N., Colborn, T., Hayes, T. B., Heindel, J. J., Jacobs, D. R., Lee, D. H., Shioda, T., Soto, A. M., vom Saal, F. S., Welshons, W. V., Zoeller, R. T., & Myers, J. P. (2012). Hormones and endocrine-disrupting chemicals: Low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine Reviews*, 33(3), 378-455. <https://doi.org/10.1210/er.2011-1050>
- Varayoud, J., Ramos, J. G., Bosquiazzo, V. L., Muñoz-de-Toro, M., & Luque, E. H. (2004). Mast cells degranulation affects angiogenesis in the rat uterine cervix during pregnancy. *Reproduction*, 127(3), 379-387. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00018>
- Veltmaat, J. M., Mailleux, A. A., Thiery, J. P., & Bellusci, S. (2003). Mouse embryonic mammogenesis as a model for the molecular regulation of pattern formation. *Differentiation*, 71(1), 1-17. <https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2003.700601.x>
- Vorderstrasse, B. A., Fenton, S. E., Bohn, A. A., Cundiff, J. A., & Lawrence, B. P. (2004). A novel effect of dioxin: Exposure during pregnancy severely impairs mammary gland differentiation. *Toxicological Sciences*, 78(2), 248-257. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfh062>
- Wagner, M., Kienle, C., Vermeirissen, E. L. M., & Oehlmann, J. (2017). Endocrine disruption and *in vitro* ecotoxicology: Recent advances and approaches. En G. Reifferscheid & S. Buchinger (Eds.), *In vitro Environmental Toxicology - Concepts, Application and Assessment. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* (Vol. 157, p. 1). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. [https://doi.org/10.1007/10\\_2016\\_2](https://doi.org/10.1007/10_2016_2)
- Wahlig, J. L., Bales, E. S., Jackman, M. R., Johnson, G. C., McManaman, J. L., & MacLean, P. S. (2012). Impact of high-fat diet and obesity on energy balance and

- fuel utilization during the metabolic challenge of lactation. *Obesity*, 20(1), 65-75. <https://doi.org/10.1038/oby.2011.196>
- Wang, S., Counterman, L. J., & Haslam, S. Z. (1990). Progesterone Action in Normal Mouse Mammary Gland. *Endocrinology*, 127(5), 2183-2189. <https://doi.org/doi.org/10.1210/endo-127-5-2183>
- Watanabe, Y., Kojima, H., Takeuchi, S., Uramaru, N., Sanoh, S., Sugihara, K., Kitamura, S., & Ohta, S. (2015). Metabolism of UV-filter benzophenone-3 by rat and human liver microsomes and its effect on endocrine-disrupting activity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 282(2), 119-128. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.12.002>
- Watson, C. J. (2006). Key stages in mammary gland development Involution: Apoptosis and tissue remodelling that convert the mammary gland from milk factory to a quiescent organ. *Breast Cancer Research*, 8(2). <https://doi.org/10.1186/bcr1401>
- Watson, C. J., & Neoh, K. (2008). The Stat family of transcription factors have diverse roles in mammary gland development. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 19(4), 401-406. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2008.07.021>
- Weibel, E. R. (1969). Stereological Principles for Morphometry in Electron Microscopic Cytology. *International Review of Cytology*, 26, 235-302. [https://doi.org/doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61637-X](https://doi.org/doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61637-X)
- White, S. S., Calafat, A. M., Kuklenyik, Z., Villanueva, L. T., Zehr, R. D., Helfant, L., Strynar, M. J., Lindstrom, A. B., Thibodeaux, J. R., Wood, C., & Fenton, S. E. (2007). Gestational PFOA exposure of mice is associated with altered mammary gland development in dams and female offspring. *Toxicological Sciences*, 96(1), 133-144. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfl177>
- White, S. S., Stanko, J. P., Kato, K., Calafat, A. M., Hines, E. P., & Fenton, S. E. (2011). Gestational and chronic low-dose PFOA exposures and mammary gland Growth and differentiation in three generations of CD-1 mice. *Environmental Health Perspectives*, 119(8), 1070-1076. <https://doi.org/10.1289/ehp.1002741>
- Wiesen, J., Young, P., Werb, Z., & Cunha, G. R. (1999). Signaling through the stromal epidermal growth factor receptor is necessary for mammary ductal development. *Development*, 126(2), 335-344.
- Williams, J. M., & Daniel, C. W. (1983). Mammary ductal elongation: Differentiation of myoepithelium and basal lamina during branching morphogenesis. *Developmental Biology*, 97(2), 274-290. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(83\)90086-6](https://doi.org/10.1016/0012-1606(83)90086-6)
- Williams, K. E., Lemieux, G. A., Hassis, M. E., Olshen, A. B., Fisher, S. J., & Werb, Z. (2016). Quantitative proteomic analyses of mammary organoids reveals distinct signatures after exposure to environmental chemicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(10), E1343-E1351. <https://doi.org/10.1073/pnas.1600645113>
- Wilson, G. J., Fukuoka, A., Love, S. R., Kim, J., Pingue, M., Hayes, A. J., & Graham, G. J. (2020). Chemokine receptors coordinately regulate macrophage dynamics and mammary gland development. *Development (Cambridge)*, 147(12). <https://doi.org/10.1242/dev.187815>
- Winkler, J., Liu, P., Phong, K., Hinrichs, J. H., Ataii, N., Williams, K., Hadler-Olsen, E., Samson, S., Gartner, Z. J., Fisher, S., & Werb, Z. (2022). Bisphenol A replacement chemicals, BPF and BPS, induce protumorigenic changes in human mammary gland organoid morphology and proteome. *Proceedings of the National Academy*

- of *Sciences*, 119(11), e2115308119. <https://doi.org/doi.org/10.1073/pnas.2115308119>
- Wintermantel, T. M., Bock, D., Fleig, V., Greiner, E. F., & Schütz, G. (2005). The epithelial glucocorticoid receptor is required for the normal timing of cell proliferation during mammary lobuloalveolar development but is dispensable for milk production. *Molecular Endocrinology*, 19(2), 340-349. <https://doi.org/10.1210/me.2004-0068>
- Wnuk, W., Michalska, K., Krupa, A., & Pawlak, K. (2022). Benzophenone-3, a chemical UV-filter in cosmetics: is it really safe for children and pregnant women? *Postepy Dermatologii i Alergologii*, 39(1), 26-33. <https://doi.org/10.5114/ADA.2022.113617>
- Woodruff, T. J., Rayasam, S. D. G., Axelrad, D. A., Koman, P. D., Chartres, N., Bennett, D. H., Birnbaum, L. S., Brown, P., Carignan, C. C., Cooper, C., Cranor, C. F., Diamond, M. L., Franjevic, S., Gartner, E. C., Hattis, D., Hauser, R., Heiger-Bernays, W., Joglekar, R., Lam, J., ... Zeise, L. (2023). A science-based agenda for health-protective chemical assessments and decisions: overview and consensus statement. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 21(1), 132. <https://doi.org/10.1186/s12940-022-00930-3>
- Yamaji, D., Kang, K., Robinson, G. W., & Hennighausen, L. (2013). Sequential activation of genetic programs in mouse mammary epithelium during pregnancy depends on STAT5A/B concentration. *Nucleic Acids Research*, 41(3), 1622-1636. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1310>
- Yan, G., Dai, M., Zhang, C., Poulet, S., Moamer, A., Wang, N., Boudreault, J., Ali, S., & Lebrun, J. J. (2021). TGF $\beta$ /cyclin D1/Smad-mediated inhibition of BMP4 promotes breast cancer stem cell self-renewal activity. *Oncogenesis*, 10(21). <https://doi.org/10.1038/s41389-021-00310-5>
- Yao, Y. N., Wang, Y., Zhang, H., Gao, Y., Zhang, T., & Kannan, K. (2024). A review of sources, pathways, and toxic effects of human exposure to benzophenone ultraviolet light filters. *Eco-Environment and Health*, 3(1), 30-44. <https://doi.org/10.1016/j.eehl.2023.10.001>
- Zhan, T., Cui, S., Shou, H., Gao, L., Lu, S., Zhang, C., & Zhuang, S. (2021). Transcriptome aberration in mice uterus associated with steroid hormone response and inflammation induced by dioxybenzone and its metabolites. *Environmental Pollution*, 286, 117294. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117294>
- Zhang, X., Martinez, D., Koledova, Z., Qiao, G., Streuli, C. H., & Lu, P. (2014). FGF ligands of the postnatal mammary stroma regulate distinct aspects of epithelial morphogenesis. *Development (Cambridge)*, 141(17), 3352-3362. <https://doi.org/10.1242/dev.106732>
- Zhang, Y., Qin, Y., Ju, H., Liu, J., Chang, F., Junaid, M., Duan, D., Zhang, J., & Diao, X. (2023). Mechanistic toxicity and growth abnormalities mediated by subacute exposure to environmentally relevant levels of benzophenone-3 in clown anemonefish (*Amphiprion ocellaris*). *Science of the Total Environment*, 902, 166308. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.166308>
- Zhou, J., Chehab, R., Tkalcevic, J., Naylor, M. J., Harris, J., Wilson, T. J., Tsao, S., Tellis, I., Zavarsek, S., Xu, D., Lapinskas, E. J., Visvader, J., Lindeman, G. J., Thomas, R., Ormandy, C. J., Hertzog, P. J., Kola, I., & Pritchard, M. A. (2005). Elf5 is essential for early embryogenesis and mammary gland development during pregnancy and lactation. *EMBO Journal*, 24, 635-644. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600538>