

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL**

**Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas**



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

**EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN PERINATAL A  
ESTRÓGENOS AMBIENTALES SOBRE LA  
DIFERENCIACIÓN DE LA GLÁNDULA MAMARIA  
DURANTE LA GESTACIÓN Y LA LACTANCIA**

**Licenciada Gabriela A. Altamirano**

**Director de Tesis: Dra. Laura Kass**

**Co-director de Tesis: Dra. Mónica Muñoz de Toro**

**Instituto de Salud y Ambiente del Litoral**



**I S A L**

**2016**

***Elogio del vivir***

*Ama tu oficio,  
tu vocación,  
tu estrella,  
aquello para lo que sirves,  
aquello en que realmente,  
eres uno entre los hombres,  
esfuérzate en tu quehacer  
como si de cada detalle que piensas,  
de cada palabra que dices,  
de cada pieza que colocas,  
de cada martillazo que das,  
dependiese la salvación de la humanidad.  
Porque depende, créeme.*

*Joan Maragall*

*A mis padres, **Rosa y Pablo**, por su amor incondicional, por guiarme y brindarme su apoyo siempre.*

*A mi hermana, **Sofía**, por ser la mejor compañera de vida y estar presente en todo momento.*

*A mis abuelos, **Alcira, Felix y Pablo**, y mi tío, **Pedro**, presentes en mis recuerdos y en mi corazón.*

*A mi amor y mejor amigo, **Ale**, por elegirme para crecer junto a él en esta, nuestra vida.*

## ***AGRADECIMIENTOS***

---

A la **Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral**, por ofrecerme la posibilidad de realizar tanto la carrera de grado como la de posgrado, y hacer posible la realización de este trabajo.

Al **CONICET**, por haberme otorgado la beca interna de posgrado que permitió la realización de ésta tesis doctoral.

A mí querida directora la **Dra. Laura Kass**, quien confió en mí desde el principio, por brindarme las enseñanzas necesarias para poder concretar este trabajo de investigación, y estar siempre dispuesta frente a mis inquietudes y necesidades. Y en lo personal, por su paciencia, su cariño, su apoyo y sus consejos en momentos donde más lo necesité.

A mí co-directora la **Dra. Mónica Muñoz-de-Toro**, quién me brindó su apoyo y confianza, permitiéndome crecer tanto en lo personal como profesionalmente.

A los directores del ISAL, el **Dr. Enrique H. Luque** y la **Dra. Mónica Muñoz-de-Toro**, por permitirme formar parte de este grupo de trabajo y apoyarme durante el desarrollo de mi trabajo de investigación a lo largo de todos estos años.

A todos mis **compañeros y amigos del ISAL y de Patología Humana**, quienes estuvieron presentes y me brindaron su apoyo durante esta etapa: Aye, Meli, Flor R., Lu, Chula, Nani, Clari, Flor A., Guille, Pao, Beti, Rami, Turco, Vero, Merce, Pau, Gise, Vir L, Vir, Silvi, Mile, Jor, Ger, Guille R., Cori, Horacio, Juanca, Walter, Guillito, Nadin, Gonza, Ceci y Mario, por su amistad y por cada momento compartido.

Al programa **Bec.Ar**, por apoyar mi trabajo y crecimiento científico, brindándome los medios para realizar una capacitación en España. A mi director de la UB el **Dr. Jordi Alcaraz**, que me aceptó en su laboratorio y me brindó sus conocimientos para futuros proyectos. A Marta, Saioa y Gemma que me ofrecieron su amistad y cariño durante esos meses.

A mis amigas y hermanas de la vida **Ivi, Ludmi, Fari, Viqui, Katy y Euge** por su apoyo incondicional, por sus consejos y por incentivarme a cumplir todas las metas que me propongo en la vida.

A mi gran familia (tíos y primos) por estar siempre presentes, en los buenos y los malos momentos, y por alentarme para continuar y avanzar en cada etapa de mi carrera. A mi abuela, Dora, por su cariño a pesar de la distancia. A Pao, Javi y Charo por abrirme las puertas de su casa en España. A Estela, Juan Pablo, Juan y Leandro por todo el afecto y apoyo que me brindan. Me llena de felicidad poder compartir este trabajo con ustedes.

A mis padres, **Rosa y Pablo**, y hermana, **Sofía**, mis pilares de la vida, por su amor incondicional, por guiarme a ser cada día una mejor persona y motivarme para alcanzar todos mis anhelos. Muchos de los logros se los debo a ustedes, incluyendo este gran logro.

A mi amor, **Ale**, por ser la mejor compañía a lo largo de estos años y apoyar todas mis decisiones. Por aceptarme tal cual soy, aguantando mis locuras y compartiendo mis alegrías, por el amor infinito que me brindás y por elegirme cada día.

A todas aquellas personas que formaron parte de esta etapa e hicieron posible la realización de esta Tesis doctoral.

## ***LISTADO DE PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS***

---

Los resultados obtenidos durante la realización de esta Tesis han sido publicados y presentados en congresos.

### **Publicaciones**

- Perinatal exposure to xenoestrogens impairs mammary gland differentiation and modifies milk composition in Wistar rats. Laura Kass; ***Gabriela A. Altamirano***, Verónica L. Bosquiazzo, Enrique H. Luque, Mónica Muñoz-de-Toro; *Reproductive Toxicology*; 33:390-400; 2012.
- Milk lipid composition is modified by perinatal exposure to bisphenol A. ***Gabriela A. Altamirano***; Mónica Muñoz-de-Toro; Enrique H. Luque; Ayelén, Gomez; Melisa, Delconte; Laura Kass. *Molecular and Cellular Endocrinology* 411: 258–267; 2015.
- Perinatal exposure to bisphenol A modifies the transcriptional regulation of the  $\beta$ -Casein gene during secretory activation of the rat mammary gland. ***Gabriela A. Altamirano***, Jorge. G. Ramos, Ayelén L. Gómez, Enrique H. Luque, Mónica Muñoz-de-Toro, Laura Kass. *Molecular and Cellular Endocrinology* 439: 407-418; 2017. Disponible online desde Septiembre 2016.

### **Presentaciones a Congresos**

- Efectos de la exposición perinatal a bajas dosis de Bisfenol A y Dietilstilbestrol sobre el desarrollo funcional de glándula mamaria. ***Gabriela A. Altamirano***; Laura Kass. XII Encuentro de Jóvenes Investigadores de la UNL y IV Encuentro de Jóvenes Investigadores de Universidades de Santa Fe, 2009.
- Exposición a Dietilstilbestrol y el desarrollo funcional de la glándula mamaria. ***Gabriela A. Altamirano***, Gisela E. Manfroni Ghibaudó, Enrique H. Luque, Mónica Muñoz-de-Toro, Laura Kass. LV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mar del Plata. *Medicina (Bs As)* 70 (Suppl II):74, 2010.

- Efectos de la exposición perinatal a bajas dosis de Bisfenol A sobre el desarrollo funcional de la glándula mamaria. Laura Kass; **Gabriela A. Altamirano**; Verónica Bosquiazzo; Enrique H. Luque; Mónica Muñoz-de-Toro. LV Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mar del Plata. Medicina (Bs As) 70 (Suppl II):181, 2010.
- La exposición perinatal a bajas dosis de xenoestrógenos modifica la diferenciación de la glándula mamaria. **Gabriela A. Altamirano**; Laura Kass. XIX Jornadas de jóvenes investigadores de la Asociación de Universidades Grupo Montevideo. Paraguay, 2011.
- La exposición perinatal a estrógenos ambientales modifica la expresión de genes que regulan la composición proteica de los glóbulos grasos durante la lactogénesis en la glándula mamaria. **Gabriela A. Altamirano**; Enrique H. Luque; Mónica Muñoz-de-Toro; Laura Kass. LVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mar del Plata. Medicina (Bs As) 71 (Suppl III):181, 2011.
- La exposición perinatal a bajas dosis de Bisfenol A modifica la síntesis y/o secreción de los glóbulos grasos en la glándula mamaria de ratas Wistar durante la gestación. **Gabriela A. Altamirano**; Enrique H. Luque; Mónica Muñoz-de-Toro; Laura Kass. IV Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental SETAC Argentina – Buenos Aires, octubre 2012
- La exposición perinatal a bajas dosis de Bisfenol A altera la síntesis y/o formación de los glóbulos grasos durante la lactancia en ratas Wistar. **Gabriela A. Altamirano**; Ayelen L. Gomez, Melisa B. Delconte, Enrique H. Luque; Mónica Muñoz-de-Toro; Laura Kass. LVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mar del Plata. Medicina (Bs As) 73 (Suppl III):159, 2013.
- Bisphenol A modifies milk lipid concentration and fatty acid profile in perinatally exposed lactating rats. **Gabriela A. Altamirano**; Carlos A. Marra; Ayelen L. Gomez; Melisa B. Delconte; Enrique H. Luque; Mónica Muñoz-de-

Toro; Laura Kass. 1° Congreso Latino-americano de Toxicología Clínica-laboratorial, Porto Alegre, Brasil, 2014.

- Milk lipid composition is modified by perinatal exposure to Bisphenol A. **Gabriela A. Altamirano**; Ayelen L. Gomez; Melisa B. Delconte; Enrique H. Luque; Mónica Muñoz-de-Toro; Laura Kass. XVI Jornadas Anuales de la Sociedad Argentina de Biología. Chascomús, Buenos Aires. Año 2014.
- Milk composition and bisphenol A exposure. **Gabriela A. Altamirano**; Enrique H. Luque; Mónica Muñoz-de-Toro; Laura Kass. SETAC Latin America 11th Biennial Meeting. Buenos Aires. Año 2015.
- La regulación epigenética del gen  $\beta$ -caseína durante la activación secretoria en la glándula mamaria es modificada por la exposición perinatal a Bisfenol A. **Gabriela A. Altamirano**; Ayelen L. Gomez; Melisa B. Delconte; Enrique H. Luque; Mónica Muñoz-de-Toro; Laura Kass. LVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica, Mar del Plata. Medicina (Bs As) 75 (Suppl II):148, 2015.

## ÍNDICE GENERAL

---

Abreviaturas y símbolos.....	i
Índice de tablas .....	v
Índice de figuras .....	vi
Resumen .....	ix
Abstract .....	xiv
<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1   Morfología e histología de la glándula mamaria de la rata. ....</b>	<b>1</b>
1.1   Generalidades.....	1
1.2   Estructura histológica de la glándula mamaria. ....	3
1.3   Desarrollo de la glándula mamaria .....	6
<b>2   Diferenciación funcional de la glándula mamaria y su regulación. ....</b>	<b>8</b>
2.1   Fase proliferativa.....	9
2.2   Diferenciación secretoria .....	9
2.2.1   Regulación hormonal de la diferenciación secretoria .....	10
2.3   Activación secretoria.....	13
2.4   Lactancia .....	14
<b>3   Biosíntesis y secreción de los componentes de la leche.....</b>	<b>15</b>
3.1   Síntesis y secreción de las proteínas de la leche. ....	17
3.2   Síntesis y secreción de la lactosa y oligosacáridos de la leche. ....	18
3.3   Síntesis y secreción de los lípidos de la leche.....	19
<b>4   Perturbadores endócrinos.....</b>	<b>23</b>
4.1   Dietilstilbestrol.....	25
4.2   Bisfenol A.....	27

## **CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS**

### **1 | Objetivo general..... 35**

1.1 | Objetivos específicos. .... 35

## **CAPÍTULO 3 - MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1 | Animales ..... 37**

1.1 | Procedimiento experimental ..... 37

1.1.1 | Preparación de soluciones ..... 37

1.1.2 | Diseño experimental..... 38

### **2 | Obtención de muestras..... 41**

2.1 | Muestras de sangre..... 41

2.2 | Muestras de leche..... 41

2.3 | Mastectomía ..... 42

### **3 | Procesamiento de muestras..... 43**

3.1 | Estudios por microscopía óptica ..... 43

3.2 | Estudios por western-blot..... 44

3.2.1 | Extracción de proteínas. .... 44

3.3 | Estudios por RT-PCR..... 44

3.3.3.1 | Extracción de ARN total ..... 45

### **4 | Evaluación de la histología de la glándula mamaria. .... 45**

### **5. | Evaluación de la expresión de proteínas en la glándula mamaria. .... 46**

5.1 | Técnicas de IHQ..... 46

5.1.1 | Inmunoperoxidasa ..... 46

5.1.2 | Inmunofluorescencia. .... 47

5.3. | Western-blot..... 47

### **6 | Análisis de la expresión de ARNm mediante RT-PCR en tiempo real..... 48**

6.1 | Transcripción reversa (RT) ..... 48

6.2   Reacción de la cadena de polimerasa (PCR) en tiempo real.....	49
6.3   Electroforesis en gel de agarosa.....	51
<b>CAPÍTULO 4 - LA EXPOSICIÓN PERINATAL A XENOESTRÓGENOS MODIFICA LA DIFERENCIACIÓN FUNCIONAL DE LA GLÁNDULA MAMARIA, Y LA COMPOSICIÓN PROTEICA DE LA LECHE EN RATAS WISTAR.</b>	
<b>1   Introducción .....</b>	<b>51</b>
<b>2   Objetivos específicos.....</b>	<b>52</b>
<b>3   Materiales y métodos.....</b>	<b>53</b>
3.1   Diseño Experimental.....	53
3.2   Producción láctea .....	54
3.3   Determinación de hormonas circulantes por RIA.....	54
3.4   Análisis histológico.....	57
3.5   Inmunohistoquímica.....	57
3.5.1   Inmunoperoxidasa. ....	57
3.5.2   Inmunofluorescencia. ....	58
3.6   Western-blot.....	59
3.7   Análisis mediante RT- PCR en tiempo real cuantitativo. ....	60
3.8   Análisis estadísticos. ....	61
<b>4   Resultados.....</b>	<b>62</b>
4.1   La exposición perinatal a BPA o DES modificó la producción láctea y el contenido de proteínas de la leche durante la lactancia. ....	63
4.2   La exposición a BPA o DES altera el desarrollo funcional de la glándula mamaria durante la gestación.....	65
4.2.1   Efecto de la exposición perinatal a xenoestrógenos sobre la morfología mamaria en el último tercio de la gestación.....	66

4.2.2   La exposición perinatal a BPA o DES modifica la síntesis de las proteínas de la leche durante la gestación.....	68
4.3   Efectos del BPA o DES sobre el microambiente endocrino de la glándula mamaria y expresión de los receptores de hormonas esteroides.....	71
4.3.1   Análisis de los niveles séricos de E2, P4 y PRL en animales expuestos perinatalmente a BPA y DES durante la preñez. ....	71
4.3.2   Expresión de los receptores de las hormonas esteroides en la glándula mamaria de animales tratados perinatalmente con BPA y DES. ....	72
4.3.3   Estudio de las alteraciones producidas en la vía de señalización de la PRL en animales F1 expuestos a xenoestrógenos. ....	73
<b>5   Discusión.....</b>	<b>75</b>
 <b>CAPÍTULO 5 - LA EXPOSICIÓN PERINATAL A BISFENOL A MODIFICA LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LA LECHE.</b>	
<b>1   Introducción .....</b>	<b>79</b>
<b>2   Objetivos específicos.....</b>	<b>80</b>
<b>3   Materiales y métodos.....</b>	<b>81</b>
3.1   Diseño experimental .....	81
3.2   Performance lactacional.....	82
3.3   Análisis mediante RT- PCR en tiempo real cuantitativo. ....	83
3.4   Análisis histológico.....	84
3.5   Extracción de lípidos y evaluación del perfil de AGs de la leche.....	85
3.6   Análisis estadístico.....	86
<b>4   Resultados.....</b>	<b>86</b>
4.1   La exposición perinatal a BPA altera la formación de los lípidos de la leche y/o la secreción al final de la gestación y al inicio de la lactancia.....	87
4.1.1   La exposición a bajas dosis de BPA modifica la maduración alveolar mamaria al inicio de la lactancia. ....	87

4.1.2   Efectos de la exposición perinatal a BPA sobre la expresión de las proteínas asociadas a la membrana del glóbulo graso de la leche al final de la gestación y durante la lactancia.....	89
4.1.3   La secreción y/o acumulación de los glóbulos grasos de la leche fue alterada en los animales expuestos perinatalmente a BPA durante la lactancia. ....	90
4.2   Efectos de la exposición perinatal a BPA sobre la síntesis de los lípidos de la leche al final de la gestación y durante la lactancia. ....	91
4.3   El perfil de AGs de la leche fue alterado por la exposición perinatal a BPA. ....	92
4.4   La expresión de los ARNm de PPAR $\gamma$ y SREBP1 fue modificada por la exposición perinatal a BPA.....	95
4.5   La exposición perinatal expuestas a BPA modificó la ganancia de peso de las crías F2.....	96
<b>5   Discusión.....</b>	<b>97</b>

**CAPÍTULO 6 - LA EXPOSICIÓN PERINATAL A BISFENOL A MODIFICA LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN  $\beta$ -CASEÍNA DURANTE LA ACTIVACIÓN SECRETORIA DE LA GLÁNDULA MAMARIA.**

<b>1   Introducción .....</b>	<b>102</b>
<b>2   Objetivos específicos.....</b>	<b>104</b>
<b>3   Materiales y métodos.....</b>	<b>105</b>
3.1   Diseño experimental .....	105
3.2   Ensayos de IHQ e IF. ....	105
3.3   RT-PCR en tiempo real.....	106
3.4   Bioinformática .....	107
3.5   Análisis del estado de metilación del ADN .....	108
3.6   Ensayo de ChIP .....	108
3.7   Análisis estadístico.....	110

<b>4   Resultados.....</b>	<b>111</b>
4.1   La exposición perinatal a BPA altera la expresión de $\beta$ -Cas independientemente de la activación del RPRL. ....	111
4.2   La interacción célula epitelial-laminina fue modificada por la exposición perinatal a BPA al inicio de la lactancia. ....	113
4.3   La exposición perinatal a BPA altera la expresión de las enzimas modificadoras de histonas durante la activación secretoria de la glándula mamaria. ....	114
4.4   La exposición perinatal a BPA induce alteraciones en la metilación de ADN e induce modificaciones de la histona 3 en el promotor y enhancer del gen de $\beta$ -Cas. ....	115
4.5   La exposición perinatal a BPA induce cambios en el estado de metilación del ADN y la modificación de la histona 3 en el exón VII del gen de $\beta$ -Cas. ....	118
<b>5   Discusión.....</b>	<b>119</b>
<b>CAPÍTULO 7 – CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>126</b>
<b>Anexo .....</b>	<b>129</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>131</b>

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

---

<b>%</b>	Por ciento
<b>µg</b>	Microgramo
<b>µm</b>	Micrometro
<b>A</b>	Alveolo
<b>AB</b>	<i>Alveolar buds</i>
<b>ACCα</b>	Acetil CoA carboxilasa alfa
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNc</b>	Ácido desoxirribonucleico copia
<b>ADNg</b>	Ácido desoxirribonucleico genómico
<b>ADPH</b>	Adipofilina
<b>AG</b>	Ácido graso
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>BPA</b>	Bisfenol A
<b>BTN</b>	Butirofilina
<b>ChIP</b>	Inmuprecipitación de la cromatina
<b>CLD</b>	Gota lipídica citoplasmática
<b>col.</b>	colaboradores
<b>Cpm</b>	Cuentas por minuto
<b>Ct</b>	Ciclo umbral
<b>DAB</b>	Diaminobencidina
<b>DAG1</b>	Distroglicano
<b>DES</b>	Dietilestilbestrol
<b>DG</b>	Día de gestación
<b>DL</b>	Día de lactancia
<b>DPN</b>	Día postnatal
<b>dNTP</b>	Deoxinucleótido trifosfato
<b>E2</b>	17β-estradiol
<b>Eg</b>	Estrógeno
<b>EPA</b>	Agencia de Protección Ambiental

<b>Etc.</b>	Etcétera
<b>EZH2</b>	<i>Enhancer of zeste homolog 2</i>
<b>FAS</b>	Sintasa de ácidos grasos
<b>FAME</b>	Ácido graso metil ésters
<b>g</b>	Gramo
<b>GH</b>	Hormona de crecimiento
<b>H&amp;E</b>	Hematoxilina y eosina
<b>HDAC</b>	Histona deacetilada
<b>hs.</b>	Horas
<b>H3Ac</b>	Histona 3 acetilada
<b>H3K27me3</b>	Histona 3 trimetilada (Lys 27)
<b>IF</b>	Inmunofluorescencia
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>ITG</b>	Integrina
<b>IP</b>	Complejo inmunoprecipitado
<b>Kg</b>	Kilógramo
<b>L</b>	Lúmen
<b>LOAEL</b>	<i>Lowest observed adverse effect level</i>
<b>LPL</b>	Lipoproteína lipasa
<b>M</b>	Molar
<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>mg</b>	Miligramos
<b>min</b>	Minutos
<b>ml</b>	Mililitros
<b>MLG</b>	Glóbulo lipídico de la leche
<b>mm</b>	Milímetros
<b>N°</b>	Número
<b>ng</b>	Nanogramos
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>P4</b>	Progesterona
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Buffer fosfato salino

<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PE</b>	Perturbadores endocrinos
<b>pg</b>	Picogramos
<b>PL</b>	Lactógeno placentario
<b>PLIN</b>	Pirilipina
<b>pmol</b>	Picomoles
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Proliferador de peroxisoma gama
<b>PRL</b>	Prolactina
<b>pStat5a/b</b>	Stat5 a/b fosforilado
<b>REST</b>	<i>Relative Expression software tool</i>
<b>RE<math>\alpha</math></b>	Receptor de estrógenos alfa
<b>RE<math>\beta</math></b>	Receptor de estrógenos beta
<b>RG</b>	Receptor de glucocorticoides
<b>RIA</b>	Radio inmuno ensayo
<b>RP</b>	Receptor de progesterona
<b>Rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RPRL</b>	Receptor de prolactina
<b>RT</b>	Transcripción reversa
<b>SCD2</b>	Estearoil CoA desaturasa
<b>Seg</b>	Segundos
<b>SEM</b>	Error estándar medio
<b>SRBP</b>	Proteína de unión a elementos de respuesta a esterol
<b>Stat5</b>	Señal de transducción y activador de la transcripción 5
<b>TA</b>	Tejido adiposo
<b>TAE</b>	Tris-acetato-EDTA
<b>TC</b>	Tejido conectivo
<b>TCDD</b>	Dioxina
<b>TD</b>	Terminal ductus
<b>TEB</b>	Terminal end buds
<b>TG</b>	Triglicéridos
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante beta
<b>ORO</b>	<i>Oil Red O</i>

<b>V</b>	Voltaje
<b>WAP</b>	<i>Whey acidic protein</i>
<b>XOR</b>	Xantina oxido reductasa
<b><math>\alpha</math>-Lactalb</b>	Alfa lactoalbúmina
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	Alfa actina de músculo liso
<b><math>\beta</math>-Cas</b>	Beta caseína

## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 1.</b> Niveles de BPA reportados. ....	28
<b>Tabla 2.</b> Consumo de BPA y DES diario por madres F0 .....	39
<b>Tabla 3.</b> Protocolo general de ciclado de PCR en tiempo real .....	50
<b>Tabla 4.</b> Anticuerpos utilizados en los ensayos de IHQ. ....	58
<b>Tabla 5.</b> Anticuerpos utilizados para western-blot. ....	60
<b>Tabla 6.</b> Secuencia de oligonucleótidos utilizados. ....	61
<b>Tabla 7.</b> Parámetros generales evaluados en madres F0 y crías F1 expuestas a BPA o DES.....	62
<b>Tabla 8.</b> Parámetros relacionados con la fertilidad de animales F1 expuestos perinatalmente a bajas dosis de BPA o DES. ....	63
<b>Tabla 9.</b> Score de diferenciación mamaria en madres F1 preñadas.....	68
<b>Tabla 10.</b> Concentraciones séricas de varias hormonas en madres F1 preñadas.....	72
<b>Tabla 11.</b> Secuencia de oligonucleótidos utilizados .....	83
<b>Tabla 12.</b> Los efectos de la exposición perinatal a BPA sobre la concentración de lípidos en la leche de madres F1 a mitad de la lactancia. ....	93
<b>Tabla 13.</b> Perfil de ácidos grasos (AGs) de la leche de madres F1 expuestas a BPA a mitad de la lactancia. ....	94
<b>Tabla 14.</b> Secuencia de oligonucleótidos utilizados .....	107
<b>Tabla 15.</b> Secuencias de oligonucleótidos utilizados para los análisis del estado de metilación de ADN y ChIP.....	110
<b>Tabla S1.</b> Composición y perfil de AGs de la comida. ....	129
<b>Tabla S2.</b> Perfil de AGs de la leche complete de madres F1 expuestas a BPA a mitad de la lactación.....	130

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática de la ubicación anatómica de las cadenas mamarias.....	2
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática de las estructuras ductales en la glándula mamaria de rata. ....	3
<b>Figura 3.</b> Fotomicrografía de conducto y alvéolos de glándula mamaria. ....	4
<b>Figura 4.</b> Células mioepiteliales en un alvéolo mamario. ....	5
<b>Figura 5.</b> Fotomicrografía de glándula mamaria de una rata adulta virgen.....	5
<b>Figura 6.</b> Desarrollo de la glándula mamaria y su regulación.....	7
<b>Figura 7.</b> Imágenes representativas de glándulas mamarias durante la gestación y lactancia.....	8
<b>Figura 8.</b> Control hormonal del desarrollo de la glándula mamaria.....	10
<b>Figura 9.</b> Vía de señalización en la activación del gen de caseína por PRL. ....	13
<b>Figura 10.</b> Vías de secreción de los componentes de la leche.....	16
<b>Figura 11.</b> Biosíntesis de la lactosa de la leche. ....	18
<b>Figura 12.</b> Síntesis de AGs y secreción de los glóbulos grasos de la leche. ....	22
<b>Figura 13.</b> Esquema comparativo de las estructuras químicas del $17\beta$ -estradiol y de dos perturbadores endocrinos: el Dietilestilbestrol y el Bisfenol A.....	24
<b>Figura 14.</b> Respuestas no monotónicas o bifásicas. ....	25
<b>Figura 15.</b> Efecto de la exposición neonatal a DES sobre la morfología e histología de la glándula mamaria de ratones hembra nulíparas de 12 semanas de edad. ....	26
<b>Figura 16.</b> Efectos de la exposición temprana a BPA sobre la histoarquitectura y funcionalidad de distintos tejidos. ....	30
<b>Figura 17.</b> Efectos de la exposición a bajas dosis de BPA sobre la glándula mamaria. ....	33
<b>Figura 18.</b> Esquemas del tratamiento experimental utilizado para estudiar los efectos de la exposición perinatal (gestación + lactancia) a xenoestrógenos. ....	40

<b>Figura 19.</b> Mastectomía. ....	42
<b>Figura 20.</b> Imágenes representativas de whole mount de glándulas mamarias de ratones hembra expuestas a TCDD durante la preñez. ....	51
<b>Figura 21.</b> Esquema del tratamiento experimental. ....	53
<b>Figura 22.</b> La producción láctea de madres F1 lactantes. ....	64
<b>Figura 23.</b> Contenido de $\alpha$ -Lactalb y $\beta$ -Cas en muestras de leche de madres F1 lactantes en DL14. ....	65
<b>Figura 24.</b> Imágenes representativas de la histología de la glándula mamaria en DG18 y DG21. ....	67
<b>Figura 25.</b> La expresión de $\alpha$ -Lactalb en la glándula mamaria de madres F1 al final de la gestación. ....	69
<b>Figura 26.</b> Expresión de $\beta$ -Cas en madres F1 al final de la gestación. ....	70
<b>Figura 27.</b> Expresión de los receptores de hormonas esteroides en la glándula mamaria en animales expuestos perinatalmente a BPA y DES. ....	73
<b>Figura 28.</b> Alteraciones transitorias en la vía de señalización de la PRL en la glándula mamaria de madres F1 expuestas a xenoestrógenos. ....	74
<b>Figura 29.</b> Esquema del tratamiento experimental. ....	81
<b>Figura 30.</b> Análisis de imágenes para determinar área luminal alveolar y tamaño de los MLGs. ....	85
<b>Figura 31.</b> Maduración alveolar durante la lactancia. ....	88
<b>Figura 32.</b> Efectos de la exposición a BPA sobre la expresión de los ARNm de las proteínas de membrana de los MLGs. ....	89
<b>Figura 33.</b> Acumulación alterada de los MLGs en la glándula mamaria de madres F1 expuestas a BPA. ....	90
<b>Figura 34.</b> Efectos de la exposición perinatal a BPA sobre la expresión del ARNm de las enzimas implicadas en la síntesis de lípidos en la glándula mamaria. ....	92
<b>Figura 35.</b> Perfiles de AGs de la leche a mediados de la lactancia (DL10). ....	95

<b>Figura 36.</b> Regulación de la lipogénesis en las glándulas mamarias de madres F1 expuestas a BPA en DL10. ....	96
<b>Figura 37.</b> Ganancia de peso de las crías F2 durante la lactancia. ....	97
<b>Figura 38.</b> Representación esquemática de la estructura de los exones alineados del gen $\beta$ -Cas de humano (HS_CSN2), bovino (BT_CSN2), ratón (MUS_csnb) y rata (RAT_csnb). ....	102
<b>Figura 39.</b> Esquema del tratamiento experimental utilizado para estudiar los efectos de la exposición perinatal (gestación + lactancia) a bajas dosis de BPA en la glándula mamaria de hembras F1 al inicio de la lactancia. ....	105
<b>Figura 40.</b> Expresión de $\beta$ -Cas al inicio de la lactancia ....	112
<b>Figura 41.</b> Vía de señalización de PRL y expresión del RG en la glándula mamaria de madres F1 expuestas a BPA. ....	113
<b>Figura 42.</b> Expresión de los receptores de laminina en la glándula mamaria de madres F1 expuestas a BPA. ....	114
<b>Figura 43.</b> La expresión de las enzimas modificadoras de histonas involucradas en la conformación de la cromatina de la glándula mamaria al inicio de la lactancia. ....	115
<b>Figura 44.</b> Análisis del estado de metilación del ADN y de la modificación de histonas en las regiones regulatorias del gen de $\beta$ -Cas en DL2. ....	117
<b>Figura 45.</b> Análisis del estado de metilación del ADN y modificación de la histona en el exón VII del gen de $\beta$ -Cas. ....	119
<b>Figura 46.</b> Regulación de la expresión del gen $\beta$ -Cas en madres F1 expuestas a BPA. ....	120

**RESUMEN**

---

En la mayoría de las especies, la leche es la única fuente de alimentación del recién nacido, por lo tanto, debe contener todos los nutrientes esenciales para su normal crecimiento y desarrollo. En esencia, la leche está compuesta principalmente por proteínas, glóbulos grasos, lactosa, calcio y agua, y esta composición depende de un correcto desarrollo alveolar y diferenciación bioquímica y estructural de las células alveolares. Además, factores ambientales y la dieta materna pueden afectar la composición láctea. En las últimas décadas, como resultado de la acción antropogénica, se ha evidenciado la presencia masiva de compuestos químicos en el medio ambiente que presentan una inesperada acción de perturbación endócrina. El uso indiscriminado y descontrolado de estas sustancias ha sido asociado con el incremento de patologías reproductivas en humanos y animales silvestres, y desequilibrios poblacionales en diversos ecosistemas. Muchos de estos compuestos químicos imitan o antagonizan la acción de los estrógenos actuando como estrógenos ambientales. El Bisfenol A (BPA), monómero utilizado en la manufactura de plásticos, es un estrógeno ambiental que ha recibido especial atención debido a su amplia distribución. Estudios previos, en roedores, han demostrado que la exposición a BPA modifica la histoarquitectura de la glándula mamaria, induciendo una alteración en su tasa de maduración, una tardía formación del lumen alveolar, un incremento tanto en el crecimiento ductal como en la respuesta secundaria a los estrógenos y un aumento en la susceptibilidad a la carcinogénesis mamaria. Estos hallazgos sugieren que la exposición a BPA durante el desarrollo puede predisponer a padecer patologías mamarias. Otro estrógeno ambiental que fue ampliamente utilizado es el dietilstilbestrol (DES). El uso de DES como terapia preventiva en pacientes con riesgo de abortos espontáneos resultó en la exposición *in utero* de numerosos individuos a este potente estrógeno sintético. Las mujeres expuestas prenatalmente a DES presentaron una alta predisposición al desarrollo de diversas anomalías reproductivas, entre ellas, adenocarcinoma de células claras de vagina. En roedores, se ha demostrado que la exposición prenatal a DES induce la aparición de tumores mamarios y que el tratamiento neonatal con altas dosis de este compuesto resulta en conductos mamarios dilatados y lactogénesis precoz en animales vírgenes. En general, los estudios enfocados a analizar los efectos de la exposición a xenoestrógenos

durante periodos críticos de la organogénesis mamaria están orientados hacia el desarrollo tumoral y no hacia la diferenciación del órgano. Por lo tanto, el objetivo de la presente tesis doctoral fue analizar la influencia de la exposición perinatal a los estrógenos ambientales (BPA ó DES) sobre el desarrollo funcional de la glándula mamaria de la rata durante la gestación y la lactancia. Para ello, se utilizaron ratas hembras preñadas de la cepa Wistar (F0) que fueron expuestas a través del agua de bebida a 0, 0.6 y 52  $\mu\text{g}$  de BPA/kg/día o 5  $\mu\text{g}$  de DES/kg/día desde el día de gestación 9 (DG9) hasta el destete. Una vez destetadas, las crías hembras F1 se transfirieron a un ambiente libre de xenoestrógenos y a los 90 días de edad fueron apareadas con machos de fertilidad comprobada. Luego de la confirmación de la preñez por la presencia de espermatozoides en el extendido vaginal, los animales fueron distribuidos en diferentes experimentos para evaluar la influencia de la exposición perinatal a BPA ó DES sobre la síntesis, composición y producción de leche materna durante la gestación y lactancia, así como también los mecanismos moleculares involucrados en la regulación del gen de  $\beta$ -Caseína ( $\beta$ -Cas) al inicio de la lactancia.

Primeramente, se evaluó la performance reproductiva y el microambiente endócrino de la glándula mamaria durante el último tercio de la gestación (DG18 y DG21). Para ello, se analizó si la exposición perinatal a BPA ó DES modificaba el número de cuerpos lúteos, sitios de implantación o sitios de reabsorción, y se determinaron los niveles séricos de  $17\beta$ -estradiol, progesterona (P4), prolactina (PRL), así como también la histomorfología mamaria y expresión de los receptores de estrógeno  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) y RE $\beta$ , receptor de progesterona (RP) y receptor de prolactina (RPRL). Luego, se evaluó si la exposición a BPA ó DES alteraba la síntesis y secreción de las proteínas de la leche durante la gestación y lactancia, para lo cual se cuantificó la expresión de  $\alpha$ -Lactoalbúmina ( $\alpha$ -Lactalb) y  $\beta$ -Cas por Inmunofluorescencia (IF), western-blot o RT-PCR en tiempo real en muestras de glándula mamaria y leche según correspondiera. También en las madres F1 lactantes expuestas perinatalmente a BPA ó DES, se evaluó la cantidad de leche producida durante la primera mitad de la lactancia.

Seguidamente, se analizó si la exposición perinatal BPA modificaba, en las madres F1, la síntesis y secreción de los lípidos de la leche al final de la gestación (DG21) y la primera mitad de la lactancia [días de lactancia 2 y 10 (DL2 y DL10)]. Para evaluar la

composición del glóbulo graso (MLG), la expresión del ARNm de las proteínas asociadas a la membrana del MLG fue analizada mediante RT-PCR en tiempo real. Asimismo, las enzimas esenciales para la síntesis *de novo* de triglicéridos (TGs) fueron determinados por RT-PCR en tiempo real, así como también el marcador de tejido adiposo perilipina. La estructura de los MLGs fue evaluada en muestras procesadas para cortes con criostato en DL2 y DL10. Además, se evaluó la curva de ganancia de peso de las crías F2 lactantes. En muestras de leche extraída en DL10 se cuantificó el contenido lípidos totales, fosfolípidos y TGs por métodos químicos. Por otro lado, se analizó la composición de los TGs secretados a través de la medición de ácidos grasos (AGs) por cromatografía gaseosa.

En la última etapa de ésta tesis, nos propusimos evaluar si la exposición perinatal a BPA modificaba los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la síntesis de  $\beta$ -Cas durante la fase de activación secretoria (DL2). Para llevar a cabo este objetivo realizamos la cuantificación de la expresión de  $\beta$ -Cas por IF y RT-PCR en tiempo real. Además, se evaluó la expresión de la señal de transducción y activador de la transcripción 5 a/b fosforilado (pStat5a/b) mediante inmunohistoquímica y del RPRL y receptor de glucocorticoides (RG) por RT-PCR en tiempo real. Por otro lado, se cuantificó la expresión de los receptores de laminina (mediante RT-PCR en tiempo real). Asimismo, en base a los resultados obtenidos, se aplicaron distintas estrategias metodológicas para estudiar los potenciales mecanismos de acción del BPA sobre la regulación de la expresión de  $\beta$ -Cas tales como análisis de metilación del ADN y/o inmunoprecipitación de cromatina.

Nuestros resultados demostraron que el tratamiento perinatal con estrógenos ambientales indujo un retraso en la maduración alveolar mamaria durante la gestación y al inicio de la lactancia, restableciéndose a mitad de la misma. Estos cambios en la morfología del tejido mamario durante un periodo crítico del desarrollo del órgano podrían vincularse con los cambios en la síntesis y/o secreción de los distintos componentes de la leche demostrados en esta tesis. También logramos comprobar que la exposición perinatal a BPA ó DES alteró el patrón de producción de leche de hembras F1 durante la lactancia sin modificar el peso de las crías F2, indicando que la exposición a estrógenos ambientales modificaría la calidad de la leche, y que en consecuencia comprometería el normal crecimiento y desarrollo de las crías F2. Teniendo en cuenta

este resultado, analizamos la calidad de la leche producida por las hembras F1 lactantes y demostramos que la exposición perinatal a BPA alteró tanto la síntesis y/o secreción de las proteínas como de los lípidos de la leche al final de la gestación y durante lactancia.

La proteína de la leche más afectada por la exposición perinatal a BPA ó DES fue  $\beta$ -Cas, la exposición a estos estrógenos ambientales indujo una disminución en su expresión en glándula mamaria tanto al final de la gestación como durante la lactancia e inclusive en las muestras de leche extraída en DL14. La expresión de  $\alpha$ -Lactalb sólo disminuyó en DG18. También la vía de señalización JAK/Stat5 mediada por PRL, sólo fue afectada en DG18, mientras que permaneció activa durante la activación secretoria de la glándula mamaria. Además, se encontraron niveles séricos altos de P4 en los animales F1 BPA52 que podrían explicar la disminución en la expresión del RP y del RE $\alpha$  observada en estos animales; no habiendo diferencia en la expresión del RE $\beta$  entre los grupos experimentales durante la gestación.

La exposición perinatal a BPA también modificó el ensamblaje y/o secreción de los MLGs, así como su tamaño durante la activación secretoria de la glándula mamaria, y en DL10 modificó la concentración láctea de lípidos totales, TGs y fosfolípidos. La exposición perinatal a BPA52 indujo un aumento en la concentración de lípidos totales, TGs y fosfolípidos, mientras que BPA0.6 produjo una disminución. La exposición a BPA también alteró el perfil de AGs. En ambos grupos expuestos a BPA, el tamaño de los MLGs se correlacionó con el perfil de AGs. La exposición perinatal a BPA52 indujo un aumento en la expresión de PPAR $\gamma$  y SREBP1, lo cual podría explicar el aumento de la síntesis de AGs en este grupo en particular en DL10.

Los cambios en la calidad de la leche producida por las madres F1 expuestas a BPA52 se reflejaron en alteraciones en la ganancia de peso de sus crías F2 durante la lactancia. Estos resultados destacan la importancia a nivel nutricional de la cantidad y calidad de la leche, no solo para permitir el normal crecimiento y desarrollo de las crías lactantes sino también es de gran importancia para la industria lechera.

Diversos mecanismos moleculares involucrados en la regulación de la expresión de  $\beta$ -Cas al inicio de la lactancia, fueron alterados por la exposición perinatal a BPA. En madres F1 expuestas a BPA52, mientras que la vía de señalización de la PRL

permaneció activa, existió una disminución de la expresión del RG. Además, observamos una disminución de la expresión de las integrinas  $\beta 1$  y  $\alpha 6$ , así como también del distroglicano en ambos grupos de BPA. Asimismo, la exposición a BPA alteró la expresión de las enzimas modificadoras de histonas e indujo modificación de histonas y metilación del ADN en el promotor, enhancer y exón VII el gen de  $\beta$ -Cas.

En conjunto, nuestros resultados muestran que la exposición perinatal a bajas dosis de BPA no solo modifica la composición proteica, sino que también la síntesis y perfil de AGs de la leche, alterando su calidad y comprometiendo el normal crecimiento de las crías lactantes. Además, debemos destacar que la menor expresión de  $\beta$ -Cas, durante la activación secretoria de la glándula mamaria, causada por la exposición perinatal a BPA se produce a través de diferentes mecanismos moleculares que actúan sinérgicamente. Siendo las modificaciones epigenéticas un potencial mecanismo de acción del BPA en este modelo experimental.

En conclusión, los resultados de esta Tesis aportan fundamentos a la preocupación mundial por la creciente exposición a estrógenos ambientales, enfatizan la elevada sensibilidad de las crías a cualquier perturbación endocrina durante el período embrionario y neonatal, y las consecuencias a largo plazo producidas por su acción sobre la diferenciación funcional de la glándula mamaria.

**ABSTRACT**

---

In most mammals, milk is the only food source for newborns and consequently must contain all the key nutrients for normal growth and development. In essence, milk is composed of milk proteins, fat globules, lactose, calcium and water. Its normal composition depends on the correct biochemical and structural differentiation of the alveolar cells. Environmental factors and the diet of the mother also affect milk composition. In recent decades, because of human action, it has been highlighted the massive presence of chemicals in the environment which present an unexpected action of endocrine disruption. The indiscriminate and uncontrolled use of these substances has been associated with increased reproductive disorders in humans and wild animals, inducing population imbalances in various ecosystems. Many of these chemicals mimic or antagonize the action of estrogen acting as environmental estrogens. Among endocrine disruptors, Bisphenol A (BPA), monomer used in the manufacture of plastics, has received special attention because its widely distributed. Previous studies have shown that exposure to BPA modifies the mammary gland histoarchitecture, inducing an alteration of its maturation rates, a delay of lumen formation, an increase of ductal growth and responsiveness to secondary estrogenic exposure and enhanced susceptibility to carcinogenesis in rodents. These findings suggest that developmental exposure to BPA may lead to predisposition to breast cancer later in life. Another environmental estrogen that was widely used is diethylstilbestrol (DES). In humans, the use of DES to prevent miscarriages resulted in transplacental *in utero* exposure of numerous individuals to this potent synthetic estrogen. Women who were prenatally exposed to DES were predisposed to a wide array of reproductive abnormalities, particularly an increased incidence of vaginal clear-cell adenocarcinoma. Also, it has been shown that prenatal exposure to DES is effective in producing mammary tumors in adult female ACI rats. In addition, the neonatal treatment with high doses of DES results in dilated mammary ducts and early lactogenesis in nulliparous animals. Most studies focusing on analyzing xenoestrogens exposure effects during critical periods of organogenesis are oriented to evaluate mammary tumor development and not to mammary gland differentiation. Therefore, the aim of the present thesis was to analyze the influence of perinatal exposure to environmental estrogens (BPA or DES) on the

functional differentiation of the rat mammary gland during pregnancy and lactation. Pregnant Wistar rats (F0) were exposed through drinking water at 0, 0.6 and 52  $\mu\text{g}$  of BPA/kg/day or 5  $\mu\text{g}$  of DES/kg/day from gestational day 9 (GD9) until weaning. At weaning, females F1 offspring were transferred to an environment free of xenoestrogens and at postnatal day 90 were bred to unexposed males of proven fertility. After pregnancy confirmation, one F1 female per litter from each treatment group were randomly distributed to evaluate the influence of perinatal exposure to BPA or DES on milk synthesis, composition and production, as well as the molecular mechanisms involved in  $\beta$ -Casein ( $\beta$ -Cas) gene regulation during early lactation.

During the last third of gestation (DG18 and DG21), reproductive performance parameters and endocrine microenvironment of the mammary gland were evaluated in F1 dams exposed to BPA or DES. First, we identified ovarian/uterine abnormalities (ie: corpora lutea, implantation sites) that may lead to functional modifications in the mammary gland. Then,  $17\beta$ -estradiol, progesterone (P4) and prolactin (PRL) serum levels were determined, as well as the expression of estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ), ER $\beta$ , progesterone receptor (PR) and prolactin receptor (PRLR) in the mammary gland. In addition, the mammary gland histology was evaluated during pregnancy and lactation, which includes among others the quantification of alveolar luminal area and analysis of mammary stroma, intracytoplasmic vacuoles and presence of secretion in the alveolar lumen. Also, to evaluate whether exposure to BPA or DES modifies the synthesis and secretion of milk proteins during pregnancy, the expression of milk proteins  $\alpha$ -Lactalbumin ( $\alpha$ -Lactalb) and  $\beta$ -Cas was quantified by immunofluorescence (IF), western-blot and RT-PCR in real time. On the other hand, milk production was analyzed throughout lactation by quantifying the amount of milk produced by the mother in a given unit of time. Moreover, in milk samples of different days of lactation, the content of  $\alpha$ -Lactalb and  $\beta$ -Cas was measured by western-blot, and total protein by chemical methods. In addition, synthesis and secretion of milk lipids were studied in F1 dams perinatally exposed to BPA during late gestation (GD21) and lactation [lactation days 2 and 10 (LD2 and LD10)]. To evaluate the composition of the milk lipid globule (MLG), the mRNA expression of proteins associated with MLG's membrane was analyzed by RT-PCR in real time. Also, essential enzymes involved in the synthesis *de novo* of triglycerides (TGs) were assessed by RT-PCR real time, as well as the marker

perilipin adipose tissue. The MLG's structure was evaluated on cryostat sections of mammary glands obtained in LD2 and LD10. Moreover, the weight gain curve of lactating F2 offspring was assessed during lactation. In milk samples, the total lipid content, phospholipids and TGs were determined by chemical methods. In addition, the composition of TGs secreted by measuring fatty acids (FAs) was quantified by gas chromatography. In the last stage of this thesis, we evaluated whether the perinatal exposure to BPA modified the molecular mechanisms involved in the regulation of  $\beta$ -Cas synthesis or secretion during the secretory activation of the gland (LD2). To accomplish this goal  $\beta$ -Cas expression was quantified by IF and RT-PCR in real time. Furthermore, expression of phosphorylated signal transduction transcription activator 5 a/b (pStat5a/b) was assessed by immunohistochemistry, and RPRL and glucocorticoids receptor (GR) by RT-PCR in real time. In addition, the expression of laminin receptors (by RT-PCR in real time) was measured. Based on the results obtained, various methodological strategies were also applied to study the potential mechanisms of BPA action on  $\beta$ -Cas expression regulation such as analysis of DNA methylation and/or chromatin immunoprecipitation.

Our results showed that perinatal exposure to environmental estrogens induced a delay in mammary alveolar maturation during gestation and early lactation that was reestablished at mid-lactation. These changes in the mammary morphology during a critical period of its development could be associated with changes in the synthesis and/or secretion of the different milk components observed in this thesis. Also, we demonstrated that perinatal exposure to BPA or DES alter the milk production pattern of F1 females during lactation, indicating that exposure to environmental estrogens could also be modifying milk quality, and consequently compromise the normal growth and development of the F2 offspring. Our data showed that the synthesis of both milk proteins and lipids were altered during late gestation and lactation. Perinatal exposure to BPA or DES induced a lower expression of milk proteins, mainly  $\beta$ -Cas, in F1 dams during late gestation (GD18 and GD21) and early lactation (LD2), and even in milk samples obtained on LD14, whereas  $\alpha$ -Lactalb only decreased its expression in the mammary gland on GD18. Interestingly, the PRL-mediated signaling pathway JAK/Stat5 was only affected on GD18, while remaining active during the secretory activation of the mammary gland. Furthermore, high P4 serum level was found in rats

perinatally exposed to BPA52 that also could explain the decreased expression of PR and ER $\alpha$  observed in these animals. On the other hand, similar ER $\beta$  expression was observed between experimental groups during pregnancy. In our work, perinatal exposure to BPA also modified the assembly and/or secretion of MLGs and its size during the secretory activation of the mammary gland. Besides, at mid-lactation (LD10), perinatal exposure to BPA altered the concentration of total lipids, phospholipids and TGs in milk. Furthermore, perinatal exposure to BPA52 induced an increase in the concentration of total lipids, phospholipids and TGs, whereas the dose one hundred times smaller to this, diminished it. Similarly, the FAs profile was altered by exposure to BPA, and the size of MLGs correlated with the profile of FAs in both BPA groups. Moreover, we demonstrated that perinatal exposure to BPA52 induced an increase in the expression of PPAR $\gamma$  and SREBP1, which could explain the increased synthesis of FAs in BPA52 F1 dams at mid-lactation. Milk quality changes induced by perinatal exposure to BPA52 were also reflected in alterations in the weight gain of F2 offspring during lactation, but not in the body weight of them registered on LD14. This finding underlines the importance of milk quantity and quality to allow normal growth and development of neonates. Furthermore, our results demonstrated that different molecular mechanisms involved in the regulation of  $\beta$ -Cas expression were altered by perinatal exposure to BPA during early lactation. Although PRL signaling pathway was active, a decrease in GR expression in BPA52 F1 dams was observed. Also, decrease in the expression of  $\alpha$ 6 and  $\beta$ 1 integrins, as well as dystroglycan was found in both BPA groups. Moreover, the exposure to BPA altered the expression of histone modifying enzymes and induced histone modifications and DNA methylation in the promoter, enhancer and exon VII of  $\beta$ -Cas gene.

Taken together, our results show that perinatal exposure to low doses of BPA not only modifies milk protein composition, but also the FA synthesis and milk FA profile, impairing milk quality and compromising the normal growth of the offspring. Furthermore, the BPA-induced decline of  $\beta$ -Cas expression during secretory activation of the mammary gland occurs through different molecular mechanisms that act synergistically. Among them, epigenetic modifications could be a potential mechanism of BPA action in this experimental model.

In conclusion, the results in this thesis support the global concern about the increasing exposure to environmental estrogens; and demonstrate the high sensitivity of the offspring during the *in utero* and lactational period to any endocrine disruption, and the lasting consequences caused by their action on the functional development of the mammary gland.

# *CAPÍTULO 1*

## *INTRODUCCIÓN*

---

*“El mejor científico está abierto a la experiencia, y esta empieza como un romance, es decir, la idea de que todo es posible”*

*Ray Bradbury*

La glándula mamaria es el órgano característico de la Clase de los Mamíferos y se desarrolla para producir los nutrientes esenciales para alimentar a las crías recién nacidas. Estos nutrientes forman parte de un fluido rico en proteínas y lípidos, denominado leche. Por ello, la función fisiológica de la glándula mamaria es sintetizar y secretar cantidades copiosas de leche que permitan el normal desarrollo de la cría (Medina, 1996).

## ***1 | Morfología e histología de la glándula mamaria de la rata.***

---

### ***1.1 | Generalidades.***

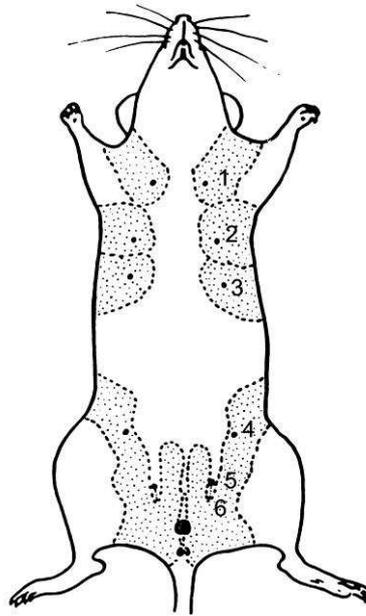
La porción epitelial o parénquima de la glándula mamaria tiene su origen embriológico en el ectodermo, mientras que el estroma circundante y el tejido adiposo, derivan del mesodermo (Imagawa y col., 1990). Al igual que otros órganos, el estroma posee vasos sanguíneos, nervios, nódulos y vasos linfáticos (Masso-Welch y col., 2000).

El número, tamaño y disposición de las glándulas mamarias varía entre especies; sin embargo, algunas características son compartidas, por ejemplo, son órganos pareados presentes tanto en hembras como en machos. En estos últimos suelen estar pobremente desarrolladas y carecer de pezones (Forsyth y col., 1999).

La glándula mamaria es una estructura subcutánea que, en la rata, se extiende desde la región cervical hasta la inguinal, en forma de seis pares ventrolaterales, cada una con su pezón. Como se observa en la Figura 1, los pares de glándula mamaria se denominan por número según su ubicación. Los pares N° 1, 2 y 3 conforman la cadena torácica y los pares N° 4, 5 y 6, la cadena abdomino-inguinal. Las glándulas torácicas, abdominales e inguinales varían en su grado de desarrollo, siendo las glándulas inguinales las más diferenciadas (Masso-Welch y col., 2000).

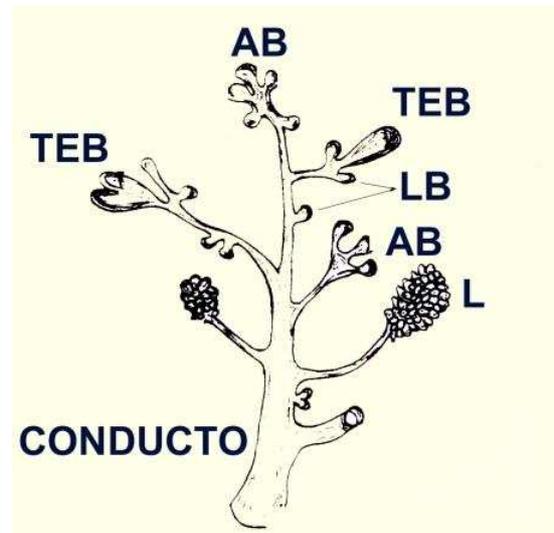
La glándula mamaria N° 4 es la que presenta menores dificultades para la disección y es la de elección para la mayoría de los estudios. Además, contiene una cadena de nódulos

linfáticos que permiten un reconocimiento rápido de la misma en el momento de la cirugía.



**Figura 1. Representación esquemática de la ubicación anatómica de las cadenas mamarias.** Modificado de Masso-Welch y col. 2000.

El epitelio de la glándula mamaria forma conductos que se ramifican a partir del pezón y que terminan en conductos más pequeños. Estos conductos (denominados conductillos) forman diversas estructuras terminales: *terminal end buds* (TEB), *blunt end buds* o *terminal ductus* (TD), *alveolar buds* (AB) y *alveolo* (A) (Russo y col., 1982) (Figura 2). Cuando la glándula mamaria está completamente diferenciada, la estructura secretora principal es el lóbulo (L), que está formado por grupos de alvéolos alrededor de un conducto menor (Imagawa y col., 1994). El parénquima epitelial está embebido en una delgada capa de tejido conectivo y todo está rodeado por tejido adiposo (*fat pad*).



**Figura 2. Representación esquemática de las estructuras ductales en la glándula mamaria de rata.** TEB (terminal end buds), AB (alveolar buds), LB (lateral buds) y L (lóbulos). Modificado de Russo y col. (1982).

En la glándula mamaria de la rata, todos los alvéolos, conductillos y conductos convergen en un solo conducto colector primario que se continúa con la superficie externa del pezón; esto último, es diferente de los 15-20 conductos que desembocan en el pezón de la mujer (Imagawa y col., 1994). El epitelio del pezón se continúa con el epitelio estratificado de la epidermis. La transición desde un epitelio estratificado (piel) a un epitelio de dos capas de células cuboidales ocurre en un único conducto lactífero en el interior del pezón. El conducto lactífero lleva la leche a través de orificio constrictivo desde el seno lactífero hacia el pezón. Durante el desarrollo, los conductos crecen por ramificación del conducto primario en múltiples conductos secundarios; con el tiempo, el número y longitud de estas ramificaciones se incrementa progresivamente formando los alvéolos (Masso-Welch y col., 2000).

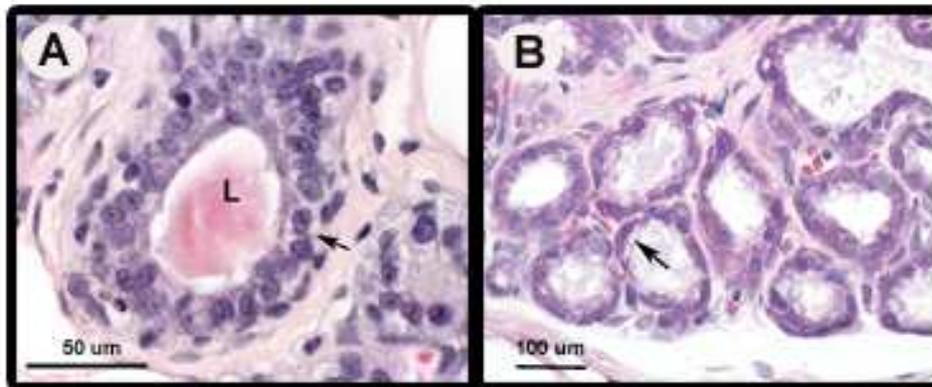
## 1.2 | Estructura histológica de la glándula mamaria.

Debido a que múltiples tipos celulares conforman la glándula mamaria, para simplificar su estudio, ésta puede dividirse en dos compartimientos:

El parénquima o epitelio glandular mamario está compuesto por estructuras epiteliales que difieren tanto morfológica como funcionalmente. Las paredes de los conductos

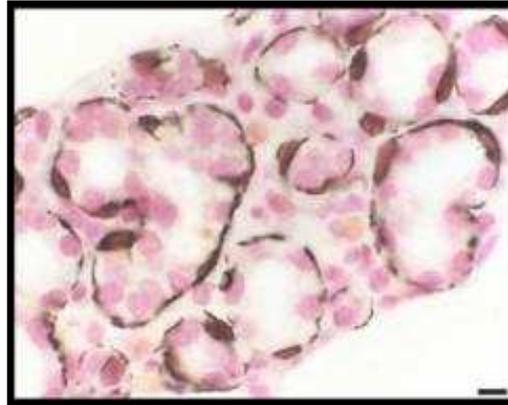
mamarios están compuestas por dos tipos celulares: una capa interna de células epiteliales que revisten el lumen, y otra capa externa y discontinua de células mioepiteliales sobre la membrana basal (Russo y Russo, 1996).

La forma de la célula epitelial varía desde cúbica o columnar en los conductos, a piramidal (antes de la secreción de leche) o achatada (luego de la secreción) en los alvéolos (Figura 3). Durante la gestación, el epitelio luminal alveolar alcanza la diferenciación completa y es el responsable de la síntesis y secreción de la leche durante la lactancia (Russo y col., 1999).



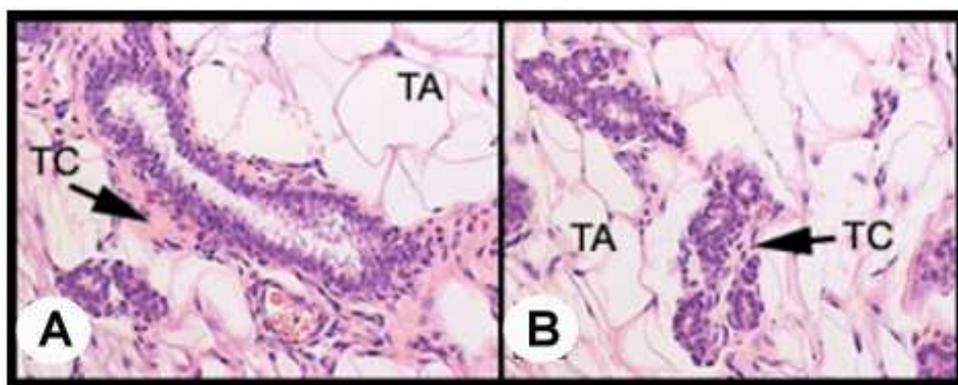
**Figura 3. Fotomicrografía de conducto y alvéolos de glándula mamaria.** En (A) se muestra un conducto con células epiteliales de tipo cúbica (flecha) y en (B), un alvéolo durante el período de lactancia, con células epiteliales adelgazadas (flecha). L: lumen.

El mioepitelio está compuesto por células basales epiteliales que rodean el epitelio luminal de conductos y alvéolos y lo separan del estroma de tejido conectivo. Las células mioepiteliales que rodean a los alvéolos durante la preñez y la lactancia forman una capa discontinua de células estrelladas cuyos brazos dendríticos encierran la base del epitelio alveolar y contraen los alvéolos durante la succión (Figura 4). Además, sintetizan y secretan los constituyentes de la membrana basal (laminina) (Masso-Welch y col., 2000).



**Figura 4. Células mioepiteliales en un alvéolo mamario.** Las células mioepiteliales se reconocen por la expresión de p63 y  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA). Se utilizó doble marcación inmunohistoquímica para p63 (núcleos marrones) y  $\alpha$ -SMA (proyecciones citoplasmáticas azul oscuro). Los núcleos negativos se muestran de color rosado (contracoloración con nuclear fast red). La barra representa 20  $\mu$ m. Modificada de Kass y col. (2004).

El mesénquima o estroma mamario está formado por tejido adiposo y tejido conectivo, en el cual se encuentran inmersos vasos sanguíneos, nervios, fibras de músculo liso, nódulos linfáticos y vasos linfáticos (Figura 5) (Masso-Welch y col., 2000). El estroma de tejido conectivo difiere en características de grosor, composición y densidad. Es intensamente eosinofílico, fibroso y denso alrededor de las estructuras cercanas al pezón; variando a más laxo y menos eosinofílico mientras más lejos se desarrolle la estructura epitelial del pezón (Masso-Welch y col., 2000).



**Figura 5. Fotomicrografía de glándula mamaria de una rata adulta virgen.** Es posible observar que tanto los conductos (A) como los alvéolos (B) se encuentran rodeados por tejido conectivo (TC, flechas) e inmersos en tejido adiposo (TA). Magnificación: 20X. Modificada de Kass y col. (2004).

En la periferia del estroma graso, una cápsula de tejido conectivo altamente vascularizado marca el límite de la glándula mamaria. Este límite de tejido conectivo sirve como “zona inhibitoria” del crecimiento de las células mamarias, que la invaden durante el desarrollo de la glándula mamaria pero no crecen más allá de ella (Forsyth y col., 1999; Knight y Peaker, 1982).

Los adipocitos o células adiposas están también presentes en el compartimiento estromal. Están rodeados por una membrana rica en laminina, y se consideran de origen mesenquimático debido a que derivan de células estromales de la glándula mamaria tipo fibroblastos (Ferguson y col., 1992). Inmersos en el tejido conectivo y entre los adipocitos, se observan abundantes fibroblastos. En la rata, los adipocitos o células grasas, están presentes en el estroma como adipocitos monolobulados (Figura 5) (Masso-Welch y col., 2000).

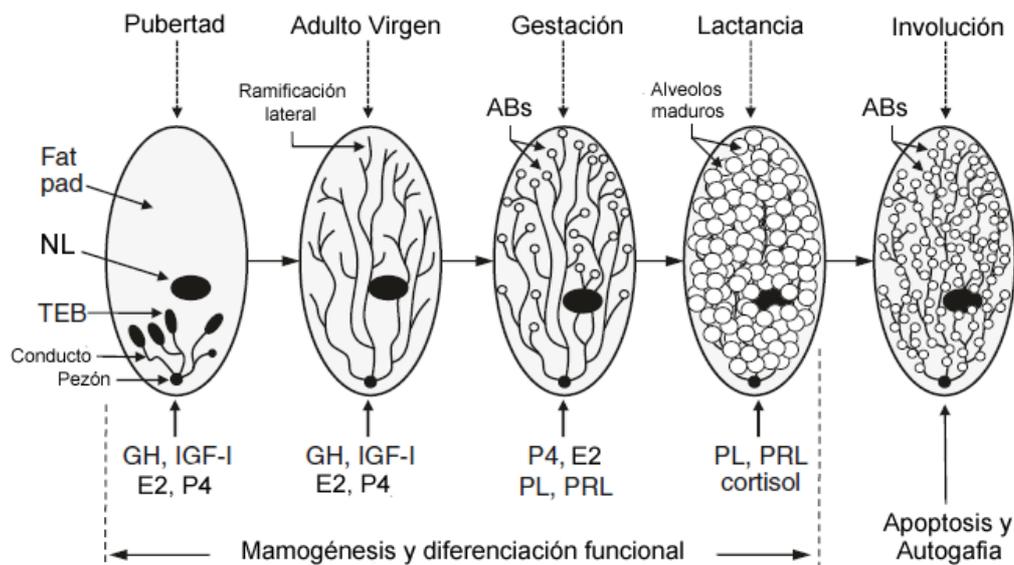
Los vasos sanguíneos están presentes en toda la glándula mamaria, y varían en tamaño, forma y abundancia. Los capilares, cambian dramáticamente durante el desarrollo formando un lecho capilar ampliamente extendido en el compartimiento intralobular durante la preñez y lactancia (Masso-Welch y col., 2000).

La cadena linfática junto con el nódulo linfático de la glándula mamaria abdominal de la rata (glándula número cuatro) pueden ser visualizados a simple vista. Los vasos linfáticos también están presentes en la glándula mamaria, y varían desde largos vasos a capilares linfáticos que son abundantes en el tejido conectivo que rodea los lóbulos mamarios (Masso-Welch y col., 2000).

### ***1.3 | Desarrollo de la glándula mamaria***

La glándula mamaria es uno de los pocos tejidos en los mamíferos que pueden sobrellevar repetidos ciclos de crecimiento, diferenciación funcional y regresión (Figura 6). El desarrollo de las estructuras de la glándula mamaria se conoce como mamogénesis (Rezaei y col., 2016); y se dividen en diferentes etapas: prenatal (embrionario y fetal), peripuberal, gestacional-lactacional e involución (Imagawa y col., 1994). El desarrollo del árbol ductal depende de las interacciones estroma-epitelio,

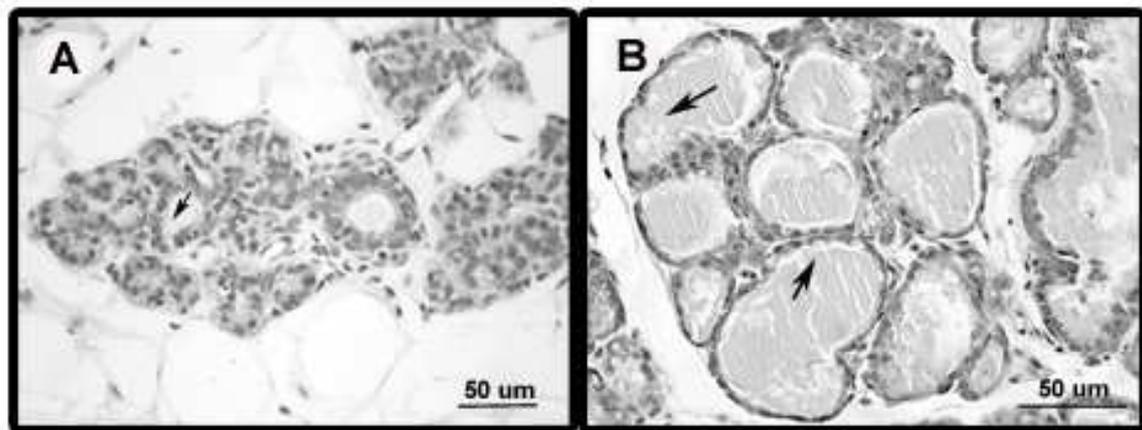
importantes tanto durante el desarrollo embrionario como posnatal (Kass y col., 2007). La mayoría de los eventos en la mamogénesis ocurren durante la gestación, y algunas de las hormonas involucradas en la preñez como el estrógeno y la progesterona (P4) son responsables del crecimiento y la maduración mamaria (Rezaei y col., 2016). Luego de la lactación, la glándula mamaria involuciona rápidamente retornando a un estadio similar al del adulto (Imagawa y col., 1994).



**Figura 6. Desarrollo de la glándula mamaria y su regulación.** La mamogénesis comienza durante el desarrollo fetal temprano. Luego del nacimiento, los conductos mamarios se elongan a través de la proliferación celular. Al iniciar la pubertad, altas concentraciones plasmáticas de hormona de crecimiento (GH) y factor de crecimiento tipo insulina (IGF-I) estimulan la proliferación del conducto mamario en sus extremos hasta formar los TEBs. Bajo la influencia del estradiol (E2), los TEBs proliferan activamente formando las ramificaciones ductales las cuales invaden el *fat pad* mamario. Luego de esta etapa, los TEBs regresionan. Durante la preñez, la progesterona (P4) y la prolactina (PRL) promueven el desarrollo lobuloalveolar para formar los ABs. Al inicio de la lactancia, se forman los alveolos maduros capaces de producir y secretar leche. La succión del pezón por el neonato resulta en la contracción de las células mioepiteliales alrededor de los alveolos, causando la expulsión de la leche a través de los conductos hacia el pezón. Luego del destete, la lactancia es detenida y la glándula mamaria involuciona a través de la apoptosis y autofagia hacia un estado no-lactacional. NL = nódulo linfático; PL = lactógeno placentario. Tomado y modificado de Rezaei y col. (2016).

En la Figura 7 se muestra imágenes representativas de la histología de la glándula mamaria de la rata durante los estadios que fueron objeto de estudio de la presente tesis

doctoral: la *gestación* y la *lactancia*. Durante la preñez, los espacios interductales, abundantes en las hembras vírgenes, van siendo ocupados por nuevas ramificaciones de conductos y desarrollo de numerosos alvéolos (Imagawa W. y col., 1994). Si los TEBs aún permanecieran en la glándula mamaria, rápidamente se dividen para formar los ABs, los cuales darán lugar a las estructuras lóbulo-alveolares, características de la gestación en la rata. Los lóbulos aumentan en tamaño y en número hasta que el espacio entre conductos se encuentre completamente invadido con epitelio (Figura 7A) (Masso-Welch y col., 2000). Mientras que, en la lactancia, los alvéolos son heterogéneos tanto en su distensión luminal como en el espesor de la capa epitelial que los forman, este epitelio tiene una apariencia esponjosa debida a los lípidos intracelulares y a las vesículas secretoras que contienen lactosa (Figura 7B). Como consecuencia del aumento en el tamaño de las células alveolares, la capa subyacente de células mioepiteliales se vuelve más discontinuo de lo que era durante la preñez (Masso-Welch y col., 2000).



**Figura 7. Imágenes representativas de glándulas mamarias durante la gestación y lactancia.** (A) Se observa la presencia de gotas lipídicas citoplasmáticas en una muestra de mama de día 18 de gestación. (B) Sección de la glándula mamaria durante la lactancia. Las flechas indican la presencia de gotas lipídicas en el lumen alveolar.

---

## 2 | *Diferenciación funcional de la glándula mamaria y su regulación.*

---

La diferenciación funcional de la glándula mamaria se puede dividir en tres fases:

- (1) la fase *proliferativa* durante el primer tercio de la gestación;
- (2) la *diferenciación secretoria* que inicia a mediados de la preñez, durante la cual la glándula se vuelve competente para secretar leche;

(3) y la *activación secretoria* comienza alrededor del parto junto con la secreción de la leche.

### **2.1 | Fase proliferativa.**

Esta fase está caracterizada por una proliferación extensiva de las células epiteliales mamarias y comienza inmediatamente luego de la concepción, alcanzando el pico máximo en día de gestación 5 (DG5) (Anderson y col., 2007). A partir de este pico, la proliferación disminuye durante el primer tercio de la gestación hasta que la glándula alcanza la quiescencia justo antes del parto. Durante este período, el contenido de ARNm de los marcadores epiteliales citoqueratina 19 y claudina 7 aumentan tres veces su magnitud, indicando una remarcable expansión del compartimiento alveolar (Blackman y col., 2005). Mientras que el aumento de los marcadores epiteliales refleja el incremento en el número de células epiteliales, esto también podría reflejar cambios en el tamaño y en el patrón de expresión de genes de estas células. A pesar de la masiva proliferación que se lleva a cabo, la organización del epitelio se mantiene (Anderson y col., 2007).

### **2.2 | Diferenciación secretoria**

La diferenciación secretoria, anteriormente referida como lactogenesis I, se inicia durante el primer tercio de la gestación y está caracterizada por diversos cambios bioquímicos que reflejan la transición hacia un estadio pre-lactacional (Anderson y col., 2007). Una de las características más relevantes de este período es que desde el DG8 al DG10 se puede observar la acumulación de gotas lipídicas citoplasmáticas en las células mamarias alveolares de ratón (McManaman y col., 2004). Asimismo, también se ha reportado que existe un aumento de la actividad de enzimas involucradas en la síntesis de lípidos de la leche en la glándula mamaria de conejo (Mellenberger y Bauman, 1974). Por otro lado, a mitad de la gestación comienza la expresión progresiva de los genes de las proteínas de la leche como:  $\beta$ -Caseína ( $\beta$ -Cas),  $\alpha$ -Lactoalbúmina ( $\alpha$ -Lactalb) y la Proteína Ácida del Suero (*whewy acidic protein*, WAP). Estas proteínas de la leche son reguladas a través de la vía de señalización de la prolactina.

Además, se observa una disminución de la proporción de tejido adiposo en la glándula mamaria que se correlaciona con una baja expresión de ARNm específicos de los adipocitos. Conjuntamente, existe una disminución en la expresión de colágeno a medida que progresa la preñez. Sin embargo, no está claro si este cambio representa una remodelación del estroma o una simple dilución de los componentes debida a la expansión del epitelio mamario (Anderson y col., 2015).

2.2.1 | Regulación hormonal de la diferenciación secretoria

PRL, P4, estrógeno (Eg) y el lactógeno placentario (PL) son las hormonas implicadas en la regulación durante la diferenciación secretoria (Figura 8). Existen claras diferencias entre especies con respecto a los roles que poseen estas hormonas, particularmente de la PRL y del PL. La hormona de crecimiento (GH) es lactogénica en muchas especies; sin embargo su rol en la diferenciación ha sido controversial debido a que todavía no está claro si el receptor de la hormona de crecimiento (GHR) se expresa en las células estromales o epiteliales (Anderson y col., 2015).

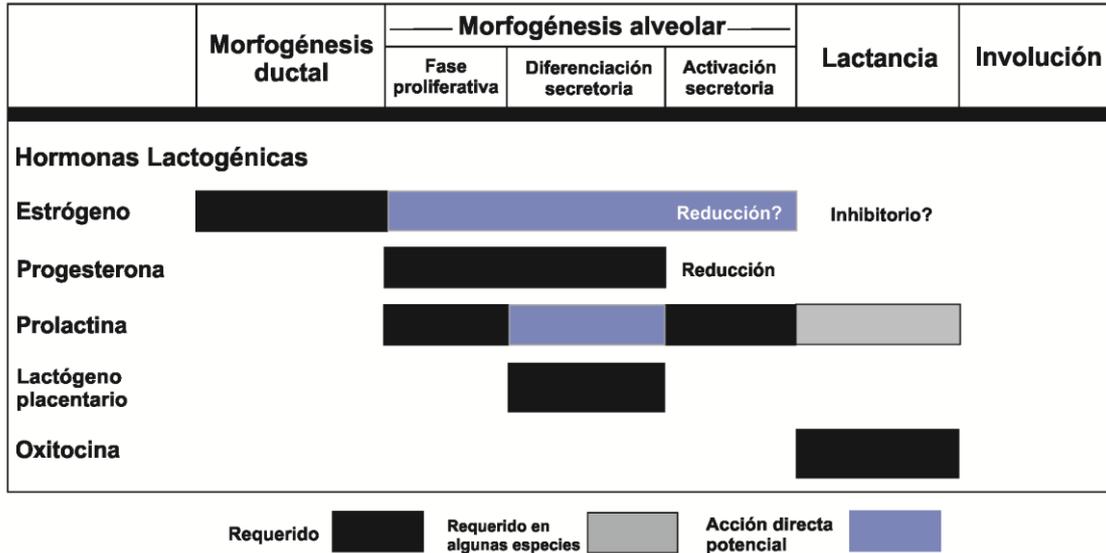


Figura 8. Control hormonal del desarrollo de la glándula mamaria. Tomado y modificado de Neville y col. (2002).

**Progesterona.** En roedores, la P4 es necesaria para la proliferación y diferenciación lobuloalveolar durante la gestación (Neville y col., 2002). Mientras que los Egs estimulan la proliferación ductal, la P4 asociada al Eg induce la morfogénesis del

alveolo mamario (Haslam y Shyamala, 1980). Además, la P4 es fundamental tanto para la ramificación lateral (Atwood y col., 2000) como para el desarrollo lobuloalveolar en ratonas (Plaut y col., 1999) y en ratas (Darcy y col., 1995).

Durante la diferenciación secretoria, en la rata, la producción de leche se encuentra inhibida por los altos niveles séricos de P4 y se observa una caída abrupta en el momento antes del parto (Figura 8) (Taya y Greenwald, 1981). De hecho, se ha sugerido que la P4 disminuye la expresión del receptor de prolactina (RPRL) (Anderson y col., 2007).

Los efectos fisiológicos de la P4 son mediados por la interacción de la hormona con su receptor, que pertenece a la familia de los factores de transcripción nuclear. La presencia del receptor de P4 (RP) en el epitelio mamario depende de los Egs y su concentración por célula varía según el estadio de desarrollo de la glándula mamaria. Está presente en los animales vírgenes, disminuye durante la gestación, es indetectable durante la lactancia y reaparece durante la involución post-lactancia. La disminución del RP observada durante la gestación se debería a una regulación negativa que ejercería la P4 sobre sus propios receptores (Haslam y Shyamala, 1980).

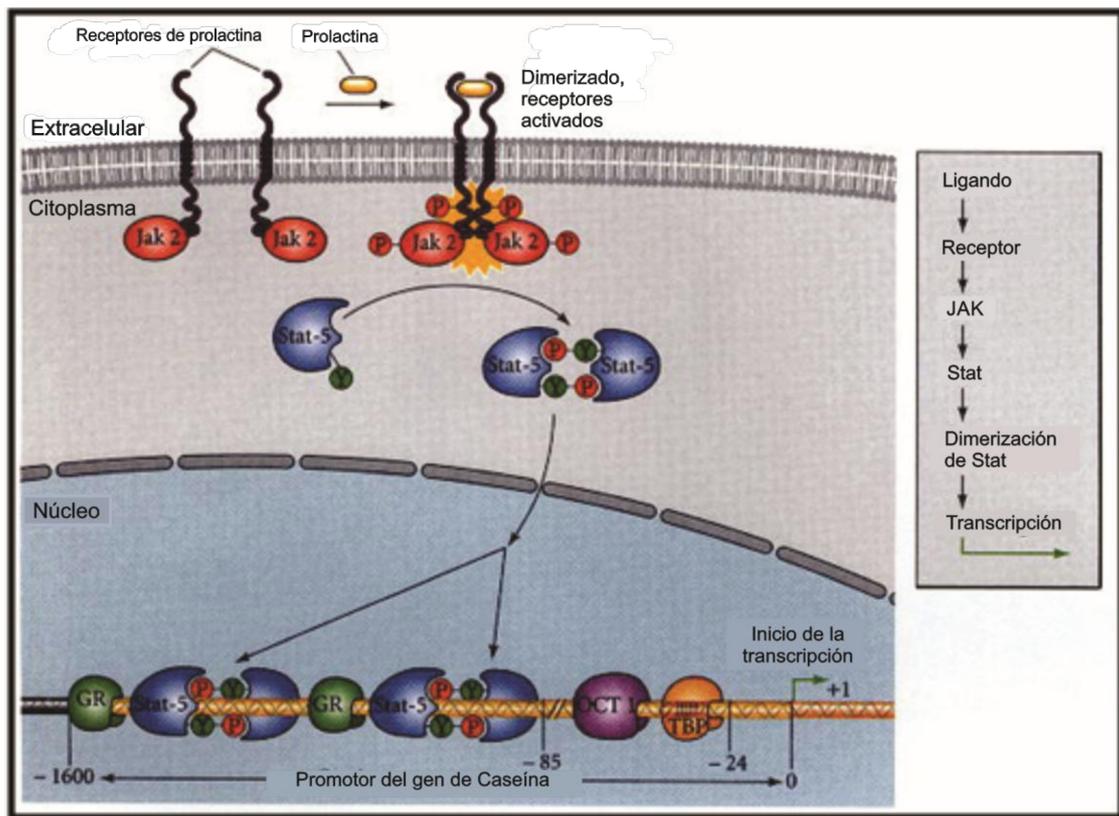
***Estrógeno.*** Los niveles séricos de  $17\beta$ -estradiol (E2) en la rata, permanecen sin cambios entre el segundo y el duodécimo día de gestación, luego se incrementan gradualmente alcanzándose los valores máximos cerca del parto (Figura 8) (Taya y Greenwald, 1981).

En la glándula mamaria de la rata, se expresan tanto el receptor de  $Eg\ \alpha$  ( $RE\alpha$ ) como el receptor de  $Eg\ \beta$  ( $RE\beta$ ) sin embargo, la presencia y distribución celular de los dos receptores es distinta. Aproximadamente el 60-70% de las células epiteliales expresan el  $RE\beta$  en todos los estadios del desarrollo mamario (e.j.: animal virgen, preñado, lactante). Sin embargo, durante la gestación ocurre una disminución de los niveles epiteliales y estromales del  $RE\alpha$  y durante la lactancia existe un aumento significativo de los niveles de  $RE\alpha$  acompañado de un incremento en la co-localización con el  $RE\beta$  (Saji y col., 2000; Saji y col., 2001).

**Prolactina.** La PRL se mantiene elevada durante la preñez en el humano, y se ha demostrado que mujeres con bajos niveles de PRL durante la gestación han tenido dificultad en la lactancia, sugiriendo que la PRL se encuentra involucrada en la diferenciación secretoria en humanos (Anderson y col., 2015). La PRL plasmática aumenta crecientemente a lo largo de la gestación probablemente debido a los altos niveles de E2 en el humano (Neville y col., 2002). En la rata, la PRL es responsable del mantenimiento del cuerpo lúteo durante el primer tercio de la gestación. La actividad de la hormona comienza a disminuir en amplitud alrededor del DG8 hasta desaparecer en DG10, en donde su acción es reemplazada por el PL (Neville y col., 2002). Interesantemente, el RPRL, al igual que la PRL circulante, se encuentra disminuido en la glándula mamaria de la rata y el ratón a lo largo de la preñez, y vuelven a niveles elevados justo antes del parto (Figura 8) (Mizoguchi y col., 1997).

El RPRL es un miembro de la superfamilia del receptor de PRL/hormona de crecimiento/citoquina, el cual se encuentra asociado con, y activa, la proteína tirosina quinasa JAK2 y los miembros de la familia de factores de transcripción Stat5 (señal de transducción y activador de la transcripción 5) (Jahn y col, 1997). En consecuencia, la vía de JAK-Stat es extremadamente importante en la activación de ciertas proteínas de la leche, principalmente en la activación del gen de  $\beta$ -Cas durante la producción de la leche (Briscoe y col., 1994, Groner & Gouilleux, 1995).

En la Figura 9 se puede observar que la PRL al unirse a la región extracelular del RPRL de las células mamarias induce su dimerización. Las proteínas quinasas JAK (JAK2) se encuentran “ancladas” en cada uno de estos receptores (en sus respectivas regiones citoplasmáticas). Como resultado de la dimerización del receptor, las proteínas JAK son fosforiladas, activando la actividad quinasa latente de estos receptores y las proteínas citoplasmáticas Stat5 (señal de transducción y activador de la transcripción 5). Existen dos proteínas Stat5, Stat5a y Stat5b, que comparten alrededor del 90% de identidad y difieren solo en su carboxilo terminal (Briskin y Rajaram, 2006). Una vez activada ambas proteínas, se produce la dimerización de estas y se traslocan hacia el núcleo celular, donde se unen a regiones específicas del ADN, activando la transcripción de los genes involucrados en la morfogénesis alveolar, incluyendo la proteína de la leche  $\beta$ -Cas (Gilbert, 2000; Oakes y col., 2008).



**Figura 9. Vía de señalización en la activación del gen de caseína por PRL.** GR es el receptor de glucocorticoide, OCT1 es un factor de transcripción general, y TBP es el set de proteínas responsables de la unión de la RNA polimerasa. A la derecha se muestra un diagrama simple. Modificado de Gilbert (2000).

**Lactógeno placentario.** Los niveles de PL permanecen elevados solamente durante la diferenciación secretoria. La hormona ha evolucionado al menos dos veces, desde el gen de PRL en los rumiantes, y desde el gen de GH en humanos (Anderson y col., 2015). En ratas, el doble pulso diario de PRL pituitaria es reemplaza por PL a mediados de la gestación por, primero, un pulso de PLI y luego por PLII, la cual continúa aumentando hasta el final de la gestación. Por otro lado, no existen evidencias de un receptor específico para PL, y se cree que PL actúa a través del RPRL, del GHR, o de ambos (Herman y col., 2000).

### 2.3 | Activación secretoria

La activación secretoria es el comienzo de la secreción copiosa de la leche; también conocida como lactogénesis II o el inicio de la lactación (Hartmann, 1973). Este proceso

inicia con la caída de la P4 que ocurre cercano al parto. En el ratón la caída de P4 viene acompañado de profundos cambios en la expresión y la actividad metabólica de diversas clases de moléculas incluyendo las proteínas de la leche y las enzimas involucradas en la síntesis de lípidos y colesterol (Anderson y col., 2015). Además, tanto en roedores como en el humano, los niveles de PRL se encuentran elevados en el momento del parto. En este momento, la PRL induce la máxima activación del RPRL y de su vía de señalización, llevando a un aumento de la transcripción de genes que codifican para las proteínas de la leche; sin embargo, al menos que la acción de la P4 sea inhibida, la secreción de la leche no se inicia (Anderson y col., 2007).

Por otro lado, existe un aumento del número de retículos endoplasmáticos y de compartimiento de Golgi en las células epiteliales alveolares, los cuales son requeridos para soportar la masiva síntesis y secreción de los diversos componentes de la leche (Anderson y col., 2007). Además, la ausencia de grandes gotas de lípidos en las células epiteliales mamarias sugiere que la activación secretoria ha ocurrido (McManaman, 2009). A partir de evidencias experimentales se cree que la PRL y las proteínas de unión a elementos de respuestas a esterol (SREBP) participan en la regulación de enzimas claves en la biosíntesis de los ácidos grasos y colesterol (Anderson y col., 2015).

## **2.4 | *Lactancia***

La continua producción de leche es definida como lactancia, antes también conocida como galactopoyesis. La lactancia se caracteriza por tres eventos diferentes: (a) la proliferación preparto de células epiteliales alveolares; (b) la diferenciación tanto estructural como bioquímica del epitelio mamario; y (c) la síntesis y secreción de los componentes de la leche (Nickerson y Akers, 1984).

Como se mencionó anteriormente, la lactación se inicia con la disminución de los niveles séricos de P4 y un aumento de los niveles de PRL (en roedores) o la mantención de altos niveles de PRL (en humanos) (Anderson y col., 2015). La lactancia es sostenida por dos hormonas diferentes: PRL y Oxitocina (OT) (Neville y col., 2002). Durante la lactancia, tanto la PRL como la OT son liberadas por el estímulo de succión, a través de la estimulación de las terminales nerviosas del pezón. La OT estimula la contracción de

las células mioepiteliales mamarias resultando en la expulsión de la leche desde los alveolos a los conductos mamarios (Anderson y col., 2015).

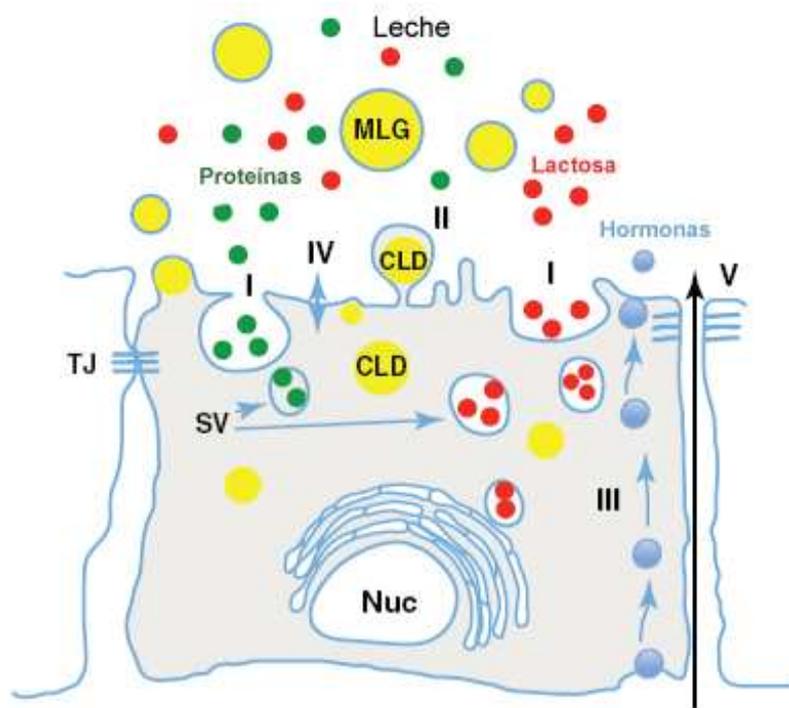
### **3 | *Biosíntesis y secreción de los componentes de la leche.***

---

La leche es la única fuente de comida que recibe el recién nacido, y por lo tanto debe contener todos los nutrientes necesarios para su normal desarrollo y crecimiento (Collier, 1999). La leche es cualitativamente y cuantitativamente compleja, conteniendo proteínas (mayormente caseínas), lípidos (triglicéridos), azúcares (incluyendo lactosa y oligosacáridos), vitaminas, minerales, y factores de crecimiento, además de agua (Anderson y col., 2015). Las cantidades relativas de estas sustancias varían significativamente entre especies, y la composición de la leche dependerá de la etapa de lactación, del ambiente, dieta y edad de la madre. Las principales diferencias entre especies pueden ser atribuidas a los distintos requerimientos nutricionales del neonato (Collier, 1999). Además, dicha variabilidad se observa debido a que los mecanismos responsables de la síntesis y/o secreción de los componentes de la leche son genéticamente determinados y fisiológicamente regulados (Anderson y col., 2015).

Por otro lado, la composición de la leche refleja las actividades de distintos procesos de secreción y transporte de la glándula mamaria. Los solutos pueden ingresar a la leche a través de rutas transcelulares o paracelulares, las cuales pueden ser divididas en cinco vías de secreción generales (Figura 10) (McManaman y Neville, 2003). Dos de estas vías están implicadas en la secreción de sustancias generadas en forma endógena: la vía de exocitosis (Vía I) que es la responsable de la elaboración de la mayoría de los componentes de la fracción acuosa de la leche, la cual incluye la secreción de las proteínas de la leche, oligosacáridos, y nutrientes como la lactosa, citrato, fosfato y calcio (Jensen, 1995). Por otra parte, los lípidos de la leche son secretados a través de un proceso específico y único en las células epiteliales mamarias (Vía II), que involucra la síntesis de triglicéridos a partir de precursores de ácidos grasos transportados desde el plasma o sintetizados en las células epiteliales alveolares (Jensen, 1995; Mather y Keenan, 1998). Los triglicéridos se integran en grandes gotas de lípidos citoplasmáticas que se moverán hacia la membrana apical y se fusionarán con la membrana plasmática

permitiendo la secreción de los glóbulos grasos de la leche hacia el lumen alveolar. Por otro lado, también existen dos vías transcelulares generales para transportar sustancias exógenas hacia la leche: la vía de la transcitosis (Vía III) que transporta un amplio rango de macronutrientes derivadas del suero o de las células estromales, que incluyen a las proteínas del suero como las inmunoglobulinas, albúmina y transferrina; hormonas endócrinas como la insulina, prolactina y estrógeno; agentes derivados del estroma como las inmunoglobulina secretoria A y citoquinas (McManaman y Neville, 2003). Además, existen varias vías de transporte de membrana (Vía IV) para la transferencia de iones y pequeñas moléculas (incluyendo a la glucosa, los aminoácidos y el agua) a través de la membrana plasmática basal y apical (Shennan y Peaker, 2000). Por último, en la mayoría de las especies durante la lactancia, los complejos de unión entre células se encuentran normalmente cerrados y se abren para permitir el pasaje directo de solutos desde los espacios intersticiales hacia la leche a través de la vía paracelular (Vía V) (Jensen, 1995; Nguyen y Neville, 1998).



**Figura 10. Vías de secreción de los componentes de la leche.** La vía I describe la secreción por exocitosis de las proteínas de la leche, lactosa, calcio y otros componentes de la fase acuosa de la leche. La vía II describe la secreción de los lípidos de la leche con la formación de las gotas lipídicas citoplasmáticas (CLD) que se mueve hacia la membrana apical para ser secretada como un glóbulo graso de la leche (MLG): La vía III describe la transcitosis vesicular de las

proteínas como las inmunoglobulinas y hormonas desde el espacio intersticial. La vía IV describe los transportadores para el movimiento directo de iones monovalentes, agua y glucosa a través de la membrana basal y apical de la célula. La vía V es abierta solo durante la gestación, involución y estados inflamatorios como la mastitis. Nuc: núcleo; SV: vesícula secretoria; TJ: unión estrecha. Modificado de Chong y col. (2011).

### **3.1 | Síntesis y secreción de las proteínas de la leche.**

El contenido proteico de la leche humana es alrededor del 3% (p/v), disminuyendo cerca del 1.5% al llegar a la segunda semana de lactancia (Allen y col., 1991). En cambio, la leche de las ratonas contiene alrededor del 12% de proteínas e incluye a las caseínas,  $\alpha$ -Lactalb, WAP, lactoferrina, inmunoglobulina A secretoria, y otras (Anderson y col., 2007). Las caseínas, que representan el 80% de las proteínas de la leche, forman micelas insolubles conteniendo altas concentraciones de calcio y fosfatos (Farrel, 1999). Otras proteínas de la leche están presentes en la fracción soluble (suero), y otras se encuentran asociadas a la membrana de los glóbulos grasos (Anderson y col., 2015).

Además de la importancia nutricional que poseen, las proteínas de la leche son consideradas marcadores celulares de diferenciación funcional en la glándula mamaria, dentro de ellas las caseínas y las proteínas del suero (WAP) son las principales (Rosen y col., 1999). La mayoría de las caseínas se expresan durante la preñez temprana hasta un nivel del 30% en DG17; por otro lado, otras proteínas como WAP comienzan a expresarse entre el DG7 y DG12 (Anderson y col., 2007). Los genes que codifican para dichas proteínas son reguladas 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-matriz extracelular activan factores de transcripción específicos, alteran la organización del citoesqueleto y cambian el estado de la cromatina y estructuras nucleares (Kabotyanski y col., 2009; Qian y Zhao, 2014).

La exocitosis es el principal mecanismo de secreción de las proteínas de la leche en las células alveolares, así como también lo es para la secreción de agua, lactosa, oligosacáridos, fosfato, calcio y citrato (McManaman y Neville, 2003). Las sustancias son empaquetadas en vesículas secretorias en el interior del aparato de Golgi que luego son transportadas a la región apical de las células, donde las vesículas se fusionan con la

membrana plasmática apical descargando su contenido hacia el espacio extracelular (McManaman y Neville, 2003). Además, las caseínas tienen la distintiva e importante propiedad de formar micelas en presencia de calcio y fosfatos inorgánicos en el interior de las vesículas secretorias (Jenness, 1974).

### 3.2 | Síntesis y secreción de la lactosa y oligosacáridos de la leche.

La lactosa es un azúcar específica de la leche y es el principal componente osmótico de la misma, por lo que su síntesis y secreción está íntimamente relacionada con el volumen total de leche que producen los mamíferos (Nickerson y Akers, 1984). Durante la lactancia, las elevadas concentraciones de lactosa en el complejo de Golgi, donde se produce la síntesis, conducen a una afluencia osmótica del agua que contribuye en la fluidez de la leche, y es un determinante de la cantidad de agua de la misma (Anderson y col., 2015; McManaman y Neville, 2003).

La reacción de síntesis de la lactosa a partir de glucosa y UDP-galactosa, es catalizada por un complejo formado por  $\beta$ 1,4-galactosiltransferasa y  $\alpha$ -Lactalb, denominado lactosa sintetasa (Figura 11) (Brew y col., 1968). La  $\alpha$ -Lactalb es una proteína sintetizada en las células epiteliales mamarias, y es considerada el limitante de la síntesis de la lactosa. La expresión de las enzimas y la síntesis/secreción de la lactosa ocurren en el momento del parto, dependiendo de la caída de los niveles séricos de P4 (Anderson y col., 2015).

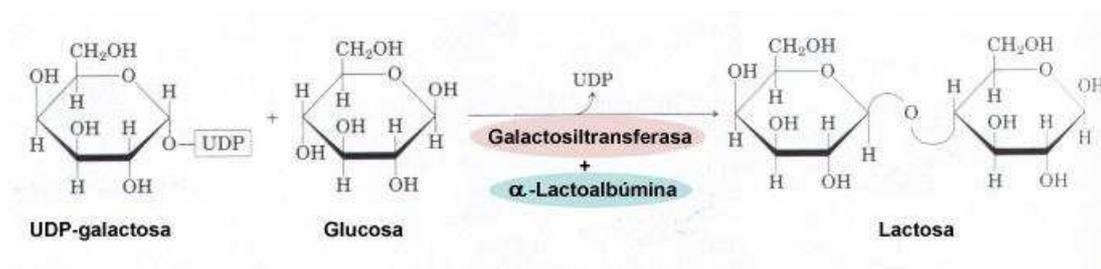


Figura 11. Biosíntesis de la lactosa de la leche. Modificado de Jenness (1974).

Por otro lado, a partir de estudios bioquímicos se ha demostrado que la lactosa es secretada junto con las proteínas de la leche en las vesículas secretorias en la glándula mamaria de ratas lactantes (Anderson y col., 2015), y debido a que la membrana del

complejo de Golgi y las vesículas secretorias son impermeables a los disacáridos, el agua ingresa a las vesículas secretorias bajo el efecto osmótico de la lactosa sintetizada (Jensen, 1995).

Los oligosacáridos de la leche son sintetizados por adición de carbohidratos como N-acetilglucosamina, fucosa, y ácido N-acetilneuramínico a los residuos de la lactosa (Kunz y col., 2000). Pocos son los detalles que se conocen sobre la regulación de su síntesis, qué determina la diversidad de sus estructuras, y cómo son empaquetados en las vesículas secretorias para su secreción durante la lactancia. Se conoce que varias de las reacciones de glicosiltransferasa para generar estructuras de oligosacáridos específicas se localizan en diferentes compartimientos de Golgi, sugiriendo la existencia de mecanismos específicos para la detección y regulación de su abundancia, así como también para transportar los oligosacáridos dentro de Golgi para que adquieran características estructurales específicas (Anderson y col., 2015).

### **3.3 | Síntesis y secreción de los lípidos de la leche.**

La mayor proporción de lípidos en la leche son triglicéridos (< 98%) (Anderson y col., 2007), los cuales debido a su alto contenido energético proveen la mayoría de las calorías requeridas por el recién nacido en crecimiento en la mayoría de las especies (Farrel, 1999). Además, los lípidos de la leche son considerados la principal fuente de ácidos grasos (AGs) esenciales necesaria para la síntesis de la membrana neonatal, como sustratos para la síntesis de eicosanoides y otras moléculas de señalización de lípidos bioactivos, y ellos proveen un mecanismo para la transferencia de vitaminas solubles en grasa para los infantes. El contenido lipídico de la leche es variable, el cual difiere entre las especies, y se encuentra influenciado por la etapa de lactación (Anderson y col., 2015).

Los lípidos de la leche, tanto los TGs como fosfolípidos, son sintetizados en el retículo endoplasmático liso de la región basal de la célula a partir de precursores de AGs y glicerol (McManaman y Neville, 2003). Los AGs son transportados desde el plasma o derivados de la síntesis *de novo* a partir de la glucosa en las células epiteliales mamarias

(Mather y Keenan, 1998; Neville y Picciano, 1997). Los AGs con un número de carbonos  $\geq 16$  son derivados de la dieta, mientras que los AGs con un número de carbonos  $\leq 16$  son sintetizados en las células mamarias secretorias (Farrel, 1999). Estas funciones son reguladas por la activación secretoria de la glándula mamaria, y también a través de la disponibilidad de lípidos exógenos derivados de la dieta y/o de la descomposición de los TGs adiposos (Anderson y col., 2007).

La glucosa, los AGs y el glicerol son los principales precursores para la síntesis de los AGs de la leche que ingresan a las células mamarias desde el plasma. Una vez que la glucosa ingresa a la célula alveolar mamaria puede ser (Figura 12): (a) convertida a Acetyl-coenzima A (CoA) a través de la vía de síntesis del piruvato y citrato, la cual provee unidades de carbono para la síntesis de AGs a través del Malonil CoA; (b) convertida a ribulosa-5-fosfato mediante la vía de las pentosas fosfatos, generando NADPH necesarias para proveer unidades reductoras para la síntesis de AGs; (c) y finalmente, el gliceraldehído-3-fosfato generado a partir de la cadena glucolítica puede ser convertido a glicerol-3-fosfato y utilizado para la formación de los TGs (Neville y Picciano, 1997). El glicerol-3-fosfato también puede ser derivado de la fosforilación del glicerol que ingresa desde el plasma.

El primer paso limitante en la síntesis de AGs es la conversión de Acetil CoA a Malonil CoA, reacción catalizada por la enzima Acetil CoA carboxilasa (ACC) (Neville y Picciano, 1997). Luego, la sintasa de ácidos grasos (FAS) cataliza una secuencia de siete reacciones, cada una de ellas añade dos unidades de carbón proveniente del Malonil CoA a la cadena naciente de AG (Smith, 1994). A su vez cada uno de los ciclos requiere dos moléculas de NADPH. El citoplasma de las células mamarias contiene una hidrolasa acetilester de cadena media, tioesterasa II, que finaliza la síntesis de AGs luego de la incorporación de 8-14 carbonos, resultando en la síntesis *de novo* de AGs de cadena mediana (Neville y Picciano, 1997).

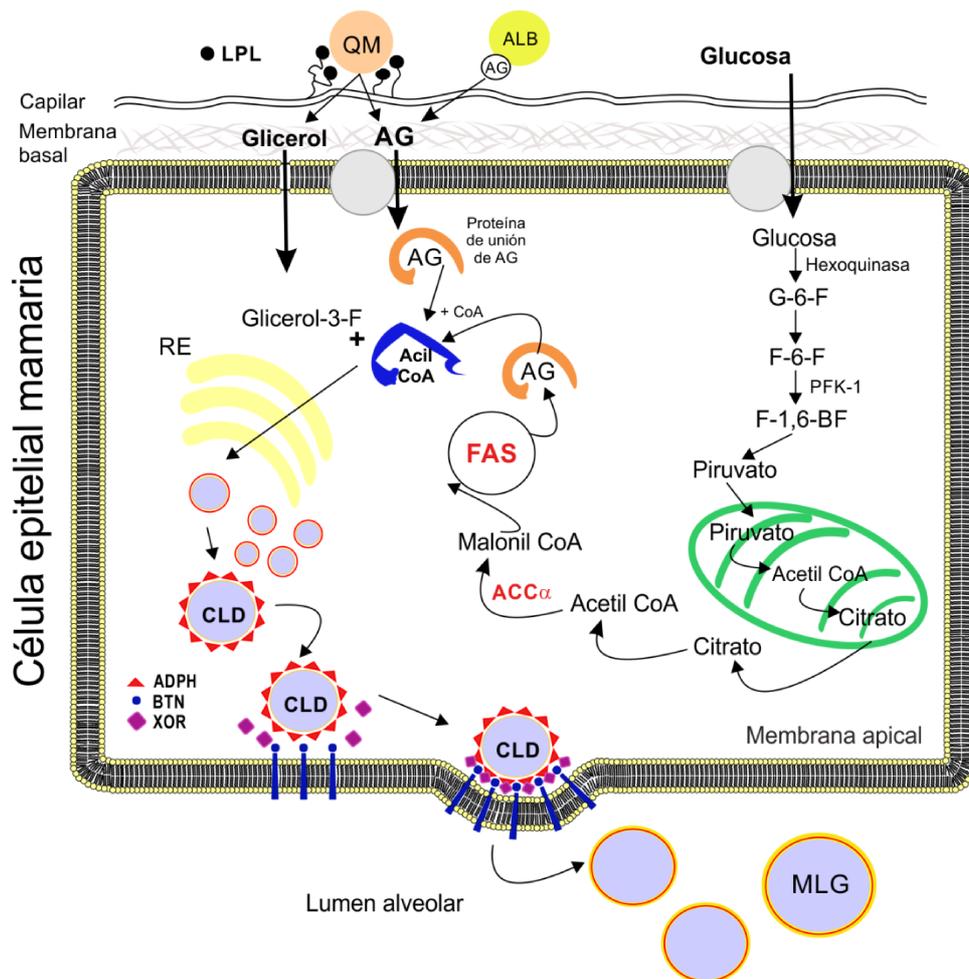
Los AGs de cadena larga son importados desde el plasma, donde son liberados desde los TGs en los quilomicrones o lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) por la acción de la enzima lipoproteína lipasa, o también puede derivarse desde un pool de

AGs no esterificados (NEFA) que circulan unidos a la albúmina (Figura 12) (Neville y Picciano, 1997). El mecanismo por el cual los AGs atraviesan el endotelio capilar y espacio intersticial para alcanzar la célula alveolar todavía no se conoce. Una vez que llega a la célula epitelial alveolar, los AGs pueden cruzar la membrana plasmática por difusión o a través de un sistema de transporte saturable. Los AGs transportados pueden ser activados por una combinación con CoA y unido a una proteína de transporte de acil-CoA (ACBP) para la transferencia a TGs. Asimismo, inmediatamente luego del transporte hacia el interior de la célula, los AGs pueden unirse a la proteína de unión de AGs (FABP), una de las proteínas citoplasmáticas más abundantes en la glándula mamaria lactante (Knudsen, 1990). Ésta proteína es la responsable de mantener el pool de AGs disponible para la síntesis de los TGs (Neville y Picciano, 1997).

Los AGs, ya sea aquellos sintetizados en las células mamarias o importadas desde el plasma, son activados mediante la combinación con CoA y unido al glicerol-3-fosfato por transacilasas localizadas en el retículo endoplasmático para luego formar los TGs. Los TGs formados son incorporados en microgotas lipídicas que se integran para formar grandes gotas de lípidos, denominadas gotas lipídicas citoplasmáticas (CLDs) (Figura 12) (Neville y Picciano, 1997). Las CLDs se dirigen hacia la membrana apical donde son secretadas por un específico y único proceso, en el cual son recubiertas por membrana plasmática apical y liberadas como glóbulo grasos de la leche (MLGs) (Mather y Keenan, 1998).

Existen evidencias que la secreción de los CLDs involucra interacciones moleculares específicas entre la CLD y las moléculas de la membrana plasmática apical (McManaman y col., 2007). Existen varios modelos hipotéticos que explican la secreción de los lípidos de la leche (Chong y col., 2011). Uno de ellos describe la secreción del CLD a través de la formación de un complejo tripartito entre la adipofilina (ADPH) localizada en la superficie de la CLD, la proteína de transmembrana butirofilina (BTN) y la enzima citoplasmática xantina oxidoreductasa (XOR) (Mather y Keenan, 1998; McManaman y col., 2007). La ADPH es el mayor componente proteico en la CLD, y regula su acumulación impidiendo el acceso de las lipasas al núcleo de TGs de la CLD (Chong y col., 2011; McManaman y col., 2007). La expresión de BTN en la glándula mamaria ocurre durante la diferenciación secretoria de la misma, y se

localiza en la membrana plasmática apical de las células secretoras de leche (Mather y Jack, 1993). La XOR es un homodímero purina oxidasa, su expresión es elevada en el citoplasma de las células epiteliales mamarias, y es un componentes estructural abundante en la membrana de los MLGs (Chong y col., 2011). En este modelo se propone que la ADPH que recubre las CLDs se une a la membrana plasmática apical a través de interacciones con la BTN monoméricas u otras proteínas de membrana todavía no identificadas. La interacción entre estas moléculas y la ADPH es luego prevista para inducir la oligomerización lateral de las moléculas de BTN conduciendo a una deformación de la membrana y el recubrimiento de la CLD. Luego, ocurre el reclutamiento de XOR en los sitios de oligomerización que induce la estabilización de los oligómeros de BTN para su posterior secreción al lumen alveolar (Figura 12) (McManaman y col., 2007).



**Figura 12. Síntesis de AGs y secreción de los glóbulos grasos de la leche.** Los ácidos grasos (AGs) pueden ser importados desde el plasma desde la albúmina (ALB) o a partir de la hidrólisis de triglicéridos de los quilomicrones (QM) mediante la lipoproteína lipasa (LPL); o

también pueden ser sintetizados *de novo* en la célula epitelial mamaria a partir de la glucosa que ingresa mediante reacciones catalizadas principalmente por las enzimas acetil CoA carboxilasa (ACC $\alpha$ ) y la sintasa de AGs (FAS). Los AGs son unidos a las proteínas de unión de AGs en el citoplasma o activados con acetil coenzima A (CoA) y utilizado para sintetizar triglicéridos. La microgotas lipídicas sintetizadas en el retículo endoplasmático (RE) se fusionan para formar gotas lipídicas citoplasmáticas (CLD) que se mueven y son cubiertas por la membrana plasmática apical para formar los glóbulos grasos de la leche (MLG) que es secretada hacia el lumen alveolar. Para dar inicio a la secreción de los MLGs, la adipofilina (ADPH) que recubre las gotas lipídicas citoplasmáticas se unen con la membrana plasmática apical a través de la interacción con la butirofilina (BTN) monomérica. Esta interacción induce la oligomerización de las moléculas de BTN que deforman la membrana y dirige la envoltura de la CLD. Por último, el reclutamiento de la xantina oxidoreductasa (XOR) en los sitios de oligomerización estabiliza los oligómeros de BTN. G-6-F: glucosa-6-fosfato; F-6-F: fructosa-6-fosfato; PFK-1: fosfofructoquinasa-1; F-1,6-BF: fructosa, 6-bifosfato. Modificado de Neville y Picciano (1997) y McManaman y col. (2007).

#### 4 | ***Perturbadores endócrinos.***

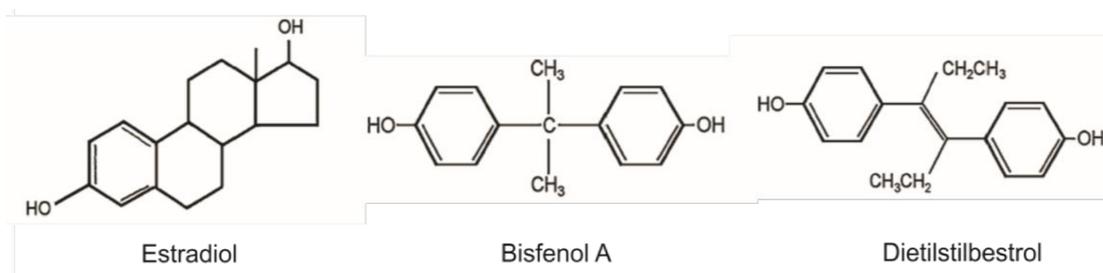
---

En las últimas décadas se ha evidenciado la presencia masiva de diversos compuestos químicos en el medio ambiente, como resultado de la acción antropogénica, los cuales presentan una inesperada acción de perturbación endócrina. El uso indiscriminado y descontrolado de estas sustancias en países como la Argentina, ha sido asociado con el incremento de patologías reproductivas en humanos y animales silvestres, induciendo desequilibrios poblacionales en diversos ecosistemas (Fenton, 2006; McLachlan, 2001; Sweeney, 2002).

Estas sustancias, que generalmente se caracterizan por ser persistentes y bioacumulables, tienen usos muy diversos, como fungicidas, herbicidas e insecticidas, químicos industriales (Ej.: bifenilos policlorados, Bisfenol A), compuestos vegetales naturales (Ej.: genisteína) o sustancias de uso farmacéutico (dietilestilbestrol-DES-, etinilestradiol) (McLachlan, 2001); y se las ha denominado conjuntamente como disruptores o ***Perturbadores Endócrinos (PE)***.

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (-EPA- del inglés: *Environmental Protection Agency*) define a los PE como: “*agentes exógenos que interfieren con la síntesis, secreción, transporte, unión a receptores, acción o degradación de las hormonas endógenas responsables de mantener la homeostasis,*

reproducción, desarrollo y/o conducta” (<http://www.epa.gov>). Más recientemente, en 2012, la *Endocrine Society* definió a los PE como químicos exógenos o mezclas de químicos que interfieren con cualquier aspecto de la acción hormonal (Zoeller y col., 2012). Estos compuestos no poseen una estructura química similar a la de las hormonas esteroides naturales (Figura 13), pero sin embargo muchos de ellos han demostrado tener actividad estrogénica (denominados **xenoestrógenos**) (National Research Council, 1999).

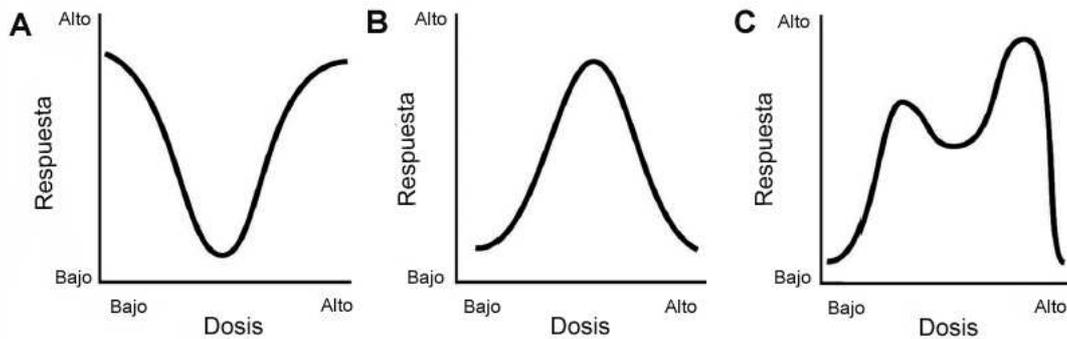


**Figura 13. Esquema comparativo de las estructuras químicas del 17 $\beta$ -estradiol y de dos perturbadores endocrinos: el Dietilestilbestrol y el Bisfenol A.** Modificado de Rubin (2011).

El mecanismo por el cual los PEs actúan sobre el organismo es bastante complejo debido a que los PEs, a diferencia de las hormonas endógenas, no son ligandos naturales y no interaccionan con los receptores hormonales con la misma especificidad y afinidad (Gore y col., 2015). Existen evidencias que postulan que los xenoestrógenos se unen a los RE con diferentes afinidades y alteran su capacidad de activar la transcripción de genes dependientes de Eg (Delfosse y col., 2012; Delfosse y col., 2014). Asimismo, se ha evidenciado que también poseen afinidad hacia otros miembros de la superfamilia de los receptores nucleares como la familia del receptor de glucocorticoide (RG) y del receptor activador proliferativo peroxisomal (PPAR) (Gore y col., 2015). La expresión anormal de genes sensibles puede dar lugar a una desregulación permanente en las vías de señalización hormonal, con consecuencias adversas para la salud.

Como las hormonas, los PEs exhiben curvas de dosis-respuesta complejas, y pueden actuar a concentraciones extremadamente bajas, llegando a producir respuestas no monotónicas en las que la pendiente de la curva cambia en el transcurso de la relación dosis-respuesta (Figura 14). Estas curvas dosis-respuesta son referidas frecuentemente

como curvas en forma de U (con respuestas máximas observadas a dosis bajas y altas) o de U invertida (con respuestas máximas observadas a dosis intermedias). Aún más, este tipo de respuestas no monotónicas se ha demostrado en más de una docena de hormonas naturales y en más de 60 PEs, tanto en cultivo de células animales como en experimentos *in vivo* (Vandenberg y col., 2012).



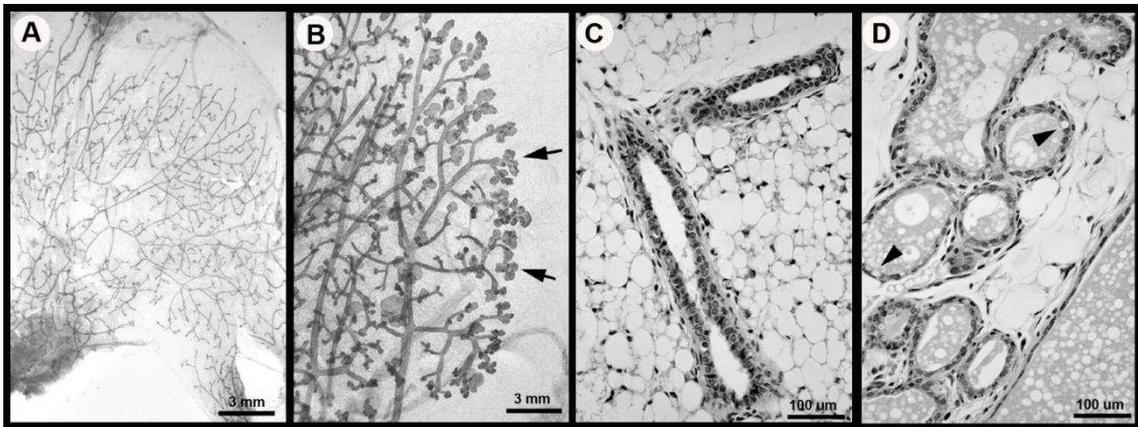
**Figura 14. Respuestas no monotónicas o bifásicas.** Dado que las hormonas interactúan con sus receptores de una manera no lineal, las curvas dosis-respuesta pueden ser no monotónicas. Dentro de éstas las más frecuentes son: (A) las que adoptan forma de U (con respuestas máximas observadas a dosis bajas y altas), (B) en forma de U invertida (con respuestas máxima observada a dosis intermedias) o (C) una curva multifacética. Todas estas son consideradas no monotónica debido a que la pendiente de la curva cambia una o más veces. Modificado de Vandenberg y col. (2012).

#### 4.1 | Dietilstilbestrol

El Dietilstilbestrol (DES) es un xenoestrógeno que posee una potente acción estrogénica. Fue ampliamente utilizado en mujeres embarazadas a partir del año 1940 para evitar abortos espontáneos y complicaciones del embarazo. Los Centros de Salud para el control y prevención de enfermedades de los Estados Unidos calculan que, durante este tiempo, hasta 10 millones de mujeres estadounidenses tomaron DES durante el embarazo. En la década del setenta, su uso fue prohibido debido a que se detectó que las hijas de mujeres embarazadas y tratadas con DES, referidas como “hijas del DES”, padecían graves problemas ginecológicos, como defectos del tracto reproductor (útero en forma de T, infertilidad y complicaciones del embarazo, como embarazo ectópico y parto prematuro) y alta incidencia de tumores de útero y vagina (como el adenocarcinoma de células claras) (Kitajewski y Sassoon, 2000; van Dijck y col., 2009). Actualmente se estima que una de cada 1.000 hijas del DES, han

desarrollado adenocarcinoma de células claras a la edad de 34 años (Giusti y col., 1995; Rubin, 2007), una tasa extraordinariamente alta para una variante tan poco frecuente de cáncer. Los daños causados por la exposición al DES no se limitó a las mujeres. Los “hijos del DES” también se vieron afectados y mostraron altas tasas de malformaciones urogenitales, testículos no descendidos, cáncer testicular, baja densidad de espermatozoides y menor movilidad de los espermatozoides (Gill y col., 1976; Palmer y col., 2006; Wilcox y col., 1995).

La mayoría de los efectos tras la exposición del feto al DES fueron observadas también en modelos animales. Se ha demostrado que la exposición prenatal a DES es efectiva en la producción de tumores mamarios en ratas ACI (Rothschild y col., 1987). Además, el tratamiento neonatal con altas dosis de DES resulta en conductos mamarios dilatados y lactogénesis precoz en animales post-puberales nulíparas (Figura 15) (Hovey y col., 2005). Aunque en la actualidad el DES no se prescribe durante el embarazo, es usado en experimentación por sus demostradas evidencias como perturbador endocrino, especialmente cuando la exposición se realiza durante etapas críticas del desarrollo.



**Figura 15.** Efecto de la exposición neonatal a DES sobre la morfología e histología de la glándula mamaria de ratones hembra nulíparas de 12 semanas de edad. (A) Whole mount de animal que recibió una única inyección (s.c.) de aceite de sésamo (control) o (B) 25 µg DES dentro de las 36 hs del nacimiento. Las flechas indican los conductos dilatados y estructuras alveolares quísticas. Imágenes histológicas de (C) animal control y (D) tratados neonatalmente con 25 µg DES. Las cabezas de flechas indican gotas lipídicas dentro de las células epiteliales de las estructuras alveolares. Tomado y modificado de Hovey y col. (2005).

## **4.2 | Bisfenol A**

El Bisfenol-A (BPA, di-(p-hidroxifenil) dimetilmetano) es otro xenoestrógeno que está recibiendo marcada atención debido a su alto potencial para causar efectos adversos sobre la salud humana y de los animales. El BPA fue sintetizado por primera vez en 1891, aunque su uso no fue muy difundido hasta que se descubrió su capacidad de polimerización para generar policarbonatos plásticos. Sin embargo, el enlace éster que une a los monómeros de BPA entre sí para formar el polímero no es estable y en consecuencia, el polímero se debilita con el tiempo, liberando BPA al material con el que se encuentra en contacto. Además el calentamiento a altas temperaturas (con fines de esterilización o de cocción en hornos de microondas) o la exposición a pH extremos, acelera la hidrólisis del enlace éster.

En la actualidad el BPA se encuentra ampliamente utilizado en la producción de productos de policarbonato, resinas epoxi y otros plásticos que incluyen polisulfonas, alquifenoles, poliéster-estirenos y ciertas resinas de estireno. Además de la industria del plástico, el BPA se ha utilizado en la formulación de pesticidas (fungicidas), antioxidantes, gomas y estabilizantes (cloruros de polivinilos) (Takahashi y Oishi, 2000; Vom Saal y Hughes, 2005). Su amplio uso crea una fuente de exposición incalculable debido a que también se encuentra presente en selladores dentales, recubriendo el interior de latas de conserva, juguetes, recipientes plásticos para alimentos y bebidas, mamaderas y utensilios para usos en horno microondas. Otras exposiciones resultan del uso de BPA en láminas films, tuberías reforzadas, esmaltes y barnices, adhesivos, dentaduras artificiales, discos compactos y aislantes eléctricos (Takahashi y Oishi, 2000). Las estimaciones actuales indican que más de ocho mil millones de libras de BPA son producidas anualmente y que aproximadamente 100 toneladas son liberadas a la atmósfera cada año (Rubin, 2011; Vandenberg y col., 2012).

Una evidencia consistente de la exposición a BPA se demostró en un estudio realizado sobre muestras de orina de 394 personas de Estados Unidos analizadas por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (Atlanta, EE.UU.), donde el 95% de ellas poseían niveles detectables de BPA (entre 0,4 y 8 ppb), sugiriendo una continua

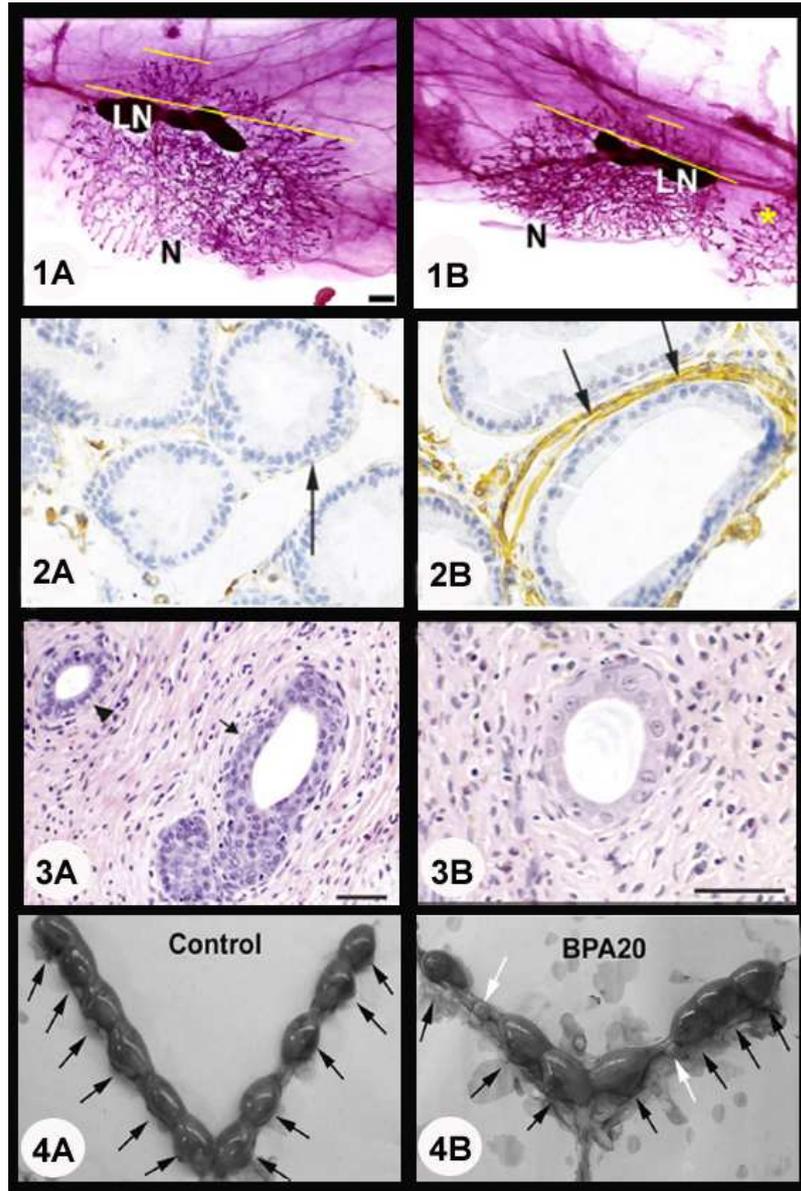
exposición humana a BPA proveniente de múltiples vías (Calafat y col., 2005). En la actualidad se asume que la vía más común de exposición a BPA en la población es a través de la dieta (Christensen y col., 2012; Rudel y col., 2011b). Las dosis ingeridas estimadas de BPA por vía oral en humanos llegan a los  $\mu\text{g}/\text{día}$  (Tabla 1). Después de la ingesta, se estima que el BPA es rápidamente metabolizado y excretado en la orina, siendo las concentraciones internas del BPA no conjugado de 1 ng/ml aproximadamente (Vandenberg y col., 2010). En promedio, los niveles de BPA observados fueron de 4,5 ng/ml en niños (6-11 años de edad), 3,0 ng/ml en los adolescentes (12-19 años de edad) y 2,5 ng/ml en adultos (mayores de 20 años de edad) (Calafat y col., 2008; Vandenberg y col., 2010). Además, concentraciones detectables de BPA también se han encontrado en el tejido placentario, líquido amniótico (Engel y col., 2006; Takahashi y Oishi, 2000), y en leche materna (Ye y col., 2006), lo que sugiere que la exposición puede ocurrir tan pronto como durante el período de la periconcepción y lactancia.

**Tabla 1. Niveles de BPA reportados.**

<b>Fuente de BPA</b>	<b>Dosis ingerida de BPA vía oral en humanos</b>	<b>Reportado por</b>
Latas de conserva	3,8 $\mu\text{g}/\text{día}$	Miyamoto y Kotake (2006)
Envases plásticos	0,14 $\mu\text{g}/\text{día}$	Li y col. (2010)
Selladores dentales	3,98ng/ml en saliva recolectada 3hs después de la aplicación de selladores dentales	Zimmerman-Downs y col. (2010)

En los años ochenta, el Programa Nacional de Toxicología (National Toxicology Program -NTP) de Estados Unidos concluyó que la dosis de BPA con la cual se observaban los menores efectos correspondía a 50 mg/kg/día (denominada: “dosis LOAEL”, del inglés: *Lowest Observed Adverse Effect Level*). Según estos datos y diversos análisis realizados por la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (U.S. Food and Drug Administration -FDA-) y la EPA, se estableció como valor de exposición “segura” a BPA, a una dosis de 50  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  (U.S. Environmental Protection Agency 1993), es decir, 1000 veces menor que la LOAEL. Esta dosis de referencia continúa siendo el estándar de seguridad actual para exposiciones diarias a BPA (Rubin, 2011).

Actualmente, numerosos estudios alertan sobre una amplia variedad de efectos adversos con exposición a dosis menores a las establecidas por la NTP. En roedores, se encontraron alteraciones en ovario (Kato y col., 2003), modificaciones en el peso corporal y adelantamiento de la pubertad (Kato y col., 2003; Rubin y col., 2001), alteraciones del eje hipotálamo-hipofiso-gonadal y ciclos estrales irregulares (Markey y col., 2002; Monje y col., 2009). Además, en nuestro grupo de trabajo, hemos observado una asociación entre exposición perinatal a BPA y alteraciones en las glándulas prostática y mamaria, el cerebro, el ovario y el útero de roedores (Bosquiazzo y col., 2010; Durando y col., 2011; Durando y col., 2007; Kass y col., 2014; Monje y col., 2007; Monje y col., 2009; Ramos y col., 2003; Ramos y col., 2001; Rodriguez y col., 2010; Santamaria y col., 2016; Varayoud y col., 2008; Varayoud y col., 2014; Vigezzi y col., 2015; Vigezzi y col., 2016), efectos de reversión sexual en una especie de la fauna como el *Caiman latirostris* (Stoker y col., 2008; Stoker y col., 2003), y alteraciones en el desarrollo folicular y la esteroidogénesis en especies de interés zootécnico (Rivera y col., 2011; Rivera y col., 2015). Otros estudios, utilizando modelos de exposición prenatal a BPA, demostraron que roedores hembras presentaban -durante el estro- cambios morfológicos y en la expresión de receptores hormonales (RE $\alpha$  y RE $\beta$ ) en los compartimientos epitelial y/o estromal del útero (Markey y col., 2005; Schonfelder y col., 2004). En la Figura 16 se muestran alteraciones en algunos tejidos y órganos de animales expuestos a BPA, reportadas por nuestro grupo de trabajo.



**Figura 16. Efectos de la exposición temprana a BPA sobre la histoarquitectura y funcionalidad de distintos tejidos.** (1) Whole mount de glándula mamaria (GM) de ratas machos (1A) control y (1B) expuestas a BPA de 30 días de edad. La exposición a BPA indujo un retraso en el crecimiento ductal en la GM. El asterisco indica la GM N°5. LN: nódulo linfático; N: pezón. Barra=1000 $\mu$ m. (2) Próstata ventral de ratas (2A) control y (2B) expuestas a BPA presentando cambios en el fenotipo del estroma periductal de la próstata ventral con aumento de la expresión de vimentina alrededor del ducto (B, flechas). (3) La exposición a BPA indujo diferentes tipo de glándulas uterinas en ratas adultas: incluyendo (3A) glándulas con metaplasia escamosas (flecha) y glándulas normales (punta de flecha); y (3B) glándulas con células anormales. Barra=50 $\mu$ m. (4) Cuernos uterinos de ratas (4A) control y (4B) expuestas a BPA, en el día 18 de gestación. La exposición a BPA produjo una disminución del n° de sitios de implantación. Las flechas negras indican los sitios de implantación y las blancas los sitios de reabsorción. Tomado y modificado de (1) Kass y col. (2014), (2) Ramos y col. (2001), (3) Vigezzi y col. (2015), (4) Varayoud y col. (2011).

El mecanismo por el cual el BPA es capaz de inducir anormalidades en los tejidos sensibles a estrógenos (Eg) es desconocido, sin embargo, actualmente está cobrando gran importancia la hipótesis de que el BPA podría estar interfiriendo con el programa epigenético normal durante el desarrollo perinatal, provocando alteraciones en la transcripción o la regulación de genes específicos con consecuencias adversas que persisten a lo largo de la vida (Bernal y Jirtle, 2010; Kundakovic y Champagne, 2011). El epigenoma es particularmente vulnerable a desregulación durante la embriogénesis debido a que los patrones de metilación o modificación de histonas necesarios para el normal desarrollo de los tejidos, se programan durante el desarrollo temprano (Dolinoy, 2007). De este modo el BPA podría interferir con los mecanismos de señalización endocrina durante etapas críticas del desarrollo, en las cuales los órganos Eg-sensibles son particularmente susceptibles o vulnerables a la acción de Eg y/o andrógenos exógenos (Yoshida y col., 2002). Los efectos de la exposición temprana a BPA podrían ponerse de manifiesto durante la adultez cuando los órganos hormonodependientes son expuestos a situaciones endocrinas particulares como ser la gestación o el tratamiento exógeno con hormonas.

Son numerosos los antecedentes que señalan a diversos órganos como blanco de perturbación endocrina. Entre estos se encuentra la glándula mamaria, un órgano que a lo largo de su desarrollo sufre cambios funcionales y morfológicos, regulados en gran parte por el sistema endocrino (Eg, P4 y/o PRL), haciendo de ésta un interesante modelo para evaluar los efectos de los PEs.

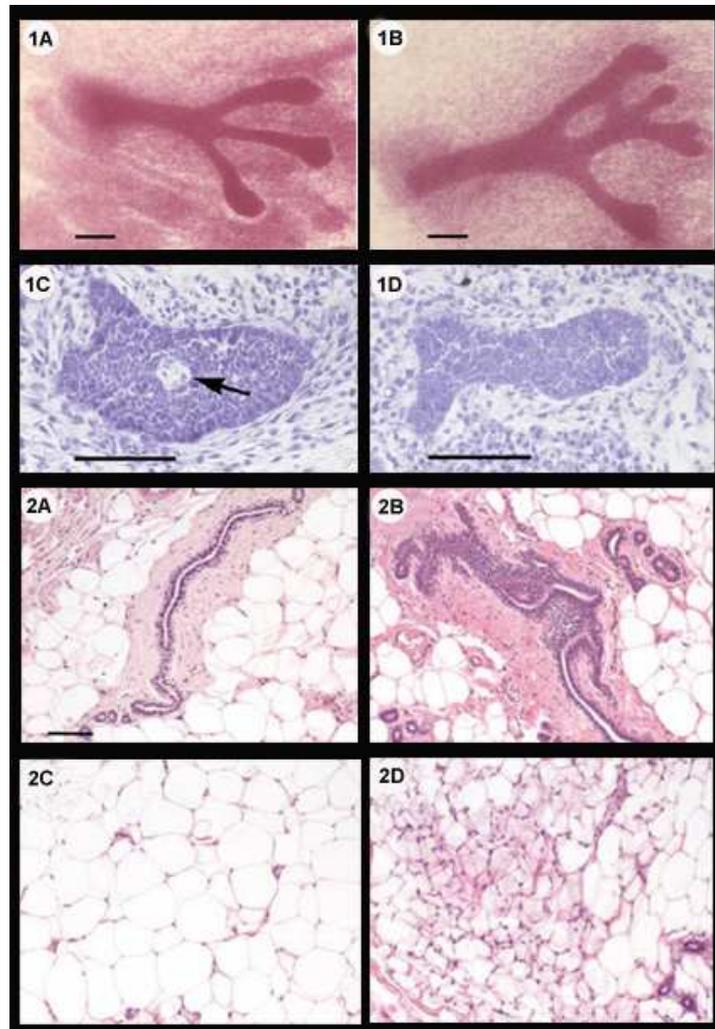
Estudios previos han demostrado que la exposición a BPA modifica la histoarquitectura de la glándula mamaria, induciendo una alteración en la tasa de maduración mamaria, una tardía formación del lumen alveolar, un incremento tanto en el crecimiento ductal como en la respuesta secundaria a los estrógenos y un aumento en la susceptibilidad a la carcinogénesis mamaria en roedores (Betancourt y col., 2010; Durando y col., 2007; Jenkins y col., 2009; Muñoz-de-Toro y col., 2005). Estos hallazgos sugieren que la exposición a BPA durante el desarrollo puede predisponer a padecer cáncer de mama (Durando y col., 2007; Jenkins y col., 2009).

La mayoría de los estudios enfocados a analizar los efectos de la exposición a xenoestrógenos durante periodos críticos de la organogénesis mamaria están orientados hacia el desarrollo tumoral y no hacia la diferenciación del órgano. Sin embargo, un estudio ha reportado que la exposición a dioxina durante la gestación afecta negativamente la diferenciación de la glándula mamaria y deteriora la habilidad, de las madres expuestas, de producir la cantidad de leche y de proteínas de la leche necesarias para mantener a sus crías (Vorderstrasse y col., 2004). Por otro lado, la ganancia de peso de las crías cuyas madres fueron expuestas a atrazina durante la gestación fue significativamente menor, sugiriendo que dichas madres lactantes fueron incapaces de proveer una manutención nutricional adecuada luego del tratamiento con atrazina (Rayner y col., 2005).

Como se mencionó anteriormente, la leche es la única fuente de alimentación del recién nacido, por lo tanto debe contener todos los nutrientes esenciales para su normal crecimiento y desarrollo (Collier, 1999). Sin embargo, la composición de la leche depende, por un lado, de un correcto desarrollo alveolar, diferenciación bioquímica y estructural de las células alveolares y la síntesis y secreción de los constituyentes de la leche (Akers, 1999; Brisken y Rajaram, 2006) y por otro, del medio ambiente, edad y dieta de la madre (Collier, 1999). Por lo tanto, cualquier interferencia, relacionada con xenoestrógenos, con el crecimiento y diferenciación de la glándula mamaria podría alterar el desempeño de la lactancia de las madres expuestas.

Además de las hormonas, las señales convergentes derivadas de la matriz extracelular actúan sobre la diferenciación alveolar.  $\beta$ 1-integrina es crucial para el desarrollo de la glándula mamaria y la función celular epitelial (Naylor y col., 2005). La exposición *in utero* a bajas concentraciones de BPA en embriones de rata de 18 días reveló alteraciones en el grado de maduración tanto del epitelio como del estroma (Vandenberg y col., 2007). En dicho estudio se postula que los cambios en el estroma periductal primario pueden ser responsables del crecimiento alterado y el retraso de la formación del lumen registrado en los conductos (Figura 17 1A-D) (Soto y col., 2013). Por otro lado, la exposición prenatal a BPA no solo induce lesiones pre-neoplásicas en la glándula mamaria sino que también modifica la composición del estroma de la glándula

mamaria en ratas adultas de 110 y 180 días de edad (Figura 17 2A-D). La distribución de las fibras de colágeno y la maduración de los adipositos y fibroblastos en la glándula fueron alterados en roedores expuestos *in utero* a BPA (Durando y col., 2007).



**Figura 17. Efectos de la exposición a bajas dosis de BPA sobre la glándula mamaria. (1)** Efectos de la exposición a 250 ng BPA/kg/día en embriones de ratones de 18 días (E18). Whole mounts de la glándula mamaria inguinal de embriones controles (**1A**), y expuestos a BPA (**1B**). Los cordones epiteliales aumentan en tamaño, comparado con los controles. La formación del lumen en la glándula mamaria de ratones E18 es inhibida por el tratamiento con BPA. La formación del lumen (flecha) fue observada en el 38% de los animales controles (**1C**), pero en ninguna de las secciones histológicas de animales expuestos a BPA (**1D**). Barra= 100 µm. (2) Imágenes representativas de la histoarquitectura de la glándula mamaria de ratas hembras adultas (110 días) expuestas *in útero* a 25 µg BPA /kg/día. Se muestra la diferencia entre los conductos normales en los controles (**2A**), y los conductos hiperplásicos en animales expuestos a BPA (**2B**). El estroma de la glándula mamaria control (**2C**) contiene principalmente células adiposas, con pocos fibroblastos o vasos sanguíneos. El tratamiento con BPA (**2D**) indujo un aumento en la densidad nuclear en el compartimiento estromal. Barra = 75 µm. Tomado y modificado de (1) Vandenberg y col. (2007) y (2) Durando y col. (2007)

La diferenciación mamaria depende de una correcta comunicación entre el epitelio y el estroma, especialmente con la membrana basal. Por tanto, ante la presencia de un estroma más rígido el desarrollo alveolar se vería comprometido resultando en una modificación en la capacidad funcional del órgano de sintetizar y secretar leche. Asimismo, la expresión de  $\beta$ -Cas en respuesta al estímulo hormonal lactogénico, solo ocurre cuando las células alveolares son cultivadas en geles de colágeno flotante (Keely y col., 1995; Parry y col., 1985). Por lo tanto, en base a los antecedentes expuestos y a la vía y período de exposición más común a los estrógenos ambientales durante la organogénesis de la glándula mamaria, nos propusimos estudiar la influencia de la exposición perinatal a BPA y DES sobre la capacidad de sintetizar y/o secretar los componentes de la leche.

# ***CAPÍTULO 2***

## ***OBJETIVOS***

---

*“Nunca es igual saber la verdad por uno mismo que tener que escucharla por otro”*

*Aldous Huxley*

## 1 | Objetivo general.

---

Nuestra hipótesis supone que la exposición a bajas concentraciones de estrógenos ambientales durante períodos críticos de la organogénesis de la glándula mamaria, modifica su desarrollo afectando a largo plazo la composición de la leche materna. Para poner a prueba esta hipótesis, se evaluó la influencia de la exposición perinatal (gestación + lactancia) a los estrógenos ambientales BPA y DES sobre la síntesis, composición y producción de leche materna durante la gestación y lactancia.

### 1.1 | Objetivos específicos.

*Utilizando crías F1 que fueron perinatalmente expuestas a BPA y DES se evaluaron:*

- 1) la performance reproductiva y el microambiente endócrino de la glándula mamaria durante la preñez:** identificando alteraciones ováricas/uterinas que puedan llevar a modificaciones funcionales de la glándula mamaria (i.e.: cuerpos lúteos, sitios de implantación) y modificaciones en los niveles séricos de E2, P4, PRL y la expresión de los RE $\alpha$  y RE $\beta$ , RP y RPRL en la glándula mamaria.
- 2) el desarrollo alveolar durante la gestación y lactancia:** la histomorfología de la glándula mamaria fue analizada en diferentes días de gestación y lactancia, se evaluaron entre otros el estroma mamario, el perímetro y diámetro alveolar (demarcado por la inmunomarcación de las células mioepiteliales) y la presencia de vacuolas intracitoplasmáticas y de secreción en el lumen alveolar.
- 3) la síntesis y secreción de los componentes de la leche durante la gestación y lactancia:** la composición del glóbulo graso y la síntesis *de novo* de AGs durante la lactogénesis se analizaron por RT-PCR en tiempo real a través de la expresión del ARNm de las proteínas asociadas a la membrana del glóbulo graso (i.e.: butirofilina, adipofilina, xantina oxidasa), enzimas esenciales para la síntesis *de novo* de AGs (i.e.: acetil-CoA carboxilasa, sintetasa de ácidos grasos) y del marcador de tejido adiposo perilipina. La estructura de los glóbulos grasos se evaluó en muestras procesadas para cortes con crióstato. Además, se

cuantificaron la expresión de las proteínas de la leche  $\alpha$ -Lactalb y  $\beta$ -Cas por inmunofluorescencia, western-blot y RT-PCR en tiempo real.

- 4) la producción y calidad nutricional de la leche determinado su composición:** la producción de leche se analizó realizando curvas de ganancia de peso de las crías F2 lactantes y cuantificando a lo largo de la gestación la cantidad de leche generada por la madre en una unidad de tiempo determinada. En muestras de leche en diferentes días de lactancia se evaluaron el contenido de  $\alpha$ -Lactalb y  $\beta$ -Cas por western-blot, proteínas totales, lípidos totales, colesterol y TGs por métodos químicos. Por otro lado, se cuantificó la composición de los TGs secretados a través de la medición de AGs por cromatografía gaseosa.
- 5) los potenciales mecanismos de acción de los estrógenos ambientales sobre la funcionalidad de glándula mamaria.** Se utilizaron diferentes metodologías tales como inmunoprecipitación de cromatina y análisis de metilación de ADN genómico (mediante PCR específica de metilación) para caracterizar las posibles modificaciones en la expresión génica resultantes de la exposición perinatal a BPA.

# ***CAPÍTULO 3***

## ***MATERIALES Y MÉTODOS***

---

*“Nuestra recompensa se encuentra en el  
esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total  
es una victoria completa”*

*Mahatma Gandhi*

## ***1 | Animales***

---

El protocolo experimental fue diseñado de acuerdo a 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 de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL. Se utilizaron ratas hembras adultas de cepa Wistar pertenecientes a la Cátedra de Fisiología Humana de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL. Los animales fueron mantenidos en condiciones controladas ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  y 14 hs de luz) y tuvieron libre acceso a agua y comida (Nutrición Animal, Rafaela, Argentina). Para mayor información sobre la composición del alimento ver Tabla S1 en el Anexo I (Andreoli y col., 2015; Kass y col., 2012). Para reducir al mínimo la exposición a otros productos químicos con actividad estrogénica, los animales fueron alojados en jaulas de acero inoxidable con camas de viruta de madera previamente esterilizada (Centro de Medicina Comparada, Instituto de Ciencias Veterinarias -ICIVET, UNL-CONICET); y tanto el agua como el tratamiento fueron provistos en mamaderas de vidrio con tetinas de acero inoxidable.

### ***1.1 | Procedimiento experimental***

Ratas hembras que se encontraban en la fase de proestro del ciclo estral (Montes y Luque, 1988) fueron colocadas con machos de fertilidad comprobada. El día en el cual se encontraron espermatozoides en el extendido vaginal fue considerado DG1. En DG9, correspondiente al comienzo de la organogénesis del feto, las hembras preñadas F0 fueron pesadas y se inició el tratamiento con BPA y DES.

#### ***1.1.1 | Preparación de soluciones***

Las dosis fueron calculadas teniendo en cuenta el peso (250 g) y consumo de agua (50 ml) promedio de las hembras preñadas de la colonia durante la gestación y lactancia. Las soluciones stock de BPA (25 mg/ml, 99% pureza, Sigma-Aldrich, Argentina) y DES (25 mg/ml, Sigma-Aldrich) fueron disueltas en etanol (Merck Chemistry Argentina, Argentina) e inmediatamente antes de su administración fueron diluidas en

agua para alcanzar las concentraciones finales de 2.5 µg BPA/l, 250 µg BPA/l o 25 µg DES/l correspondientes a las dosis teóricas de: a) 0.5 µg BPA/kg/día, b) 50 µg BPA/kg/día y c) 5 µg DES/kg/día, respectivamente. El grupo control fue expuesto a una solución de vehículo (0.001% etanol en agua). Las botellas conteniendo el tratamiento en el agua de bebida fueron lavadas y rellenadas con soluciones frescas dos veces por semana.

### ***1.1.2 | Diseño experimental***

En DG9, las madres F0 fueron asignadas al azar a los siguientes grupos experimentales (identificados de acuerdo a la dosis real recibida por los animales, ver más adelante): a) 0.6 µg BPA/kg/día (BPA0.6); b) 52 µg/kg/día (BPA52); c) 5 µg/kg/día (DES5) y d) %0.002 etanol (control); se incluyeron entre 10-12 animales por grupo experimental. Todos los tratamientos fueron administrados en el agua de bebida de madres F0 desde el DG9 hasta el destete (DPN21). Para determinar la dosis administrada, los pesos corporales individuales y el consumo de agua de las madres F0 fueron registrados dos veces a la semana a lo largo del tratamiento (Tabla 2). La dosis alta de BPA utilizada en este experimento fue equivalente a la dosis segura (50 µg/kg/día) establecida por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (Richter y col., 2007), y la otra dosis fue cien veces menor (BPA0.6). En nuestro experimento DES será utilizado como control positivo de perturbación endócrina, para asegurarnos que nuestro modelo animal es sensible a un químico de acción estrogénica. Por lo tanto, la dosis de DES (5 µg/kg peso corporal/día) fue seleccionada basándonos en: (a) la limitada literatura sobre el tratamiento oral con DES (Maranghi y col., 2008), (b) las dosis que interfieren en el desarrollo del tracto reproductor femenino y masculino sin producir toxicidad maternal o embrionaria (Kubo y col., 2003), (c) el menor rango de uso terapéutico al que el humano se encuentra expuesto (Hammes y Laitman, 2003), y la dosis considerada consistente con el consumo humano de perturbadores endócrinos en la dieta y/o el medio ambiente (Maranghi y col., 2008).

**Tabla 2. Consumo de BPA y DES diario por madres F0**

	Control	BPA0.6	BPA52	DES5
Concentración en agua de bebida ( $\mu\text{g/l}$ )	0	2.5	250	25
Consumo de agua ( $\text{ml/día}$ )	51.56 $\pm$ 5.23	55.46 $\pm$ 3.87	52.04 $\pm$ 3.23	52.47 $\pm$ 1.70
Peso corporal F0 (g)	255.78 $\pm$ 4.13	253.30 $\pm$ 3.61	250.14 $\pm$ 3.19	257.07 $\pm$ 5.77
Dosis promedio ( $\mu\text{g/kg/día}$ )	0	0.55 $\pm$ 0.03	52.20 $\pm$ 3.58	5.11 $\pm$ 0.16

El peso corporal y el consumo de agua fueron registrados dos veces a la semana a lo largo del tratamiento. Los valores se expresaron como valores medio  $\pm$  SEM de 8-10 madres F0/grupo.

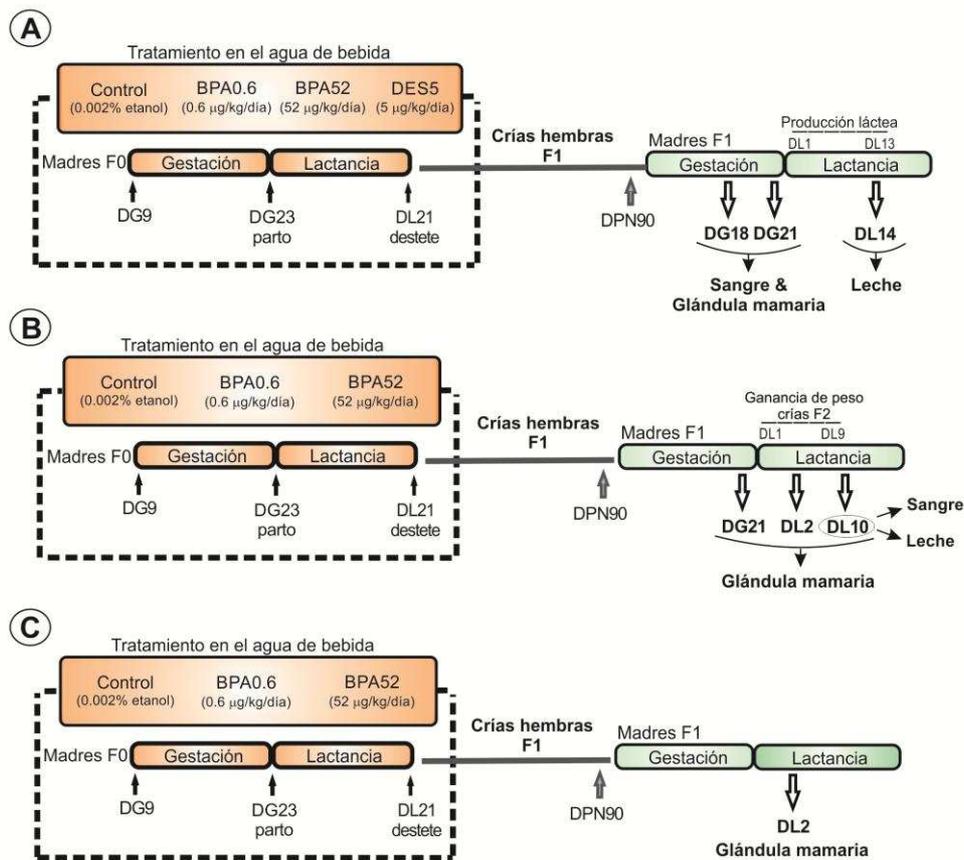
Luego del parto [Día de lactancia 0 (DL0)], las crías F1 fueron pesadas y sexadas de acuerdo a la distancia anogenital; se dejaron camadas de ocho crías (preferentemente cuatro machos y cuatro hembras) con sus madres lactantes F0 hasta el día del destete en DL21. Al destete, las crías hembras (F1) (expuestas a los estrógenos ambientales a través de la placenta y la leche) fueron transferidas a un ambiente libre de BPA y DES hasta el final del experimento. Las crías hembra F1 expuestas durante la gestación-lactancia fueron apareadas a los 90 días de edad con machos de fertilidad comprobada (n=8-10 ratas/grupo/día experimental). Una vez confirmada la preñez, las hembras F1 preñadas de cada grupo experimental fueron distribuidas en tres experimentos diferentes teniendo en cuenta los siguientes objetivos:

**A) *Evaluar los efectos de la exposición perinatal a BPA o DES sobre la diferenciación funcional de la glándula mamaria durante la gestación y la performance láctea durante la lactancia.*** Un grupo de hembras F1 de cada grupo experimental fue sacrificado entre las 11:00 am - 12:00 pm del DG18 o DG21 obteniéndose muestras de sangre y glándula mamaria en cada día experimental. A otro grupo de madres F1 preñadas se les permitió completar la gestación (n= 10-12 madres/grupo), en día postnatal 0 (2 hs luego de que la última cría fue parida) se registraron el número y peso corporal de las crías F2, y se ajustaron las camadas a 8 crías F2/madre F1. En estas madres F1 la producción láctea fue evaluada a lo largo de la lactancia y, en DL14 se obtuvieron muestras de leche para cuantificar la concentración proteica en la misma (Figura 18A).

**B)** *Evaluar los efectos de la exposición perinatal a BPA sobre la diferenciación de la glándula mamaria durante la gestación y la lactancia y la composición lipídica de la leche.* Hembras F1 de cada grupo experimental fueron sacrificadas entre las 11:00 am - 12:00 pm del DG21, DL2 o DL10 obteniéndose muestras de glándula mamaria, y sangre y leche en DL10, o fueron utilizadas para el análisis de la ganancia de peso de las crías F2 durante la primera mitad de la lactancia (DL1-DL9) (Figura 18B).

**C)** *Para estudiar si la exposición a BPA altera la expresión de  $\beta$ -Cas y su regulación transcripcional.* Madres F1 de cada grupo experimental fueron sacrificadas entre las 11:00 am - 12:00 pm del DL2 obteniéndose muestras de sangre y glándula mamaria (Figura 18C).

Las hembras F1 expuestas restantes y todos los machos fueron asignados a otros experimentos.



**Figura 18.** Esquemas del tratamiento experimental utilizado para estudiar los efectos de la exposición perinatal (gestación + lactancia) a xenoestrógenos sobre: (A) la diferenciación

funcional de la glándula mamaria durante la gestación y la producción láctea; **(B)** la diferenciación funcional de la glándula mamaria durante la gestación y lactancia, y la composición de los lípidos de la leche; y **(C)** la regulación de  $\beta$ -Cas y su regulación transcripcional. F0, F1 y F2 indican las distintas generaciones de animales utilizados en el desarrollo del trabajo. DG: día de gestación; DL: día de lactancia; DPN: día postnatal.

## **2 | *Obtención de muestras.***

---

### **2.1 | *Muestras de sangre***

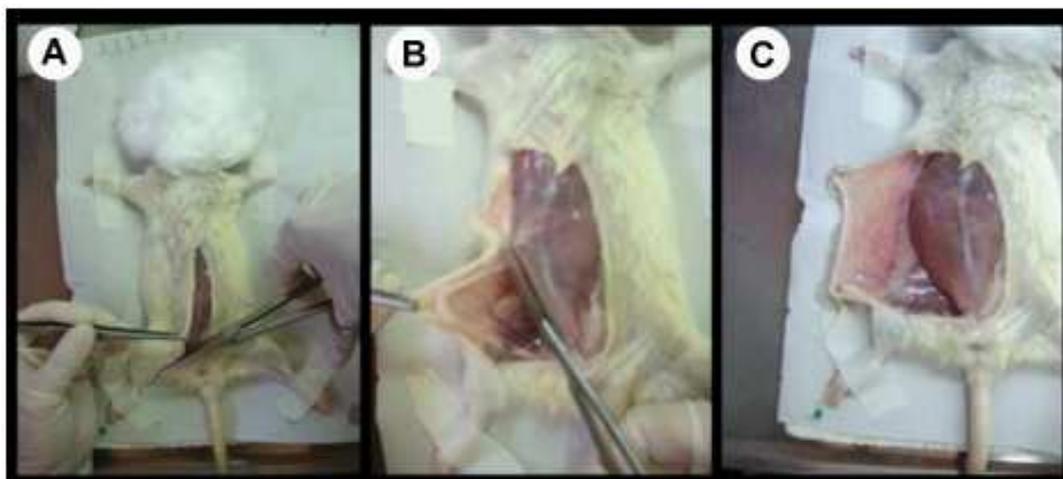
Las muestras de sangre fueron recolectadas en tubos de vidrio. Para facilitar la retracción del coágulo los tubos se incubaron por 15 min en estufa a 37°C y luego de centrifugarlos se separó el suero que fue conservado a -80°C hasta el momento del dosaje hormonal por radioinmunoensayo (RIA, Radio Immuno Assay) o la determinación de la concentración de glucosa, colesterol y triglicéridos por métodos enzimáticos (Wiener Laboratorios SAIC, Rosario, Argentina).

### **2.2 | *Muestras de leche***

Las muestras de leche fueron obtenidas de madres F1 lactantes, en DL10 para cuantificación de lípidos y en DL14 para cuantificación de proteínas. Brevemente, luego de retirar todas las crías F2, las madres (F1) fueron alojadas en una jaula con ambiente controlado durante 1 hora. Los animales fueron anestesiados utilizando la mezcla de anestesia disociativa: ketamina (50 mg/ml, Holliday Scott, San Isidro, Buenos Aires, Argentina), Acepromacina maleato (ACEDAN. 10 mg/ml, Holliday Scott) y Xilazina (20 mg/ml, Koning LK, Avellaneda, Buenos Aires, Argentina) en una relación 50:5:1. Luego, 10UI de OT (BIOL, Florencio Varela, Argentina) fue administrada en la cavidad peritoneal (i.p.). Diez minutos después de la inyección, los pezones fueron calentados con algodón empapado en agua tibia, y la leche expulsada fue recolectada por aspiración con micropipeta. Las muestras de leche (aproximadamente 600  $\mu$ l/rata) fueron congeladas para su posterior análisis (n=10-12 animales/tratamiento).

### 2.3 | Mastectomía

Los animales se sacrificaron por decapitación, luego se colocaron sobre una tabla de disección con el abdomen hacia arriba y se desinfectó con alcohol 70° el campo quirúrgico. Las glándulas mamarias N° 4 y 5 se identificaron a través de la ubicación de sus correspondientes pezones, se realizó una incisión en la línea media del abdomen y dos cortes perpendiculares al anterior: uno por debajo del pezón N° 6 y el otro a la altura del diafragma (estos cortes permiten extraer las glándulas mamarias y separarlas tanto de la piel como del músculo abdominal). Posteriormente, se separó la glándula mamaria N° 4 que está adherida a la piel del músculo subyacente y se fijó la piel a la tabla de disección para facilitar la separación de la mama de la piel. Con ayuda de una tijera de punta roma, se separó la piel del tejido muscular subyacente quedando expuesta la cadena abdomino-inguinal (N° 4, 5 y 6) (Figura 19). Una de las glándulas N°4 fue fijada en formol buffer al 10% (v/v) y embebida en parafina. La glándula contralateral fue congelada en nitrógeno líquido y mantenida a -80°C para su posterior análisis mediante diferentes técnicas de biología molecular.



**Figura 19. Mastectomía.** (A) Luego del corte ventro-medial inicial, se realiza un nuevo corte oblicuo al primero. (B) La cadena mamaria dispuesta subcutáneamente es desprendida del músculo abdominal y (C) queda expuesta para su disección completa.

### 3 | *Procesamiento de muestras*

---

Las muestras de glándula mamaria obtenidas fueron procesadas de diferentes maneras de acuerdo a los siguientes propósitos:

- Estudios por microscopía óptica
- Estudios por western-blot
- Estudios por RT-PCR

#### 3.1 | *Estudios por microscopía óptica*

Las glándulas mamarias se fijaron durante 6 hs en formol buffer para mantener de forma definitiva las estructuras histológicas y citológicas de los tejidos. Luego se realizaron dos lavados con PBS (pH: 7.5) de 10 min cada uno y se mantuvieron los tejidos en una solución de alcohol 70°. Se procesaron por técnicas histológicas de rutina hasta su inclusión en parafina (Junqueira y Junqueira, 1983). Durante el protocolo de procesado, las muestras fueron deshidratadas en alcoholes de graduación creciente, debido a que la parafina (sustancia donde finalmente quedará incluido el tejido) es inmisible en agua. El alcohol presente en los tejidos, fue sustituido por un solvente (no acuoso) miscible en parafina fundida, en nuestro caso xilol. Las muestras embebidas en este solvente se tornaron traslúcidas, debido a lo cual este proceso es denominado “aclaramiento”. La inclusión en parafina consistió en colocar la muestra dentro de un frasco que contenía parafina fundida, en estufa a 60°C. El calor provocó la evaporación de los restos del solvente (xilol) y de esta forma, los espacios ocupados por éste fueron impregnados por la parafina. Luego se colocó la muestra en un recipiente con parafina fundida y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Esto permitió obtener un bloque de parafina denominado “taco” con el tejido en su interior. Obtenido el taco, se realizaron cortes histológicos seriados de 5 µm de espesor en micrótomo (Leica, Jung RM2025, Leica Instruments GMT, Nussioch, Alemania) que se montaron en portaobjetos pretratados con adhesivo tisular (3-aminopropil trietoxysilano, Sigma-Aldrich) y se secaron en estufa a 37°C durante 24 hs. Estas muestras fueron utilizadas para analizar la histomorfología mamaria así como también para Inmunohistoquímica (IHQ) e Inmunofluorescencia (IF), lo cual permitió determinar la expresión de diferentes proteínas.

### 3.2 | *Estudios por western-blot.*

Se realizaron extractos proteicos de glándulas mamarias obtenidas en condiciones estériles y mantenidas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para analizar la expresión proteica de los marcadores de diferenciación celular  $\beta$ -Cas y  $\alpha$ -Lactalb mediante ensayos de western-blot.

#### 3.2.1 | *Extracción de proteínas.*

Las muestras fueron procesadas siguiendo una metodología descrita previamente en nuestro laboratorio (Rodríguez y col., 2003). Brevemente, la homogeneización se realizó en buffer RIPA [Nonidet P40 1%, deoxicolato de sodio 0,5%, duodecil sulfato de sodio (SDS) 0,1%, EDTA 2 mM, fluoruro de sodio 50 mM; todos de Sigma-Aldrich] conteniendo inhibidores de proteasas (Complete Mini, Protease Inhibitor Cocktail Tablet, Roche Diagnostics GMBH, Germany) en buffer PBS, 0,1 M pH: 7,00. El tejido fue homogeneizado con un homogeneizador Ultra-Turrax T25 Basic (IKA- Werke GMBH & Co.KG, Staufen, Germany), el homogenato fue incubado en hielo por 30 min y centrifugado a 14000 rpm durante 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se guardó a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La concentración de proteínas se determinó usando una reacción colorimétrica que se basa en la reducción de catión cúprico ( $\text{Cu}^{+2}$ ) a catión cuproso ( $\text{Cu}^{+1}$ ), por las proteínas presentes en la muestra, en un medio alcalino con la detección colorimétrica (altamente sensible y selectiva) del  $\text{Cu}^{+1}$  por el ácido bicinconínico (BCA Protein Assay, Pierce Chemical Co., Rockford, IL).

### 3.3 | *Estudios por RT-PCR.*

Las cadenas mamarias abdomino-inguinales (sin el ganglio linfático) fueron disecadas en condiciones estériles, congeladas rápidamente en  $\text{N}_2$  líquido y conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Estas muestras fueron utilizadas para la extracción de ARN total con el objetivo de obtener ADN copia (ADNc) por retrotranscripción (RT) y emplearlo posteriormente en técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

### **3.3.3.1 | Extracción de ARN total**

La extracción de ARN total se realizó utilizando el reactivo comercial “TRIZol Reagent” (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina), que se fundamenta en el método de isotiocianato de guanidina-fenol-cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 1987). Básicamente, en el contenedor del homogeneizador Ultra Turrax<sup>®</sup> T25 Basic (IKA - Werke GMBH & Co.KG, Staufen, Germany) se agregaron 1000 µl del reactivo TRIZol por cada 50-100 mg de tejido congelado, y se homogeneizó suavemente. Durante la homogeneización de la muestra el reactivo preservó la integridad del ARN. El agregado de cloroformo y posterior centrifugación, separó la solución en una fase acuosa y otra fase orgánica. El ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa, de donde fue recuperado por precipitación con alcohol isopropílico, lavado con etanol al 80% y solubilizado en agua libre de ribonucleasas. La concentración de ARN total en las muestras procesadas se determinó mediante la lectura en espectrofotómetro (Bio Photometer Plus, Eppendorf) a una longitud de onda de 260 nm. Se usó como referencia de la pureza del ARN extraído, la relación entre las absorbancias obtenidas a 260 nm (punto de máxima absorción de ácidos nucleicos) y 280 nm (punto de máxima absorción de proteínas), utilizándose solamente aquellas muestras con una relación de absorbancia 260/280 mayor a 1,9. Los ARN obtenidos fueron conservados a -80°C hasta su utilización. A partir de cada ARN extraído se realizó una RT con el fin de obtener el correspondiente ADNc.

## **4 | Evaluación de la histología de la glándula mamaria.**

---

Para el estudio histológico, secciones de 5µm de espesor de glándula mamaria embebidas en parafina se colorearon con hematoxilina y eosina (H&E) para el análisis por microscopía óptica (Olympus BH2, Tokio, Japón). Para la coloración con H&E los cortes histológicos se desparafinaron e hidrataron en soluciones de alcoholes de graduación decreciente, se colorearon con hematoxilina de Mayer (1 min) y eosina (30 s) y posteriormente se deshidrataron. Las secciones de tejido coloreadas se montaron usando un líquido de montaje permanente (Eukitt, Sigma-Aldrich).

## 5. | *Evaluación de la expresión de proteínas en la glándula mamaria.*

---

### 5.1 | *Técnicas de IHQ*

#### 5.1.1 | *Inmunoperoxidasa*

La técnica IHQ se realizó siguiendo un protocolo previamente publicado utilizando el método estreptavidina-biotina peroxidasa (Muñoz de Toro y col., 1998), con pequeñas modificaciones para cada marcador evaluado. Previo a cada paso de la técnica se lavaron las muestras en PBS y salvo expresa consideración el protocolo seguido fue:

- Desparafinización e hidratación de los cortes histológicos
- Pretratamiento en horno microondas (HM), sumergiendo las muestras en 0,01M Buffer Citrato pH 6,0.
- Bloqueo de la actividad endógena de peroxidasa, sumergiendo las muestras durante 15 min en una solución al 3% de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30 volúmenes (vol) en metanol absoluto.
- Bloqueo de los sitios de unión no-específicos, incubando 30 min a TA con una solución de suero normal de cabra (NGS) al 5% adicionado con 1,5% de leche en polvo descremada (Sigma-Aldrich).
- Incubación con el anticuerpo primario en cámara húmeda durante toda la noche a 4°C.
- Incubación con el anticuerpo secundario biotilado durante 30 min a TA.
- Incubación con el complejo Extreptavidina-peroxidasa (Sigma-Aldrich) por 30 min a TA.
- Revelado de la reacción utilizando el siguiente sustrato: 2 mg/ml de Diaminobenzidina (DAB, Sigma-Aldrich) - 0,001% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en 0,05M Buffer Tris (pH 7,2) durante 10 min a TA.
- Contracoloración con Hematoxilina de Mayer y montaje con medio de montaje permanente (Eukitt, Sigma-Aldrich).

### 5.1.2 | *Inmunofluorescencia.*

Las secciones de tejido mamario fueron desparafinadas y deshidratadas en diferentes graduaciones de etanol. Previo a cada paso de la técnica se lavaron las muestras en PBS y salvo expresa consideración el protocolo seguido fue:

- Bloqueo de la autofluorescencia con 10 mg/ml de Borohidruro durante 40 min.
- Pretratamiento en horno microondas (HM), sumergiendo las muestras en 0,01M Buffer Citrato pH 6,0.
- Bloqueo de los sitios de unión no-específicos, incubando 1 hora a TA con una solución de suero normal de cabra (NGS) al 5% adicionado con 1,5% de leche en polvo descremada (Sigma-Aldrich).
- Incubación con el anticuerpo primario en cámara húmeda durante toda la noche a 4°C.
- Incubación con el anticuerpo secundario (Sigma-Aldrich) durante 1 hora a TA.
- Incubación con 4,6-diamidina-2-fenilindol (DAPI; Fluka, Sigma-Aldrich) durante 5 minutos en oscuridad.
- Montado con Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) y mantener en oscuridad a 4°C.

### 5.3. | *Western-blot*

Las proteínas se separaron por electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida-duodecil sulfato de sodio al 15% (PAGE-SDS, Bio-Rad Laboratories, CA, USA). Se sembró un pool de homogenatos de glándula mamaria equivalente a 25 µg de proteínas por calle. En cada corrida, se sembró también un patrón de peso molecular de amplio espectro (10-225 kDa, *Broad range protein molecular weight markers*, Promega). Una vez realizada la corrida electroforética, los geles fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad Argentina, Argentina) para realizar

western-blot. La transferencia se realizó durante aproximadamente 2 h en baño de hielo, a voltaje (V) constante de 100 V/h.

Una vez obtenidas las membranas, éstas fueron sometidas a tinción reversible con Ponceau S (Sigma-Aldrich) para detectar las bandas proteicas transferidas. Las membranas fueron incubadas con leche descremada 5% PBS durante toda la noche a 4°C con el objeto de bloquear las uniones inespecíficas. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 10 min en agitación con Tris buffer salino-Tween (TBST; Tris 25 mM, NaCl 0,14 M, Tween-20 0,05% v/v, pH 7,4) y se incubó 1,5 hs con el anticuerpo primario correspondiente. El revelado se realizó con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (LETH, FBCB, UNL) y la reacción fue visualizada utilizando DAB (Sigma-Aldrich).

## 6 | *Análisis de la expresión de ARNm mediante RT-PCR en tiempo real*

---

### 6.1 | *Transcripción reversa (RT)*

A partir de los ARN extraídos se realizaron transcripciones reversas con el fin de obtener los correspondientes ADNc.

La RT se llevó a cabo empleando cantidades iguales (4 µg) del ARN total y utilizando la enzima *M-MLV*\_transcriptasa reversa (*Moloney Murine Leukemia Virus*, 200U/µl, Promega, Madison, WI, USA). Se emplearon oligonucleótidos hexaméricos (1µg/µl, Promega) como cebadores. Al tubo de reacción se le adicionaron 40 U/µl de inhibidor de ARNasa (RNAout, Invitrogen) y 10 nmol de una mezcla de dNTP's (deoxinucleótidos trifosfatos) y se alcanzó un volumen final de 30 µl con la solución amortiguadora de la reacción provista por el fabricante de la enzima. La reacción de RT se realizó a 70°C por 5 min y 30 seg con la mezcla de los ARN y oligonucleotidos, luego se agregó el resto de los reactivos y se continuó la reacción a 37°C por 90 min y 42°C por 15 min. La reacción finalizó calentando a 80°C por 5 min y a 94°C por 30 segundos para posteriormente efectuar un enfriamiento a 25°C. Las reacciones de RT se llevaron a cabo en el termociclador T18 (IVEMA, Buenos Aires, Argentina).

Seguidamente se diluyó el ADN copia generado llevándolo a un volumen final de 60  $\mu$ l con agua libre de ARNasa. Como control negativo de la reacción se utilizó el ARN incubado en condiciones idénticas, pero sin transcriptasa reversa.

### 6.2 | *Reacción de la cadena de polimerasa (PCR) en tiempo real.*

Luego de realizada la extracción del ARN total y posterior RT, se determinó la expresión del ARN mensajero (ARNm) de diversos genes mediante ensayos de PCR en tiempo real utilizando el termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen, Tecnolab; Buenos Aires, Argentina). Esta metodología se basa en la detección y cuantificación ciclo a ciclo de una molécula fluorescente (en este caso se empleó Eva Green) que se intercala a las hebras de ADN doble cadena. La fluorescencia es detectada y leída por un fluorómetro acoplado al termociclador a medida que transcurre la reacción de PCR.

Todos los oligonucleótidos fueron diseñados utilizando el software Vector NTI Suite Versión 6.0 (Infomax Inc., North Bethesda, MD, USA). Como control interno (gen de referencia) se utilizó la determinación de ARNm del gen ribosomal L19. La temperatura de hibridación para cada amplicón se obtuvo a partir del análisis *in silico* usando el software Vector NTI. La especificidad de los oligonucleótidos fue cotejada por comparación directa de su secuencia contra el genoma completo de *Rattus norvegicus* mediante el uso de la herramienta BLAST disponible en la página web del *National Center for Biotechnology Information* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

Los tubos de reacción para la PCR en tiempo real se constituyeron con 5  $\mu$ l de ADNc que se combinaron con HOT-FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne; Biocientífica; Rosario, Argentina) y 10 pmoles de cada oligonucleótido en un volumen final de 20  $\mu$ l. El protocolo general de ciclado utilizado se muestra en la Tabla 3. La pureza de los productos obtenidos fue confirmada mediante curvas de disociación y electroforesis en geles de agarosa de muestras elegidas al azar en cada corrida. Controles sin ADNc fueron incluidos en todos los ensayos, los cuales no produjeron amplificación.

**Tabla 3. Protocolo general de ciclado de PCR en tiempo real**

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	N° de ciclos
Desnaturalización inicial	95	15 min	1
Desnaturalización	95	15 s	
Hibridación	Específica para cada amplicón	15 s	40
Extensión	72	15 seg	
Lectura	81	4 seg	
Incubación	10	10 min	1

El cálculo de los niveles de expresión relativa de cada muestra se realizó utilizando el método del ciclo umbral (Ct) (Higuchi y col., 1993). El valor de Ct para cada muestra se calculó utilizando el software Rotor-Gene Q Series (Versión 1.7, Qiagen; Tecnolab) con un umbral de ajuste de fluorescencia automática (Rn). La eficiencia (Ef) de la reacción de PCR para cada gen estudiado y para el gen de referencia (L19) fue calculada mediante curvas estándar. Estas curvas se construyen a partir de la amplificación de cada gen en diluciones seriadas de los ADNc. Luego, graficando el logaritmo de las diluciones de los ADNc vs. su correspondiente Ct, se obtiene la fórmula de la recta por regresión lineal a partir de la cual se calcula la Ef ( $Ef = 10^{(-1/pendiente)} - 1$ ). Dependiendo de las condiciones específicas de PCR, la Ef varió entre 98% y 102%. El posterior cálculo de los niveles de expresión relativa de cada gen en los animales tratados con respecto a los controles. En el primer experimento, se utilizó el software REST 2009 (del inglés: “Relative Expression software tool”, Qiagen) que compara grupos con diferente eficiencia de reacción y realiza un análisis estadístico de la expresión del gen en estudio en los grupos experimentales en relación al control mediante pruebas de aleatorización y proporciona un valor normalizado por condición experimental (Pfaffl y col., 2002). En los restantes experimentos, la expresión relativa de cada gen se realizó utilizando el método de la curva estándar relativa (Cikos y col., 2007). Para todas las muestras experimentales, la cantidad relativa del gen de interés y del gen L19 fue determinada a partir de la curva estándar previamente realizada para cada gen. La cantidad obtenida correspondiente al gen de interés fue normalizada con la cantidad relativa del gen L19 en cada grupo experimental.

### **6.3 | *Electroforesis en gel de agarosa***

Las electroforesis horizontales en geles de agarosa (concentraciones de agarosa entre 1% p/v y 3% p/v) se realizaron utilizando buffer Tris-acetato-EDTA (TAE) 1X como solución reguladora de electroforesis. El agente revelador utilizado fue Gelred<sup>®</sup> el cual se agregó al gel en una relación de 1µl de Gelred 1000X por cada ml de solución de gel. Las corridas se realizaron en una cuba de electroforesis horizontal Bio-Rad Power Pac<sup>®</sup> 300 manteniendo el voltaje constante a 70V hasta que todo el frente de corrida ingresara al gel, para luego subir el voltaje hasta 80V. Los geles fueron revelados en un transiluminador Fotodyne<sup>®</sup> Foto/UV<sup>®</sup> 1.

## ***CAPÍTULO 4***

# ***LA EXPOSICIÓN PERINATAL A XENOESTRÓGENOS MODIFICA LA DIFERENCIACIÓN FUNCIONAL DE LA GLÁNDULA MAMARIA Y LA COMPOSICIÓN PROTEICA DE LA LECHE EN RATAS WISTAR***

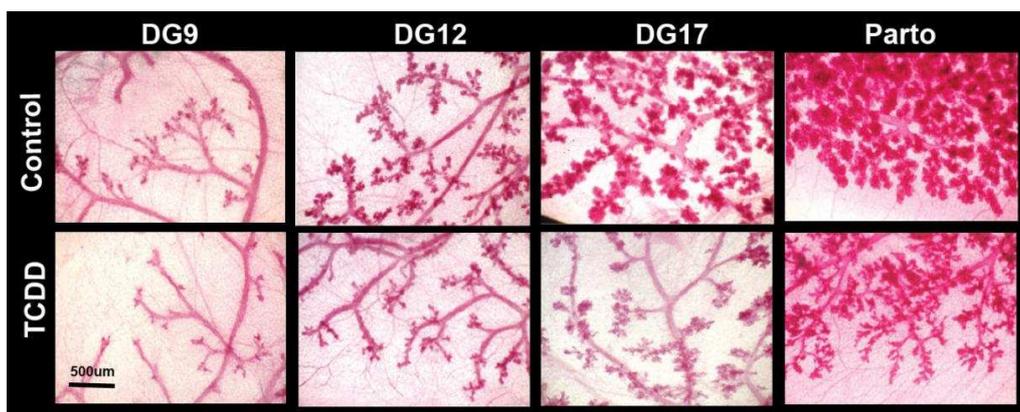
---

*“Una experiencia nunca es un fracaso,  
pues siempre viene a demostrar algo”*

*Tomas A. Edison*

1 | Introducción

En el capítulo 1 hemos descripto diversos efectos de la exposición a BPA sobre el desarrollo de la glándula mamaria: alteración en la tasa de maduración, retraso en la formación del lumen, incremento del crecimiento ductal y sensibilidad hacia una exposición estrogénica secundaria, así como también un aumento en la susceptibilidad a la carcinogénesis mamaria (Betancourt y col., 2010; Durando y col., 2007; Jenkins y col., 2009; Muñoz-de-Toro y col., 2005). Por otro lado, la exposición prenatal a DES induce la producción de tumores mamarios en crías hembras adultas de ratas ACI (Rothschild y col., 1987). Además, el tratamiento neonatal con una alta dosis de DES resulta en conductos mamarios con una dilatación extensiva y una precaria lactogénesis en ratas hembra nulíparas postpuberales (Hovey y col., 2005). Hasta el momento, los estudios sobre los efectos de la exposición perinatal a PEs sobre la glándula mamaria se han ocupado principalmente de aspectos relacionados con la morfogénesis y carcinogénesis mamaria, más que en evaluar efectos a largo plazo sobre la diferenciación de la glándula mamaria, producción láctea y calidad de la leche. Sin embargo, Vorderstrasse y col. (2004) reportaron que el tratamiento con dioxina (TCDD) durante la gestación afecta la diferenciación de la glándula mamaria de roedores (Figura 20), y perjudica la habilidad de las madres expuestas directamente (F0) a producir leche en cantidad suficiente, y con el contenido proteico adecuado, para sostener sus camadas.



**Figura 20.** Imágenes representativas de whole mount de glándulas mamarias de ratones hembra expuestas a TCDD durante la preñez. Ratonas preñadas de la cepa C57Bl/6J fueron expuestas por vía intragástrica a 5µg /kg de peso corporal en DG0, DG7 y DG14. La exposición a TCDD indujo una menor diferenciación del tejido mamario a lo largo de la gestación. Barra= 500 µm. Tomado y modificado de Vorderstrasse y col. (2004).

Previamente hemos mencionado que la leche es la única fuente de comida para los recién nacidos y, consecuentemente, debe contener todos los nutrientes claves para el normal crecimiento y desarrollo en la mayoría de los mamíferos. En esencia, la leche está compuesta por proteínas de la leche, glóbulos grasos de la leche, lactosa, calcio y agua (Farrel, 1999; Rosen y col., 1999; Teglund y col., 1998). Su composición depende de una correcta diferenciación tanto bioquímica como estructural de las células alveolares (Akers, 1999; Brisken y Rajaram, 2006). Además, se ha demostrado que los factores ambientales y la dieta de la madre afectan la composición de la leche (Collier, 1999), lo cual indicaría que el ambiente puede interferir con el crecimiento y la diferenciación de la glándula mamaria afectando luego la producción y composición de la leche. La exposición prenatal a BPA no solo induce lesiones pre neoplásicas en la glándula mamaria sino que también modifica la composición del estroma de la glándula mamaria de la rata (Durando y col., 2007; Vandenberg y col., 2007). Por lo tanto, en éste capítulo nos enfocamos en evaluar si la exposición perinatal (gestación + lactancia) a BPA o DES modifica la diferenciación histológica y/o funcional de la glándula mamaria de hembras F1, y si afecta la expresión de las proteínas de la leche,  $\beta$ -Cas y  $\alpha$ -Lactalb, durante la lactancia.

## **2 | *Objetivos específicos***

---

*Utilizando crías F1 que fueron perinatalmente expuestas a BPA y DES se evaluaron:*

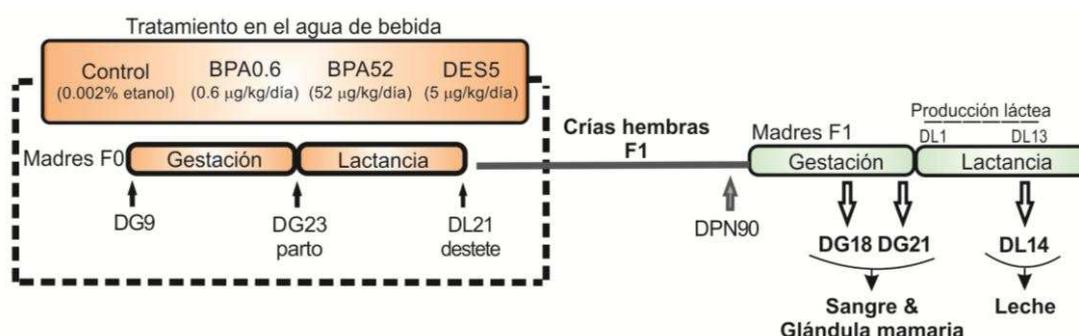
- 1) la performance reproductiva y el microambiente endócrino de la glándula mamaria durante la preñez:** se identificaron alteraciones ováricas/uterinas que puedan llevar a modificaciones funcionales de la glándula mamaria (i.e.: cuerpos lúteos, sitios de implantación) y modificaciones en los niveles séricos de E2, P4, PRL y la expresión de los RE $\alpha$  y RE $\beta$ , RP y RPRL en la glándula mamaria.
- 2) el desarrollo alveolar durante la gestación:** la histomorfología de la glándula mamaria fue analizada en diferentes días de gestación, se evaluaron entre otros el estroma mamario, el perímetro y diámetro alveolar, y la presencia de vacuolas intracitoplasmáticas y de secreción en el lumen alveolar.

- 3) **la síntesis y secreción de las proteínas de la leche durante la gestación:** se cuantificaron la expresión de las proteínas de la leche  $\alpha$ -Lactalb y  $\beta$ -Cas por inmunofluorescencia, western-blot y RT-PCR en tiempo real.
- 4) **la producción y calidad nutricional de la leche determinado su composición proteica:** la producción de leche se analizó la cantidad de leche generada por las madres F1 lactantes en una unidad de tiempo determinada. En muestras de leche en diferentes días de lactancia se evaluó el contenido de  $\alpha$ -Lactalb y  $\beta$ -Cas por western-blot y proteínas totales por métodos químicos.

### 3 | Materiales y métodos

#### 3.1 | Diseño Experimental

El diseño experimental se explica detalladamente en el capítulo 3 sección 1.1.2. Brevemente, ratas hembra preñadas de la cepa Wistar (F0) fueron expuestas a través del agua de bebida a 0, 0.6 y 52  $\mu$ g de BPA/kg/día o 5  $\mu$ g de DES/kg/día desde el DG9 hasta el destete. Una vez realizado el destete, las crías hembras F1 se transfirieron a un ambiente libre de xenoestrógenos. En DPN90, las hembras F1 fueron apareadas con machos de fertilidad comprobada (Figura 21).



**Figura 21. Esquema del tratamiento experimental.** F0 y F1 indican las distintas generaciones de animales utilizados en el desarrollo del trabajo. DG: día de gestación; DL: día de lactancia; DPN: día postnatal.

En DG18 y DG21, se obtuvieron muestras de tejido mamario y sangre de las madres F1 de cada grupo experimental (10-12 madres/grupo en cada día). Las muestras de suero fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la realización del dosaje hormonal

mediante radioinmunoensayo (RIA, Radio Immuno Assay). Se obtuvieron muestras de las glándulas mamarias N°4, las cuales fueron fijadas en 10% (v/v) de formol-buffer y embebidas en parafina. Las glándulas mamarias contralaterales fueron congeladas rápidamente en nitrógeno líquido, y almacenadas a -80°C para su posterior análisis mediante western-blot y RT-PCR en tiempo real. Además, para identificar alteraciones en ovario/útero/embrión que puedan dirigir a una regulación hormonal inapropiada durante la diferenciación de la glándula mamaria, parámetros reproductivos de las madres F1 (número de cuerpo lúteo, sitios de implantación y sitios de reabsorción) fueron evaluados en DG18 y DG21 (n= 20 madres/grupo) (Varayoud y col., 2011). Un tercer grupo de madres F1 preñadas completaron la gestación (n= 10-12 madres/grupo): en día postnatal 0 (2 hs luego de que la última cría fue parida) se registró el número y peso corporal de las crías F2, y se ajustaron las camadas a 8 crías F2/madre F1. Además, se evaluó la producción láctea a lo largo de la lactancia y, en DL14 se obtuvieron muestras de leche para cuantificar los niveles de las proteínas de la leche.

### **3.2 | Producción láctea**

A lo largo de la lactancia, se evaluó la conducta tanto de lactación (la posición de espalda arqueada de la madre F1 sobre sus crías F2) como de succión (el apego de las crías F2 al pezón cuando se posicionan bajo de su madre lactante). Además, día por medio desde el día del parto hasta el DL13, las crías F2 fueron separadas de la madre F1 durante 1 hora y pesadas al final de este período (peso inicial). Luego, las crías fueron colocadas nuevamente con su madre permitiendo la succión de la leche durante 1 hora y se volvieron a pesar pasado ese tiempo (peso final). La diferencia de peso de las crías antes y después de la succión fue registrada, y la producción de leche, en g/camada/h, fue definida como la ganancia de peso promedio en 1 hora para cada camada.

### **3.3 | Determinación de hormonas circulantes por RIA**

**Determinación de E2 sérico.** La determinación de E2 sérico se realizó siguiendo la metodología de rutina descrita en nuestro laboratorio (Kass y col., 2004). Esta técnica se basa en la extracción de esteroides a partir de 800 µl de suero con éter etílico (Merck,

Buenos Aires, Argentina) y resuspensión en buffer conteniendo PBS con el agregado de azida sódica y gelatina (Sigma-Aldrich) durante 1,5 hs en baño térmico. Posteriormente se agregó la hormona marcada radiactivamente ( $^3\text{H-E2}$  (Estradiol 2,4,6,7,16,17- $^3\text{H(N)}$ ) (NETS 17) NEN PerkinElmer Life And Analytical Sciences, Inc., Boston, USA) en una concentración de 8000-10000 cuentas por minuto (cpm). Esta hormona marcada (también denominada “*hormona caliente*”) compitió con la hormona endógena por la unión al anticuerpo anti-E<sub>2</sub>, provisto por el Dr. Gordon N. Niswender, (Colorado State University, Department of Physiology, Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory, CO, USA). Este complejo “*hormona caliente/hormona endógena-anticuerpo*” se incubó a 4°C durante toda la noche. Producida la inmunorreacción, se realizó la adsorción de la hormona que quedó libre (tanto marcada como endógena) por incubación con una suspensión de carbón dextrán (0,5%-0,05%) (Sigma-Aldrich) durante 10 min con agitación periódica; luego con una centrifugación a 3500 rpm a 4°C por 10 min, se separó el carbón-dextrán unido a hormona libre. El sobrenadante se homogeneizó con líquido de centelleo (PerkinElmer) en una relación de volumen 1:10 (muestra:líquido de centelleo) y se contaron las cpm en un contador beta (WinSpectral, Modelo: 1414, PerkinElmer). En paralelo se realizó una curva estándar con diluciones seriadas de E2 (Sigma-Aldrich) comprendiendo un rango de 1,56 a 400 pg/ml.

En todos los casos se realizaron además, los siguientes controles: 1) blanco de extracción agregando agua destilada en lugar de suero, 2) control de recuperación luego de la extracción: para conocer la eficiencia de la extracción, una cantidad conocida de hormona marcada fue agregada a un suero de rata macho que luego fue sometido al proceso de extracción empleado de rutina; evaluando de este modo las cuentas recuperadas luego de este proceso. Los resultados de los diferentes ensayos fueron corregidos según la recuperación calculada; 3) pool de suero de ratas hembras vírgenes y 4) pool de suero de ratas multípara preñadas en DG9. Las mediciones de la curva de calibrado y de los controles se realizaron por triplicado; los sueros experimentales fueron medidos por duplicado. El análisis estadístico mostró un coeficiente de variación intra-ensayo de 3,5% y una variación inter-ensayo de 11%.

**Determinación de P4 sérica.** La determinación de P4 circulante se realizó siguiendo una técnica basada en la extracción de esteroides de 50 µl de muestra con n-Hexano (Merck, Buenos Aires, Argentina) (Díaz-Torga y col., 2001) y resuspensión en buffer de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH=7.5 con el agregado de gelatina (Sigma-Aldrich) por 1,5 hs en baño térmico. El agregado de P<sub>4</sub> marcada radiactivamente [<sup>3</sup>H-P<sub>4</sub> (Progesterone 1,2,6,7-<sup>3</sup>H(N)), PerkinElmer], la competencia con la hormona endógena por el anticuerpo anti-P<sub>4</sub> (provisto por el Dr. Gordon N. Niswender) y la adsorción con carbón dextrán, son idénticas a las descriptas para RIA de E2. Luego de la centrifugación, el sobrenadante se homogeneizó con líquido de centelleo (PerkinElmer) en una relación de volumen 1:6 (muestra:líquido de centelleo). La cuantificación se realizó en contador beta (WinSpectral). Se realizó una curva estándar con diluciones seriadas de P<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich) comprendidas entre 62,5 y 32000 pg/ml.

Al igual que en el RIA para medición de E2 en suero, se realizaron los siguientes controles: 1) blanco de extracción, 2) control de recuperación luego de la extracción, 3) pool de sueros de ratas vírgenes y preñadas y 4) suero de rata macho pre-absorbido con carbón-dextran con agregado de una cantidad conocida de hormona fría (Sugden, 1978). Todas las diluciones de la curva de calibrado y las muestras fueron evaluadas por triplicado. El análisis estadístico mostró un coeficiente de variación intra-ensayo de 9% y una variación inter-ensayo de 14,3%.

**Determinación de PRL sérica.** La determinación de PRL circulante fue medida utilizando kits RIA provisto por el *Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases* [NIDDK; Dr. A.F. Parlow, National Hormone and Pituitary Program (NHPP), Torrance, CA]. El análisis estadístico mostró un coeficiente de variación intra-ensayo de 6,5% y una variación inter-ensayo de 11,5%. Este procedimiento fue realizado por el grupo de investigación de la Dra. Damasia Becu-Villalobo en el Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME), CONICET, Buenos Aires, Argentina.

### 3.4 | *Análisis histológico*

Para el estudio histológico, secciones de 5µm de espesor de glándula mamaria de DG18 y DG21, fueron coloreadas con H&E como se detalló previamente en el capítulo 3 sección 4.

Para el análisis de las imágenes, se efectuó un *score* con una escala subjetiva de 1 a 3. La diferenciación del tejido fue analizada teniendo en cuenta: la cantidad de parénquima que cubre la glándula, el número de alvéolos dentro de la estructura lóbulo-alveolar, la presencia de gotas lipídicas en las células epiteliales y la distensión luminal. El valor de 1 representó un escaso desarrollo de la glándula y un valor de 3, a una glándula correctamente diferenciada en DG21. Al menos dos secciones por madre fueron analizadas en cada día estudiado.

### 3.5 | *Inmunohistoquímica.*

#### 3.5.1 | *Inmunoperoxidasa.*

Para evaluar el microambiente endócrino de la glándula mamaria durante la gestación se evaluaron diferentes receptores esteroides mediante la técnica de IHQ. Sobre cortes de glándula mamaria N°4 de 5 µm de espesor, se realizaron ensayos de IHQ para la detección de las siguientes proteínas: RE $\alpha$ , RE $\beta$ , RP y del factor de transcripción Stat5 a/b fosforilado (pStat5a/b), siguiendo la metodología de rutina descrita anteriormente en el capítulo 3 sección 5.1.1. Las secciones fueron incubadas durante 14-16hs a 4°C con los anticuerpos primarios (Tabla 4). Se utilizaron los anticuerpos secundarios biotinilados anti-ratón (Sigma-Aldrich) o anti-conejo (Zymed laboratorios, Invitrogen Argentina, Buenos Aires, Argentina).

Tabla 4. Anticuerpos utilizados en los ensayos de IHQ.

Anticuerpo primario utilizado	Dilución empleada	Anticuerpo secundario biotinilado	Extravidina-peroxidasa	Proveedor
Anti-RP (PR-130)	1/100	Anti-conejo, 1/100	1/100	LETH
Anti-RE $\alpha$ (clon 6F11)	1/100	Anti-ratón, 1/100	1/150	Novocastra, Newcastle upon Tyne, U.K.
Anti-RE $\beta$ (clon EMR02)	1/100	Anti-ratón, 1/200	1/150	Novocastra, Newcastle upon Tyne, U.K.
Anti-Stat5 a/b (Tyr 694)	1/50	Anti-conejo, 1/100	1/100	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

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

La expresión de RE $\alpha$ , RE $\beta$ , RP y pStat5a/b fue analizada en las células epiteliales alveolares. Se cuantificó el porcentaje de células positivas, contando como mínimo 2000 células por muestra experimental, utilizando un microscopio óptico Olympus BH2 (iluminación: lámpara halógena de 12 voltios, 100 W, equipado con una fuente de luz estable; Olympus Optical Co., Ltd, Tokyo, Japón) y una objetiva plana de inmersión Dplan 100X (apertura numérica = 1.25, 160/0.17).

### 3.5.2 | *Inmunofluorescencia.*

Por otro lado, se llevaron a cabo ensayos de IF como previamente describimos en el capítulo 3 sección 5.1.2. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios:  $\alpha$ -Lactalb y  $\beta$ -Cas (1/400, provistos gentilmente por el Dr. Bussmann, IBYME-CONICET, Argentina). Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo anti-conejo Alexa Fluor 488 (verde, 1/200, Invitrogen, Buenos Aire, Argentina).

La expresión proteica fue analizada cualitativamente utilizando un microscopio equipado para detección epifluorescente (Olympus BX-51) y con filtros apropiados

(Durando y col., 2011). Las imágenes fueron registradas utilizando una Cámara Color Digital USB 2.0 de alta resolución (QImaging Go-3, QImaging, Surrey, BC, Canada).

### 3.6 | *Western-blot*

Para analizar si la expresión proteica de los marcadores de diferenciación funcional,  $\alpha$ -Lactalb y  $\beta$ -Cas, fueron modificados debido a la exposición perinatal a los xenoestrógenos durante la gestación, se realizó su cuantificación mediante western-blot en muestras de glándula mamaria. El protocolo utilizado fue descrito previamente en el capítulo 3 sección 5.3. La coloración con Ponceau S, permitió identificar la zona de la membrana en la que deberían estar las proteínas de interés  $\alpha$ -Lactalb,  $\beta$ -Cas y  $\beta$ -actina, según el peso molecular conocido para cada una (14,1 kDa, 29 kDa y 43 kDa respectivamente). Los anticuerpos primarios utilizados se muestran en la Tabla 5. El revelado se realizó con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (LETH, FBCB, UNL) en una dilución 1:500 y la reacción fue visualizada utilizando DAB (Sigma-Aldrich). Las bandas proteicas fueron digitalizadas utilizando una cámara digital (C-5000Zoom, Olympus Co., Japan). Las densidades de las bandas fueron determinadas por densitometría (Image Pro-Plus 4.1.0.1®, Media Cybernetics) utilizando  $\beta$ -actina como control interno de la expresión proteica de glándula mamaria a partir de tres experimentos independientes.

Cada *blotting* incluyó controles positivos (homogenatos obtenidos de muestras de glándula mamaria de animales múltiparos preñados en DG22) y controles negativos, en los cuales se omitió la incubación con anticuerpos primarios.

**Tabla 5. Anticuerpos utilizados para western-blot.**

<b>Anticuerpo primario utilizado</b>	<b>Dilución empleada</b>	<b>Anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa</b>	<b>Proveedor</b>
Anti- $\alpha$ -Lactalb	1/400	Anti-conejo, 1/500	Dr. Leonardo Bussman
Anti- $\beta$ -Cas	1/400	Anti-conejo, 1/500	Dr. Leonardo Bussman
Anti- $\beta$ -actina (clon AC-15)	1/150	Anti-ratón, 1/500	Sigma-Aldrich

Además, se cuantificó la cantidad de  $\alpha$ -Lactalb y  $\beta$ -Cas presente en muestras de leche que fueron extraídas en DL14. La concentración total de proteína en la leche se determinó tal como se describió anteriormente, y cantidades iguales de proteína (25 $\mu$ g) fueron separadas utilizando SDS-PAGE 15%, transferidas a membranas de nitrocelulosa, e incubadas con los anticuerpos primarios anti- $\alpha$ -Lactalb y anti- $\beta$ -Cas durante toda la noche. Para el revelado se empleó el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa y DAB. Las densidades de la banda de los tres experimentos independientes fueron determinadas por densitometría (Image Pro-Plus 4.1.0.1®, Media Cybernetics) y normalizado contra el total de contenido de proteínas de la leche.

### 3.7 | *Análisis mediante RT-PCR en tiempo real cuantitativo.*

Para analizar si los niveles de expresión relativa de los ARNm de  $\beta$ -Cas,  $\alpha$ -Lactalb y RPRL fueron modificados en las madres F1 expuestas perinatalmente a BPA y DES, se realizó RT-PCR en tiempo real en DG18 y DG21. Primeramente, se realizó la extracción de ARN total a partir de las glándulas mamarias de ocho animales de cada uno de los grupos experimentales (Control, BPA0.6, BPA52 y DES5) de cada uno de los días evaluados (DG18 y DG21), y se prosiguió con la RT para la obtención de los ADNc como se describió anteriormente en el capítulo 3 sección 4.3. Los pares de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los ADNc de  $\beta$ -Cas,  $\alpha$ -Lactalb, RPRL y L19 (gen de referencia) se muestran en la Tabla 6. Las muestras fueron analizadas por triplicado. Los niveles de ADNc fueron detectados utilizando PCR en

tiempo real con el termociclador Rotor-Gene Q como se explicó previamente en el capítulo 3 sección 6.3.

**Tabla 6. Secuencia de oligonucleótidos utilizados.**

Gen	Secuencia	Tamaño del amplicón
<b><math>\alpha</math>-lactoalbúmina</b>	Antisense: 5'-ATCAAGGAACTTGTCACAGG-3' Sense: 5'-CTATCGTCAAGAACAATGGC-3'	128 pb
<b><math>\beta</math>-caseína</b>	Sense: 5'-AAACATCCAGCCTATTGCTC-3' Antisense: 5'-CATCTGTTTGTGCTTGGGAA-3'	118 pb
<b>RPRL</b>	Sense: 5'-AAAGTATCTTGTCCAGACTCGCTG-3' Antisense: 5'-AAACAGATGACAGCAGAGAGAATG-3'	150 pb
<b>L19</b>	Sense: 5'-AGCCTGTGACTGTCCATTCC-3' Antisense: 5'-TGGCAGTACCCTTCCTCTTC-3'	130 pb

Como control interno para las diferentes comparaciones se utilizó la determinación de L19. El cálculo de los niveles de expresión relativa de cada muestra se realizó utilizando el método del ciclo umbral (Ct) (Higuchi y col., 1993). En nuestros experimentos, el valor de Ct para cada muestra fue calculado usando el software Rotor-Gene Q Series Software 1.7 (Qiagen) y la eficiencia de la reacción de PCR fue calculada mediante curvas de calibrado a partir de diluciones seriadas de los fragmentos de ADNc de los transcritos en estudio. Adecuadamente, el aumento o disminución de la expresión en relación a los valores controles fue calculado mediante el software REST 2009 (Qiagen) que compara grupos con diferente eficiencia de reacción y realiza un análisis estadístico de la expresión del gen en estudio en los grupos experimentales en relación al control.

### 3.8 | *Análisis estadísticos.*

Todos los resultados se expresaron como media  $\pm$  SEM. Los resultados experimentales fueron analizados con test paramétricos (ANOVA) y no paramétricos (Kruskal-Wallis) seleccionados específicamente para cada experimento. La expresión relativa de cada ARNm blanco se analizó utilizando el software REST 2009 (Qiagen) (Pfaffl y col., 2002). Los resultados de la producción láctea fueron analizados utilizando un modelo mixto lineal con ganancia de peso~tratamiento + día + tratamiento x día como efectos fijos y la identificación de la camada como efecto aleatorio, y el análisis fue llevado a

cabo utilizando el software R (The R Foundation for Statistical Computing, <http://www.r-project.org/>). Un  $p < 0.05$  será considerado significativo en todos los casos.

#### 4 | Resultados

La exposición perinatal a BPA o DES no produjo signos evidentes de toxicidad ni en las madres F0 ni en las crías F1 a corto y mediano plazo. Las madres F0 tuvieron partos normales en el DG23, el n° de crías por camada fue similar entre los grupos y no se observaron comportamientos maternos anormales ni se observaron cambios en la ganancia de peso o consumo de agua durante la preñez y lactancia. Por otra parte, la supervivencia de la camada no se modificó durante la lactancia. El inicio de la pubertad en las crías F1 no mostró diferencias significativas entre los grupos. Todas las hembras F1 expuestas a xenoestrógenos exhibieron ciclos estrales regulares (5 días). Estos datos se resumen en la Tabla 7.

**Tabla 7. Parámetros generales evaluados en madres F0 y crías F1 expuestas a BPA o DES.**

	Control	BPA0.6	BPA52	DES5
% Gestación exitosa	100%	100%	100%	100%
No. de crías F1/camada	10±1	11±1	10±1	10±1
Peso de las crías F1 al nacer (g)	6.00±0.14	5.89±0.15	5.56±0.11	6.18±0.19
Peso de las crías F1 al destete (DPN21) (g)	34.51±1.16	33.85±1.50	33.38±0.90	36.00±1.37
Relación hembras/machos <sup>1</sup>	50/50	50/50	55/45	49/51
Inicio de la pubertad de crías F1 (días) <sup>2</sup>	48±1	49±1	48±1	48±1
Ciclos estrales de hembras F1	Regular	Regular	Regular	Regular

Los parámetros fueron evaluados determinando la distancia anogenital<sup>1</sup> y apertura vaginal<sup>2</sup>. Los valores se expresaron como la media ± SEM.

Por otra parte, la tasa de gestación de las hembras F1 no difirió de los animales control no expuestos F0 o F1 (Tabla 8). Además, para identificar alteraciones reproductivas que podrían perturbar el microambiente endócrino de la glándula mamaria y producir modificaciones histológicas y funcionales, distintos parámetros reproductivos fueron

evaluados en las crías F1 preñadas. Como se muestra en la Tabla 8, no hubo diferencias significativas con respecto al número de cuerpos lúteos y sitios de implantación entre los diferentes tratamientos. Mientras que el número de sitios reabsorbidos (pérdidas post-implantación) fue elevado ( $p < 0.05$ ) en las hembras F1 de los grupos BPA52 y DES5 comparados con el grupo control. Sin embargo, no se observaron diferencias en el número de crías/camada al momento del nacimiento en estos animales.

**Tabla 8. Parámetros relacionados con la fertilidad de animales F1 expuestos perinatalmente a bajas dosis de BPA o DES.**

	Control	BPA0.6	BPA52	DES5
% Gestación exitosa	100%	100%	100%	100%
Nº Cuerpos lúteos <sup>a</sup>	12.3±0.3	12.6±0.3	13.5±0.4	13.3±0.4
Crías perdidas pre-implantación <sup>a</sup>	1.3±0.3	1.2±0.4	1.2±0.4	1.2±0.4
Crías perdidas post-implantación <sup>a</sup>	0.2±0.1	0.6±0.2	1.1±0.3*	0.9±0.3*
Número de crías/camada <sup>b</sup>	10±1	10±1	10±2	9±2
Peso de las crías F2 al nacer (g) <sup>b</sup>	6.46±0.19	6.14±0.16	6.18±0.21	6.13±0.30
Peso de las crías F2 en DL14 (g) <sup>b</sup>	21.62±0.79	21.52±0.70	22.69±1.06	21.42±1.13

\* $p < 0.05$  comparado con el grupo control (ANOVA seguido del post-test de Dunnett).

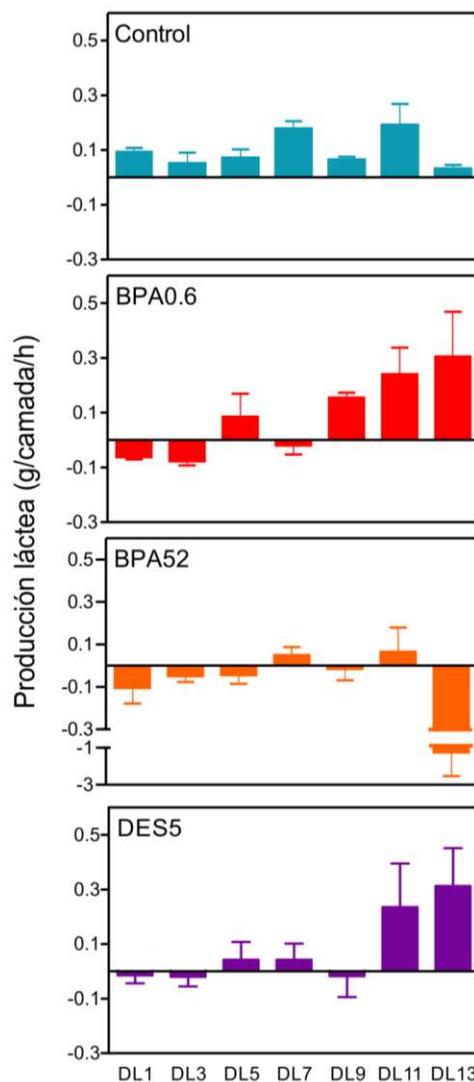
<sup>a</sup> Los valores se expresaron como valores medio  $\pm$  SEM de 20-24 hembras preñadas F1/grupo (DG18-DG21).

<sup>b</sup> Los valores se expresaron como valores medio  $\pm$  SEM de 10-12 camadas/grupo.

#### **4.1 | La exposición perinatal a BPA o DES modificó la producción láctea y el contenido de proteínas de la leche durante la lactancia.**

Para evaluar si la exposición a BPA o DES afecta la producción de leche y/o su composición proteica, se evaluó la producción láctea, y se cuantificó la cantidad de proteínas en muestras de leche recolectadas en DL14. A pesar de que no existieron alteraciones en el comportamiento de la madre F1 durante la lactancia y durante la succión por parte de las crías F2, la exposición perinatal a BPA o DES disminuyó la producción de leche en las madres F1, definida como el promedio de la ganancia de peso en una hora por cada camada F2 en cada DL estudiado (Figura 22). En el primer día de lactancia, los tres grupos tratados con xenoestrógenos presentaron una menor

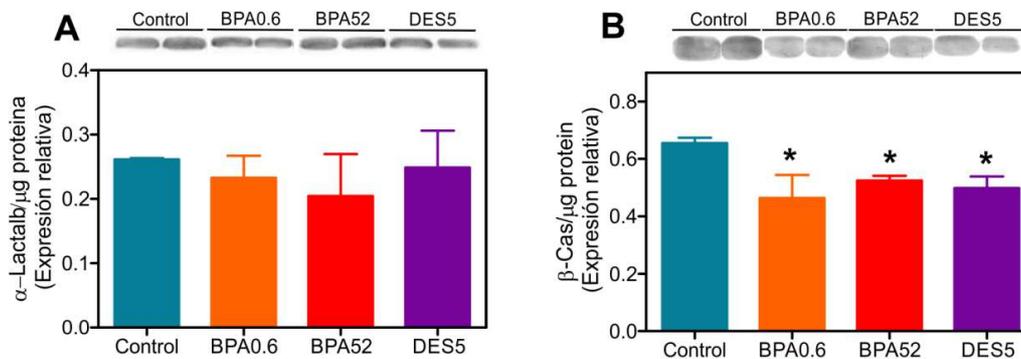
producción láctea que el grupo control (BPA52:  $t = -2.10$ ; BPA0.6:  $t = -2.73$ ; DES5;  $t = -2.23$ ;  $p < 0.05$ ). A medida que la lactancia progresó, la diferencia entre animales controles y tratados con BPA0.6 o DES5 desapareció gradualmente (términos de interacción positiva BPA0.5 x día y DES5 x día;  $p < 0.05$ ), mientras que las hembras F1 BPA52 continuaron exhibiendo valores bajos de producción láctea ( $p < 0.05$ ). Es notable que a pesar de que la producción láctea fue alterada en madres lactantes F1 expuesta a BPA y DES, el peso corporal de las crías F2 fue similar entre los grupos al finalizar el experimento en DL14 (Tabla 8).



**Figura 22. La producción láctea de madres F1 lactantes.** Los grupos tratados con BPA o DES presentaron una menor producción láctea que el grupo control. A pesar de que las madres F1 BPA52 mantuvieron un menor nivel en la producción de la leche a lo largo del período de lactancia, la diferencia entre las hembras F1 BPA0.6 y DES5 con los controles se perdió

gradualmente a lo largo de la lactancia (modelo mixto-lineal). Los resultados se expresaron como el promedio de la ganancia de peso en 1 hora por cada camada en cada uno de los días de lactancia estudiados. Las barras representan el valor medio  $\pm$  SEM.

Debido a que las proteínas son secretadas en la leche, y su expresión se utiliza como indicador de diferenciación funcional de la glándula mamaria (Brisken y Rajaram, 2006),  $\alpha$ -Lactalb y  $\beta$ -Cas fueron cuantificadas en las muestras de leche de DL14. Los resultados mostraron que el contenido de  $\alpha$ -Lactalb fue similar entre los grupos experimentales (Figura 23A), mientras que la cantidad de  $\beta$ -Cas secretada fue menor en todos los grupos expuestos a xenoestrógenos comparado con los controles (Figura 23B;  $p < 0.05$ ).



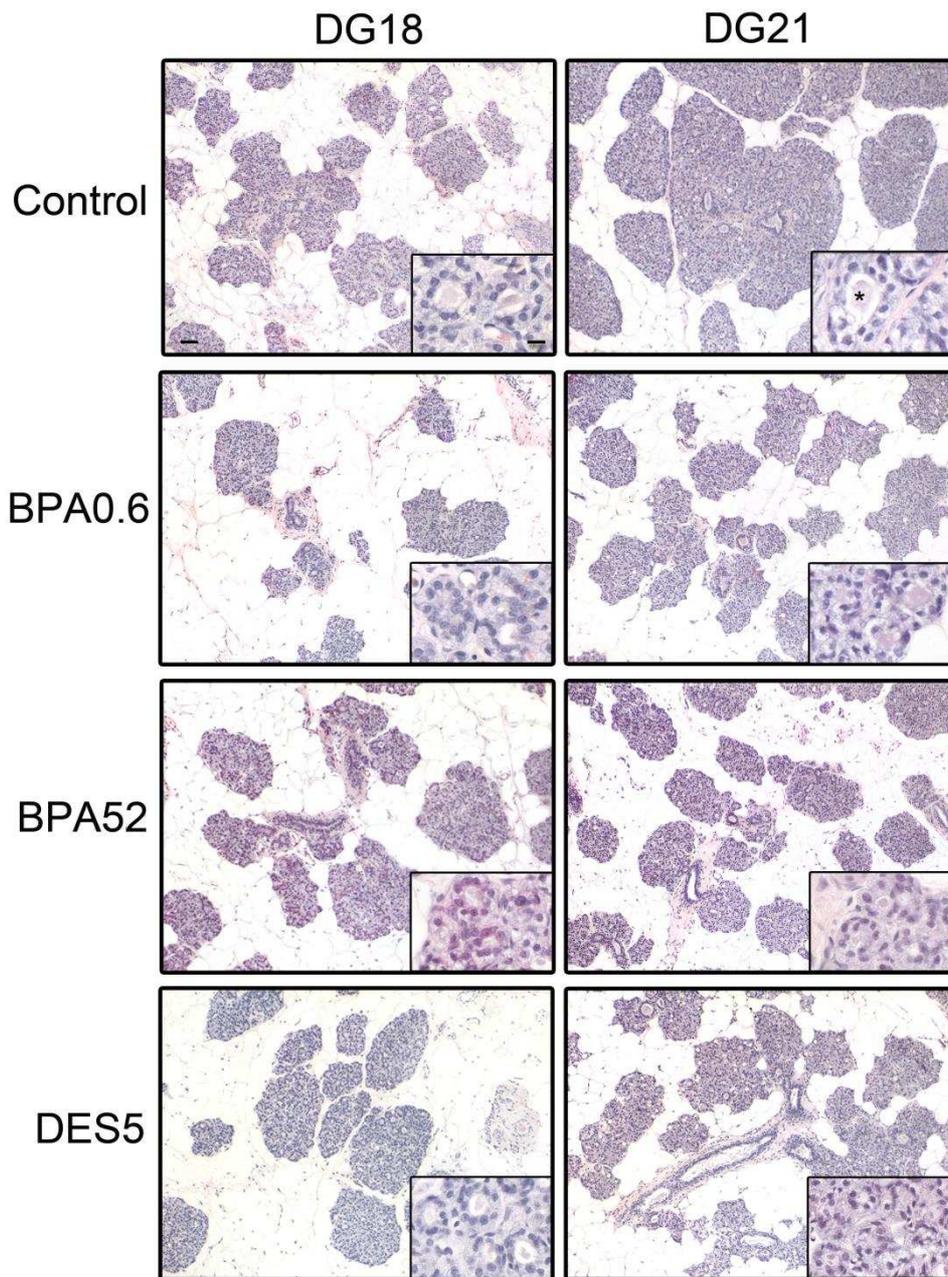
**Figura 23. Contenido de  $\alpha$ -Lactalb y  $\beta$ -Cas en muestras de leche de madres F1 lactantes en DL14.** Las proteínas fueron cuantificadas mediante western-blot. (A) El contenido de  $\alpha$ -Lactalb en la leche fue similar entre los grupos tratados; sin embargo, (B) el contenido de  $\beta$ -Cas fue menor en todos los grupos experimentales comparado con el grupo control. Los resultados son expresados por  $\mu\text{g}$  de proteína de la leche. Se muestran imágenes representativas de los western-blot; las barras representan los valores medios  $\pm$  SEM (\* $p < 0.05$ ; ANOVA seguido del post-test de Dunnett).

#### 4.2 | La exposición a BPA o DES altera el desarrollo funcional de la glándula mamaria durante la gestación.

Para dilucidar si la exposición perinatal a BPA o DES altera el desarrollo funcional de la glándula mamaria, se evaluó la histología de la glándula mamaria y la síntesis de las proteínas de la leche,  $\alpha$ -Lactalb y  $\beta$ -Cas, en muestras de glándulas mamarias obtenidas a partir de animales F1 preñados.

***4.2.1 | Efecto de la exposición perinatal a xenoestrógenos sobre la morfología mamaria en el último tercio de la gestación.***

Todos los grupos experimentales se evaluaron en DG18 y DG21. En ambos días estudiados, el epitelio luminal mamario presentó una apariencia esponjosa debido a la acumulación de lípidos intracelulares (visibles como regiones no teñidas en la coloración de H&E). Además, los alveolos mamarios fueron heterogéneos tanto en su distensión luminal como en el grosor del epitelio luminal que los conformaba y, una sustancia basófila ocupaba su lumen (Figura 24).



**Figura 24. Imágenes representativas de la histología de la glándula mamaria en DG18 y DG21.** En DG21, los animales expuestos a BPA o DES mostraron alveolos con una menor distensión luminal que los animales control y; por lo tanto, un menor tamaño lobular. Recuadro: imagen con mayor aumento de la estructura alveolar dentro del lóbulo. Barras = 20µm. Los asteriscos indican el lumen alveolar.

Para comparar el grado de diferenciación mamario alcanzado durante la gestación, se realizó un *score* teniendo en cuenta la cantidad de parénquima que cubría la glándula, el número de alvéolos dentro de la estructura lóbulo-alveolar, la presencia de gotas lipídicas en las células epiteliales y la distensión luminal. En DG21, las hembras

preñadas F1 expuestas a BPA y DES mostraron un reducido *score* de diferenciación mamaria que no fue diferente al del grupo control en DG18 (Tabla 9). La menor diferenciación mamaria observada en DG21, en los animales F1 expuestos a BPA y DES, podría deberse principalmente a la menor distensión alveolar presentada por estos animales, que producen en consecuencia, una disminución del tamaño lobular (Figura 23). La presencia de un lumen alveolar pequeño en madres preñadas F1 tratadas con xenoestrógenos podría indicar un retraso en la diferenciación de este órgano; y por lo tanto, alterar la síntesis de las proteínas de la leche durante la gestación.

**Tabla 9. Score de diferenciación mamaria en madres F1 preñadas.**

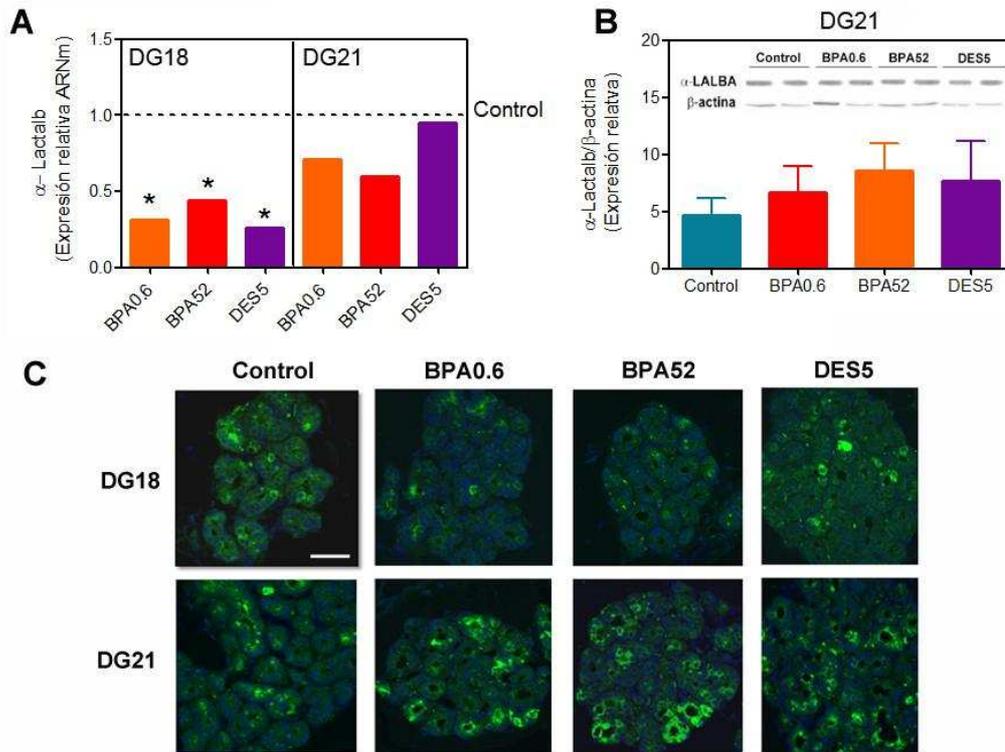
	Control	BPA0.6	BPA52	DES5
DG18	2.0±0.2	1.60±0.2	2.0±0.1	1.90±0.1
DG21	2.8±0.1	2.2±0.2*	2.0±0.1*	2.3±0.1*

El rango del *score* de diferenciación mamaria es de 1 a 3, representando 3 el mayor grado de diferenciación mamaria alcanzado en DG21. Los valores se expresaron como valores medio ± SEM de 10-12 madres preñadas F1/grupo/día de gestación. \*p<0.05 comparado con el grupo control (ANOVA seguido del post-test de Dunnett).

#### **4.2.2 | La exposición perinatal a BPA o DES modifica la síntesis de las proteínas de la leche durante la gestación.**

Para evaluar si las alteraciones histológicas observadas en la glándula mamaria de animales expuestos perinatalmente a BPA y DES inducen modificaciones en la expresión de los marcadores de diferenciación funcional  $\alpha$ -Lactalb y  $\beta$ -Cas, la expresión de los mismos fue analizada en muestras mamarias de hembras F1 durante el último tercio de la gestación.

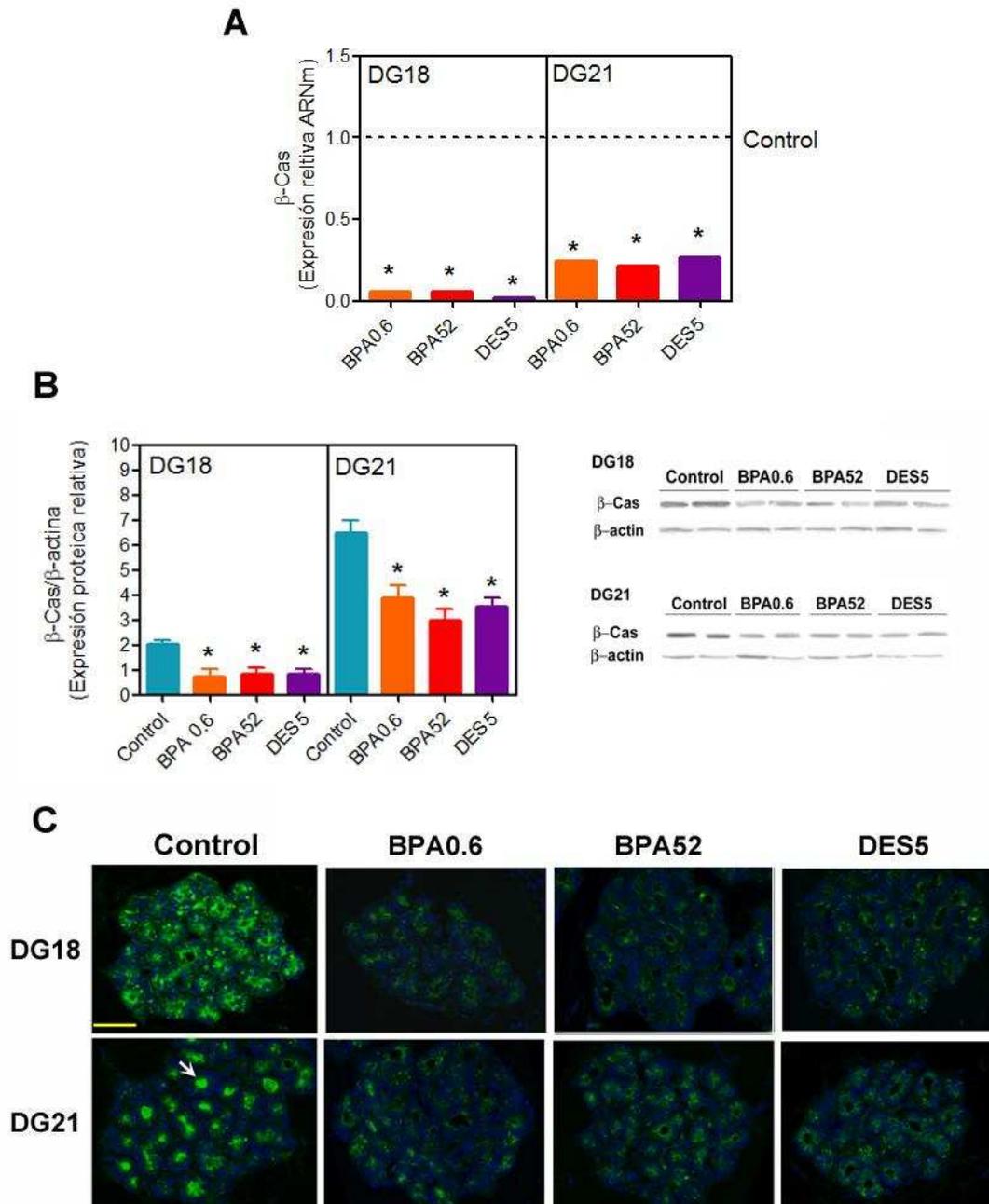
En DG18, los grupos expuestos a BPA y DES, mostraron una menor expresión del ARNm de  $\alpha$ -Lactalb comparada con el grupo control (Figura 25, p<0.05). Sin embargo, en DG21 la expresión del ARNm fue similar entre los grupos (Figura 25A). Asimismo, la expresión proteica de  $\alpha$ -Lactalb mediante western-blot e IF se correlacionó con el patrón del ARNm en ambos días estudiados (Figura 25B, C).



**Figura 25.** La expresión de  $\alpha$ -Lactalb en la glándula mamaria de madres F1 al final de la gestación. (A) Expresión del ARNm de  $\alpha$ -Lactalb en DG18 y DG21. Las muestras fueron normalizadas frente a L19 y el grupo Control, designado con el valor de 1, utilizando el software REST 2009 y se grafica el valor normalizado resultante del análisis (\*:  $p < 0.05$ ,  $n = 8$  animales/grupo). (B) Western-blot de muestras de glándula mamaria en DG21. Todas las muestras fueron normalizadas frente a la expresión de  $\beta$ -actina, utilizada como control interno. Las barras representan el valor medio  $\pm$  SEM. (C) Imágenes representativas de la expresión proteica de  $\alpha$ -Lactalb en DG18 y DG21 mediante IF. El citoplasma y el lumen apical de las células alveolares fueron positivos para  $\alpha$ -Lactalb (verde), mientras que los núcleos fueron negativos (azul, DAPI+). Barra =  $40\mu\text{m}$ .

Con respecto a  $\beta$ -Cas, los resultados muestran que tanto en DG18 como en DG21 existió una disminución en la expresión del ARNm comparada con los animales controles (Figura 26A,  $p < 0.05$ ). Asimismo, como se muestra en el western-blot (Figura 26B,  $p < 0.05$ ) y en la tinción por IF (Figura 26C), la disminución de la expresión del ARNm se asocia con una baja expresión proteica. Por otro lado, en DG21 la expresión de  $\beta$ -Cas no solo se observó en las células epiteliales en DG18 sino también en el lumen alveolar, sugiriendo una secreción activa en este día (Figura 26C, flecha blanca). Analizando los resultados obtenidos en su conjunto, los mismos sugieren que existe un retraso durante el último tercio de gestación en la síntesis y/o secreción de las proteínas

de la leche, principalmente  $\beta$ -Cas, en animales expuestos perinatalmente a los xenoestrógenos BPA y DES.



**Figura 26. Expresión de  $\beta$ -Cas en madres F1 al final de la gestación.** (A) Expresión del ARNm en DG18 y DG21. Las muestras fueron normalizadas frente a L19 y el grupo Control, designado con el valor de 1, utilizando el software REST 2009 y se grafica el valor normalizado resultante del análisis (\*:  $p < 0.05$ ,  $n = 8$  animales/grupo). (B) Western-blot de muestras de glándula mamaria en DG18 y DG21. Todas las muestras fueron normalizadas frente a la expresión de  $\beta$ -actina, utilizada como control interno. Las barras representan los valores medios  $\pm$  SEM de 8-10 animales/grupo (\*:  $p < 0.05$ ; ANOVA seguido del post-test de Dunnett). (C) Imágenes representativas de la expresión proteica de  $\beta$ -Cas en DG18 y DG21 mediante IF. El citoplasma y el lumen apical de las células alveolares fueron positivos para  $\beta$ -Cas (verde),

mientras que los núcleos fueron negativos (azul, DAPI+). En DG21, solo el grupo control exhibió secreción de  $\beta$ -Cas en el lumen (flecha blanca), indicando un retraso en la diferenciación de glándula mamaria en los grupos expuestos a xenoestrógenos. Barra = 40 $\mu$ m.

#### ***4.3 | Efectos del BPA o DES sobre el microambiente endocrino de la glándula mamaria y expresión de los receptores de hormonas esteroides.***

En la glándula mamaria durante la gestación, se producen las modificaciones más importantes que serán responsables de completar su desarrollo hasta alcanzar un órgano funcionalmente activo. Este desarrollo se encuentra bajo la influencia de diferentes hormonas y factores de crecimiento, los cuales inciden en la morfogénesis, proliferación y diferenciación celular (Imagawa y col., 1994).

En roedores, la diferenciación funcional de las células epiteliales mamarias durante la preñez se encuentra modulada por E2, P4 y hormonas peptídicas que actúan en combinación con factores de crecimiento y señales que derivan del estroma. Por lo tanto, para evaluar si la disminución de la expresión y/o síntesis de las proteínas de la leche observadas luego de la exposición perinatal a BPA o DES fue debido a cambios producidos en el microambiente endócrino de la glándula mamaria, se midieron los niveles séricos de E2, P4 y PRL, así como la expresión proteica de los receptores de hormonas esteroides, ER $\alpha$ , ER $\beta$  y RP, y la expresión de ARNm del RPRL y de la proteína pStat5a/b, en DG18 y DG21.

##### ***4.3.1 | Análisis de los niveles séricos de E2, P4 y PRL en animales expuestos perinatalmente a BPA y DES durante la preñez.***

En las madres preñadas F1, la exposición oral a BPA y DES no modificó los niveles de E2 y PRL en ninguno de los días estudiados con respecto al grupo control (Tabla 10). Además, todos los grupos experimentales mostraron un aumento de los niveles de E2 en DG21 comparado con DG18 (Tabla 10). Con respecto a la concentración sérica de P4, no existieron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales en DG18. Por otro lado, todos los animales expuestos perinatalmente a xenoestrógenos,

excepto el grupo BPA52 ( $p < 0.05$ ), presentaron una disminución de los niveles de P4 en DG21 comparado con DG18 (Tabla 10).

**Tabla 10. Concentraciones séricas de varias hormonas en madres F1 preñadas.**

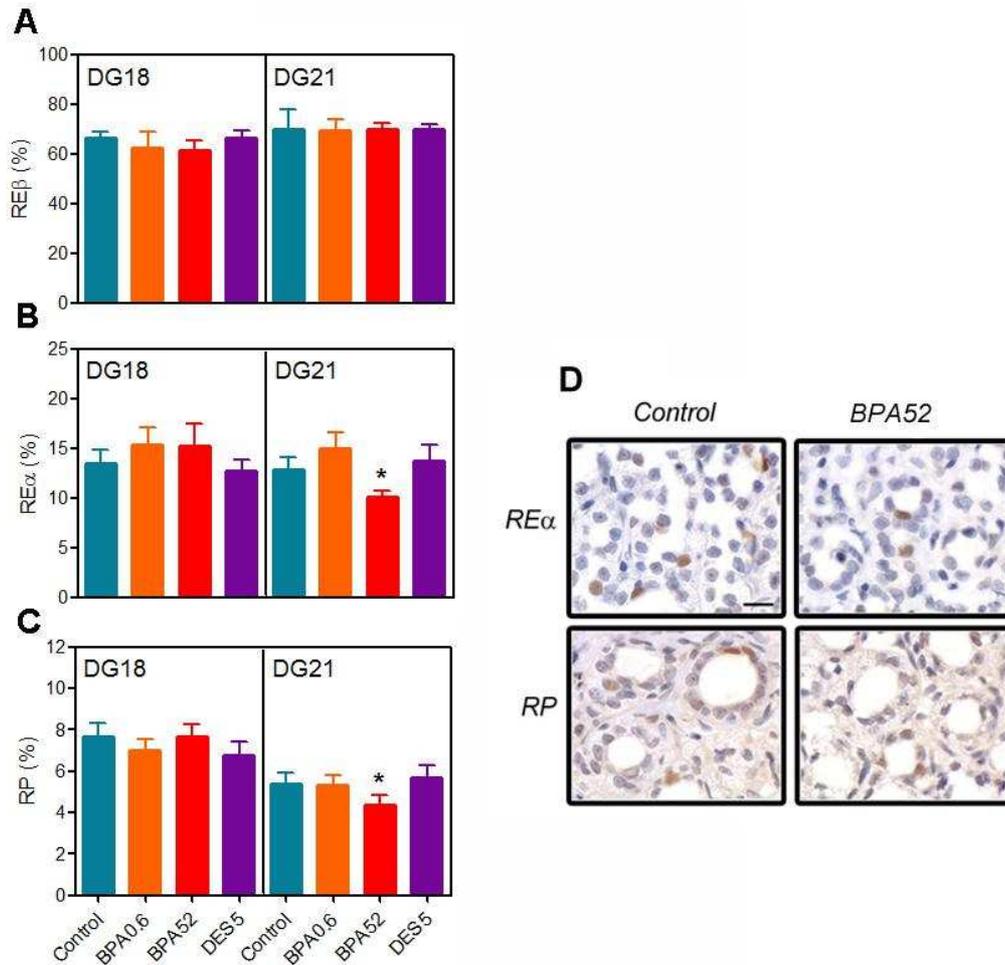
	E2 (pg/ml)		P4 (ng/ml)		PRL (ng/ml)	
	DG18	DG21	DG18	DG21	DG18	DG21
<b>Control</b>	19.48±1.46	29.27±1.98	26.49±1.52	19.59±1.86	37.34±2.87	39.83±3.14
<b>BPA0.6</b>	19.29±1.86	27.96±1.13	27.66±2.23	20.91±2.28	41.87±3.26	53.33±8.04
<b>BPA52</b>	16.63±0.97	31.89±1.97	29.06±2.74	30.99±2.66*	39.03±2.11	41.73±3.11
<b>DES5</b>	15.89±1.39	33.67±1.96	26.52±2.84	22.78±1.84	39.76±3.83	38.13±2.56

Los valores están expresados como valores medios  $\pm$  SEM de 10-12 madres F1 preñadas/ grupo/ día gestacional (DG). \*  $p < 0.05$  comparado con el grupo control en cada uno de los días evaluados (ANOVA seguido del post-test de Dunnett).

#### 4.3.2 | *Expresión de los receptores de las hormonas esteroides en la glándula mamaria de animales tratados perinatalmente con BPA y DES.*

Además de cuantificar los niveles séricos de E2 y P4, también evaluamos si la exposición perinatal a BPA o DES inducía cambios en la expresión proteica de sus receptores (RE $\alpha$ , RE $\beta$  y RP).

En DG21, los animales expuestos perinatalmente a BPA52 presentaron una menor expresión tanto del RE $\alpha$  como del RP comparado con el grupo control (Figura 27B-C,  $p < 0.05$ ). Además, se observó que en todos los grupos experimentales existió un elevado porcentaje de células positivas que expresaron el RE $\beta$  en ambos días estudiados, indicando que la expresión de este receptor no fue modificada por la exposición a BPA o DES (Figura 27A).

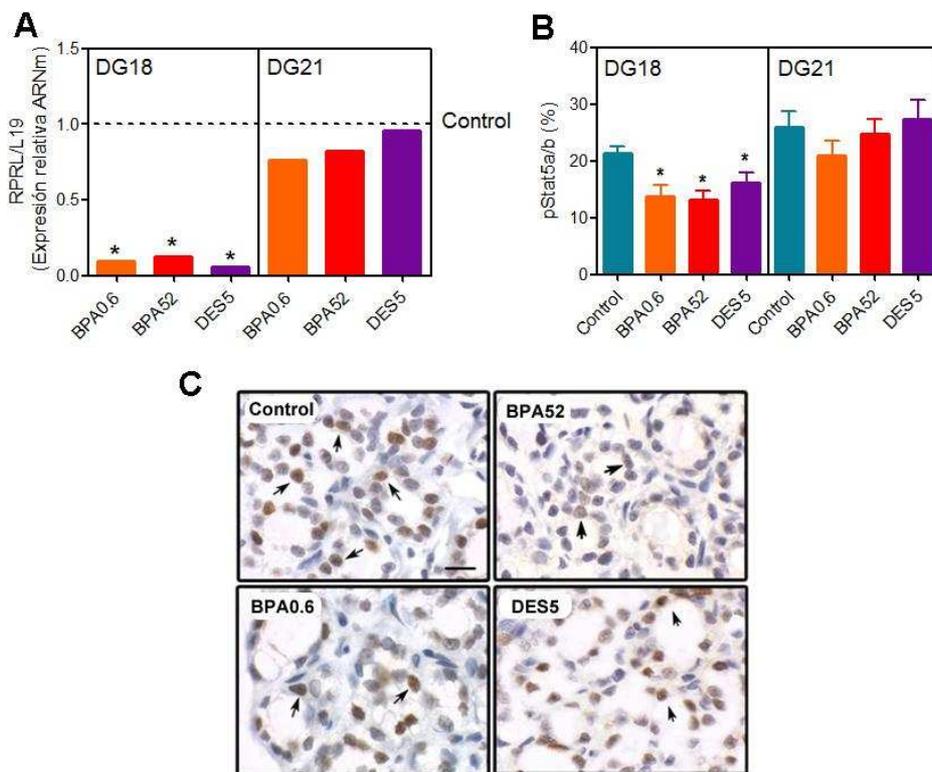


**Figura 27.** Expresión de los receptores de hormonas esteroideas en la glándula mamaria en animales expuestos perinatalmente a BPA y DES. Se cuantificó el porcentaje de células positivas que expresan (A) RE $\beta$ , (B) RE $\alpha$  y (C) RP en DG18 y DG21. Las barras representan los valores medios  $\pm$  SEM de 8-10 animales/grupo (\*:  $p < 0.05$ ; ANOVA seguido del post-test de Dunnett). (D) Imágenes representativas de la expresión de los receptores de hormonas esteroideas en muestras de glándulas mamarias de animales expuestos a BPA52 de DG21. Barra = 20 $\mu$ m.

#### 4.3.3 | Estudio de las alteraciones producidas en la vía de señalización de la PRL en animales F1 expuestos a xenoestrógenos.

Teniendo en cuenta que la vía de señalización de PRL está involucrada tanto en la diferenciación de las células alveolares y como en la regulación de la síntesis de  $\alpha$ -Lactalb y  $\beta$ -Cas, y que, además, la concentración sérica de PRL no fue afectada por la exposición a BPA o DES, decidimos evaluar la expresión del RPRL y de pStat5a/b en la glándula mamaria de hembras preñadas F1.

En DG18, todos los grupos expuestos a los xenoestrógenos tuvieron una menor expresión del ARNm del RPRL comparado con el grupo control ( $p < 0.05$ ), mientras que en DG21 no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales (Figura 28A). Asimismo, la expresión del factor de transcripción pStat5a/b (Figura 28B-C;  $p < 0.05$ ), siguió el mismo patrón de expresión que el RPRL, indicando que no solo la expresión del ARNm mensajero del RPRL se encuentra alterado a consecuencia de la exposición perinatal a xenoestrógenos, sino que su actividad transcripcional también se encuentra modificada en DG18.



**Figura 28. Alteraciones transitorias en la vía de señalización de la PRL en la glándula mamaria de madres F1 expuestas a xenoestrógenos.** (A) Expresión relativa del ARNm de RPRL en DG18 y DG21. Las muestras fueron normalizadas frente a L19 y el grupo Control, designado con el valor de 1, utilizando el software REST 2009 y se grafica el valor normalizado resultante del análisis (\*:  $p < 0.05$ ,  $n = 8$  animales/grupo). (B) Cuantificación de la expresión de pStat5a/b en animales F1 expuestos perinatalmente a BPA y DES. Porcentaje de células alveolares positivas que expresaron pStat5a/b en DG18 y DG21. Las barras representan valores medios  $\pm$  SEM de 8-10 animales/grupo (\*:  $p < 0.05$ ; ANOVA seguido del post-test de Dunnett). (C) Imágenes representativas de la expresión alveolar de pStat5a/b en animales expuestos perinatalmente a BPA o DES en DG18. Barra =  $20\mu\text{m}$ .

## **5 | Discusión**

---

En el presente capítulo analizamos si la exposición a bajas dosis de BPA ó DES durante el periodo perinatal (gestación + lactancia) modifica la diferenciación de la glándula mamaria en hembras preñadas F1. Nuestros resultados demuestran que el tratamiento con xenoestrógenos afecta la diferenciación de la glándula mamaria, afectando la producción láctea y alterando la expresión y/o síntesis de los componentes de la leche en los animales F1. En DG18, el retraso en la diferenciación de la glándula mamaria, evidenciado a través de la disminución en la expresión de  $\alpha$ -Lactalb y  $\beta$ -Cas tanto a nivel del ARNm como de la proteína, se asoció con alteraciones en la vía de señalización de la PRL; las hembras F1 expuestas a BPA ó DES presentaron una menor expresión tanto del ARNm del RPRL como del factor de transcripción pStat5a/b al compararlas con las hembras F1 control. Más aún, en DG21 la síntesis y expresión de  $\beta$ -Cas permaneció disminuida tanto en la glándula mamaria (DG21) como en las muestras de leche (DL14) en las hembras F1 expuestas a BPA ó DES.

El principal objetivo del desarrollo de la glándula mamaria durante la gestación es alcanzar un estado de diferenciación que permita la correcta síntesis y secreción de los componentes de la leche, para satisfacer la demanda de las crías luego del parto. Además de la síntesis de la leche, las adaptaciones maternas durante la lactancia incluyen la expulsión de leche, la conducta materna y la respuesta reducida al estrés (Dobolyi, 2011). Cualquier interferencia con el control y coordinación de las adaptaciones maternas durante la gestación y la lactancia puede conducir a un suministro inadecuado de nutrientes al neonato en crecimiento. Nuestros resultados muestran que los animales F1 control tuvieron un balance positivo en la producción de la leche, sin embargo, los animales expuestos a xenoestrógenos mostraron una respuesta variable. Las hembras F1 del grupo BPA52 exhibieron una producción láctea negativa en 5 de los 7 días de lactancia estudiados. Los valores negativos en la producción láctea, observados en los animales expuestos, podrían reflejar una reducción momentánea de la expulsión de la leche como consecuencia de la elevada vulnerabilidad de estas madres al estrés producido por la remoción y sustitución de sus crías durante el experimento. Estudios experimentales en roedores han demostrado que la exposición a BPA altera el

epigenoma del feto directamente (*in utero*) o indirectamente en las crías a través de la alteración de la conducta materna de la madre tratada con el xenoestrógeno (Galea y Barha, 2011; Jasarevic y col., 2011). Las modificaciones epigenéticas inducidas por el BPA pueden provocar alteraciones funcionales a largo plazo en las crías F1 (Kundakovic y Champagne, 2011). También ha sido comprobado que la exposición perinatal a BPA puede actuar sobre el eje hipotalámico-pituitario-adrenal en roedores, modificando los niveles, expresión y mecanismos epigenéticos de los principales mediadores del estrés a largo plazo (Kitraki y col., 2016), y como un agonista del receptor de glucocorticoide (Rubin, 2011). Esto es importante debido a que altos niveles de corticosterona presentes en el postparto y/o en situaciones estresantes influyen sobre la respuesta emocional de las crías F1 adultas (Brummelte y Galea, 2010), aumentando su vulnerabilidad a situaciones de alta demanda emocional como lo son la gestación y la lactancia. Ni las diferencias en la composición de la leche o la disminución en la producción láctea fueron reflejadas en cambios en el peso de las crías F2 durante la lactancia. Este resultado difiere del previamente reportado por Rayner y col. (2005), el cual describe los efectos a largo plazo de la exposición a atrazina; sin embargo, está de acuerdo con White y col. (2011), quien reportó que a pesar de la presencia de anomalías morfológicas en las glándulas lactantes de madres F1 expuestas a ácido perfluorooctanoico, el peso corporal de las crías F2 fue similar entre los grupos. Cabe considerar que, el peso de las crías no es un indicador muy sensitivo o específico de una lactancia alterada (Rudel y col., 2011a). Dos posibles explicaciones para las discrepancias que observamos entre lactancia alterada y peso de las crías podrían ser que a) la conducta lactacional de los neonatos F2 podría cambiar para compensar la disminución de la producción de la leche por las madres F1 (White y col., 2011) o b) que en un ambiente tranquilo, entre períodos de desafíos lactacionales, los valores de leche excretada podrían ser restablecidos.

La síntesis de las proteínas de la leche por las células alveolares puede ser sinónimo de diferenciación celular secretoria (Cowie y col., 1980; Haslam y Shyamala, 1980; Robinson y col., 1995). La inducción de la síntesis de las proteínas de la leche al final de la gestación y durante la lactancia es el resultado de una combinación de factores que actúan sistemática y/o localmente en la mama (Brisken y Rajaram, 2006; Neville y col.,

2002). En la glándula mamaria de la rata, los niveles del ARNm de  $\alpha$ -Lactalb y  $\beta$ -Cas aumentan continuamente pero no uniformemente a lo largo de la preñez (Nakhasi y Quasba, 1979; Neville y col., 2002). La caída drástica de los niveles circulantes de P4 al final de la gestación, la cual no fue observada en BPA52, permite maximizar la estimulación de la síntesis de  $\alpha$ -Lactalb y  $\beta$ -Cas mediante la PRL en la rata (Nakhasi y Quasba, 1979; Neville y col., 2002). Asimismo, ha sido demostrado que los progestágenos suprimen específicamente la síntesis y secreción de  $\alpha$ -Lactalb (Quirk y col., 1985), y que P4 interfiere con la inducción mediada por PRL de la transcripción de  $\beta$ -Cas a través de la interacción física del RP con las regiones regulatorias del gen de  $\beta$ -Cas, induciendo modificaciones de la cromatina que reprimen las regiones promotoras del gen y; en consecuencia, la síntesis de  $\beta$ -Cas disminuye (Buser y col., 2011). En DG18, nuestros resultados muestran una menor expresión de  $\alpha$ -Lactalb y  $\beta$ -Cas en los animales F1 expuestos a los xenoestrógenos. Mientras que la expresión de  $\alpha$ -Lactalb fue similar en todos los grupos experimentales en los últimos días de la gestación, la expresión de  $\beta$ -Cas se mantuvo baja incluso en las muestras de leche obtenidas a mitad de la lactancia en los animales F1 expuestos perinatalmente a BPA o DES. Sin embargo, la exposición perinatal a estos compuestos químicos no modificó la concentración sérica de PRL y E2 en los días estudiados. En la rata, el parto cursa con una caída en la concentración sérica de P4 que ocurre principalmente en los últimos dos días previos al mismo (Taya y Greenwald, 1981). Los animales F1 expuestos a BPA52 no exhibieron esta disminución de P4 característica al final de la gestación (DG21); sugiriendo que una estimulación incorrecta de la PRL podría estar ocurriendo sobre la síntesis de las proteínas de la leche. Además, los altos niveles séricos de P4 encontrados en los animales F1 BPA52 podrían explicar la disminución en la expresión del RP y del RE $\alpha$  observada en estos animales. Sin embargo, el significado de estos resultados, en relación a la diferenciación de la glándula mamaria, permanece sin respuestas. Por otro lado, la expresión del RE $\beta$  fue similar entre los grupos experimentales en ambos días de gestación estudiados.

La señalización a través del RPRL y de su factor de transcripción Stat5 es importante para el desarrollo funcional de la glándula mamaria (Brisken y col., 1999; Miyoshi y col., 2001; Ormandy y col., 1997). Debido a que los niveles séricos de PRL fueron

similares entre los grupos, y para estudiar si la disminución en la expresión de  $\alpha$ -Lactalb y  $\beta$ -Cas fue debida a alteraciones en la vía de señalización de la PRL (inducidas por BPA y DES), la expresión del RPRL y de la forma activada de su factor de transcripción, pStat5a/b, fueron evaluadas. Analizando los resultados obtenidos, observamos en DG18 que tanto la expresión del ARNm del RPRL como el porcentaje de células alveolares pStat5a/b positivas fue menor en todos los grupos experimentales comparados con el grupo control. En cambio, en DG21 la expresión del RPRL y de pStat5a/b fue similar entre todos los grupos. En DG18, los animales F1 expuestos perinatalmente a BPA ó DES mostraron una menor activación de la vía de señalización de la PRL, la cual podría ser la responsable de la baja expresión de  $\alpha$ -Lactalb y  $\beta$ -Cas observada en este día. Sin embargo, no explica por qué los niveles de  $\beta$ -Cas continúan disminuidos en DG21 y en las muestras de leche en DL14.

Múltiples factores son requeridos para la transcripción del gen de  $\beta$ -Cas, incluyendo el receptor de glucocorticoide, el factor de crecimiento transformante (TGB- $\beta$ ), C/EBPb y Oct-1 (Wu y col., 2008). Por lo tanto, la supresión/inducción de la expresión o función de cualquiera de estos factores podría dirigir a una inapropiada expresión de  $\beta$ -Cas. Se ha demostrado que TGF- $\beta$  suprime la expresión de  $\beta$ -Cas en células mamarias de cultivos primarios de ratón (Wu y col., 2008). La activación de Smads 2, 3 y 4 inducida por activina y TGF- $\beta$  lleva a una inhibición directa de la asociación de Stat5 con su co-activador CBP en el núcleo, bloqueando la transactivación de Stat5 y, por lo tanto, la transcripción de  $\beta$ -Cas mediada por Stat5 sin impedir la fosforilación, traslocación y unión a ADN del Stat5 (Cocolakis y col., 2008). Otros estudios son requeridos para responder si la exposición perinatal a bajas dosis de BPA o DES induce alteraciones en la vía de señalización de TGF- $\beta$  en la glándula mamaria de animales preñados. Interesantemente, Fukushima y col. (2007) han demostrado que la exposición a BPA induce la expresión de TGB- $\beta$  en el área preóptica del cerebro de una rata adulta.

Por otro lado, la síntesis de  $\beta$ -Cas también depende de señales que derivan de la matriz extracelular; se ha demostrado que la laminina y una matriz extracelular laxa son requeridas para el mantenimiento de la expresión de  $\beta$ -Cas en cultivo (Alcaraz y col., 2008). Además, las moléculas de la matriz extracelular y la PRL cooperan para inducir

la acetilación de las histonas y la unión de los factores de transcripción y del complejo SWI/SNF al promotor de  $\beta$ -Cas estimulando su expresión (Xu y col., 2007). La exposición a BPA modifica la distribución de las fibras de colágeno alrededor de los conductos mamarios y la maduración de los adipocitos y fibroblastos (Durando y col., 2007; Vandenberg y col., 2007). Por lo tanto, el tratamiento con xenoestrógenos podría inducir cambios histológicos y/o funcionales en la glándula mamaria que interferirían con la comunicación normal entre el estroma y el epitelio que es crítico para la correcta diferenciación funcional de la glándula mamaria (Morrison y Cutler, 2010).

En resumen, nuestros resultados muestran, por primera vez, que la exposición perinatal a bajas dosis de BPA ó DES no solo modifica la diferenciación de la glándula mamaria, sino también la capacidad de las células alveolares de sintetizar las proteínas de la leche, en consecuencia, el crecimiento y/o desarrollo de las crías lactantes podría estar alterado. Estos descubrimientos enfatizan la elevada sensibilidad de las crías durante el período de organogénesis y las perdurables consecuencias de su perturbación.

**CAPÍTULO 5**  
**LA EXPOSICIÓN PERINATAL A BISFENOL A**  
**MODIFICA LA COMPOSICIÓN LIPÍDICA DE LA**  
**LECHE.**

---

*“Lo importante es no dejar de hacerse  
preguntas”*

*Albert Einstein*

## 1 | Introducción

---

La composición lipídica de la leche muestra marcados cambios durante la lactancia, especialmente durante el periodo neonatal temprano (Guilloteau y col., 2009; Hsieh y col., 2009). Además del elevado contenido energético, los lípidos de la leche aportan la mayoría de las calorías que requiere el neonato para su desarrollo y crecimiento (German y Dillard, 2006; McManaman, 2009). Los lípidos de la leche también proveen un mecanismo para el transporte de vitaminas solubles en grasas al infante, y son la principal fuente de AGs esenciales requeridas para la síntesis de la membrana celular y como sustrato para la síntesis de eicosanoides y otros lípidos bioactivos (McManaman, 2009). Por lo tanto, cambios en la fracción lipídica de la leche podría establecer un punto crítico en el consumo de energía o en la tasa metabólica a lo largo de la vida de las crías (Passos y col., 2000).

Como se explicó anteriormente, la secreción de lípidos en la glándula mamaria es un proceso apócrino especializado, durante el cual elementos de la membrana plasmática apical rodean a la CLD para la formación de los MLGs para su posterior secreción al lumen alveolar (Barber y col., 1997; Dewettinck y col., 2007; McManaman, 2014; Russell y col., 2007). El patrón de acumulación de las CLDs en las células epiteliales mamarias sugiere que la formación de los lípidos de la leche implica una regulación lipogénica secuencial, además del transporte y secreción de los mismos, que son asociados funcionalmente con la maduración de los alveolos mamarios (McManaman, 2009; Russell y col., 2007).

Además, ha sido propuesto que la formación, acumulación y secreción de los MLGs también dependen de la síntesis de AGs intracelular. Los AGs pueden ser transportados desde el plasma o sintetizados *de novo* a partir de la glucosa que ingresa a la célula. Estas funciones son reguladas mediante la activación secretoria de la glándula mamaria y la disponibilidad de lípidos exógenos (Anderson y col., 2007). Otro regulador del metabolismo lipídico en la glándula mamaria es el receptor activador proliferador de peroxisoma gamma (PPAR $\gamma$ ), que cumple un importante rol modulando la síntesis de los lípidos de la leche, directamente o a través de la activación del factor de

transcripción, proteína de unión a elementos de respuesta reguladores de esteroides (SREBP1) y el receptor hepático X alfa (Shi y col., 2013).

Estudios epidemiológicos recientes han demostrado que la exposición a PEs se encuentra asociado con sobrepeso y obesidad a largo plazo (Lubrano y col., 2013; Newbold, 2010). Además, diversos estudios realizados en ratones y ratas han indicado aumento del peso corporal y complicaciones metabólicas en animales pre- y perinatalmente expuestos a BPA (Rubin, 2011; Vom Saal y col., 2012). Por otro lado, Vandenberg y col. (2007) han demostrado que la exposición perinatal a BPA induce un incremento en la maduración del *fat pad* de la glándula mamaria en embriones hembra de 18 días que podría influir sobre la diferenciación epitelial, crecimiento y morfología celular. En el capítulo anterior, hemos señalado que la exposición perinatal a bajas dosis de BPA, modifica la producción láctea y altera la composición proteica de la leche en ratas F1 lactantes. En el presente capítulo evaluaremos si la exposición perinatal a bajas dosis de BPA altera la maduración de los alveolos mamarios, la regulación de la lipogénesis en la glándula mamaria, la síntesis y secreción de los lípidos de la leche, y la composición y/o perfil de AGs en madres F1 al final de la gestación y durante la lactancia.

## **2 | *Objetivos específicos***

---

*Utilizando crías F1 que fueron perinatalmente expuestas a BPA se evaluaron:*

- 1) el desarrollo alveolar durante la lactancia:** la histomorfología de la glándula mamaria fue analizada en diferentes días lactancia, se evaluarán entre otros el estroma mamario, el área luminal alveolar, y la presencia de vacuolas intracitoplasmáticas y de secreción en el lumen alveolar.
- 2) la síntesis y secreción de los componentes de la leche durante el último tercio de la gestación y primera mitad de la lactancia:** la composición del glóbulo graso y la síntesis *de novo* de TGs durante la lactogénesis fue analizada mediante RT-PCR en tiempo real a través de la expresión del ARNm de las proteínas asociadas a la membrana del glóbulo graso (i.e.: butirofilina, adipofilina, xantina oxidasa), enzimas esenciales para la síntesis *de novo* de

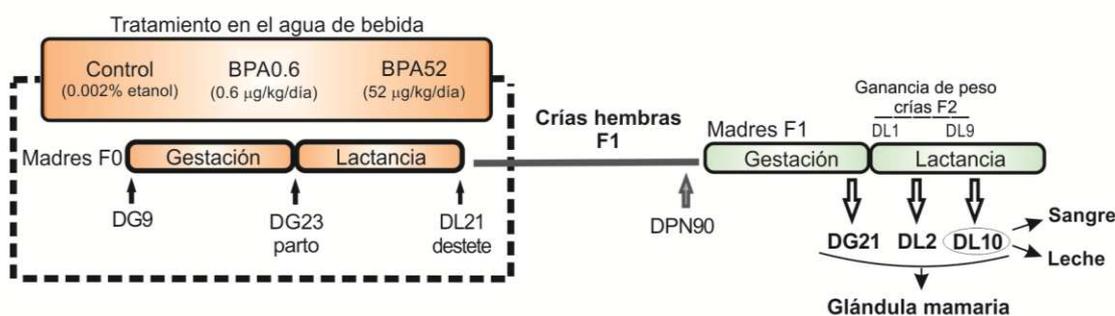
triglicéridos (i.e.: acetil-CoA carboxilasa, sintetasa de ácidos grasos) y del marcador de tejido adiposo perilipina. La estructura de los glóbulos grasos fue evaluada en muestras procesadas para cortes con crióstato.

- 3) **la calidad nutricional de la leche determinando su composición lipídica:** En muestras de leche en diferentes días de lactancia se evaluó el contenido lípidos totales, fosfolípidos y TGs por métodos químicos. Por otro lado, se cuantificó la composición de los TGs secretados a través de la medición de AGs por cromatografía gaseosa. Además, se realizó y analizó la curva de ganancia de peso de las crías F2 lactantes.

### 3 | Materiales y métodos

#### 3.1 | Diseño experimental

El diseño experimental se explica detalladamente en el capítulo 3 sección 1.1.2. Brevemente, ratas hembra preñadas de la cepa Wistar (F0) fueron expuestas a través del agua de bebida a 0, 0.6 y 52 µg de BPA/kg/día desde el DG9 hasta el destete. Una vez realizado el destete, las crías hembras F1 se transfirieron a un ambiente libre de xenoestrógenos. En DPN90, las hembras F1 fueron apareadas con machos de fertilidad comprobada (Figura 29).



**Figura 29. Esquema del tratamiento experimental.** F0, F1 y F2 indican las distintas generaciones de animales utilizados en el desarrollo del trabajo. DG: día de gestación; DL: día de lactancia; DPN: día postnatal.

Las muestras de glándula mamaria y sangre de las madres F1 fueron obtenidas en DG21, DL2 y DL10 (n = 8-10 madres/grupo en cada día). Las muestras de suero fueron almacenadas a -80°C hasta que la concentración sérica de glucosa, colesterol y TGs

fueran determinadas por métodos enzimáticos (Wiener laboratorios S.A.I.C., Rosario, Argentina). De la cadena mamaria abdomino-inguinal izquierda, la glándula mamaria N°4 fue fijada en 10% (v/v) formol buffer y embebida en parafina, y la glándula mamaria N°5 fue colocada en un molde de aluminio relleno con Tissue Freezing Medium (Jung, Leica Microsystems, Buenos Aires, Argentina) y almacenado a -80°C. Por otro lado, porciones de la cadena contralateral, excluyendo los nódulos linfáticos, fueron congelados rápidamente con nitrógeno líquido y almacenados a -80°C para posterior análisis mediante RT-PCR.

Un grupo de animales fue utilizado para el análisis de la ganancia de peso de las crías F2 durante la primera mitad de la lactancia (DL1-DL9) y para recolectar muestras de leche para determinar su contenido de lípidos totales y el perfil de AGs presente en DL10.

### **3.2 | *Performance lactacional.***

La conducta materna fue evaluada día por medio mediante observación directa de las hembras lactantes en sus jaulas durante 30 min desde el DL0 al DL10. Durante este periodo, se evaluó la conducta tanto de la lactación (la posición de la espalda arqueada de la madre F1 sobre sus crías F2) como el de succión (el apego de las crías F2 al pezón cuando se posicionan bajo de su madre lactante).

Para analizar si la calidad de la leche producida por las madres F1 expuestas a BPA modifica el crecimiento de las crías, se cuantificó la ganancia de peso corporal de las crías F2 durante la primera mitad de la lactancia. Día por medio desde el DL1 al DL9, las crías F2 fueron separadas de las madres F1 durante una hora y fueron pesadas al final de este periodo para obtener una medida estandarizada. La ganancia de peso corporal fue definida como la diferencia entre el peso de las crías de cada DL con el peso registrado en DL1. Todos los animales fueron alojados en cámaras con ambiente controlado para evitar las fluctuaciones de la temperatura corporal.

3.3 | *Análisis mediante RT-PCR en tiempo real cuantitativo.*

Para analizar si los niveles de expresión relativa de los ARNm de las proteínas asociadas a los MLGs, enzimas claves en la síntesis de TGs y otros reguladores de la lipogénesis fueron modificados en madres F1 expuestas perinatalmente a BPA en DG21, DL2 y DL10, se realizó RT-PCR en tiempo real. Primeramente, se extrajo ARN total de las glándulas mamarias de ocho animales de cada grupo experimental (Control, BPA0.6 y BPA52) en cada uno de los días evaluados. Luego se prosiguió con la RT para la obtención de los ADNc como se describió anteriormente en el capítulo 3 sección 4.3. Los pares de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los ADNc se muestran en la Tabla 11. Las muestras fueron analizadas por triplicado y los niveles de ADNc fueron detectados utilizando PCR en tiempo real con el termociclador Rotor-Gene Q como se explicó previamente en el capítulo 3 sección 6.3.

**Tabla 11. Secuencia de oligonucleótidos utilizados**

Gen	Secuencia
<b>BTN</b>	Sense 5'- AGGAATCCTGATACGGAAGG -3'
	Antisense 5'- AAGAAGGGAGCTGGTAAGGA-3'
<b>XOR</b>	Sense 5'- CTGACCTCAATGGACAGGGT -3'
	Antisense 5'- AAATCCAGTTGCGGACAAAC -3'
<b>ADPH</b>	Sense 5'- CACACTACATGCCAGACGCT -3'
	Antisense 5'- GAAGGAGGTAACATTGCGGA -3'
<b>PLIN</b>	Sense 5'- CTGATGGATCTGGGATTCTG -3'
	Antisense 5'- CAGGACTCTGGAGCACAT -3'
<b>ACC<math>\alpha</math></b>	Sense 5'- TGAAGGATGTGGATGATGGACTG -3'
	Antisense 5'- TGAAGAGGTTAGGGAAGTCATCTGC -3'
<b>FAS</b>	Sense 5'- AACAAACGCTGCCCTCCTGGT -3'
	Antisense 5'- ACCTGTTTCGCACCTCCTTGG -3'
<b>LPL</b>	Sense 5'- AGGGGCTTGGAGATGTGGAC -3'
	Antisense 5'- CCTGTATGCCTTGCTGGGGT -3'
<b>SCD2</b>	Sense 5'- CTGCACGTTCTCATCCCTGG -3'
	Antisense 5'- GCTGTGATTGTGGTGGTGGC-3'
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	Sense 5'-CCCTGGCAAAGCATTGTAT -3'
	Antisense 5'-ACTGGCACCCCTTGAAAAATG -3'
<b>SREBP1</b>	Sense 5'-AGCCCAGCCTTTGAGGATAA -3'
	Antisense 5'-TCAGACACAGGAAGACCAGTACA -3'
<b>L19</b>	Sense 5'-AGCCTGTGACTGTCCATTCC-3'
	Antisense 5'-TGGCAGTACCCTTCCTCTTC-3'

ACC $\alpha$ : acetil CoA Carboxilasa  $\alpha$ ; ADPH: adipofilina; BTN: butirofilina; FAS: sintasa de ácidos grasos; LPL: lipoproteína lipasa; PLIN: pirilipina; PPAR $\gamma$ : receptor activador proliferador de

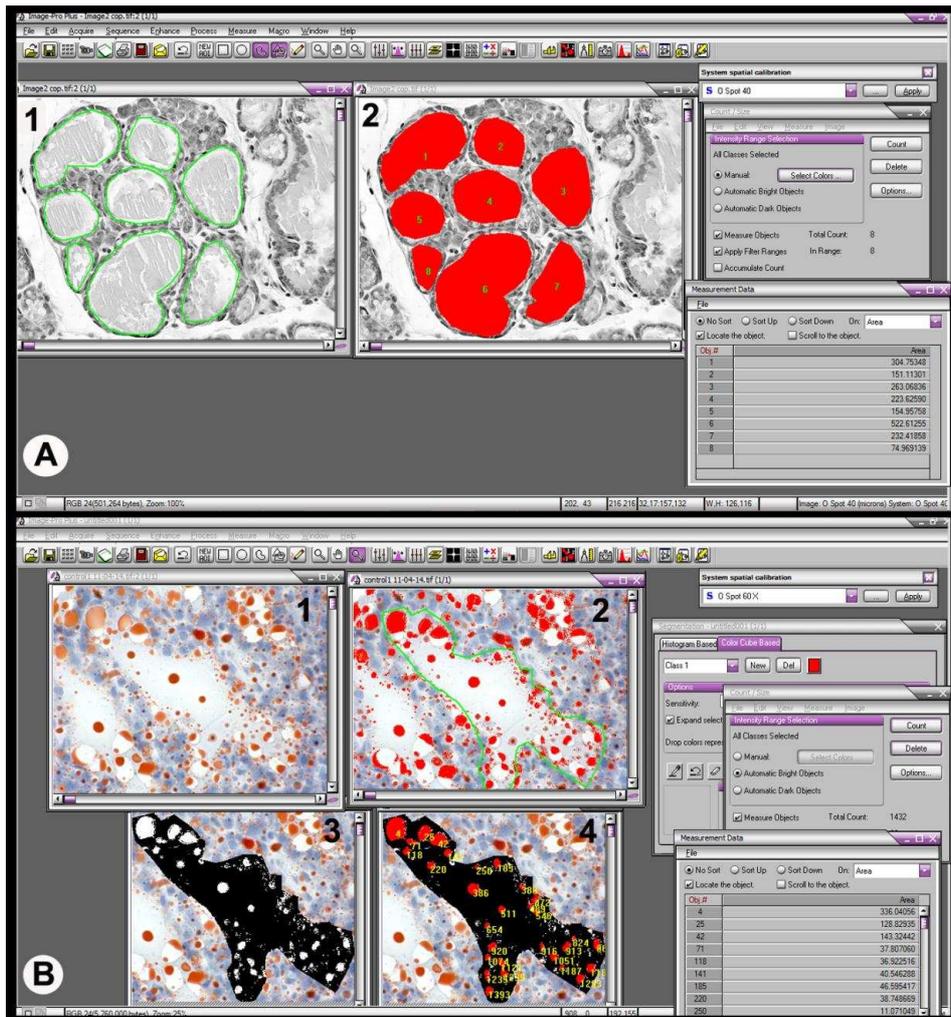
peroxisomas  $\gamma$ ; SCD2: esteroil CoA desaturasa 2; SREBP1: proteína de unión a elementos reguladores de esterol; XOR: xantina oxidoreductasa.

Como control interno para las diferentes comparaciones se utilizó la determinación de L19. El cálculo de los niveles de expresión relativa de cada muestra se realizó utilizando el método del ciclo umbral (Ct) (Higuchi y col., 1993). No se observó diferencias en los valores de Ct de L19 entre los diferentes grupos experimentales. En nuestros experimentos, el valor de Ct para cada muestra fue calculado usando el software Rotor-Gene Q Series Software 1.7 (Qiagen) y la eficiencia de la reacción de PCR fue calculada mediante curvas de calibrado a partir de diluciones seriadas de los fragmentos de ADNc de los transcritos en estudio. El nivel de expresión relativa de cada gen fue calculado utilizando el método de curva estándar (Cikos y col., 2007), L19 y el grupo control fueron utilizados para normalizar los valores de Ct.

### **3.4 | *Análisis histológico***

En DL2 y DL10, se cortaron secciones de parafina de 5  $\mu\text{m}$  de tejido mamario para realizar la coloración con H&E como se detalló previamente en el capítulo 3 sección 4. Se cuantificó el área luminal alveolar en madres F1 preñadas en 60-80 alveolos elegidos al azar con una magnificación de 200x en cinco secciones por animal (Figura 30A).

Para identificar los lípidos neutros dentro del lumen alveolar, en secciones congeladas de 10  $\mu\text{m}$  de espesor obtenidas con criostato, se realizó la coloración de Oil Red O (ORO; Invitrogen) durante 10 min y contracoloración con hematoxilina de Mayer por 15 seg (Mehlem y col., 2013). Las secciones de tejido coloreadas se montaron usando un líquido de montaje acuoso (Aquatex®, Merck Millipore). El promedio del área de los MLGs individuales ( $\geq 1.5 \mu\text{m}$ ) fue cuantificado en 60-80 alveolos elegidos al azar con una magnificación de 600x en cinco secciones por animal (Figura 30B). Para ambos análisis histológicos, las imágenes fueron registradas utilizando una cámara digital (C5000 Zoom, Olympus Co, Japan), y las mediciones se realizaron utilizando un software de análisis de imagen Image Pro Plus 4.1.0.1® (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA).



**Figura 30. Análisis de imágenes para determinar área luminal alveolar y tamaño de los MLGs. (A)** Cuantificación del área luminal alveolar: 1) Primero se delimita el área luminal de los alveolos visibles en el campo, y 2) luego se aplica la función contar/tamaño previamente configurada para cuantificar el área de los objetos seleccionados. **(B)** Cuantificación del área de los MLGs secretados hacia el lumen alveolar: 1) Se delimita el lumen alveolar. 2) Luego se determina el umbral de detección, que permite seleccionar a los MLGs. 3) Se aplica una máscara limitada a la zona de estudio, y 4) finalmente determinamos el área de cada MLG utilizando la función contar/tamaño. Estas mediciones se realizaron utilizando un sistema computarizado de análisis de imágenes, con el software Image Pro Plus 4.1.0.1®.

### 3.5 | Extracción de lípidos y evaluación del perfil de AGs de la leche

Los lípidos totales fueron extraídos a partir de muestras de glándula mamaria y leche obtenidas en DL10 de acuerdo con la metodología de Folch y col. (1957). Los extractos lipídico fueron fraccionados en fosfolípidos y lípidos neutros mediante el método cromatográfico de micro-columna (Hurtado de Catalfo y col., 2009) y cuantificado gravimétricamente (Marra y de Alaniz, 1990). Luego de la saponificación de todas las muestras de leche a 80 °C durante 40 min bajo atmosfera de nitrógeno en 10% KOH en

etanol, los AGs libres fueron extraídos con hexano y evaporados hasta sequedad. Luego fueron esterificados (de Alaniz y Marra, 1992) y los AGs metil esters (FAMEs) obtenidos fueron extraídos dos veces con hexano. Los FAMEs fueron cuantificados mediante cromatografía gaseosa utilizando GLC-Hewlett Packard HP 6890 GC Series System Plus (Avondale, PA, USA) y fueron identificados por comparación con sus tiempos de retención relativos con auténticos estándares. La temperatura del horno fue programada para que aumente desde 185 a 230 °C incrementando 3 °C/min. Se utilizó helio ultra seco como gas transportador con una presión de apertura de 3.0 kg/cm<sup>2</sup>. La detección de los FAMEs fue realizado con un detector de ionización de llamas operando a 280 °C. En algunos casos, las identidades de los AGs fueron confirmados mediante análisis de espectrometría de masa. Cada AG fue expresado como  $\mu$ moles por mg de lípidos en la muestra. Este procedimiento fue realizado por el grupo de investigación del Dr. Carlos Marra en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP), CONICET-UNLP, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de La Plata (UNLP), La Plata, Argentina.

### **3.6 | *Análisis estadístico***

Todos los resultados se expresaron como media  $\pm$  SEM. Los resultados experimentales fueron analizados con test paramétricos (ANOVA) para obtener una significancia global, y el post hoc test Dunnett ( $p > 0.05$ ) o Turkey ( $p < 0.01$ ) para comparar grupos experimentales frente al control. Para el análisis de RT-PCR en tiempo real se utilizó el test no paramétrico U de Mann-Whitney, un  $p < 0.05$  fue considerado significativo.

## **4 | *Resultados***

---

Como se describió previamente en el capítulo 4, el tratamiento con BPA no produjo signos evidentes de toxicidad ni en madres F0 ni en crías F1 o anormalidad de la conducta materna, además, no modificó la ganancia de peso o el consumo de agua de las madres F0. La duración de la gestación no fue alterada y no se observaron malformaciones en las crías F1. La relación de sexo en la camada no fue alterada y se encontró dentro del rango normal (50% hembras y 50% machos).

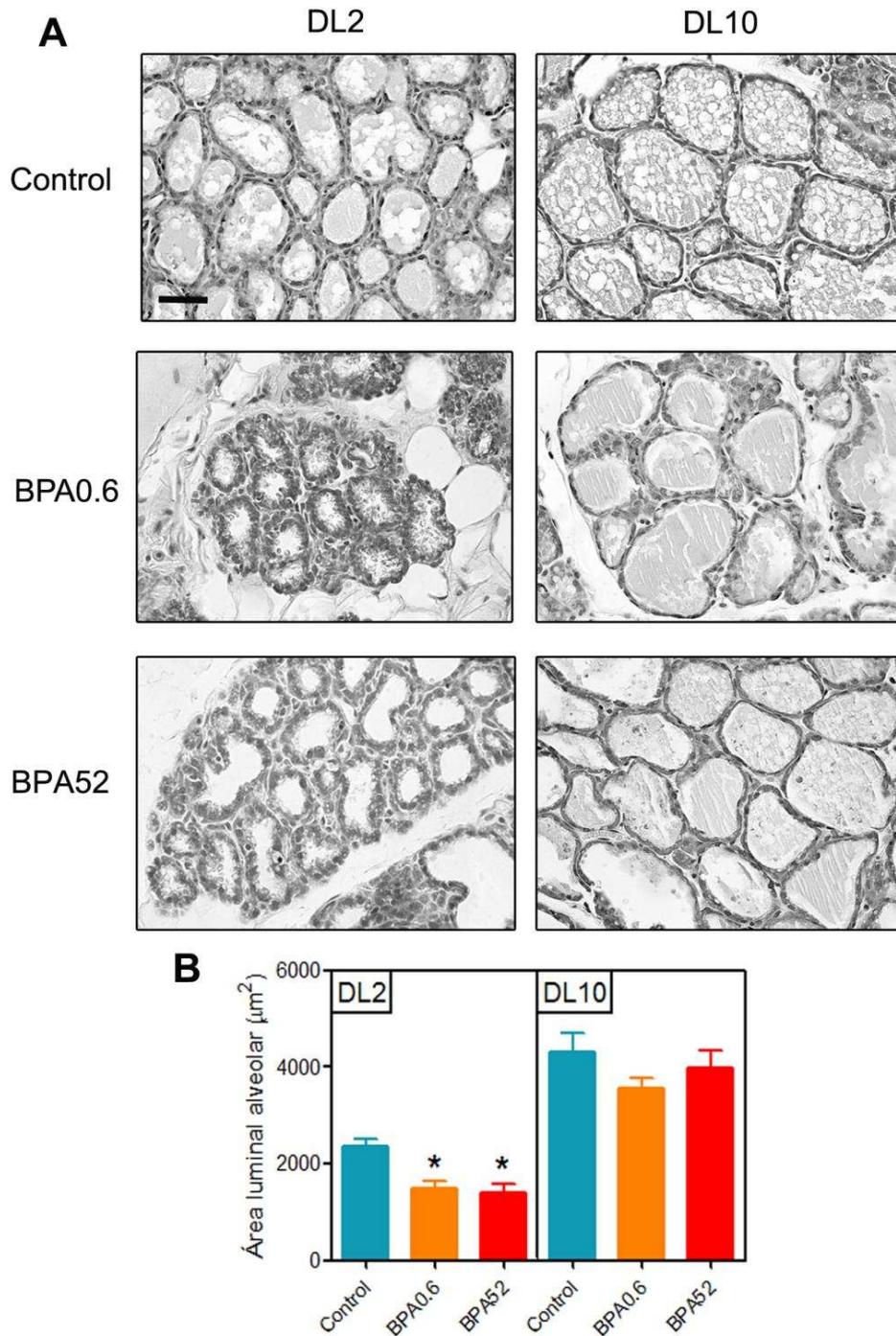
Por otra parte, la tasa de gestación de las hembras F1 no difirió de los animales Control no expuestos F0 o F1. El número promedio de crías vivas F2 por camada, y el peso corporal al nacer no fueron significativamente diferentes al grupo control (Tabla 8).

#### ***4.1 | La exposición perinatal a BPA altera la formación de los lípidos de la leche y/o la secreción al final de la gestación y al inicio de la lactancia.***

En el capítulo anterior hemos demostrado que la exposición perinatal a BPA induce un retraso en la diferenciación de la glándula mamaria en madres F1 al final de la gestación. Para dilucidar si la exposición perinatal a BPA también altera el desarrollo funcional de la glándula mamaria durante la lactancia, se evaluó la maduración alveolar en DL2 y DL10, y la formación y/o secreción de los glóbulos grasos de la leche al final de la gestación y durante la lactancia.

##### ***4.1.1 | La exposición a bajas dosis de BPA modifica la maduración alveolar mamaria al inicio de la lactancia.***

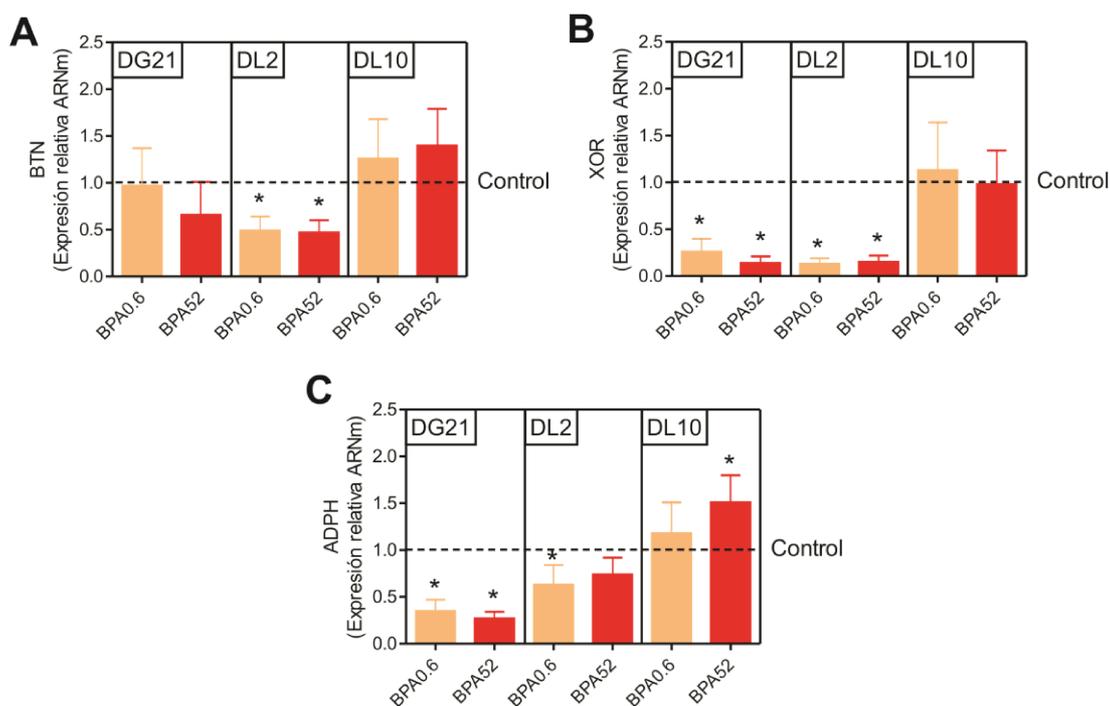
Para evaluar si la exposición a BPA afecta la diferenciación de la glándula mamaria durante la lactancia, se analizó la histología mamaria y el área del lumen alveolar. En DL2, se observó un espacio luminal alveolar expandido, la capa de células epiteliales fue más prominente comparada con los adipocitos, y se observaron pequeñas gotas de lípidos en la superficie apical de las células epiteliales de los animales control. En DL10, la glándula mamaria contenía conductos y estructuras lumbales prominentes, y se observaron pocos adipocitos por campo microscópico (Figura 31A). En DL2, a pesar de que las secciones mamarias de madres F1 expuestas a BPA exhibieron características celulares similares a los animales control, el área luminal alveolar fue menor ( $p < 0.05$ ). No se observaron diferencias entre grupos experimentales en DL10 (Figura 31B).



**Figura 31. Maduración alveolar durante la lactancia.** (A) Imágenes representativas de H&E que ilustran las características histológicas de la glándula mamaria en DL2 y DL10. En ambos días estudiados, la glándula mamaria lactante mostró un epitelio organizado, área reducida de tejido adiposo, una fina capa de tejido conectivo rodeando los alveolos, gotas de lípidos muy pequeñas dentro de las células epiteliales, y alveolos completamente expandidos con gotas de lípidos y leche en el espacio luminal. Mientras que en DL2, el área luminal de los alveolos se observó reducido en madres F1 expuestas a BPA, en DL10, no se encontraron diferencias entre grupos experimentales. Barra = 50 µm. (B) Cuantificación del área luminal alveolar en DL2 (izquierda) y DL10 (derecha). Las barras representan el valor medios ± SEM de 8 animales/grupo (\*p<0.05; ANOVA seguido del post test Dunnet).

**4.1.2 | Efectos de la exposición perinatal a BPA sobre la expresión de las proteínas asociadas a la membrana del glóbulo graso de la leche al final de la gestación y durante la lactancia.**

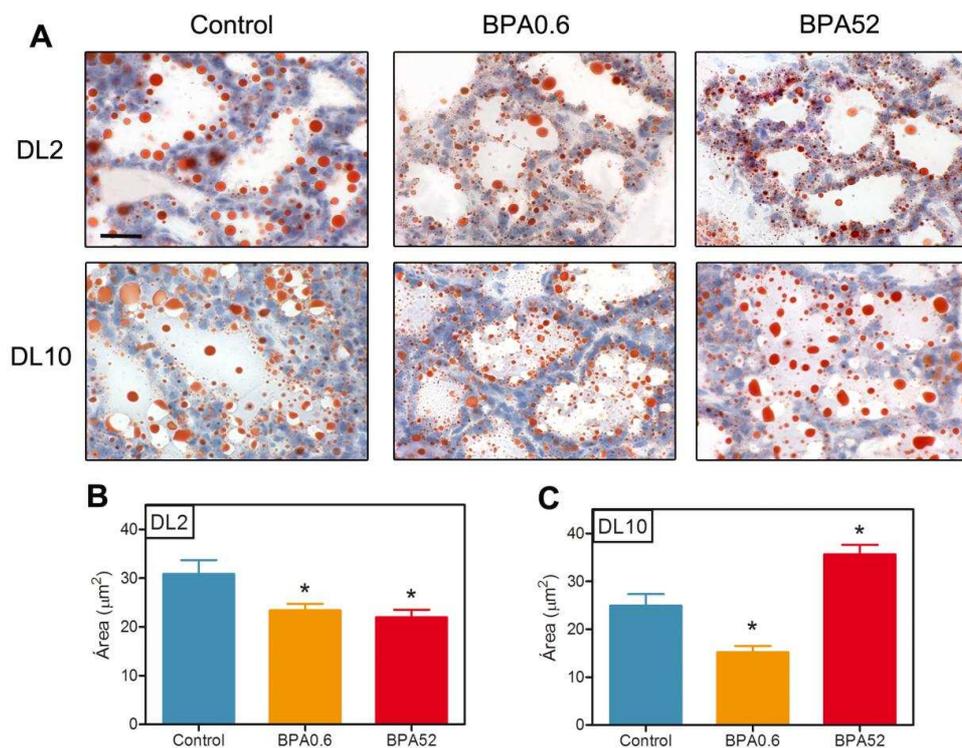
Para dilucidar si la alteración en la diferenciación de la glándula mamaria observada en las madres F1 al final de la gestación y al inicio de la lactancia está asociada con modificaciones en el ensamblaje y/o secreción de los MLGs, se evaluó la expresión del ARNm de las proteínas de membrana ADPH, BTN y XOR en DG21, DL2 y DL10. En DG21 y DL2, el nivel de expresión de los ARNm de BTN y XOR fue menor en todos los grupos expuestos perinatalmente a BPA (Figura 32A-B;  $p < 0.05$ ). Además, el nivel de ARNm de ADPH fue reducido en los animales F1 del grupo BPA0.6 en DL2, mientras que en DL10 se encontró aumentado en madres F1 expuestas a BPA52 comparada con las ratas del grupo control (Figura 32C;  $p < 0.05$ ).



**Figura 32. Efectos de la exposición a BPA sobre la expresión de los ARNm de las proteínas de membrana de los MLGs.** En DG21, DL2 y DL10, se cuantificaron los niveles de expresión de ARNm de (A) BTN, (B) XOR y (C) ADPH mediante RT-PCR en tiempo real en la glándula mamaria de madres F1. Las barras representan el valor medio  $\pm$  SEM de 8 animales/grupo. Las muestras fueron normalizadas frente a la expresión de L19 y el grupo control, al cual se le asignó el valor de 1 ( $*p < 0.05$ ; Mann-Whitney test).

**4.1.3 | La secreción y/o acumulación de los glóbulos grasos de la leche fue alterada en los animales expuestos perinatalmente a BPA durante la lactancia.**

Considerando que la exposición a BPA alteró el ensamblaje normal de los MLGs durante el inicio de la lactancia, se analizó la secreción y/o acumulación de ellos en el lumen alveolar a través de la identificación de lípidos neutros mediante la coloración con ORO (Figura 33). En DL2, se observó una disminución del tamaño de los MLGs en madres F1 expuestas a BPA. Además, el área total ocupada por los MLGs fue menor en estos animales comparados con el grupo control (Figura 33A-B,  $p < 0.05$ ); sin embargo, el crecimiento de las crías F2 no fue afectada por la exposición a BPA en este momento. A mitad de la lactancia (DL10), el área de los MLGs permaneció disminuida en las muestras de BPA0.6, y significativamente aumentadas en las muestras de BPA52 comparadas con los animales control (Figura 33C;  $p < 0.05$ ), sugiriendo que la síntesis de TGs en la glándula mamaria podría estar modificada por la exposición perinatal a BPA.

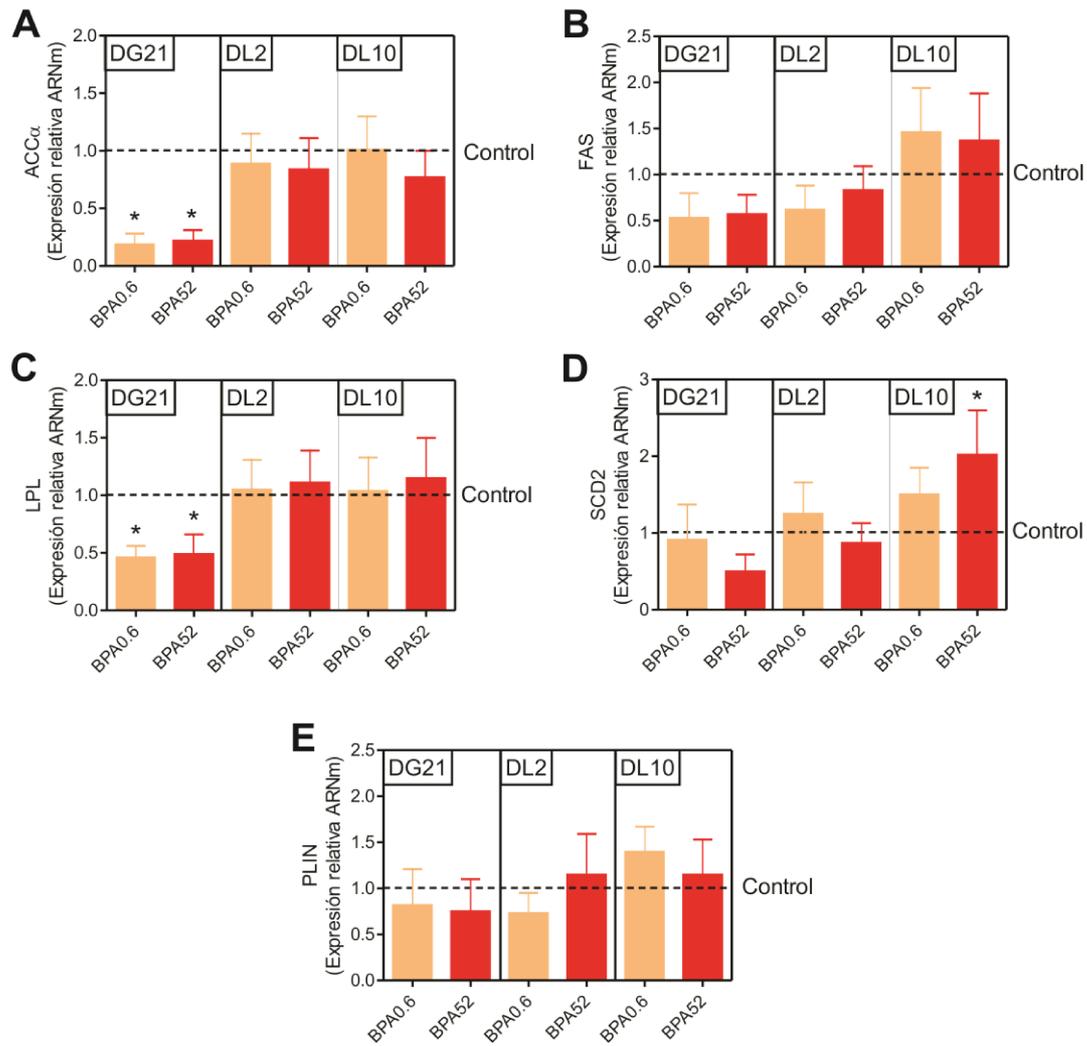


**Figura 33. Acumulación alterada de los MLGs en la glándula mamaria de madres F1 expuestas a BPA.** (A) Coloración ORO de lípidos neutros (rojo) en criosecciones de glándula mamaria. En DL2, las madres F1 expuestas a BPA mostraron una disminución en la acumulación de los MLGs en el lumen alveolar comparado con los animales control. En DL10, las glándulas mamarias de madres F1 BPA52 tuvieron un incremento en la acumulación de los MLGs mientras que aquellas madres F1 BPA0.6 presentaron menos MLGs que el grupo control. Barra= 40 µm. El área de los MLGs fue cuantificada en (B) DL2 y (C) DL10. Las barras

representan el valor medio  $\pm$  SEM de 8 animales/grupo. (\* $p < 0.05$ ; ANOVA seguido del post test Dunnet).

#### ***4.2 | Efectos de la exposición perinatal a BPA sobre la síntesis de los lípidos de la leche al final de la gestación y durante la lactancia.***

La producción de TGs por la glándula mamaria depende de la expresión de diversas enzimas claves involucradas en la síntesis de AGs (Anderson y col., 2007). Uno de los cambios asociados con la activación secretoria de la glándula mamaria durante la lactancia es la expresión aumentada de dichas enzimas (Anderson y col., 2007). Por lo tanto, para examinar si la exposición perinatal a bajas dosis de BPA modifica los niveles transcripcionales en las madres F1, la expresión de los ARNm de las enzimas LPL, FAS, ACC $\alpha$  y SCD2 fue examinada en DG21, DL2 y DL10. En DG21, el nivel de expresión de los ARNm de ACC $\alpha$ , LPL y SCD2 se encontró disminuida en ambos grupos expuestos a BPA (Figura 34A, 34C-D;  $p < 0.05$ ). Estos resultados sugieren que la exposición perinatal a BPA modifica los niveles transcripcionales de estas enzimas, limitando la síntesis de AGs en la glándula mamaria al final de la gestación. Durante la lactancia, no se observaron alteraciones en la expresión de los ARNm de las enzimas evaluadas en DL2, y solo se observó un aumento de la expresión del ARNm de SCD2 en madres F1 expuestas a BPA52 en DL10 (Figura 34D;  $p < 0.05$ ). La expresión del ARNm de PLIN, un marcador celular de células adiposas (Blanchette-Mackie y col., 1995), fue también evaluada en DG21, DL2 y DL10, no encontrándose diferencias significativas entre los grupos experimentales (Figura 34E).



**Figura 34.** Efectos de la exposición perinatal a BPA sobre la expresión del ARNm de las enzimas implicadas en la síntesis de lípidos en la glándula mamaria. En DG21, DL2 y DL10, los niveles de expresión de los ARNm de (A) ACC $\alpha$ , (B) FAS, (C) LPL y (D) SCD2 así como también el marcador de adipocitos PLIN (E) fueron cuantificados. Las barras representan el valor medio  $\pm$  SEM de 8 animales/grupo. Las muestras fueron normalizadas frente a la expresión de L19 y el grupo control, al cual se le asignó el valor de 1 (\* $p < 0.05$ ; Mann-Whitney test).

#### 4.3 | El perfil de AGs de la leche fue alterado por la exposición perinatal a BPA.

Para dilucidar si las alteraciones en la síntesis y secreción de los lípidos de la leche observadas en las madres F1 expuestas a BPA durante la lactancia se reflejaban en la fracción lipídica de la leche, se analizó tanto el contenido lipídico como el perfil de AGs en las muestras de leche extraídas en DL10.

Primero, las concentraciones de lípidos totales, TGs y fosfolípidos en la leche fueron determinados mediante gravimetría. Las madres F1 expuestas a BPA0.6 mostraron niveles bajos de lípidos totales, TGs y fosfolípidos en la leche comparados con los animales control (Tabla 12). En contraste, la leche de las madres lactantes F1 expuestas a BPA52 exhibió elevadas concentraciones de lípidos totales, TGs y fosfolípidos en comparación con la de los controles (Tabla 12).

**Tabla 12. Los efectos de la exposición perinatal a BPA sobre la concentración de lípidos en la leche de madres F1 a mitad de la lactancia.**

Leche	Grupos experimentales		
	Control	BPA0.6	BPA52
Lípidos totales (mg/ml)	214.9 ± 4.4	182.8 ± 5.1*	238.7 ± 4.8*
Triglicéridos (mg/ml)	203.3 ± 6.1	177.5 ± 4.4*	217.1 ± 4.2*
Fosfolípidos (mg/ml)	11.3 ± 1.49	6.1 ± 0.9*	22.4 ± 1.9*

Los valores son expresados como media ± SEM de 8-10 madres F1/grupo.

\* p<0.01 comparado con el grupo control (ANOVA seguido del post test de Tuckey).

Para entender el metabolismo de los lípidos durante la diferenciación de la glándula mamaria, los AGs fueron agrupados de acuerdo a sus características químicas en AGs saturados, monosaturados y poliinsaturados (Tabla 13). El nivel de AGs saturados fue alto en el grupo expuesto a BPA52, principalmente debido a los elevados niveles de los AGs C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C16:0, C18:0 y C20:0. En el grupo BPA0.6, las proporciones de los AGs saturados C8:0 y C20:0 fueron reducidas en la leche. Uno de los AGs de mayor proporción en la leche, el AG monosaturado C18:1n-9, fue menor en el grupo BPA0.6 y mayor en el grupo de BPA52 comparado con los controles. Adicionalmente, los niveles de los AGs poliinsaturados C18:2n-6 y C20:3n-6 fueron reducidos en el grupo de BPA0.6 y aumentados en el grupo de BPA52. El nivel de ácido araquidónico (C20:4n-6), al contrario, fue elevado en el grupo de BPA0.6 y reducido en el grupo de BPA52 comparado con el grupo control. Además, los niveles de AGs poliinsaturados C22:4n-6, C22:5n-3 y C22:6n-3 fueron elevados en las madres F1 del grupo expuesto a BPA0.6. El perfil completo de AGs de la leche para todos los grupos experimentales se muestran en la Tabla S2 del Anexo.

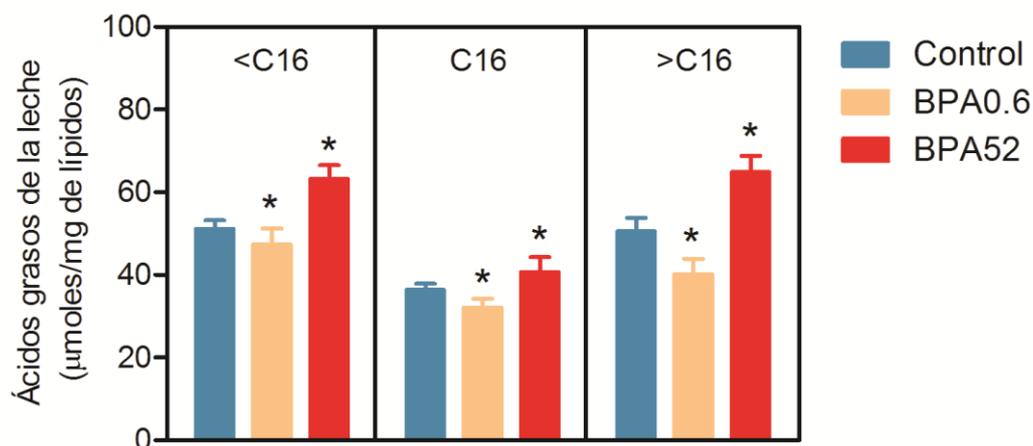
**Tabla 13. Perfil de ácidos grasos (AGs) de la leche de madres F1 expuestas a BPA a mitad de la lactancia.**

Tipo de ácido graso ( $\mu$ moles/mg de lípidos)	Grupos experimentales		
	Control	BPA0.6	BPA52
<b>AGs saturados</b>			
C8:0	14.7 $\pm$ 0.2	12.9 $\pm$ 0.3*	18.3 $\pm$ 0.2*
C10:0	12.0 $\pm$ 0.4	11.3 $\pm$ 0.2	16.1 $\pm$ 0.3*
C12:0	10.2 $\pm$ 0.3	9.5 $\pm$ 0.2	12.7 $\pm$ 0.1*
C14:0	13.1 $\pm$ 0.2	12.6 $\pm$ 0.3	15.0 $\pm$ 0.3*
C16:0	32.5 $\pm$ 0.5	28.8 $\pm$ 0.5*	36.7 $\pm$ 0.6*
C18:0	5.5 $\pm$ 0.2	3.2 $\pm$ 0.1*	8.9 $\pm$ 0.2*
C20:0	2.2 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1*	3.9 $\pm$ 0.1*
<b>AGs monostaurados</b>			
C16:1n-7	3.8 $\pm$ 0.1	3.2 $\pm$ 0.1	3.9 $\pm$ 0.3
C18:1n-9	18.6 $\pm$ 0.3	15.2 $\pm$ 0.4*	22.7 $\pm$ 0.3*
<b>AGs poliinsaturados</b>			
C18:2n-6	15.4 $\pm$ 0.3	11.0 $\pm$ 0.3*	19.1 $\pm$ 0.5*
C20:3n-6	2.5 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1*	4.5 $\pm$ 0.1*
C20:4n-6	1.8 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.1*	1.0 $\pm$ 0.1*
C22:4n-6	0.5 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.1*	0.4 $\pm$ 0.1
C22:5n-3	0.3 $\pm$ 0.04	0.5 $\pm$ 0.1*	0.4 $\pm$ 0.01
C22:6n-3	0.5 $\pm$ 0.05	0.8 $\pm$ 0.1*	0.5 $\pm$ 0.02*

Los valores están expresados como los valores medios  $\pm$  SEM de 8-10 madres F1/grupo  
 \*p<0.01 comparado con grupo control (ANOVA seguido del post test de Tuckey).

Los AGs también fueron categorizados según sus orígenes. La proporción de los AGs de cadena mediana derivadas de la síntesis *de novo* (<C16) fue menor en las muestras de leche del grupo BPA0.6 que en los controles. Más aún, en las muestras de leche de madres F1 expuestas a BPA0.6, la proporción de AGs de cadena larga derivados de la circulación (>C16) y los AGs originadas de ambas fuentes (C16) fueron más bajos que en los controles (Figura 35). Estos resultados fueron consistentes con la menor concentración de TGs cuantificada en muestras de leche en este grupo. En las madres F1 expuestas a BPA52 se observaron resultados opuestos, las proporciones de los AGs de la leche fueron elevados independientemente del origen de AGs, y el mismo resultado fue observado para la concentración de TGs. Estos resultados sugieren que la

exposición perinatal a bajas dosis de BPA modifica la composición y las proporciones de AGs en la leche durante la lactancia. Estos hallazgos podrían indicar que la síntesis de lípidos en la leche está alterada en estos animales a pesar de que las concentraciones de glucosa, colesterol y TGs en el suero fueron similares a aquellos animales control (datos no mostrados).

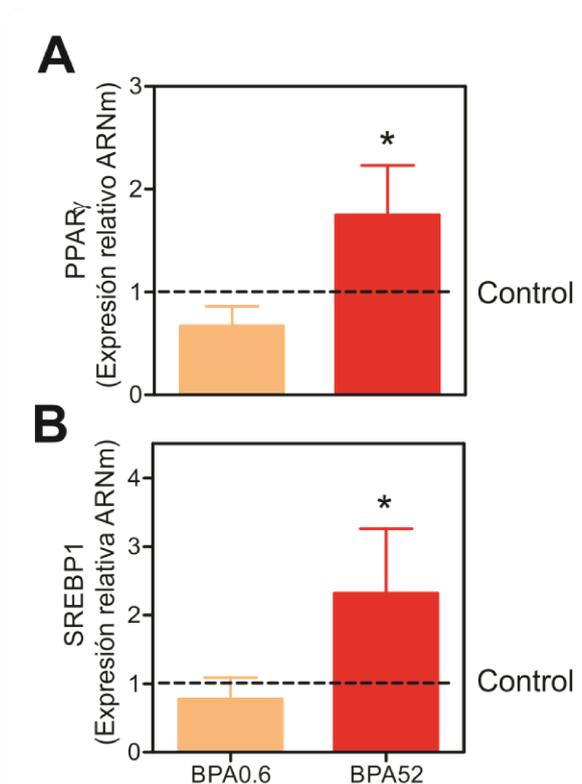


**Figura 35. Perfiles de AGs de la leche a mediados de la lactancia (DL10).** Los AGs fueron categorizados según sus orígenes de la siguiente manera: AGs *de novo* (<C16), AGs preformados (>C16) y AGs de ambas fuentes (C16). Las barras representan los valores medios  $\pm$  SEM de 8-10 animales/grupo (\* $p < 0.01$ ; ANOVA seguido del post test de Tuckey).

#### 4.4 | La expresión de los ARNm de PPAR $\gamma$ y SREBP1 fue modificada por la exposición perinatal a BPA.

PPAR $\gamma$  es conocido por regular la expresión de diversos genes que están involucrados en la síntesis de AGs *de novo*, como el SREBP1, y el almacenamiento de glóbulos grasos de la leche en la glándula mamaria durante la lactancia (Kang y col., 2015; Shi y col., 2013). Por lo tanto, para examinar si los cambios en la fracción lipídica de la leche por la exposición perinatal a BPA están asociados con alteraciones en la regulación en el metabolismo lipídico, se evaluaron los niveles de expresión de los ARNm de PPAR $\gamma$  y SREBP1 en madres expuestas perinatalmente a BPA en DL10.

En DL10, se observó un aumento en los niveles de expresión de ARNm de PPAR $\gamma$  y SREBP1 en las madres F1 expuestas a BPA52 (Figura 36;  $p < 0.05$ ), mientras que no se observaron diferencias significativas entre las madres F1 de los grupos BPA0.6 y control.



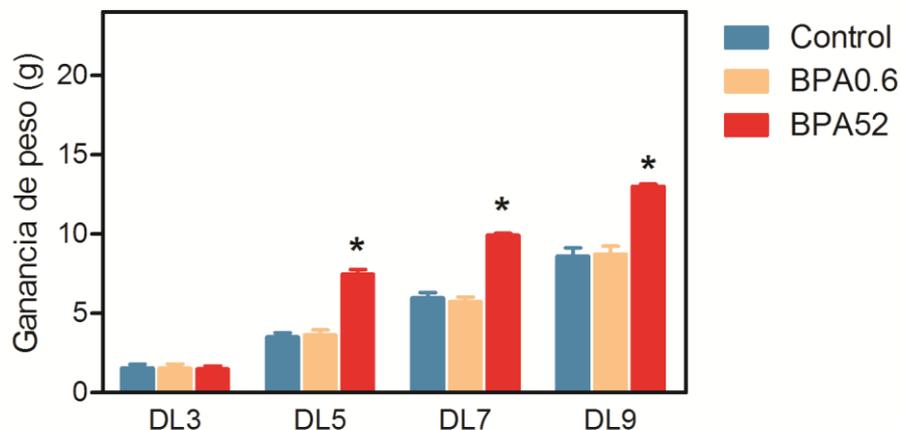
**Figura 36. Regulación de la lipogénesis en las glándulas mamarias de madres F1 expuestas a BPA en DL10.** Los niveles de expresión de los ARNm de (A) PPAR $\gamma$  y (B) SREBP1 fueron evaluados en DL10. Las barras representan los valores medios  $\pm$  SEM de 8-10 animales/grupo. Las muestras fueron normalizadas frente a L19 y el grupo control, al cual se le asignó el valor de 1 (\* $p < 0.01$ ; ANOVA seguido del post test de Tuckey).

#### 4.5 | La exposición perinatal a BPA modificó la ganancia de peso de las crías F2.

La grasa de la leche, la principal fuente de lípidos, provee un alto porcentaje de calorías, y AGs esenciales y lípidos bioactivos que son requeridos para el crecimiento y el desarrollo de los neonatos (McManaman, 2009). Para evaluar si los cambios en el perfil de AGs y el contenido lipídico de la leche inducidos por la exposición a BPA alteran el crecimiento de las crías F2, se analizó la ganancia de peso corporal de las crías F2 desde DL1 a DL9.

La ganancia de peso corporal de las crías F2 del grupo expuesto perinatalmente a BPA52 aumentó desde DL5 a DL9 (Figura 37). Estos resultados podrían indicar que la exposición perinatal a BPA52 no solo modificó el perfil de AGs sino que también alteró el crecimiento y el desarrollo de las crías lactantes F2. En cambio, no se observaron cambios en la ganancia de peso corporal de las crías F2 del grupo de madres F1

expuestas a BPA0.6, a pesar de las alteraciones detectadas en el contenido de lípidos y perfil de AGs de la leche.



**Figura 37. Ganancia de peso de las crías F2 durante la lactancia.** La ganancia de peso de las crías F2 lactantes que pertenecen al grupo BPA52 fue mayor comparada con el grupo control a partir de DL5 hasta DL9. La ganancia de peso fue calculada como la diferencia de peso en gramos de cada DL con respecto al peso de las crías F2 en DL1. Las barras representan los valores medios  $\pm$  SEM. Los asterisco indican un  $p < 0.05$  (ANOVA seguido de Dunnett's post test).

## 5 | Discusión

A medida que la glándula mamaria se diferencia en un órgano secretor, las células secretoras de leche requieren la coordinación de múltiples procesos bioquímicos para producir grandes cantidades de lípidos de la leche (Anderson y col., 2007; Russell y col., 2007). En el presente capítulo, observamos que la exposición perinatal a BPA indujo un retraso en la maduración alveolar de la glándula mamaria durante la activación secretoria, y modificó la síntesis y/o secreción de los MLGs. Además, los cambios en el contenido lipídico en la leche y la composición de AGs inducidos por la exposición a BPA resultaron en un aumento en la ganancia de peso corporal de las crías lactantes F2 de madres F1 expuestas perinatalmente a una dosis equivalente a la establecida por la EPA como dosis segura para el consumo humano.

En el capítulo anterior, hemos establecido que la exposición perinatal a BPA altera la diferenciación funcional de la glándula mamaria de la rata y altera la composición de las proteínas de la leche durante el último tercio de la gestación. Los hallazgos reportados en este capítulo demuestran que la histo-arquitectura de la glándula mamaria de madres F1 expuestas a BPA se mantuvo modificada al inicio de la lactancia (DL2), pero no a

mitad de la lactancia (DL10). Considerando los resultados obtenidos durante la gestación y la lactancia, estos sugieren que la exposición perinatal a bajas dosis de BPA induce un retraso en la maduración alveolar durante la activación secretoria de la glándula mamaria. La interacción entre las células epiteliales y la matriz extracelular, especialmente con la membrana basal, es crítico para la correcta diferenciación lactogénica (Morrison y Cutler, 2010). La exposición de la glándula mamaria a BPA durante periodos críticos de la morfogénesis podrían modificar las propiedades mecánicas de la matriz extracelular, resultando en un retraso en la maduración alveolar durante la activación secretoria. Cuando la lactancia se estableció, las glándulas mamarias de las madres F1 expuestas a BPA fueron capaces de sintetizar y secretar leche; sin embargo, el contenido de proteínas y lípidos, así como también el perfil de AGs de la leche fue diferente a la de los animales control.

Es bien sabido que los defectos en la secreción y/o síntesis de los lípidos de la leche están asociados con alteraciones en la maduración alveolar de la glándula mamaria (McManaman, 2014; Russell y col., 2011). Además, deficiencias de XOR y/o BTN o interferencias con su interacción con ADPH podrían alterar la secreción de los MLGs (McManaman y col., 2002; McManaman y col., 2007). Nuestros resultados demuestran que la exposición perinatal a BPA no solo altera la maduración alveolar sino que también modifica la expresión de los ARNm de BTN, XOR y ADPH, y altera el ensamblaje y/o secreción de los MLGs durante la activación secretoria de la glándula mamaria. La expresión de los ARNm de BTN y XOR fue disminuida por la exposición perinatal a BPA en DG21 y DL2, sugiriendo que la secreción de los MLGs podría estar reducida. En ambos grupos de BPA, el tamaño de los MLGs fue más pequeño que en las ratas control al inicio de la lactancia. En cambio, en DL10, mientras que el área de los MLGs permaneció disminuida en las madres F1 expuestas a BPA0.6, se encontró aumentada en madres F1 expuestas a BPA52. Un patrón similar de expresión fue observado para el ARNm de ADPH en ambos grupos expuestos a BPA durante la lactancia. Ha sido demostrado que ADPH regula el crecimiento de las CLDs previniendo el acceso de las lipasas al núcleo de TGs de las CLDs (Listenberger y col., 2007) y modificando la maduración alveolar en la glándula mamaria (Russell y col., 2011). Por lo tanto, uno de posibles mecanismos por el cual BPA podría modificar la homeostasis de los MLGs en la glándula mamaria es interfiriendo en la expresión de ADPH. Además, los niveles de expresión de ARNm de PLIN observados sugieren que

la exposición perinatal a BPA no modifica la maduración de adipocitos en la glándula mamaria lactante durante este periodo.

Considerando que el crecimiento de las CLDs y el tamaño de los MLGs fueron modificados durante la diferenciación secretoria por la exposición perinatal a BPA, la síntesis de AGs de la leche podía también estar alterada durante este periodo. En DG21, la exposición perinatal a BPA disminuyó los niveles transcripcionales de ACC $\alpha$  y LPL, limitando la síntesis y la entrada de AGs en la glándula mamaria durante la activación secretoria. En contraste, la expresión de los ARNm de las enzimas lipogénicas evaluadas fue similar entre grupos experimentales en DL2, y solo la expresión del ARNm de SCD2 fue elevado en las madres F1 expuestas a BPA52 en DL10. A pesar del restablecimiento de la arquitectura de la glándula mamaria y los similares niveles de expresión de los ARNm de las enzimas lipogénicas, a mitad de la lactancia, nuestros resultados demuestran claramente que la composición de AGs y el perfil lipídico de la leche fueron modificados por la exposición perinatal a BPA. Las discrepancias entre la expresión de ARNm y el contenido de lípidos de la leche observados en nuestro experimento podría deberse a cambios en la regulación post transcripcional de las enzimas lipogénicas inducidos por BPA en ratas F1 lactantes. Por otro lado, los niveles de expresión de los ARNm de PPAR $\gamma$  y SREBP1 fueron mayores en las madres F1 expuestas a BPA52 que en las controles. PPAR $\gamma$  tiene un rol central en la regulación de los niveles transcripcionales de varios genes involucrados en el metabolismo lipídico en la glándula mamaria, incluyendo el SREBP1 (Bionaz y Loor, 2008; Shi y col., 2013), que a su vez regula la síntesis *de novo* de AGs mediante ACC $\alpha$  y FAS (Liang y col., 2002; Rudolph y col., 2010). En células epiteliales mamarias de cabra se ha demostrado que la activación de la vía de señalización de PPAR $\gamma$  promueve la acumulación de lípidos a través del aumento de la expresión y de la actividad del promotor de ADPH (Kang y col., 2015). La exposición perinatal a BPA podría activar directamente o indirectamente la señalización de PPAR $\gamma$  en la glándula mamaria, aumentando de este modo la síntesis *de novo* de los AGs y la expresión del ARNm de ADPH en ratas lactantes F1 expuestas a BPA52 en DL10.

Como previamente mencionamos, el contenido de lípidos de la leche fue modificado por la exposición perinatal a BPA. La concentración de lípidos totales, TGs y fosfolípidos fueron inferiores en madres F1 expuestas a BPA0.6 y elevados en madres

expuestas a BPA52 comparadas con las ratas control. Además, el perfil de AGs fue alterado, y el tamaño del MLG y el perfil de AGs se relacionaron en ambos grupos de BPA. Las madres F1 expuestas a BPA0.6 mostraron MLGs pequeños, niveles reducidos de AGs saturados de cadenas medianas y niveles aumentados de AGs poliinsaturados de cadena larga en la leche. Por otro lado, las madres F1 expuestas a BPA52 mostraron MLGs grandes, con niveles aumentados de AGs saturados de cadena mediana y niveles bajos de AGs poliinsaturados de cadena larga a mediados de la lactación. En este sentido, las modificaciones en la composición en la envoltura de lípidos polares de los MLGs y el perfil de AGs han sido asociados con el tamaño de los MLGs en bovinos (Mesilati-Stahy y col., 2011). De acuerdo con nuestros resultados, la exposición perinatal a BPA52 aparenta inducir la síntesis *de novo* de AGs debido al aumento de los niveles de ácido mirístico, ácido palmítico y ácido esteárico en la leche, indicando que la actividad de FAS estaría aumentada a pesar de que la expresión del ARNm fue similar entre grupos experimentales. Al contrario, los niveles de dichos AGs fueron bajos en ratas F1 lactantes expuestas a BPA0.6. Otro AG importante en la leche es el ácido araquidónico (AA), el cual se requiere para el crecimiento y desarrollo neuronal del recién nacido (Rodríguez-Cruz y col., 2011). Chen y col. (2012) reportaron que la exposición a BPA podría incrementar la actividad desaturasa y aumentar la conversión de ácido linolénico (AL) a AA en testículos. Nuestros resultados muestran que en la leche de las madres expuestas a BPA0.6, en concordancia con el nivel disminuido de LA, existió un incremento significativo de AA. En cambio, las madres F1 BPA52 tuvieron un aumento en el nivel de AL y una disminución en el nivel de AA en relación a las madres control. Estos descubrimientos indican que mientras que la exposición a BPA0.6 aumenta la conversión de AL a AA, la exposición a BPA52 disminuye este proceso metabólico. Estos resultados sugieren que la exposición perinatal a bajas dosis de BPA modifica la calidad de la fracción de lípidos de la leche, un hecho que podría alterar el crecimiento y el desarrollo de las crías lactantes F2. Hecho que se vio reflejado en el grupo BPA52, teniendo en cuenta que además de alterar la composición de AGs de la leche producida por las madres F1, la exposición perinatal a esta dosis de BPA incrementa la ganancia de peso de las crías F2 en relación a los animales control entre DL5 y DL9. Estudios recientes han demostrado la exposición prenatal o perinatal a PEs provoca aumento de peso corporal y modificaciones de la adipogénesis a través de efectos trans-generacionales (Chamorro-García y col., 2013; Zhang y col., 2014). Además, se ha reportado que la exposición perinatal a BPA altera la conducta materna

de las madres F1 e induce en las crías F2 un aumento de su peso corporal (Boudalia y col., 2014). En nuestro experimento, al no haber modificaciones en la conducta materna inducidas por BPA, las diferencias en la ganancia de peso corporal de las crías F2 estarían relacionadas con los cambios en la composición de la leche. En el capítulo 4, hemos descrito que el peso corporal de las crías F2 fue similar entre los distintos grupos experimentales en DL14. La menor producción láctea y el bajo contenido proteico en la leche, previamente observados en las madres F1 expuestas a BPA52, podrían contrarrestar la elevada fracción lipídica de la leche en estos animales, explicando por qué, en DL14, no se observaron cambios entre los grupos a pesar del incremento en la ganancia de peso corporal entre DL5 y DL9.

En conclusión, nuestro estudio demuestra que la exposición perinatal a bajas dosis de BPA induce un retraso en la diferenciación funcional de la glándula mamaria durante la activación secretoria, la cual es restablecida durante la lactancia. Más aún, la calidad de la leche producida a mediados de la lactancia es afectada por la exposición a BPA, sugiriendo que el crecimiento y desarrollo normal de la generación F2 podría estar afectada.

## ***CAPÍTULO 6***

# ***LA EXPOSICIÓN PERINATAL A BISFENOL A MODIFICA LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN $\beta$ -CASEÍNA DURANTE LA ACTIVACIÓN SECRETORIA DE LA GLÁNDULA MAMARIA.***

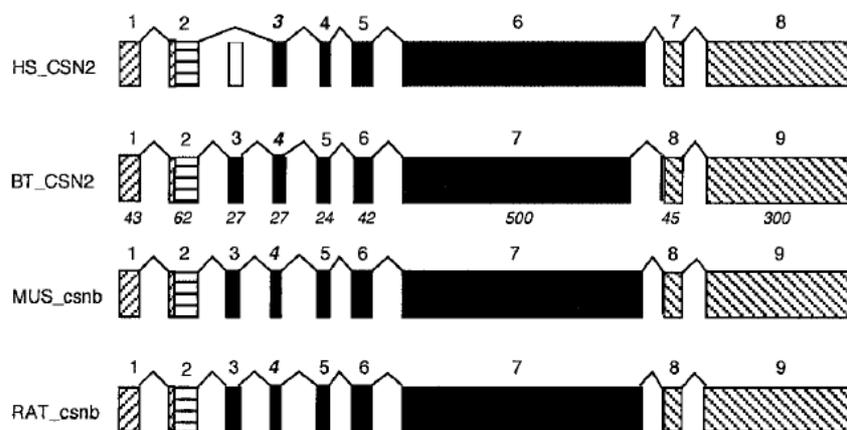
---

*“Todo parece imposible hasta que se hace”*

*Nelson Mandela*

1 | Introducción

La expresión de los genes codificantes de las proteínas de la leche está influenciada por las hormonas lactogénicas, las cuales junto con la cooperación de los factores de crecimiento local, y las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular (MEC), activan factores de transcripción específicos, alteran la organización del citoesqueleto, y cambian el estado de la cromatina y las estructuras nucleares (Kabotyanski y col., 2009; Qian y Zhao, 2014).  $\beta$ -Cas es una de las principales proteínas de la leche secretadas durante la lactancia y es conocida como un marcador de diferenciación funcional de la glándula mamaria de los roedores (Rijnkels y col., 2010). La estructura del gen de  $\beta$ -Cas consta de 9 exones que varían en tamaño desde 21 a 525 pb, y posee dos regiones regulatorias importantes: el promotor proximal y el *enhancer* distal (Jones y col., 1985; Rijnkels y col., 2010). Este último es también conocido como elemento de respuesta a MEC y se localiza a -3.5 kb 5' del sitio de inicio de la transcripción en la rata (Kabotyanski y col., 2006; Rijnkels y col., 2003). Dentro de los genes de caseína, la estructura del gen de  $\beta$ -Cas es el más conservado entre sus ortólogos (Figura 38), y se ha sugerido que es el que más se asemeja al gen de caseína ancestral (Rijnkels, 2002).



**Figura 38. Representación esquemática de la estructura de los exones alineados del gen  $\beta$ -Cas de humano (HS\_CSN2), bovino (BT\_CSN2), ratón (MUS\_csnb) y rata (RAT\_csnb).** Los bloques con líneas diagonales indican las regiones '3 y '5 UTR, los bloques con líneas horizontales indican la secuencia codificante del péptido señal, los bloques negros representan los exones codificantes del péptido maduro y el bloque vacío representa los exones que no están presentes en el ARNm pero sí a nivel de ADN. Los números por encima de los bloques indican el número del exón y los números por debajo de los bloques en bovino indican el tamaño del exón. Modificado de Rijnkels (2002).

La expresión del gen de  $\beta$ -Cas está regulado transcripcionalmente por diversas vías de transducción de señales. Las hormonas lactogénicas, PRL y glucocorticoides modulan la actividad del factor de transcripción Stat5 y el receptor de glucocorticoides (RG), respectivamente (Groner, 2002), los cuales se unen a elementos de respuesta consensos presentes en el promotor proximal y en el *enhancer* distal de  $\beta$ -Cas. Evidencias obtenidas a partir de ensayo de inmunoprecipitación indican que la interacción proteína-proteína entre Stat5 y el RG exhibe un alto grado de sinergia transcripcional sobre el promotor de  $\beta$ -Cas (Doppler y col., 2000). Por otro lado, se ha comprobado que mutaciones en los medios sitios de unión a los elementos de respuesta al RG (1/2 GRE) presentes en el promotor  $\beta$ -Cas disminuye severamente su expresión en las células epiteliales mamarias HC11, indicando que la unión del RG al ADN también es importante (Groner, 2002). Además, se ha comprobado que el reclutamiento de RG es esencial para incrementar la acetilación de histonas resultando en una estructura de cromatina abierta en ambas regiones regulatorias (Kabotyanski y col., 2009). Sumado a PRL y glucocorticoides, la adhesión a las proteínas de membrana basal (especialmente la laminina-1) es también necesaria para la regulación de la expresión de  $\beta$ -Cas (Alcaraz y col., 2008; Streuli y col., 1995). Laminina transduce su señal al interior de las células epiteliales a través de su unión a los receptores de integrina (i.e. ITG  $\alpha 6\beta 1$  y  $\alpha 6\beta 4$ ) y a otras moléculas de la superficie celular como es el distroglicano (DAG1) (Muschler y col., 1999), modulando la vía de señalización dirigida por PRL mediante la activación de interacciones Stat5-ADN (Edwards y col., 1998; Streuli y col., 1995). Con respecto a DAG1, se ha demostrado que su delección altera la morfogénesis acinar mamaria e inhibe la expresión de las proteínas de la leche en células epiteliales mamarias (Weir y col., 2006).

Las modificaciones epigenéticas pueden producir alteraciones en la conformación de la cromatina mediante la metilación del ADN o modificaciones de histonas y ARNs no-codificantes, las cuales son asociadas con una cromatina activa/abierta o una cromatina inactiva/cerrada (Li, 2002). Teniendo en cuenta que los mecanismos epigenéticos son también considerados reguladores de la transcripción de la expresión de las proteínas de la leche (Qian y Zhao, 2014), la expresión del gen  $\beta$ -Cas podría ser controlada a nivel transcripcional a través de la modificación de la accesibilidad al ADN de los factores de transcripción. Con respecto a esto, se ha sugerido que el ambiente de la glándula mamaria durante su desarrollo, desde la vida fetal a la lactancia, podría influenciar la

performance lactacional del animal mediante alteraciones epigenéticas del genoma (Rijnkels y col., 2010). Como mencionamos previamente, se ha demostrado que la exposición a BPA altera el desarrollo de la glándula mamaria (Gore y col., 2015; Soto y col., 2013) y la diferenciación funcional en roedores. Además, diversos estudios han demostrado que la exposición maternal a BPA induce efectos postnatales sobre el estado de metilación del ADN y modificaciones en las histonas que alteran la expresión de genes específicos en las crías (Kundakovic y Champagne, 2011). En los capítulos anteriores, hemos descrito que la exposición perinatal a bajas dosis de BPA retrasa la diferenciación de la glándula mamaria, modifica la producción de la leche, y altera tanto las proteínas como la composición de lípidos de la leche en ratas F1 lactantes. En el presente capítulo, examinamos si la exposición perinatal a bajas dosis de BPA altera la regulación transcripcional del gen de  $\beta$ -Cas a través de cambios en las hormonas lactogénicas/vías de señalización derivadas de la MEC o modificaciones epigenéticas en las glándulas mamarias de madres F1 al inicio de la lactancia.

## **2 | *Objetivos específicos***

---

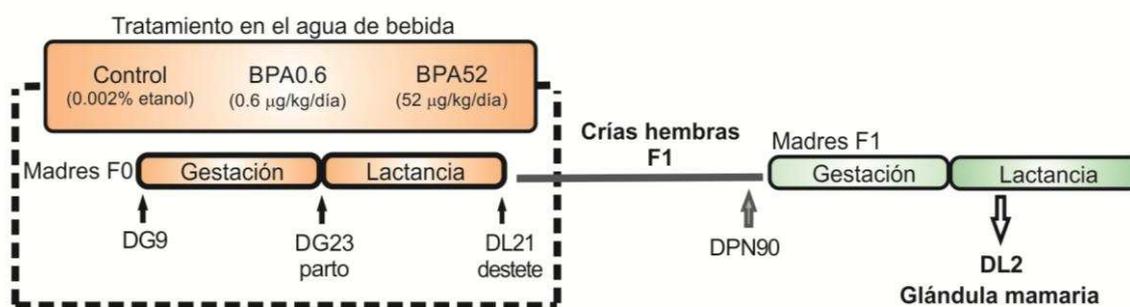
*Utilizando crías F1 que fueron perinatalmente expuestas a BPA se evaluaron:*

- 1) la síntesis y/o secreción de  $\beta$ -Cas y su regulación al inicio de la lactancia:** se cuantificó la expresión de  $\beta$ -Cas por IF y RT-PCR en tiempo real. Además, se evaluó la expresión de pStat5a/b mediante IHQ y del RPRL y RG por RT-PCR en tiempo real. Por otro lado, se cuantificó la expresión de los receptores de laminina (mediante RT-PCR en tiempo real).
- 2) los potenciales mecanismos de acción de los estrógenos ambientales sobre la funcionalidad de glándula mamaria.** Se utilizaron diferentes metodologías tales como inmunoprecipitación de cromatina y análisis de metilación de ADN genómico (mediante PCR específica de metilación) para caracterizar las posibles modificaciones en la expresión génica resultantes de la exposición perinatal a BPA.

### 3 | Materiales y métodos

#### 3.1 | Diseño experimental

El diseño experimental se explica detalladamente en el capítulo 3 sección 1.1.2. Brevemente, ratas hembra preñadas de la cepa Wistar (F0) fueron expuestas a través del agua de bebida a 0, 0.6 y 52  $\mu\text{g}$  de BPA/kg/día desde el DG9 hasta el destete. Una vez realizado el destete, las crías hembras F1 se transfirieron a un ambiente libre de xenoestrógenos. En DPN90, las hembras F1 fueron apareadas con machos de fertilidad comprobada (Figura 39).



**Figura 39.** Esquema del tratamiento experimental utilizado para estudiar los efectos de la exposición perinatal (gestación + lactancia) a bajas dosis de BPA en la glándula mamaria de hembras F1 al inicio de la lactancia. F0 y F1 indican las distintas generaciones de animales utilizados en el desarrollo del trabajo. DG: día de gestación; DL: día de lactancia; DPN: día postnatal.

Para evaluar si la exposición perinatal a BPA altera la expresión proteica de  $\beta$ -Cas y la regulación genética al inicio de la lactancia, se obtuvieron muestras de glándula mamaria de madres F1 en DL2 (n= 8-10 madres/grupo). De la cadena mamaria abdomino-inguinal izquierda, la glándula mamaria N°4 fue fijada en 10% (v/v) formol buffer y embebida en parafina. Además, porciones de la glándula mamaria contralateral excluyendo los nódulos linfáticos fueron congelados rápidamente en nitrógeno líquido y almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  para análisis mediante RT-PCR en tiempo real, metilación del ADN e inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).

#### 3.2 | Ensayos de IHQ e IF.

La expresión proteica de  $\beta$ -Cas y pStat5a/b se analizó mediante ensayos de IF e IHQ, respectivamente, como previamente se describió en el capítulo 4 sección 3.5.

Brevemente, secciones de glándula mamaria (5  $\mu\text{m}$  de espesor) fueron desparafinadas y deshidratadas en diferentes grados de etanol. Para el ensayo de IF, las secciones fueron bloqueadas con 10 mg/ml de borohidruro de sodio (Sigma-Aldrich) para minimizar la autofluorescencia. Se realizó la incubación con el anticuerpo primario contra  $\beta$ -Cas (1:400, conejo; gentilmente provisto por Dr. Bussmann) durante toda la noche a 4°C. Luego, las secciones fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-conejo Alexa Fluor 488 (Invitrogen) durante una hora, montado en ProLong Gold (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Buenos Aires, Argentina) con DAPI (Sigma-Aldrich) y guardado en la oscuridad a 4°C hasta su evaluación como se describió en capítulo 4 sección 3.5.

Para los ensayos de IHQ, el anticuerpo primario contra pStat5a/b (1:100, conejo; Tyr, Santa Cruz Biotechnology) fue incubado toda la noche a 4°C. Las reacciones fueron reveladas utilizando el método de peroxidasa estreptavidina-biotina y DAB como cromógeno (Sigma-Aldrich). La expresión proteica de pStat5a/b y su localización fueron evaluadas en dos secciones de tejido mamario por animal.

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

### **3.3 | *RT-PCR en tiempo real***

El ensayo de RT-PCR en tiempo real fue llevado a cabo se describió en el capítulo 3 sección 6.3. Primeramente, se extrajo ARN total de las glándulas mamarias de ocho animales de cada uno de los grupos experimentales (Control, BPA0.6 y BPA52) extraídos en DL2. Luego, se prosiguió con la RT para la obtención de los ADNc como se describió en el capítulo 3 sección 4.3. Los pares de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los ADNc se muestran en la Tabla 13. Las muestras fueron analizadas por triplicado, y los niveles de ADNc fueron detectados utilizando PCR en tiempo real con el termociclador Rotor-Gene Q como se explicó previamente en el capítulo 3 sección 6.3.

Tabla 14. Secuencia de oligonucleótidos utilizados

Gen	Sentido (5'→ 3')	Antisentido (5'→ 3')
<b>β-Cas</b>	AAACATCCAGCCTATTGCTC	CATCTGTTTGTGCTTGGGAA
<b>RPRL</b>	AAAGTATCTTGTCCAGACTCGCTG	AAACAGATGACAGCAGAGAGAATG
<b>RG</b>	ACAGCATCCCTTTCTCAGCA	CTCATTCCAGGGCTTGAGTAC
<b>ITGα6</b>	CTCGTGAGGGCGTCCATAGA	TCCACCACGCTATCCCTGA
<b>ITGβ1</b>	GGCTGAAGACTACCCTATTG	GCGGAAGTCTGAAGTAATCC
<b>DAG1</b>	AACCAGCTTGAGGCGTCCAT	CTGTTGGAATGCTCACTCGG
<b>HDAC1</b>	CAATGAAGCCTCACCGAATC	TTGGTCATCTCCTCAGCGTT
<b>HDAC3</b>	CAACTGGGCTGGTGGTCTAC	CGAGGGTGGTACTTGAGCAG
<b>EZH2</b>	GATTTTCCAGCACAAAGTCAT	AACAGTTTCATCTCCACCA
<b>L19</b>	AGCCTGTGACTGTCCATTCC	TGGCAGTACCCTTCCTCTTC

β-Cas: β-caseína; DAG1: distroglicano; EZH2: *enhancer of zeste homolog 2*; HDAC: histona deacetilasa; ITGα6: integrina α6; ITGβ1: integrina β1; RG: receptor de glucocorticoide; RPRL: receptor de prolactina.

La pureza de los productos fue confirmada a través de curvas de disociación, y muestras al azar fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa. El cálculo del nivel de expresión relativo de cada uno de los genes se realizó mediante el método de curva estándar (Cikos y col., 2007), y el gen de referencia L19 y el grupo control fueron utilizados para normalizar los valores de Ct. No hubo diferencias significativas de la expresión de L19 entre los diferentes grupos experimentales.

### 3.4 | Bioinformática

El gen β-Cas de la rata (número de acceso NM\_017120) fue analizado para buscar islas CpG utilizando el software Methyl Primer Express Software v1.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Además, las regiones del promotor, *enhancer* y exón VII de β-Cas fueron también analizadas para la búsqueda de los sitios de restricción *Bst*UI ó *Mae* II. Para reconocer los sitios de unión a los factores de transcripción, utilizamos el programa TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>). Los oligonucleótidos para las PCR fueron diseñados con el software Vector NTI Suite Version 6.0 (Infomax Inc., North Bethesda, MD, USA).

### 3.5 | *Análisis del estado de metilación del ADN*

Para evaluar el estado de metilación del ADN en las regiones del promotor, *enhancer* y exón VII del gen de  $\beta$ -Cas se utilizó la técnica combinada de digestión con enzimas de restricción sensibles a metilación seguida de PCR en tiempo real (Rossetti y col., 2015). Para la extracción de ADN genómico (ADNg) a partir de muestras de glándula mamaria se utilizó el método fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. La concentración total de ADN fue determinada por medición a  $A_{280}$  y el ADN fue almacenado entre 2-8°C. Para reducir el tamaño de los fragmentos de ADN, 1  $\mu$ g del ADNg total fue digerido con 7.5 unidades de *EcoRI* (Promega, Madison, WI) y el producto de digestión fue purificado mediante una extracción con fenol/cloroformo. Luego, 1  $\mu$ g de ADN clivado con *EcoRI* fue incubado en baño de agua (Tecno Dalvo, Santa Fe, Argentina) durante 1 hora con 10 unidades de *BstUI* (New England BioLabs, Beverly, MA) ó 1 unidad de *Mae II* (Roche Applied Science, Indianapolis, IN) en buffer enzimático 1X a 60 °C o 50 °C, respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante. Nuevamente, los productos de digestión fueron purificados mediante el método fenol/cloroformo. El nivel de expresión relativa de las diferentes regiones del ADN fue analizado mediante PCR en tiempo real (como se describió previamente). Las secuencias de los oligonucleótidos empleados se muestran en la Tabla 14. Cada muestra fue cuantificada por duplicado o triplicado, las enzimas de restricción sensibles a metilación *MaeII* o *BstUI* fueron incapaces de cortar en los sitios metilados permitiendo la amplificación del fragmento. Como control interno (CI) se amplificó una región del gen que no contenía sitios *BstUI* o *Mae II* (control normalizador). Los niveles relativos de metilación se calcularon utilizando el método de curva estándar relativa previamente descrito en el capítulo 3 sección 6.3.

### 3.6 | *Ensayo de ChIP*

El análisis de ChIP fue realizado siguiendo un protocolo modificado de aquel descrito por Kazi y Koos (2007). Brevemente, 40 mg de muestra de glándula mamaria congelada fueron disociados en pequeños pedazos e inmersos en una solución de 1% formaldehído durante 15 min. Luego, la reacción fue detenida con la adición de 1.5 ml de glicina 1M durante 5 min. El precipitado de tejido obtenido fue homogeneizado en 600  $\mu$ l de buffer de lisis RIPA [compuesto por Nonidet P40 1%, deoxicolato de sodio 0.5%, duodecil

sulfato de sodio (SDS) 0.1%, EDTA 2 mM, fluoruro de sodio 50 mM; todos de Sigma-Aldrich] conteniendo inhibidores de fosfatasa (PhosSTOP, Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablet, Roche Diagnostics) y proteasas (Complete Mini, Protease Inhibitor Cocktail Tablet, Roche Diagnostics) en buffer PBS 0.1 M pH: 7.00. Los homogenatos fueron centrifugados a 12000 rpm durante 5 min a 4°C y los sobrenadantes fueron removidos y descartados. Los núcleos separados fueron lisados en un buffer de lisis SDS [Tris-HCL (pH 8.1) 50mM, EDTA 5mM, SDS 0.1%] conteniendo inhibidores de proteasa y fosfatasa (como se mencionó anteriormente) e incubados en hielo durante 10 min. Luego, las muestras fueron sonicadas en hielo utilizando el Sonicador Vibra-Cell™ VCX750 (Sonics & Materials, Newtown, CT, USA) al 30% de potencia y empleando 40 ciclos de 2 seg cada uno, seguido de un intervalo de 1 min de descanso entre ciclos. El tamaño de fragmentos de ADN resultante fue entre 0.5-1.0 kb. Lugo de la sonicación, las muestras fueron centrifugadas a 14000 rpm durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes fueron luego recolectados y almacenados a -80°C. La alícuotas de las muestras sonicadas fueron descongeladas en hielo y se realizó una dilución 1:10 con buffer de dilución [Tris-HCl (pH. 8.1) 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, triton X-100 1%, e inhibidores de proteasas y fosfatasa]. Luego, 50 µl de Dynabeads® Proteína A (Invitrogen) fueron incubados con 2.5 µl de anticuerpo policlonal de conejo Anti-Acetil Histona H3 (H3Ac; Upstate Biotechnology, Lake 210 Placid, NY, USA) ó Anti-trimetil-Histona H3 (Lis 27) (H3K27me3; EMD Millipore, Darmstadt, Germany) durante 10 min. Las muestras previamente diluidas fueron incubadas con el complejo de anticuerpo-Dynabeads® Proteína A durante toda la noche a 4°C con rotación. Para el control de anticuerpo no específico, un volumen igual de suero de conejo normal fue sustituido por el anticuerpo específico. Los complejos inmuprecipitados (IPs) fueron lavados 3 veces con PBS y una vez con buffer TE (pH 8.0). Los complejos Proteína-ADN fueron eluidos de los Dynabeads® Proteína A por incubación en 100 µl de buffer de elución [NaHCO<sub>3</sub> 50mM y SDS 1%] y 0.5 µl de proteinasa K (Sigma-Aldrich) a 65°C durante 2 hs para remover la proteína. El *cross-linking* fue revertido con incubación a 95°C durante 10 min. El 10% del sobrenadante total fue guardado como control de input total y procesado con los IPs eluidos al comenzar el paso de reversión del *cross-linking*. El ADN fue purificado utilizando el kit comercial Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo (Invitrogen). El ADN recuperado fue luego cuantificado mediante PCR en tiempo real. Las secuencias de oligonucleótidos utilizados para amplificar las secuencias genómicas de las regiones del *enhancer*,

promotor y exón VII del gen de  $\beta$ -Cas se muestran en la Tabla 14. Las cantidades relativas de los IPs y el ADN input fueron determinados por comparación con la curva estándar generada mediante diluciones seriadas del ADN input. Tanto los IPs experimental como el ADN input fueron realizados por triplicado. Los IPs con anticuerpos específicos fueron normalizados primero por substracción de la señal obtenido con el control de anticuerpo no específico, y luego expresando el valor como la relación entre el ADN input y el valor normalizado de los valores de las muestras control.

**Tabla 15. Secuencias de oligonucleótidos utilizados para los análisis del estado de metilación de ADN y ChIP.**

Gen	Sentido (5' → 3')	Antisentido (5' → 3')
<i>Análisis de metilación del ADN</i>		
Control Interno <i>Enhancer</i>	GACTTAGAATGCCACAGACTTAA	CGAGTCTGTTTTACAGCAATGG
MaeII <i>Enhancer</i>	AAAAGGAAATGTTGCCTGGG	TTGGCTGCCTTGTGTATCCT
Control Interno Promotor	TGTCCCCCAGAATTTCTTGG	GGATGATGGTCTATCAGACTCTGTG
MaeII (a) Promotor	TAGGTGAGGTTAAAGCCCC	GGTGAAGGAACTTGTCCAGG
MaeII (b) Promotor	TCTTGTCTCCGCTAAAGGT	CTGACTTTCAAAAGCCTGTCC
Control Interno Exón VII	ATTCCACAAAACATCCAGCC	CATCTGTTTGTGCTTGGGAA
BstUI Exón VII	ACCTTCCTCAGTCTCCAGCC	GGAAGAGGGGTGCTAGTTGC
<i>Análisis de modificación de las histonas</i>		
<i>Enhancer</i> (a)	TTTTTTTTTGGCTCAGACCA	AACACAGAAGTAAGCAAGCCTTA
<i>Enhancer</i> (b)	TTTCTTAGAAGTCACGTATTGTTGC	TGAATTAAGTCTGTGGGCATTCT
Promotor (a)	TGTGTACTAGGCTGGAGAGA	TCTGGGGGACATTAACAAG
Promotor (b)	TGTCCCCCAGAATTTCTTGG	GGATGATGGTCTATCAGACTCTGTG
Exón VII (a)	ATTCCACAAAACATCCAGCC	CATCTGTTTGTGCTTGGGAA
Exón VII (b)	ACCTTCCTCAGTCTCCAGCC	GGAAGAGGGGTGCTAGTTGC
Exón VII (c)	AACTAGCACCCCTCTTCCAA	GGAATGAAGTTGTTGAGTGCC

### 3.7 | Análisis estadísticos

Todos los resultados se expresaron como media  $\pm$  SEM. Los resultados experimentales fueron analizados con test paramétricos (ANOVA) para obtener la significancia global, y el post-hoc test de Dunnett ( $p > 0.05$ ) para comparar grupos experimentales con el

grupo control. Para el análisis de RT-PCR en tiempo real se utilizó el test no paramétrico U de Mann-Whitney. Un  $p < 0.05$  será considerado significativo.

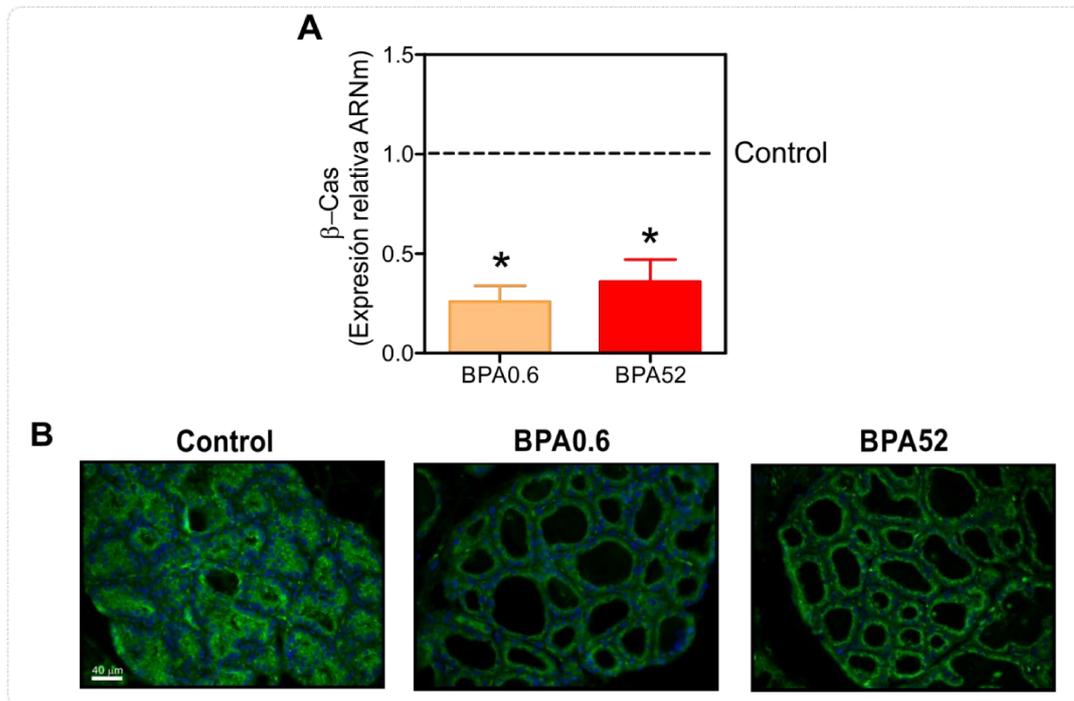
#### **4 | Resultados**

---

Como en los experimentos previamente descritos, la exposición perinatal a BPA a través del agua de bebida no produjo signos de embriotoxicidad. Además, la tasa de gestación de las hembras F1 no difirió de los animales Control no expuestos F0 o F1, y tanto el número promedio de crías F2 vivas y el peso corporal de las crías F2 no fue significativamente diferente de aquellos del grupo control.

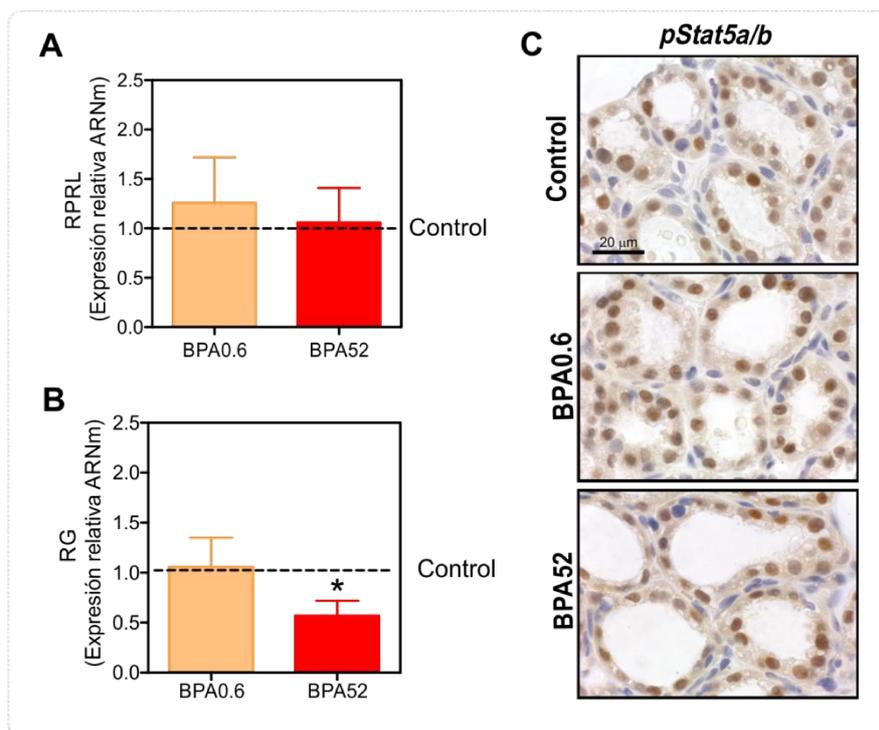
##### ***4.1 | La exposición perinatal a BPA altera la expresión de $\beta$ -Cas independientemente de la activación del RPRL.***

En el capítulo 4 hemos demostrado que la exposición perinatal a BPA altera la síntesis de la proteína de la leche  $\beta$ -Cas durante la diferenciación de la glándula mamaria en ratas F1 preñadas. Para definir las acciones del BPA sobre la síntesis de  $\beta$ -Cas durante la activación secretoria, la expresión del ARNm y de la proteína fue analizada en DL2. El nivel de ARNm de  $\beta$ -Cas fue reducido en ambos grupos tratados con BPA al inicio de la lactancia (Figura 40A;  $p < 0.05$ ) y, como se muestra en la Figura 40B, esta menor expresión de ARNm fue asociado con una disminución del nivel de la expresión proteica de  $\beta$ -Cas.



**Figura 40. Expresión de  $\beta$ -Cas al inicio de la lactancia.** (A) Cuantificación de la expresión del ARNm de  $\beta$ -Cas mediante RT-PCR en tiempo real en madres F1 en DL2. Las barras representan el valor medio  $\pm$  SEM de 8 animales/grupo. Las muestras fueron normalizadas frente a la expresión L19 y los animales control, y el valor de 1 fue asignado al grupo control (\*  $p < 0.05$ , Mann-Whitney test). (B) Imágenes representativas de IF de la expresión de  $\beta$ -Cas en el alveolo mamario en DL2. El citoplasma y el lumen apical de la célula alveolar fueron positivos para  $\beta$ -Cas (verde) mientras el núcleo (azul, DAPI +) fue negativo. En DL2, ambos grupos expuestos a BPA tuvieron una baja intensidad de la expresión de  $\beta$ -Cas que el grupo control, en concordancia con los resultados de la expresión del ARNm. Barra = 40  $\mu$ m.

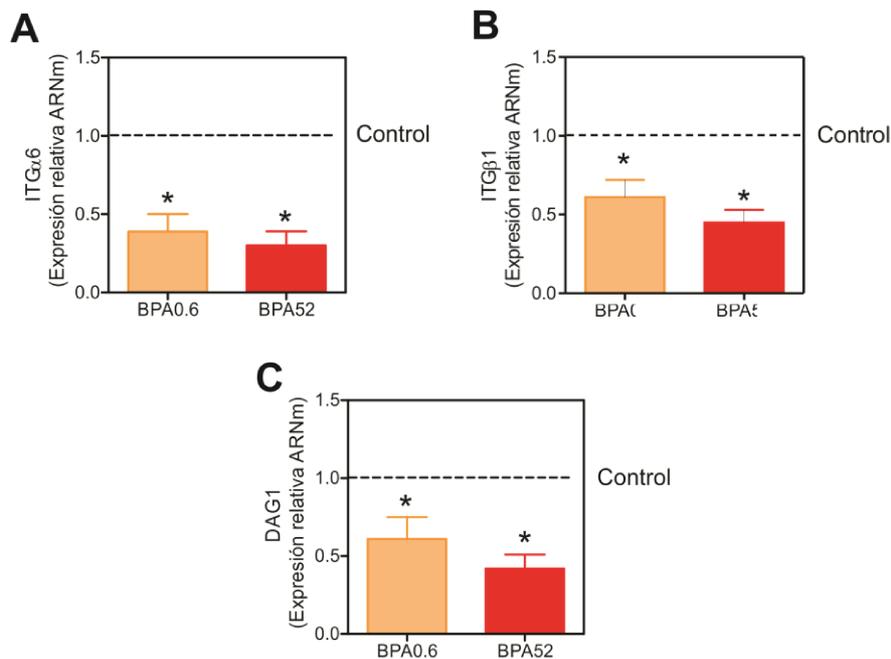
Para evaluar si la disminución de la expresión de  $\beta$ -Cas observado en las madres F1 expuestas a BPA está relacionada con los cambios en las acciones de PRL o los glucocorticoides en las células epiteliales mamarias, la expresión del ARNm del RPRL, del factor de transcripción pStat5a/b y el ARNm del RG fue analizada en la glándula mamaria lactante. La exposición a BPA no modificó la expresión del ARNm del RPRL ni la expresión proteica pStat5a/b en DL2 (Figura 41A, C). Interesantemente, los ensayos de IHQ mostraron que la expresión de pStat5a/b fue nuclear en todos los grupos experimentales; sugiriendo que la vía de señalización de PRL está activa en la glándula mamaria (Figura 41C). Por otro lado, la expresión de ARNm del RG fue inferior en las madres expuestas a BPA52 que en las madres F1 control (Figura 41B;  $p < 0.05$ ).



**Figura 41. Vía de señalización de PRL y expresión del RG en la glándula mamaria de madres F1 expuestas a BPA.** Los niveles de expresión del ARNm del (A) RPRL y (B) RG fueron cuantificados durante la activación secretoria. Las barras representan el valor medio  $\pm$  SEM de 8 animales/grupo. Las muestras fueron normalizadas frente a la expresión L19 y los animales control, y el valor de 1 fue asignado al grupo control (\*  $p < 0.05$ , Mann-Whitney test). (C) Imágenes representativas del ensayo de IHQ de la expresión de pStat5a/b en la glándula mamaria. No se observaron diferencias significativas de la expresión nuclear de pStat5a/b entre grupos experimentales. Barra = 20  $\mu$ m.

#### 4.2 | La interacción célula epitelial-laminina fue modificada por la exposición perinatal a BPA al inicio de la lactancia.

Ha sido demostrado que la cooperación entre laminina y PRL regula la unión de pStat5a/b al promotor de  $\beta$ -Cas en las células epiteliales mamarias (Xu y col., 2007). Para examinar si los receptores de superficie celular para laminina fueron afectados por la exposición perinatal a BPA, se analizó la expresión del ARNm de las subunidades ITG $\alpha$ 6 y ITG $\beta$ 1 del receptor de laminina, así como también la expresión de DAG1, una de las moléculas de superficie celular más importante vinculadas a la señalización intracelular mediada por laminina. En DL2, el nivel transcripcional de ITG $\alpha$ 6, ITG $\beta$ 1 y DAG1 fue menor en todos los animales expuestos a BPA en relación a las ratas control (Figura 42;  $p < 0.05$ ).



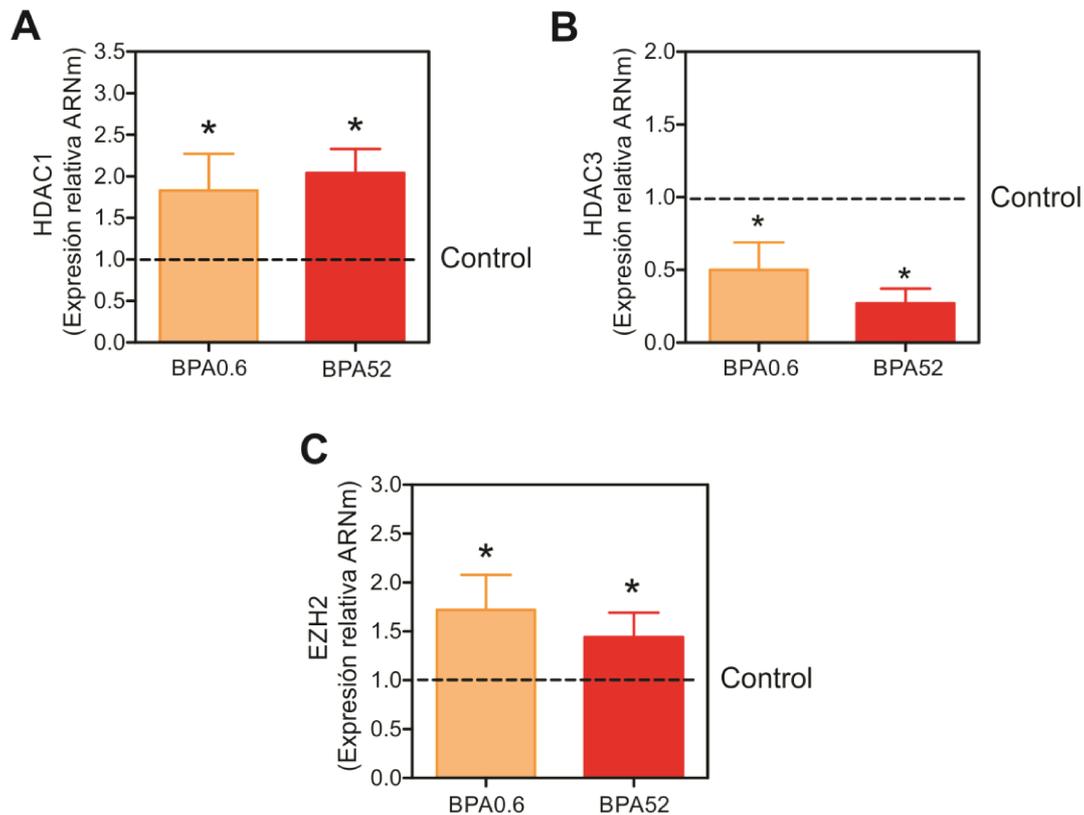
**Figura 42. Expresión de los receptores de laminina en la glándula mamaria de madres F1 expuestas a BPA.** Los niveles de expresión de (A) ITG $\alpha$ 6, (B) ITG $\beta$ 1 y (C) DAG1 fueron evaluados en DL2. Las barras representan el valor medio  $\pm$  SEM de 8 animales/grupo. Las muestras fueron normalizadas frente a la expresión L19 y los animales control, y el valor de 1 fue asignado al grupo control (\*  $p < 0.05$ , Mann-Whitney test).

#### 4.3 | La exposición perinatal a BPA altera la expresión de las enzimas modificadoras de histonas durante la activación secretoria de la glándula mamaria.

Los modificadores de histonas como p300 e histona deacetilasa 1 (HDAC1) son reclutados e involucrados en la activación de la expresión del gen de  $\beta$ -Cas luego de la estimulación de las hormonas lactogénicas (Kabotyanski y col., 2009). En cambio, HDAC3, junto con YY-1 y C/EBP, es parte de un complejo de represión que se une a el promotor de  $\beta$ -Cas en ausencia de las hormonas lactogénicas (Kabotyanski y col., 2009). Para definir si la exposición perinatal oral a BPA alteró los modificadores de histona HDAC1 y HDAC3, se evaluaron los niveles de expresión de sus ARNm. En DL2, el nivel de expresión de HDAC1 fue mayor (Figura 43A;  $p < 0.05$ ) mientras que el de HDAC3 fue menor (Figura 43B;  $p < 0.05$ ) en hembras F1 expuestas a BPA que las controles.

Otra enzima modificadora de histona de interés es la metiltransferasa específica para la histona 3 lisina 27, EZH2, la cual está involucrada en el silenciamiento genético y la tumorigénesis (Kuzmichev y col., 2002; Rea y col., 2000). Para evaluar si la expresión

de EZH2 fue afectada por el tratamiento oral perinatal con BPA, analizamos la expresión de su ARNm. En DL2, la exposición a ambas dosis de BPA aumentó su expresión en comparación con las madres control (Figura 43C;  $p < 0.05$ )

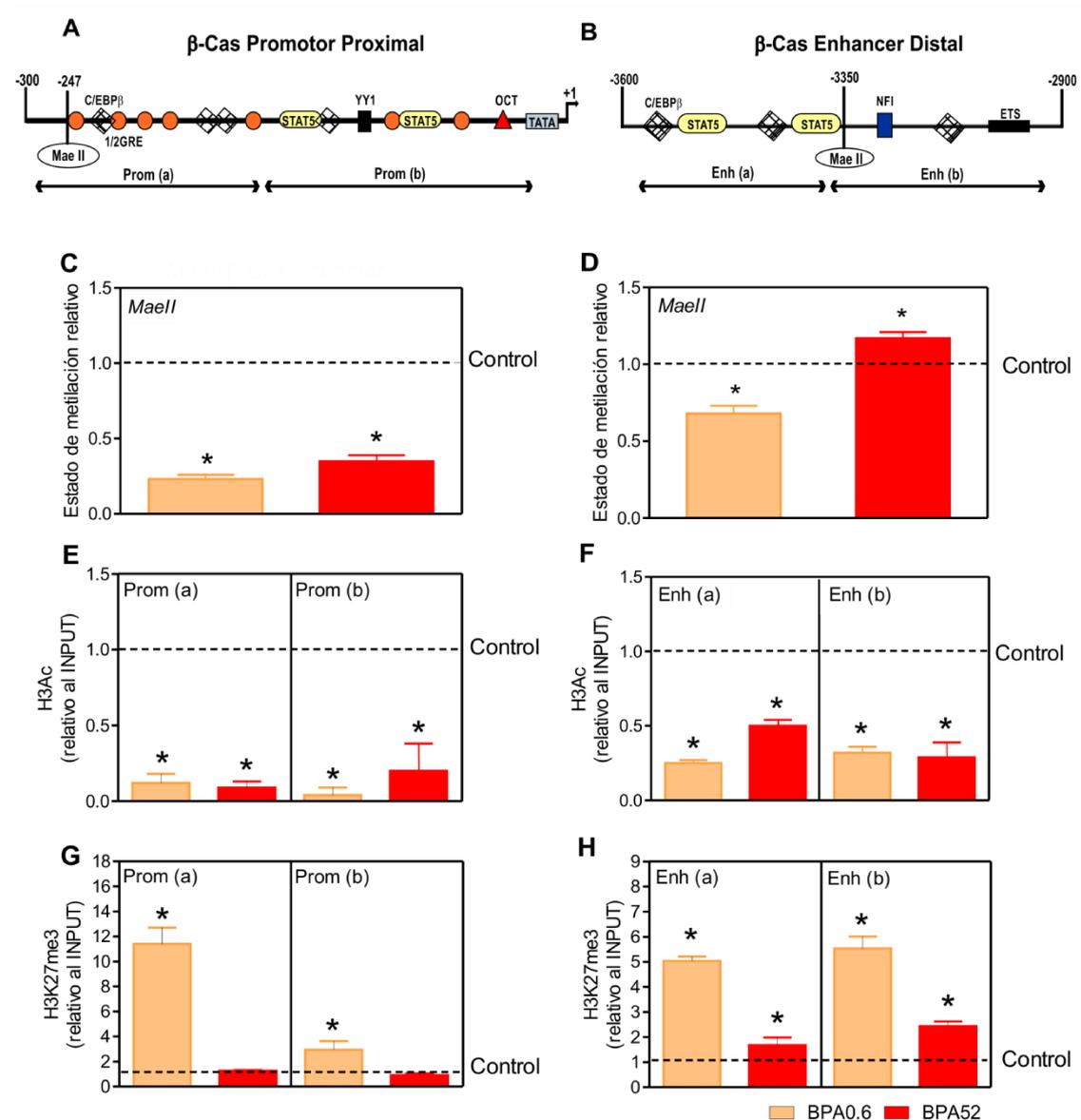


**Figura 43.** La expresión de las enzimas modificadoras de histonas involucradas en la conformación de la cromatina de la glándula mamaria al inicio de la lactancia. La expresión de (A) HDAC1, (B) HDAC3 y (C) EZH2 fue cuantificada en DL2. Las barras representan el valor medio  $\pm$  SEM de 8 animales/grupo. Las muestras fueron normalizadas frente a la expresión L19 y los animales control, y el valor de 1 fue asignado al grupo control (\*  $p < 0.05$ , Mann-Whitney test).

#### 4.4 | La exposición perinatal a BPA induce alteraciones en la metilación de ADN e induce modificaciones de la histona 3 en el promotor y enhancer del gen de $\beta$ -Cas.

Los mecanismos epigenéticos tales como metilación del ADN y modificación de histonas cumplen un rol importante en la regulación transcripcional de los genes de caseínas durante el desarrollo de la glándula mamaria (Qian y Zhao, 2014; Rijnkels y col., 2013; Rijnkels y col., 2010). Para evaluar si la exposición perinatal a BPA indujo cambios en la metilación del ADN y modificación de las histonas en el promotor proximal y el *enhancer* distal de  $\beta$ -Cas, se realizaron los análisis tanto del estado de metilación del ADN como el de ChIP en DL2. Primero, se estudió el gen de  $\beta$ -Cas y se

buscaron sitios candidatos para metilación del ADN a través de un software bioinformático. No se observaron islas CpG en el gen de  $\beta$ -Cas; sin embargo, se encontraron dos sitios de restricción de ADN sensible a metilación para *MaeII*: uno de ellos en el promotor y el otro en el *enhancer* de  $\beta$ -Cas (Figura 44A y B). Ambos grupos expuestos a BPA exhibieron una disminución del estado de metilación en el promotor de  $\beta$ -Cas (Figura 44C;  $p < 0.05$ ). En contraste, el *enhancer* de  $\beta$ -Cas mostró un aumento en el estado de metilación en los animales BPA52 y una disminución en aquellos de BPA0.6 (Figura 44D;  $p < 0.05$ ). Adicionalmente, los niveles de H3Ac y H3K27me3 en diferentes regiones del promotor y *enhancer* de  $\beta$ -Cas fueron medidos mediante ensayos de ChIP seguido de PCR en tiempo real (Figura 44E-H). En la mayoría de las regiones analizadas, los resultados de ChIP mostraron un nivel reducido de H3Ac en ambos grupos expuestos a BPA (Figura 44E-F;  $p < 0.05$ ). Junto con el análisis de metilación de histonas, las madres F1 expuestas a BPA0.6 revelaron un incremento del nivel de H2K27me3 en el promotor de  $\beta$ -Cas comparado con los animales control (Figura 44E;  $p < 0.05$ ). También, el nivel de H3K27me3 fue mayor en el *enhancer* de  $\beta$ -Cas en ambos grupos expuestos a BPA (Figura 44H;  $p < 0.05$ ).

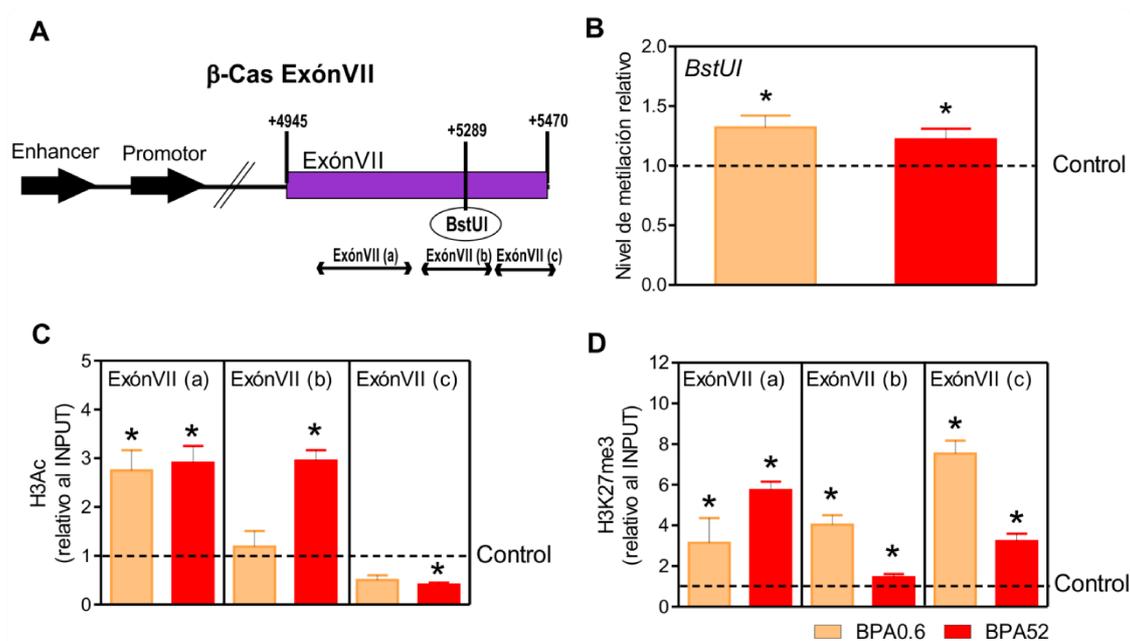


**Figura 44. Análisis del estado de metilación del ADN y de la modificación de histonas en las regiones regulatorias del gen de  $\beta$ -Cas en DL2.** Representación esquemática del (A) promotor y (B) enhancer de  $\beta$ -Cas, sus proteínas de unión, áreas CG sensibles a metilación y los amplicones utilizados en el ensayo de ChIP. Se indica la posición de la caja TATA. Los sitios de unión predichos para Stat5, CCAAT/proteína de unión al enhancer (C/EBP), Ying Yang 1 (YY-1), factor de unión octamero-1 (Oct-1), sitio específico de transformación E26 (Ets), sitio de unión al factor nuclear 1 (NF-1) y los medios elementos de respuesta para glucocorticoides (1/2 GREs) se muestran con diferentes formas. Se indican los sitios CG para la digestión mediante la enzima de restricción sensibles a metilación *Mae II* (ACGT). El análisis del estado de metilación del ADN del (C) promotor y (D) enhancer de  $\beta$ -Cas fue llevado a cabo en DL2. Las barras representan el valor medio  $\pm$  SEM de 8 animales/grupo. Las muestras fueron normalizadas frente a la expresión del control interno y los animales control, y el valor de 1 fue asignado al grupo control (\*  $p < 0.05$ , Mann-Whitney test). La acetilación de la histona (H3Ac) fue determinada en diferentes regiones del (E) promotor y (F) enhancer de  $\beta$ -Cas mediante ensayos de ChIP. También, la metilación de la histona (H3K27me3) fue evaluada en diferentes regiones del (G) promotor y el (H) enhancer de  $\beta$ -Cas mediante análisis de ChIP. Las barras

representan el valor medio  $\pm$  SEM de 8 animales/grupo. Las muestras fueron normalizadas frente a la expresión del INPUT y los animales control, y el valor de 1 fue asignado al grupo control (\*  $p < 0.05$ , Mann-Whitney test). Enh: *enhancer*; Prom: promotor.

#### **4.5 | La exposición perinatal a BPA induce cambios en el estado de metilación del ADN y la modificación de la histona 3 en el exón VII del gen de $\beta$ -Cas.**

El dominio hidrofóbico de  $\beta$ -Cas está codificado en el exón VII y está involucrado en la formación de la micela (Jones y col., 1985; Rijnkels, 2002). En el presente trabajo de tesis, utilizamos este exón para cuantificar la expresión del ARNm de  $\beta$ -Cas, tal como lo hicieron otros investigadores (Buser y col., 2011; Kabotyanski y col., 2006; Kabotyanski y col., 2009; Winklehner-Jennewein y col., 1998). Como se muestra en la Figura 45A, su expresión fue reducida por la exposición perinatal a BPA. Para identificar si este resultado fue debido a alteraciones epigenéticas, se analizó en este exón el estado de metilación del ADN y las modificaciones de histonas. Los cambios en el estado de metilación ADN en la glándula mamaria fueron evaluados en el sitio sensible a metilación *BstUI* (Figura 45A). Este sitio, el estado de metilación fue mayor en las madres expuestas a BPA que en los animales control (Figura 45B;  $p < 0.05$ ). Por otro lado, los niveles de H3Ac y H3K27me3, en diferentes regiones del exón VII de  $\beta$ -Cas, fueron analizados a través de los ensayos de ChIP (Figura 45A). A pesar de que el nivel de H3Ac se encontró aumentado en la región exón VII (a) en ambos grupos expuestos a BPA, solo las madres F1 expuestas a BPA52 revelaron un incremento de su expresión en la región exón VII (b) y una disminución en la región de exón VII (c) del gen de  $\beta$ -Cas (Figura 45C;  $p < 0.05$ ). Además, ambos grupos expuestos a BPA mostraron altos niveles de H3K27me3 en todas las regiones del exón VII de  $\beta$ -Cas analizadas (Figura 45D;  $p < 0.05$ ).



**Figura 45. Análisis del estado de metilación del ADN y modificación de la histona en el exón VII del gen de β-Cas.** (A) Mapa del exón VII del gen de β-Cas. Se indican los sitios CG candidatos para la digestión con la enzima de restricción sensible a metilación *BstUI* (CGCG), así como también los amplicones utilizados en los ensayos de ChIP. (B) El nivel del estado de metilación del sitio *BstUI* fue determinado en el exón VII en DL2. Las barras representan el valor medio ± SEM de 8 animales/grupo. Las muestras fueron normalizadas frente a la expresión del control interno y los animales control, y el valor de 1 fue asignado al grupo control (\* p<0.05, Mann-Whitney test). Se realizaron ensayos de ChIP para investigar (C) la acetilación de la histona (H3Ac) y (D) la metilación de la histona (H3K27me3) en el exón VII de β-Cas. Las barras representan el valor medio ± SEM de 8 animales/grupo. Las muestras fueron normalizadas frente a la expresión del INPUT y los animales control, y el valor de 1 fue asignado al grupo control (\* p<0.05, Mann-Whitney test).

## 5 | Discusión

Por décadas, el gen β-Cas ha sido una de las proteínas de la leche más extensamente estudiada, y su promotor ha sido utilizado como modelo del control de señalización hormonal de la expresión de genes que codifican para las proteínas de la leche (Qian y Zhao, 2014). En los capítulos previos, hemos demostrado que la exposición perinatal a BPA retrasa la maduración alveolar durante la gestación y al inicio de la lactancia, y altera la síntesis y/o secreción de β-Cas durante el último tercio de la gestación. En el presente capítulo, hemos demostrado que la síntesis de β-Cas también se encuentra disminuida en madres F1 expuestas a BPA durante la activación secretoria de la glándula mamaria, y que diferentes mecanismos moleculares podrían ser responsables de esta disminución (Figura 46).

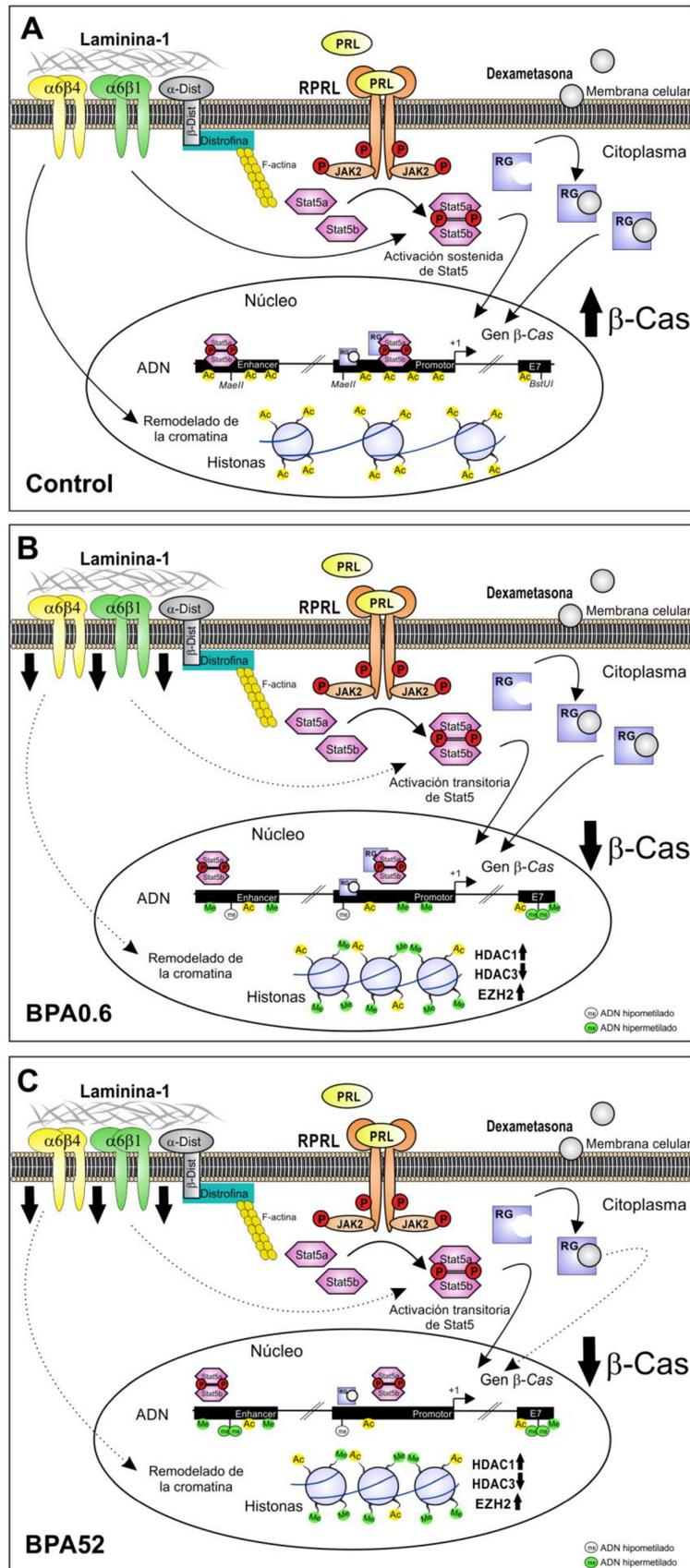


Figura 46. Regulación de la expresión del gen  $\beta$ -Cas en madres F1 expuestas a BPA. (A) Integración de las señales de laminina, PRL y glucocorticoides para la inducción de la expresión de  $\beta$ -Cas en madres F1 control. Una de las más importantes vías de señalización que regula la

expresión del gen de  $\beta$ -Cas es la activación del RPRL, el cual, junto con la laminina permite la activación sostenida de Stat5, necesaria para la remodelación de la cromatina en genes específicos mamarios y la acetilación de histona en el promotor de  $\beta$ -Cas. La exposición perinatal a BPA (**B** y **C**) induce la reducción en la expresión de los receptores de unión a laminina, posiblemente dirigiendo una activación transitoria de Stat5 la cual no es suficiente para activar completamente la expresión del gen de  $\beta$ -Cas. Además, la presencia reducida de H3Ac en el promotor y *enhancer* de  $\beta$ -Cas, indicando la deacetilación de histonas, y el aumento en la expresión de EZH2 podrían estar relacionados con la disminución de la expresión de  $\beta$ -Cas en madres F1 expuestas a BPA. Además de la acetilación de las histonas, se observó un incremento de los niveles de H3K27me3 en BPA0.6 tanto en el promotor como en el *enhancer* de  $\beta$ -Cas, resultando en la compactación de la cromatina, y, en consecuencia, en la alteración de la expresión de  $\beta$ -Cas (**B**). La menor expresión de RG y el incremento en la metilación del ADN y en los niveles de H3K27me3 en el *enhancer* podrían también estar relacionados con la disminución de la expresión de  $\beta$ -Cas en madres expuestas a BPA52 (**C**). Las líneas punteadas muestran las vías de transducción de la señal alteradas por la exposición perinatal a BPA.  $\alpha$ -Dist:  $\alpha$ -dístroglicano;  $\beta$ -Dist:  $\beta$ -dístroglicano;  $\beta$ -Cas:  $\beta$ -Caseína; Ac: acetilación de la histona; EZH2: enhancer of zeste homolog 2; RG: receptor de glucocorticoide; HDAC: histona deacetilasa; Me: metilación de histonas; me: metilación del ADN; Stat5: señal de transducción y activador de la transcripción 5; PRL: prolactina; RPRL: receptor de la prolactina.

Para la activación de la expresión de  $\beta$ -Cas en las células epiteliales mamarias se requiere de un proceso de múltiples etapas que involucra diferentes vías de señalización principalmente dirigidas por las hormonas lactogénicas (Anderson y col., 2007). Durante la activación secretoria, PRL aumenta la transcripción de los genes que codifican para las proteínas de la leche a través de la activación del RPRL, y la posterior fosforilación y dimerización de Stat5 (Anderson y col., 2007) (Figura 46A). La exposición perinatal a BPA no modificó la expresión del RPRL o pStat5a/b en DL2 (Figura 46B, C). Interesantemente, la expresión de pStat5a/b en hembras F1 expuestas a BPA fue nuclear, indicando que la vía de señalización de la PRL se encuentra activa en estos animales. Por otro lado, hay que tener en cuenta que la interacción de pStat5a/b con el ADN depende también de la cooperación del RG, ya que la activación del ligando del RG induce la formación del complejo RG-pStat5a/b y la subsecuente desviación hacia el sitio de unión al ADN de Stat5 (Groner, 2002) (Figura 46A). En nuestro experimento, el nivel de expresión del ARNm del RG fue inferior en las madres expuestas a BPA52, y esto podría relacionarse con la menor expresión de  $\beta$ -Cas observada en estos animales (Figura 46C). Además, se ha comprobado que las células epiteliales mamarias, en presencia de PRL, son capaces de activar la unión de pStat5a/b al ADN solo cuando éstas son cultivadas en una MEC rica en laminina (Streuli y col., 1995). La organización estructural de la célula es un componente esencial en la

señalización de la laminina y está mediada por las integrinas  $\alpha 6\beta 4$  y  $\beta 1$ , así como también por los receptores de laminina E3 (Muschler y col., 1999). DAG1, considerado co-receptor de laminina, es también requerido para la correcta señalización a través de las integrinas  $\alpha 6\beta 4$  and  $\beta 1$  permitiendo la producción eficiente de  $\beta$ -Cas en las células epiteliales mamarias (Muschler y col., 1999; Weir y col., 2006) (Figura 46A). Nuestros resultados mostraron que no solo la expresión del ARNm de ITG $\alpha 6$  y ITG $\beta 1$  sino que también de DAG1 fue disminuida en la glándula mamaria lactante de ratas expuestas a BPA (Figura 46B, C). Por lo tanto, la menor expresión de  $\beta$ -Cas observada podría ser explicada en parte por la disrupción en el anclaje de laminina a la superficie celular, y en consecuencia, una disminución de la señalización estimuladora de la expresión de  $\beta$ -Cas. Diversos estudios han demostrado que la delección del gen de ITG $\beta 1$  o DAG1 resulta en un crecimiento de la glándula, lactación y actividad Stat5 defectuoso (Muschler y Streuli, 2010). La reducción en los niveles de ARNm de DAG1 y ITG $\beta 1$  exhibidos en los grupos expuestos a BPA podría estar también asociado al retraso en la maduración alveolar observado en los capítulos previos.

La transcripción de los genes codificantes de las proteínas de la leche no solo requiere de la activación de los factores de transcripción sino que también de la remodelación de la cromatina durante el desarrollo de la glándula mamaria (Rijnkels y col., 2010; Xu y col., 2007). Los mecanismos de regulación epigenética representan uno de los objetivos más plausibles a través de los cuales los compuestos estrogénicos ambientales tales como el BPA podrían ejercer sus efectos (Kundakovic y Champagne, 2011). En estos últimos años, se ha demostrado que la exposición a BPA altera la expresión de enzimas claves implicadas en la regulación epigenética como ser ADN metiltransferasas, HDACs y EZH2 en diferentes órganos hormono-sensibles (Bhan y col., 2014; Dhimolea y col., 2014; Doherty y col., 2010; Kundakovic y Champagne, 2011; Vigezzi y col., 2016). En el presente estudio, las madres F1 expuestas a BPA exhibieron cambios en la expresión del ARNm de enzimas modificadoras de histona en DL2. Nuestros resultados revelaron que el nivel de ARNm de HDAC1 fue mayor mientras que HDAC3 fue menor en ambos grupos expuestos a BPA en relación a los controles (Figura 46B, C). Las enzimas HDAC revierten la acetilación y estabilizan la arquitectura de la cromatina local, lo que es consistente con la actividad de represores transcripcionales que las HDACs (Bannister y Kouzarides, 2011). Sin embargo, en el gen de  $\beta$ -Cas, HDAC1 y HDAC3 cumplen un rol en la formación secuencial de complejos que dirigen hacia su

activación luego de la estimulación hormonal (Kabotyanski y col., 2009). YY-1 se une al promotor de  $\beta$ -Cas interactuando con C/EBP y HDAC3, y reprime su expresión en ausencia de hormonas lactogénicas. En cambio, la activación de la vía de señalización de PRL induce la dimerización, traslocación y unión al ADN de Stat5, el cual promueve el desplazamiento de YY-1 y HDAC3, y el reclutamiento de HDAC1 para activar la transcripción del gen de  $\beta$ -Cas (Kabotyanski y col., 2009). Si relacionamos nuestros resultados con ésta vía de activación, la expresión del gen de  $\beta$ -Cas debería estar aumentada en las hembras F1 expuestas a BPA; sin embargo, analizamos la expresión de HDAC1 y HDAC3 en la glándula mamaria entera y no sobre el gen de  $\beta$ -Cas en particular. Por lo tanto, los cambios inducidos por la exposición a BPA y observados en la presente Tesis podrían estar modificando la actividad del represor transcripcional HDAC en genes que no hemos estudiado. Asimismo, tanto la metilación del exón VII como las modificaciones de histonas inducidas por la exposición perinatal a BPA podrían ser más significativas en reducir la expresión de  $\beta$ -Cas que el incremento en la expresión del ARNm de HDAC3. Adicionalmente, muchos estudios *in vivo* e *in vitro* han evidenciado que la exposición a PEs tal como BPA y DES incrementa la expresión de EZH2 en las células epiteliales mamarias y que EZH2 es un gen regulado por el estradiol (Bhan y col., 2014; Doherty y col., 2010). En nuestro experimento, la exposición perinatal a BPA estimula los niveles de expresión del ARNm de EZH2 en la glándula mamaria de madres F1 al inicio de la lactancia (Figura 46B, C). Se piensa que el EZH2 es crítico en el silenciamiento genético y en la condensación de la cromatina (Bhan y col., 2014). Por lo tanto, una conformación de la cromatina más condensada podría ser encontrada en la región del gen de  $\beta$ -Cas en las madres expuestas a BPA, disminuyendo así su expresión.

Entre las modificaciones epigenéticas, la metilación del ADN y las modificaciones de histonas han sido intensamente estudiadas en el contexto de la transcripción genética y eventos anormales (Vaissiere y col., 2008). En la glándula mamaria, la proliferación celular extensiva durante la gestación e inicio de la lactancia dirige a una pasiva demetilación de los elementos regulatorios de los genes codificante de las proteínas de la leche, que se correlaciona con la inducción de la expresión genética (Rijnkels y col., 2010). Además, ciertos sitios de restricción en el gen de  $\beta$ -Cas de la glándula mamaria lactante de la rata son digeridas fácilmente por enzimas de restricción sensibles a metilación, resultando en un estado hipometilado específico de la glándula (Johnson y

col., 1983) (Figura 46A). Utilizando una estrategia similar, encontramos alteraciones en el estado de metilación del ADN de los sitios de restricción sensibles a metilación en el promotor y *enhancer* del gen de  $\beta$ -Cas en los grupos expuestos a BPA (Figura 46B, C). En el promotor de  $\beta$ -Cas, identificamos un sitio *MaeII* al lado de un sitio de unión  $\frac{1}{2}$  GRE que fue hipometilado en los grupos expuestos a BPA (Figura 46B, C). Vanselow y col. (2006) caracterizaron un nuevo sitio de unión a Stat5 en el *enhancer* del gen que codifica para  $\alpha$ -S1-Caseína de bovino y se comprobó que la metilación CpG de esta área estuvo asociada a una disminución de la síntesis de  $\alpha$ S1-Caseína. Por ésta razón, decidimos evaluar el sitio *MaeII* localizado cerca del sitio de unión a Stat5 en el *enhancer* de  $\beta$ -Cas. Este sitio *MaeII* fue hipometilado en madres expuestas a BPA0.6 (Figura 46B) e hipermetilado en madres expuestas a BPA52 (Figura 46C): Basado en estos hallazgos, la síntesis de  $\beta$ -Cas debería estar aumentada en las madres expuestas a BPA0.6 y disminuidas en las madres expuestas a BPA52. Adicionalmente, ha sido demostrado que el enriquecimiento de H3Ac en las regiones regulatorias de los genes de caseína aumenta la tasa de transcripción debido a la estructura laxa de la cromatina (Rijnkels y col., 2013) (Figura 46A). En la presente Tesis, se observó una menor presencia de H3Ac en el promotor y el *enhancer* de  $\beta$ -Cas en ambos grupos expuestos a BPA comparados con los animales control (Figura 46B, C). La deacetilación de la histona H3 resulta en la compactación de la estructura de la cromatina y, por lo tanto, en la reducción de la transcripción del gen de  $\beta$ -Cas. La hipoacetilación de la histona H3, observada en estos animales, podría estar relacionada con la disrupción en el anclaje de laminina a la superficie celular debido a que es necesaria la cooperación entre laminina y PRL para inducir la acetilación de histonas en el promotor de  $\beta$ -Cas (Xu y col., 2007). Otra modificación de histonas asociada con el silenciamiento genético es la metilación de la histona H3K27 (Bhan y col., 2014). En nuestro experimento, en el promotor de  $\beta$ -Cas, el nivel de H3K27me3 fue elevado solo en las ratas lactantes expuestas a BPA0.6, mientras que en el *enhancer* estuvo aumentado en ambos grupos expuestos a BPA. (Figura 46B, C). El incremento en H3K27me3 en el promotor y *enhancer* de  $\beta$ -Cas podría relacionarse con la elevada expresión de EZH2 encontrada en los animales expuestos a BPA, considerando que EZH2 posee actividad metiltransferasa específica para la lisina 27 de la histona 3 y es un regulador epigenético clave (Kuzmichev y col., 2002). Nuestros resultados indican que la modificación de la conformación de la cromatina en las regiones regulatorias del gen de  $\beta$ -Cas es un mecanismo importante de acción del BPA sobre la transcripción del gen de  $\beta$ -Cas durante la activación secretoria

de la glándula mamaria. Adicionalmente, en el exón VII de  $\beta$ -Cas la metilación del ADN y de la histona H3K27me3 se encontró incrementado en los animales expuestos a BPA. Por el contrario, el reclutamiento de H3Ac fue elevado en algunas de las regiones del exón VII evaluadas por CHIP, indicando una estructura de cromatina abierta en estas regiones (Figura 46B, C).

En conjunto, nuestros resultados muestran que la exposición perinatal a BPA reduce la expresión de  $\beta$ -Cas a través de diferentes mecanismos moleculares durante la activación secretoria de la glándula mamaria de la rata (Figura 46). Las modificaciones epigenéticas y la alteración en las vías de señalización tanto de la matriz extracelular como de las hormonas lactogénicas pueden actuar sinérgicamente en la disminución de la expresión de  $\beta$ -Cas. Estos descubrimientos resaltan la alta sensibilidad de la exposición a BPA durante el período *in utero* y lactacional de las crías, y las consecuencias a largo plazo sobre la síntesis de proteínas de la leche durante la activación secretoria de la glándula mamaria.

# ***CAPÍTULO 7***

## ***CONCLUSIONES GENERALES***

---

*“No es necesario hacer cosas  
extraordinarias para conseguir resultados  
extraordinarios”*

*Warren Buffett*

Diversos factores medioambientales así como también la dieta de la madre lactante pueden afectar la composición de la leche materna (Collier, 1999). Por tanto, cualquier interferencia con el crecimiento y la diferenciación de la glándula mamaria podría alterar la *performance* lactacional de las madres. Teniendo en cuenta los antecedentes previos sobre modificaciones en la glándula mamaria inducida por la exposición a estrógenos ambientales, en esta Tesis decidimos analizar la influencia de la exposición perinatal a bajas dosis de estrógenos ambientales (BPA ó DES) sobre la funcionalidad de la glándula mamaria en hembras preñadas F1.

Estudios previos han reportados los efectos de la exposición a bajas dosis de BPA sobre el grado de maduración epitelial, y alteraciones en el estroma de la glándula mamaria de la rata en diferentes estadios (Durando y col., 2007; Vandenberg y col., 2007). Considerando que para una normal diferenciación funcional mamaria se requiere de una correcta comunicación entre el estroma y el epitelio, alteraciones en la morfología mamaria podrían modificar la capacidad funcional del órgano de sintetizar y secretar leche. Nuestros resultados demuestran que el tratamiento perinatal con estrógenos ambientales induce un retraso en la maduración alveolar mamaria durante la gestación e inicio de la lactancia, restableciéndose a mitad de la lactancia. Estos cambios en la morfología del tejido mamario durante un periodo crítico del desarrollo del órgano podrían vincularse con los cambios en la síntesis y/o secreción de los distintos componentes de la leche observados en esta Tesis.

También logramos comprobar que la exposición perinatal a BPA ó DES altera el patrón de producción de leche de hembras F1 durante la lactancia, indicando que la exposición a estrógenos ambientales estaría también modificando la calidad de la leche, y que en consecuencia podrían comprometer el normal crecimiento y desarrollo de las crías F2. Al estudiar la calidad de la leche producida por las hembras F1 lactantes determinamos que la exposición perinatal a BPA altera tanto la síntesis y/o secreción de las proteínas como la de glóbulos grasos de la leche durante el último tercio de la gestación y durante la lactancia.

Las proteínas de la leche poseen un alto valor biológico en la salud, y es una importante fuente de aminoácidos esenciales (Qian y Zhao, 2014). Nuestros resultados muestran que la exposición perinatal a BPA induce una menor expresión de las proteínas de la

leche, principalmente  $\beta$ -Cas, en madres F1 expuestas a estrógenos ambientales al final de la gestación y al inicio de la lactancia, incluso en las muestras de leche extraída en DL14. Mientras que  $\alpha$ -Lactalb solo disminuye su expresión en la glándula mamaria en DG18. Cabe destacar que una de las principales vías de regulación de la expresión de las proteínas de la leche, la vía de señalización JAK/Stat5 mediada por PRL, sólo es afectada en DG18, mientras que permanece activa durante la activación secretoria de la glándula mamaria.

Otro de los componentes importantes de la leche son los lípidos de la leche, los cuales aportan la mayoría de las calorías que requiere el neonato para su correcto crecimiento y desarrollo (McManaman, 2009). En nuestro trabajo, la exposición perinatal a BPA modifica el ensamblaje y/o secreción de los MLGs, así como su tamaño durante la activación secretoria de la glándula mamaria. Asimismo, a mitad de la lactancia, la exposición perinatal a BPA altera la concentración de lípidos totales, TGs y fosfolípidos de la leche. La exposición a una dosis de BPA establecida como segura para consumo humano por la EPA induce un aumento en la concentración de lípidos totales, TGs y fosfolípidos, mientras que una dosis cien veces menor produce una disminución de las mismas. De igual manera, el perfil de AGs es alterado por la exposición a BPA, y el tamaño de los MLGs se correlaciona con el perfil de AGs en ambos grupos de BPA. Además, observamos que la exposición perinatal a BPA52 induce un aumento en la expresión de PPAR $\gamma$  y SREBP1, lo cual podría explicar el aumento de la síntesis de AGs en este grupo en particular a mitad de la lactación.

Estos cambios en la calidad de la leche producida por las madres F1 expuestas a BPA52 se reflejaron en alteraciones en la ganancia de peso de sus crías F2 durante la lactancia, pero no así en el peso corporal de las mismas registrado en DL14. Estos hechos destacan la importancia a nivel nutricional de la cantidad y calidad de la leche, no solo para permitir el normal crecimiento y desarrollo de las crías lactantes sino también es de gran importancia para la industria lechera.

Por otro lado, debemos destacar que la menor expresión de  $\beta$ -Cas causada por la exposición perinatal a BPA durante la activación secretoria de la glándula mamaria se produce a través de diferentes mecanismos moleculares que actúan sinérgicamente.

Siendo las modificaciones epigenéticas un potencial mecanismo de acción del BPA en este modelo experimental.

En conclusión, los resultados de esta Tesis aportan fundamentos a la preocupación mundial por la creciente exposición a estrógenos ambientales, enfatizan la elevada sensibilidad de las crías a cualquier perturbación endocrina durante el período embrionario y neonatal, y las consecuencias a largo plazo producidas por su acción sobre la diferenciación funcional de la glándula mamaria.

# ***ANEXO***

---

*“La ciencia se compone de errores, que a su vez son los pasos hacia la verdad”*

*Julio Verne*

**Tabla S1. Composición y perfil de AGs de la comida.**

<b>Composición</b>	
Humedad (máximo)	12%
Proteína (mínimo)	23%
Extracto etéreo (mínimo)	5%
Fibra cruda (máximo)	6%
Minerales (máximo)	10%
Calcio (mín-máx)	1.0% - 1.4%
Fósforo (mín-máx)	0.5% - 0.8%
Cloro	0.3%
Sodio	0.2%
Potasio	0.7%
Magnesio	0.2%
Sulfuro	0.16%
Valor energético	2900 kcal/kg

<b>Materia prima</b>	
Fuente animal	20% , harina de pescado
Fuente Vegetal	76%, maíz, gluten de maíz, harina de girasol, trigo, salvado de trigo, harina de soja y aceite de soja (el contenido de soja representa el 30% de la fuente vegetal de la materia prima)
Vitaminas-Minerales	4%

<b>Perfil de AGs en lípidos totales*</b>	
	Valores expresados como la media $\pm$ SEM
C8:0	0.60 $\pm$ 0.02 %
C12:0; C14:0; C15:0	Trazas
C16:0	24.50 $\pm$ 1.51 %
C16:1	1.80 $\pm$ 0.20 %
C18:0	2.12 $\pm$ 0.11 %
C18:1	42.33 $\pm$ 2.45 %
C18:2	12.76 $\pm$ 0.90 %
C18:3n-3	6.12 $\pm$ 0.15 %
C18:4n-3	Trazas
C20:0; C20:1	Trazas
C22:0; C22:1	Trazas
C20:4n-6	0.31 $\pm$ 0.04 %
Otros AGs poliinsaturados	0.91 $\pm$ 0.06 %

Pellet para ratones-ratas (16-014007, Nutrición Animal, Santa Fe, Argentina)

\* El perfil de AGs en la dieta fue cuantificado en el laboratorio del Dr. Carlos A. Marra, INIBIOLP, CCT-La Plata, Argentina.

**Tabla S2. Perfil de AGs de la leche completa de madres F1 expuestas a BPA a mitad de la lactación.**

Tipo de AG ( $\mu$ moles/mg of lipidos)	Grupos		
	Control	BPA0.6	BPA52
<b>AGs saturados</b>			
C8:0	14.7 $\pm$ 0.2	12.9 $\pm$ 0.3*	18.3 $\pm$ 0.2*
C10:0	12.0 $\pm$ 0.4	11.3 $\pm$ 0.2	16.1 $\pm$ 0.3*
C12:0	10.2 $\pm$ 0.3	9.5 $\pm$ 0.2	12.7 $\pm$ 0.1*
C14:0	13.1 $\pm$ 0.2	12.6 $\pm$ 0.3	15.0 $\pm$ 0.3*
C15:0	1.1 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1
C16:0	32.5 $\pm$ 0.5	28.8 $\pm$ 0.5*	36.7 $\pm$ 0.6*
C17:0	0.1 $\pm$ 0.05	0.3 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.04
C18:0	5.5 $\pm$ 0.2	3.2 $\pm$ 0.1*	8.9 $\pm$ 0.2*
C20:0	2.2 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1*	3.9 $\pm$ 0.1*
<b>AGs monosaturados</b>			
C16:1n-7	3.8 $\pm$ 0.1	3.2 $\pm$ 0.1	3.9 $\pm$ 0.3
C16:1n-4	0.1 $\pm$ 0.03	0.1 $\pm$ 0.03	0.1 $\pm$ 0.05
C18:1n-9	18.6 $\pm$ 0.3	15.2 $\pm$ 0.4*	22.7 $\pm$ 0.3*
C18:1n-7	0.5 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.2
C20:1	0.2 $\pm$ 0.05	0.1 $\pm$ 0.01	0.1 $\pm$ 0.04
<b>AGs poliinsaturados</b>			
C18:2n-6	15.4 $\pm$ 0.3	11.0 $\pm$ 0.3*	19.1 $\pm$ 0.5*
C18:3n-6	0.2 $\pm$ 0.05	0.2 $\pm$ 0.01	0.2 $\pm$ 0.05
C18:3n-3	0.9 $\pm$ 0.03	0.9 $\pm$ 0.02	1.1 $\pm$ 0.1
C20:2n-6	0.5 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.2
C20:3n-6	2.5 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1*	4.5 $\pm$ 0.1*
C20:4n-6	1.8 $\pm$ 0.1	2.5 $\pm$ 0.1*	1.0 $\pm$ 0.1*
C20:5n-3	0.1 $\pm$ 0.02	0.1 $\pm$ 0.01	0.1 $\pm$ 0.01
C22:4n-3	0.4 $\pm$ 0.06	0.5 $\pm$ 0.01	0.5 $\pm$ 0.1
C22:4n-6	0.5 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.1*	0.4 $\pm$ 0.1
C22:5n-3	0.3 $\pm$ 0.04	0.5 $\pm$ 0.1*	0.4 $\pm$ 0.01
C22:5n-6	0.3 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.02	0.3 $\pm$ 0.1
C22:6n-3	0.5 $\pm$ 0.05	0.8 $\pm$ 0.1*	0.5 $\pm$ 0.02*

Los valores se expresan como el valor medio  $\pm$  SEM of 8-10 F1 madres/grupo.

\*  $p < 0.01$  comparados con el grupo control (ANOVA seguido de Tuckey's post-hoc test).

# ***BIBLIOGRAFÍA***

---

*“La experiencia no es lo que te sucede, sino  
lo que haces con lo que te sucede”*

*Aldous Huxley*

- Akers, R.M., 1999. Lactogenesis, Knobil E., Neil JD, editors. Encyclopedia of reproduction. American press, San Diego, pp. 979-85.
- Alcaraz, J., Xu, R., Mori, H., Nelson, C.M., Mroue, R., Spencer, V.A., Brownfield, D., Radisky, D.C., Bustamante, C. and Bissell, M.J., 2008. Laminin and biomimetic extracellular elasticity enhance functional differentiation in mammary epithelia. *EMBO J*, 27, 2829-38.
- Allen, J.C., Keller, R.P., Archer, P. and Neville, M.C., 1991. Studies in human lactation: milk composition and daily secretion rates of macronutrients in the first year of lactation. *Am J Clin Nutr*, 54, 69-80.
- Anderson, S.M., MacLean, P.S., McManaman, J.F. and Neville, M.C., 2015. Lactation and its hormonal control, in: Plant, T.M. and Zeleznik, A.J. (Eds.), Knobil and Neill's Physiology of reproduction. pp. 2055-2105.
- Anderson, S.M., Rudolph, M.C., McManaman, J.L. and 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 Res*, 9, 204.
- Andreoli, M.F., Stoker, C., Rossetti, M.F., Alzamendi, A., Castrogiovanni, D., Luque, E.H. and Ramos, J.G., 2015. Withdrawal of dietary phytoestrogens in adult male rats affects hypothalamic regulation of food intake, induces obesity and alters glucose metabolism. *Mol Cell Endocrinol*, 401, 111-9.
- Atwood, C.S., Hovey, R.C., Glover, J.P., Chepko, G., Ginsburg, E., Robison, W.G. and Vonderhaar, B.K., 2000. Progesterone induces side-branching of the ductal epithelium in the mammary glands of peripubertal mice. *J Endocrinol*, 167, 39-52.
- Bannister, A.J. and Kouzarides, T., 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*, 21, 381-95.
- Barber, M.C., Clegg, R.A., Travers, M.T. and Vernon, R.G., 1997. Lipid metabolism in the lactating mammary gland. *Biochim Biophys Acta*, 1347, 101-26.
- Bernal, A.J. and Jirtle, R.L., 2010. Epigenomic disruption: the effects of early developmental exposures. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 88, 938-44.
- Betancourt, A.M., Eltoum, I.A., Desmond, R.A., Russo, J. and Lamartiniere, C.A., 2010. In utero exposure to bisphenol A shifts the window of susceptibility for mammary carcinogenesis in the rat. *Environ Health Perspect*, 118, 1614-9.
- Bhan, A., Hussain, I., Ansari, K.I., Bobzean, S.A., Perrotti, L.I. and Mandal, S.S., 2014. Histone methyltransferase EZH2 is transcriptionally induced by estradiol as well

- as estrogenic endocrine disruptors bisphenol-A and diethylstilbestrol. *J Mol Biol*, 426, 3426-41.
- Bionaz, M. and Loor, J.J., 2008. Gene networks driving bovine milk fat synthesis during the lactation cycle. *BMC Genomics*, 9, 366.
- Blackman, B., Russell, T., Nordeen, S.K., Medina, D. and Neville, M.C., 2005. Claudin 7 expression and localization in the normal murine mammary gland and murine mammary tumors. *Breast Cancer Res*, 7, R248-55.
- Blanchette-Mackie, E.J., Dwyer, N.K., Barber, T., Coxey, R.A., Takeda, T., Rondinone, C.M., Theodorakis, J.L., Greenberg, A.S. and Londos, C., 1995. Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes. *J Lipid Res*, 36, 1211-26.
- Bosquiazzo, V.L., Varayoud, J., Munoz-de-Toro, M., Luque, E.H. and Ramos, J.G., 2010. Effects of neonatal exposure to bisphenol A on steroid regulation of vascular endothelial growth factor expression and endothelial cell proliferation in the adult rat uterus. *Biol Reprod*, 82, 86-95.
- Boudalia, S., Berges, R., Chabanet, C., Folia, M., Decocq, L., Pasquis, B., Abdennebi-Najar, L. and Canivenc-Lavier, M.C., 2014. A multi-generational study on low-dose BPA exposure in Wistar rats: effects on maternal behavior, flavor intake and development. *Neurotoxicol Teratol*, 41, 16-26.
- Brew, K., Vanaman, T.C. and Hill, R.L., 1968. The role of alpha-lactalbumin and the A protein in lactose synthetase: a unique mechanism for the control of a biological reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 59, 491-7.
- Brisken, C., Kaur, S., Chavarria, T.E., Binart, N., Sutherland, R.L., Weinberg, R.A., Kelly, P.A. and Ormandy, C.J., 1999. Prolactin controls mammary gland development via direct and indirect mechanisms. *Dev Biol*, 210, 96-106.
- Brisken, C. and Rajaram, R.D., 2006. Alveolar and lactogenic differentiation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 11, 239-48.
- Brummelte, S. and Galea, L.A., 2010. Depression during pregnancy and postpartum: contribution of stress and ovarian hormones. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 34, 766-76.
- Buser, A.C., Obr, A.E., Kabotyanski, E.B., Grimm, S.L., Rosen, J.M. and Edwards, D.P., 2011. Progesterone receptor directly inhibits beta-casein gene transcription in mammary epithelial cells through promoting promoter and enhancer repressive chromatin modifications. *Mol Endocrinol*, 25, 955-68.

- Calafat, A.M., Kuklennyik, Z., Reidy, J.A., Caudill, S.P., Ekong, J. and Needham, L.L., 2005. Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Perspect*, 113, 391-5.
- Calafat, A.M., Ye, X., Wong, L.Y., Reidy, J.A. and Needham, L.L., 2008. Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ Health Perspect*, 116, 39-44.
- Cikos, S., Bukovska, A. and Koopel, J., 2007. Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Mol Biol*, 8, 113.
- Cocolakis, E., Dai, M., Drevet, L., Ho, J., Haines, E., Ali, S. and Lebrun, J.J., 2008. Smad signaling antagonizes STAT5-mediated gene transcription and mammary epithelial cell differentiation. *J Biol Chem*, 283, 1293-307.
- Collier, R.J., 1999. Lactation, nonhuman. *Encyclopedia of Reproduction*, 2, 973:979.
- Cowie, A.T., Forsyth, I.A. and Hart, I.C., 1980. Hormonal control of lactation. *Monogr Endocrinol*, 15, I-XIV, 1-275.
- Chamorro-Garcia, R., Sahu, M., Abbey, R.J., Laude, J., Pham, N. and Blumberg, B., 2013. Transgenerational inheritance of increased fat depot size, stem cell reprogramming, and hepatic steatosis elicited by prenatal exposure to the obesogen tributyltin in mice. *Environ Health Perspect*, 121, 359-66.
- Chen, M., Xu, B., Ji, W., Qiao, S., Hu, N., Hu, Y., Wu, W., Qiu, L., Zhang, R., Wang, Y., Wang, S., Zhou, Z., Xia, Y. and Wang, X., 2012. Bisphenol A alters n-6 fatty acid composition and decreases antioxidant enzyme levels in rat testes: a LC-QTOF-based metabolomics study. *PLoS One*, 7, e44754.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162, 156-9.
- Chong, B.M., Reigan, P., Mayle-Combs, K.D., Orlicky, D.J. and McManaman, J.L., 2011. Determinants of adipophilin function in milk lipid formation and secretion. *Trends Endocrinol Metab*, 22, 211-7.
- Christensen, K.L., Lorber, M., Koslitz, S., Bruning, T. and Koch, H.M., 2012. The contribution of diet to total bisphenol A body burden in humans: results of a 48 hour fasting study. *Environ Int*, 50, 7-14.
- Darcy, K.M., Shoemaker, S.F., Lee, P.P., Ganis, B.A. and Ip, M.M., 1995. Hydrocortisone and progesterone regulation of the proliferation, morphogenesis,

- and functional differentiation of normal rat mammary epithelial cells in three dimensional primary culture. *J Cell Physiol*, 163, 365-79.
- de Alaniz, M.J. and Marra, C.A., 1992. Glucocorticoid and mineralocorticoid hormones depress liver delta 5 desaturase activity through different mechanisms. *Lipids*, 27, 599-604.
- Delfosse, V., Grimaldi, M., Pons, J.L., Boulahtouf, A., le Maire, A., Cavailles, V., Labesse, G., Bourguet, W. and Balaguer, P., 2012. Structural and mechanistic insights into bisphenols action provide guidelines for risk assessment and discovery of bisphenol A substitutes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 14930-5.
- Delfosse, V., Maire, A.L., Balaguer, P. and Bourguet, W., 2014. A structural perspective on nuclear receptors as targets of environmental compounds. *Acta Pharmacol Sin*, 10.1038/aps.2014.133.
- Dewettinck, K., Rombaut, R., Thienpont, N., Le, T. and Messens, K., 2007. Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *Int Dairy J* 18, 436–457.
- Dhimolea, E., Wadia, P.R., Murray, T.J., Settles, M.L., Treitman, J.D., Sonnenschein, C., Shioda, T. and Soto, A.M., 2014. Prenatal exposure to BPA alters the epigenome of the rat mammary gland and increases the propensity to neoplastic development. *PLoS One*, 9, e99800.
- Dobolyi, A., 2011. Novel potential regulators of maternal adaptations during lactation: tuberoinfundibular peptide 39 and amylin. *J Neuroendocrinol*, 23, 1002-8.
- Doherty, L.F., Bromer, J.G., Zhou, Y., Aldad, T.S. and Taylor, H.S., 2010. In utero exposure to diethylstilbestrol (DES) or bisphenol-A (BPA) increases EZH2 expression in the mammary gland: an epigenetic mechanism linking endocrine disruptors to breast cancer. *Horm Cancer*, 1, 146-55.
- Dolinoy, D.C., 2007. Epigenetic gene regulation: early environmental exposures. *Pharmacogenomics*, 8, 5-10.
- Doppler, W., Geymayer, S. and Weirich, H.G., 2000. Synergistic and antagonistic interactions of transcription factors in the regulation of milk protein gene expression. Mechanisms of cross-talk between signalling pathways. *Adv Exp Med Biol*, 480, 139-46.
- Durando, M., Kass, L., Perdomo, V., Bosquiazzo, V.L., Luque, E.H. and Munoz-de-Toro, M., 2011. Prenatal exposure to bisphenol A promotes angiogenesis and

- alters steroid-mediated responses in the mammary glands of cycling rats. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 127, 35-43.
- Durando, M., Kass, L., Piva, J., Sonnenschein, C., Soto, A.M., Luque, E.H. and Munoz-de-Toro, M., 2007. Prenatal bisphenol A exposure induces preneoplastic lesions in the mammary gland in Wistar rats. *Environ Health Perspect*, 115, 80-6.
- Edwards, G.M., Wilford, F.H., Liu, X., Hennighausen, L., Djiane, J. and Streuli, C.H., 1998. Regulation of mammary differentiation by extracellular matrix involves protein-tyrosine phosphatases. *J Biol Chem*, 273, 9495-500.
- Engel, S.M., Levy, B., Liu, Z., Kaplan, D. and Wolff, M.S., 2006. Xenobiotic phenols in early pregnancy amniotic fluid. *Reprod Toxicol*, 21, 110-2.
- Farrel, H.M., 1999. Milk, composition and synthesis, Knobil E., Neil JD, editors. *Encyclopedia of reproduction*. American press, San Diego, pp. 256-63.
- Fenton, S.E., 2006. Endocrine-disrupting compounds and mammary gland development: early exposure and later life consequences. *Endocrinology*, 147, S18-24.
- Ferguson, J.E., Schor, A.M., Howell, A. and Ferguson, M.W., 1992. Changes in the extracellular matrix of the normal human breast during the menstrual cycle. *Cell Tissue Res*, 268, 167-77.
- Folch, J., Lees, M. and Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*, 226, 497-509.
- Forsyth, I.A., Gabai, G. and Morgan, G., 1999. Spatial and temporal expression of insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor-II and the insulin-like growth factor-I receptor in the sheep fetal mammary gland. *J Dairy Res*, 66, 35-44.
- Fukushima, A., Funabashi, T., Kawaguchi, M., Mitsushima, D. and Kimura, F., 2007. Bisphenol A induces transforming growth factor-beta3 mRNA in the preoptic area: a cDNA expression array and Northern blot study. *Neurosci Lett*, 411, 81-5.
- Galea, L.A. and Barha, C.K., 2011. Maternal bisphenol A (BPA) decreases attractiveness of male offspring. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 11305-6.
- German, J.B. and Dillard, C.J., 2006. Composition, structure and absorption of milk lipids: a source of energy, fat-soluble nutrients and bioactive molecules. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 46, 57-92.

- Gilbert, S.F., 2000. Cell surface receptors and their signal transduction pathways, in: *Biology*, D. (Ed.). Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Gill, W.B., Schumacher, G.F. and Bibbo, M., 1976. Structural and functional abnormalities in the sex organs of male offspring of mothers treated with diethylstilbestrol (DES). *J Reprod Med*, 16, 147-53.
- Giusti, R.M., Iwamoto, K. and Hatch, E.E., 1995. Diethylstilbestrol revisited: a review of the long-term health effects. *Ann Intern Med*, 122, 778-88.
- Gore, A.C., Chappell, V.A., Fenton, S.E., Flaws, J.A., Nadal, A., Prins, G.S., Toppari, J. and Zoeller, R.T., 2015. EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocr Rev*, 36, E1-E150.
- Groner, B., 2002. Transcription factor regulation in mammary epithelial cells. *Domest Anim Endocrinol*, 23, 25-32.
- Guilloteau, P., Zabielski, R., Hammon, H.M. and Metges, C.C., 2009. Adverse effects of nutritional programming during prenatal and early postnatal life, some aspects of regulation and potential prevention and treatments. *J Physiol Pharmacol*, 60 Suppl 3, 17-35.
- Hammes, B. and Laitman, C.J., 2003. Diethylstilbestrol (DES) update: recommendations for the identification and management of DES-exposed individuals. *J Midwifery Womens Health*, 48, 19-29.
- Hartmann, P.E., 1973. Changes in the composition and yield of the mammary secretion of cows during the initiation of lactation. *J Endocrinol*, 59, 231-47.
- Haslam, S.Z. and Shyamala, G., 1980. Progesterone receptors in normal mammary gland: receptor modulations in relation to differentiation. *J Cell Biol*, 86, 730-7.
- Herman, A., Bignon, C., Daniel, N., Grosclaude, J., Gertler, A. and Djiane, J., 2000. Functional heterodimerization of prolactin and growth hormone receptors by ovine placental lactogen. *J Biol Chem*, 275, 6295-301.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R., 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*, 11, 1026-30.
- Hovey, R.C., Asai-Sato, M., Warri, A., Terry-Koroma, B., Colyn, N., Ginsburg, E. and Vonderhaar, B.K., 2005. Effects of neonatal exposure to diethylstilbestrol, tamoxifen, and toremifene on the BALB/c mouse mammary gland. *Biol Reprod*, 72, 423-35.

- Hsieh, C.W., Millward, C.A., DeSantis, D., Pisano, S., Machova, J., Perales, J.C. and Croniger, C.M., 2009. Reduced milk triglycerides in mice lacking phosphoenolpyruvate carboxykinase in mammary gland adipocytes and white adipose tissue contribute to the development of insulin resistance in pups. *J Nutr*, 139, 2257-65.
- Hurtado de Catalfo, G.E., de Alaniz, M.J. and Marra, C.A., 2009. Influence of commercial dietary oils on lipid composition and testosterone production in interstitial cells isolated from rat testis. *Lipids*, 44, 345-57.
- Imagawa, W., Bandyopadhyay, G.K. and Nandi, S., 1990. Regulation of mammary epithelial cell growth in mice and rats. *Endocr Rev.*, 11, 494-523.
- Imagawa, W., Yang, J., Guzman, R. and Nandi, S., 1994. *The Physiology of Reproduction. Control of mammary gland development.*, 2nd ed. Raven Press, New York.
- Jasarevic, E., Sieli, P.T., Twellman, E.E., Welsh, T.H., Jr., Schachtman, T.R., Roberts, R.M., Geary, D.C. and Rosenfeld, C.S., 2011. Disruption of adult expression of sexually selected traits by developmental exposure to bisphenol A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 11715-20.
- Jenkins, S., Raghuraman, N., Eltoum, I., Carpenter, M., Russo, J. and Lamartiniere, C.A., 2009. Oral exposure to bisphenol a increases dimethylbenzanthracene-induced mammary cancer in rats. *Environ Health Perspect*, 117, 910-5.
- Jenness, R., 1974. *Proceedings: Biosynthesis and composition of milk.* *J Invest Dermatol*, 63, 109-18.
- Jensen, R.B., 1995. *Handbook of milk composition*, Academic Press, San Diego.
- Johnson, M.L., Levy, J., Supowit, S.C., Yu-Lee, L.Y. and Rosen, J.M., 1983. Tissue- and cell-specific casein gene expression. II. Relationship to site-specific DNA methylation. *J Biol Chem*, 258, 10805-11.
- Jones, W.K., Yu-Lee, L.Y., Clift, S.M., Brown, T.L. and Rosen, J.M., 1985. The rat casein multigene family. Fine structure and evolution of the beta-casein gene. *J Biol Chem*, 260, 7042-50.
- Junqueira, L.C.U. and Junqueira, L.M., 1983. *Técnicas básicas en citología e histología.*, Com. Imp. Ltda. Rua Augusta, São Paulo, Brasil.
- Kabotyanski, E.B., Huetter, M., Xian, W., Rijnkels, M. and Rosen, J.M., 2006. Integration of prolactin and glucocorticoid signaling at the beta-casein promoter

- and enhancer by ordered recruitment of specific transcription factors and chromatin modifiers. *Mol Endocrinol*, 20, 2355-68.
- Kabotyanski, E.B., Rijnkels, M., Freeman-Zadrowski, C., Buser, A.C., Edwards, D.P. and Rosen, J.M., 2009. Lactogenic hormonal induction of long distance interactions between beta-casein gene regulatory elements. *J Biol Chem*, 284, 22815-24.
- Kang, Y., Hengbo, S., Jun, L., Wangsheng, Z., Huibin, T. and Huaiping, S., 2015. PPAR $\gamma$  Modulated Lipid Accumulation in Dairy GMEC via Regulation of ADRP Gene. *J Cell Biochem*, 116, 192-201.
- Kass, L., Altamirano, G.A., Bosquiazzo, V.L., Luque, E.H. and Muñoz-de-Toro, M., 2012. Perinatal exposure to xenoestrogens impairs mammary gland differentiation and modifies milk composition in Wistar rats. *Reprod Toxicol*, 33, 390-400.
- Kass, L., Durando, M., Altamirano, G.A., Manfroni-Ghibaudo, G.E., Luque, E.H. and Muñoz-de-Toro, M., 2014. Prenatal Bisphenol A exposure delays the development of the male rat mammary gland. *Reprod Toxicol*, 10.1016/j.reprotox.2014.02.001.
- Kass, L., Durando, M., Ramos, J.G., Varayoud, J., Powell, C.E., Luque, E.H. and Munoz-de-Toro, M., 2004. Association of increased estrogen receptor beta2 expression with parity-induced alterations in the rat mammary gland. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 91, 29-39.
- Kass, L., Erler, J.T., Dembo, M. and Weaver, V.M., 2007. Mammary epithelial cell: influence of extracellular matrix composition and organization during development and tumorigenesis. *Int J Biochem Cell Biol*, 39, 1987-94.
- Kato, H., Ota, T., Furuhashi, T., Ohta, Y. and Iguchi, T., 2003. Changes in reproductive organs of female rats treated with bisphenol A during the neonatal period. *Reprod Toxicol*, 17, 283-8.
- Kazi, A.A. and Koos, R.D., 2007. Estrogen-induced activation of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , vascular endothelial growth factor expression, and edema in the uterus are mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Endocrinology*, 148, 2363-74.
- Keely, P.J., Fong, A.M., Zutter, M.M. and Santoro, S.A., 1995. Alteration of collagen-dependent adhesion, motility, and morphogenesis by the expression of antisense alpha 2 integrin mRNA in mammary cells. *J Cell Sci*, 108 ( Pt 2), 595-607.

- Kitajewski, J. and Sassoon, D., 2000. The emergence of molecular gynecology: homeobox and Wnt genes in the female reproductive tract. *Bioessays*, 22, 902-10.
- Kitraki, E., Nalvarte, I., Alavian-Ghavanini, A. and Rüegg, J., 2016. Effects of pre- and post-natal exposure to bisphenol A on the stress system. *Endocrine Disruptors*, 4, 11.
- Knight, C.H. and Peaker, M., 1982. Development of the mammary gland. *J Reprod Fertil*, 65, 521-36.
- Knudsen, J., 1990. Acyl-CoA-binding protein (ACBP) and its relation to fatty acid-binding protein (FABP): an overview. *Mol Cell Biochem*, 98, 217-23.
- Kubo, K., Arai, O., Omura, M., Watanabe, R., Ogata, R. and Aou, S., 2003. Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats. *Neurosci Res*, 45, 345-56.
- Kundakovic, M. and Champagne, F.A., 2011. Epigenetic perspective on the developmental effects of bisphenol A. *Brain Behav Immun*, 25, 1084-93.
- Kunz, C., Rudloff, S., Baier, W., Klein, N. and Strobel, S., 2000. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu Rev Nutr*, 20, 699-722.
- Kuzmichev, A., Nishioka, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Reinberg, D., 2002. Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev*, 16, 2893-905.
- Li, E., 2002. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet*, 3, 662-73.
- Li, X., Ying, G.G., Su, H.C., Yang, X.B. and Wang, L., 2010. Simultaneous determination and assessment of 4-nonylphenol, bisphenol A and triclosan in tap water, bottled water and baby bottles. *Environ Int*, 36, 557-62.
- Liang, G., Yang, J., Horton, J.D., Hammer, R.E., Goldstein, J.L. and Brown, M.S., 2002. Diminished hepatic response to fasting/refeeding and liver X receptor agonists in mice with selective deficiency of sterol regulatory element-binding protein-1c. *J Biol Chem*, 277, 9520-8.
- Listenberger, L.L., Ostermeyer-Fay, A.G., Goldberg, E.B., Brown, W.J. and Brown, D.A., 2007. Adipocyte differentiation-related protein reduces the lipid droplet association of adipose triglyceride lipase and slows triacylglycerol turnover. *J Lipid Res*, 48, 2751-61.

- Lubrano, C., Genovesi, G., Specchia, P., Costantini, D., Mariani, S., Petrangeli, E., Lenzi, A. and Gnassi, L., 2013. Obesity and metabolic comorbidities: environmental diseases? *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 640673.
- Maranghi, F., Tassinari, R., Moracci, G., Macri, C. and Mantovani, A., 2008. Effects of a low oral dose of diethylstilbestrol (DES) on reproductive tract development in F1 female CD-1 mice. *Reprod Toxicol*, 26, 146-50.
- Markey, C.M., Rubin, B.S., Soto, A.M. and Sonnenschein, C., 2002. Endocrine disruptors: from Wingspread to environmental developmental biology. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 83, 235-44.
- Markey, C.M., Wadia, P.R., Rubin, B.S., Sonnenschein, C. and Soto, A.M., 2005. Long-term effects of fetal exposure to low doses of the xenoestrogen bisphenol-A in the female mouse genital tract. *Biol Reprod*, 72, 1344-51.
- Marra, C.A. and de Alaniz, M.J., 1990. Mineralocorticoids modify rat liver delta 6 desaturase activity and other parameters of lipid metabolism. *Biochem Int*, 22, 483-93.
- Masso-Welch, P.A., Darcy, K.M., Stangle-Castor, N.C. and Ip, M.M., 2000. A developmental atlas of rat mammary gland histology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 5, 165-85.
- Mather, I.H. and Jack, L.J., 1993. A review of the molecular and cellular biology of butyrophilin, the major protein of bovine milk fat globule membrane. *J Dairy Sci*, 76, 3832-50.
- Mather, I.H. and Keenan, T.W., 1998. Origin and secretion of milk lipids. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 3, 259-73.
- McLachlan, J.A., 2001. Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocr Rev*, 22, 319-41.
- McManaman, J.L., 2009. Formation of milk lipids: a molecular perspective. *Clin. Lipidol.*, 4, 391-401.
- McManaman, J.L., 2014. Lipid Transport in the Lactating Mammary Gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 19, 35-42.
- McManaman, J.L. and Neville, M.C., 2003. Mammary physiology and milk secretion. *Adv Drug Deliv Rev*, 55, 629-41.
- McManaman, J.L., Palmer, C.A., Anderson, S., Schwertfeger, K. and Neville, M.C., 2004. Regulation of milk lipid formation and secretion in the mouse mammary gland. *Adv Exp Med Biol*, 554, 263-79.

- McManaman, J.L., Palmer, C.A., Wright, R.M. and Neville, M.C., 2002. Functional regulation of xanthine oxidoreductase expression and localization in the mouse mammary gland: evidence of a role in lipid secretion. *J Physiol*, 545, 567-79.
- McManaman, J.L., Russell, T.D., Schaack, J., Orlicky, D.J. and Robenek, H., 2007. Molecular determinants of milk lipid secretion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 12, 259-68.
- Medina, D., 1996. The mammary gland: a unique organ for the study of development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 1, 5-19.
- Mehlem, A., Hagberg, C.E., Muhl, L., Eriksson, U. and Falkevall, A., 2013. Imaging of neutral lipids by oil red O for analyzing the metabolic status in health and disease. *Nat Protoc*, 8, 1149-54.
- Mellenberger, R.W. and Bauman, D.E., 1974. Metabolic adaptations during lactogenesis. Fatty acid synthesis in rabbit mammary tissue during pregnancy and lactation. *Biochem J*, 138, 373-9.
- Mesilati-Stahy, R., Mida, K. and Argov-Argaman, N., 2011. Size-dependent lipid content of bovine milk fat globule and membrane phospholipids. *J Agric Food Chem*, 59, 7427-35.
- Miyamoto, K. and Kotake, M., 2006. Estimation of daily bisphenol a intake of Japanese individuals with emphasis on uncertainty and variability. *Environ Sci*, 13, 15-29.
- Miyoshi, K., Shillingford, J.M., Smith, G.H., Grimm, S.L., Wagner, K.U., Oka, T., Rosen, J.M., Robinson, G.W. and Hennighausen, L., 2001. Signal transducer and activator of transcription (Stat) 5 controls the proliferation and differentiation of mammary alveolar epithelium. *J Cell Biol*, 155, 531-42.
- Mizoguchi, Y., Kim, J.Y., Enami, J. and Sakai, S., 1997. The regulation of the prolactin receptor gene expression in the mammary gland of early pregnant mouse. *Endocr J*, 44, 53-8.
- Monje, L., Varayoud, J., Luque, E.H. and Ramos, J.G., 2007. Neonatal exposure to bisphenol A modifies the abundance of estrogen receptor alpha transcripts with alternative 5'-untranslated regions in the female rat preoptic area. *J Endocrinol*, 194, 201-12.
- Monje, L., Varayoud, J., Munoz-de-Toro, M., Luque, E.H. and Ramos, J.G., 2009. Neonatal exposure to bisphenol A alters estrogen-dependent mechanisms governing sexual behavior in the adult female rat. *Reprod Toxicol*, 28, 435-42.

- Montes, G.S. and Luque, E.H., 1988. Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Acta Anat (Basel)*, 133, 192-9.
- Morrison, B. and Cutler, M.L., 2010. The contribution of adhesion signaling to lactogenesis. *J Cell Commun Signal*, 4, 131-9.
- Muñoz-de-Toro, M., Markey, C.M., Wadia, P.R., Luque, E.H., Rubin, B.S., Sonnenschein, C. and Soto, A.M., 2005. Perinatal exposure to bisphenol-A alters peripubertal mammary gland development in mice. *Endocrinology*, 146, 4138-47.
- Muñoz de Toro, M.M., Maffini, M.V., Kass, L. and Luque, E.H., 1998. Proliferative activity and steroid hormone receptor status in male breast carcinoma. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 67, 333-9.
- Muschler, J., Lochter, A., Roskelley, C.D., Yurchenco, P. and Bissell, M.J., 1999. Division of labor among the alpha6beta4 integrin, beta1 integrins, and an E3 laminin receptor to signal morphogenesis and beta-casein expression in mammary epithelial cells. *Mol Biol Cell*, 10, 2817-28.
- Muschler, J. and Streuli, C.H., 2010. Cell-matrix interactions in mammary gland development and breast cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a003202.
- Nakhasi, H.L. and Quasba, P.K., 1979. Quantitation of milk proteins and their mRNAs in rat mammary gland at various stages of gestation and lactation. *J Biol Chem*, 254, 6016-25.
- National Research Council, U., 1999. *Hormonally Active agents in the Environment.*, National Academy Press, Nueva York.
- Naylor, M.J., Li, N., Cheung, J., Lowe, E.T., Lambert, E., Marlow, R., Wang, P., Schatzmann, F., Wintermantel, T., Schuetz, G., Clarke, A.R., Mueller, U., Hynes, N.E. and Streuli, C.H., 2005. Ablation of beta1 integrin in mammary epithelium reveals a key role for integrin in glandular morphogenesis and differentiation. *J Cell Biol*, 171, 717-28.
- Neville, M.C., McFadden, T.B. and Forsyth, I., 2002. Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 7, 49-66.
- Neville, M.C. and Picciano, M.F., 1997. Regulation of milk lipid secretion and composition. *Annu Rev Nutr*, 17, 159-83.
- Newbold, R.R., 2010. Impact of environmental endocrine disrupting chemicals on the development of obesity. *Hormones (Athens)*, 9, 206-17.

- Nguyen, D.A. and Neville, M.C., 1998. Tight junction regulation in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 3, 233-46.
- Nickerson, S.C. and Akers, R.M., 1984. Biochemical and ultrastructural aspects of milk synthesis and secretion. *Int J Biochem*, 16, 855-65.
- Ormandy, C.J., Binart, N. and Kelly, P.A., 1997. Mammary gland development in prolactin receptor knockout mice. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2, 355-64.
- Palmer, J.R., Wise, L.A., Hatch, E.E., Troisi, R., Titus-Ernstoff, L., Strohsnitter, W., Kaufman, R., Herbst, A.L., Noller, K.L., Hyer, M. and Hoover, R.N., 2006. Prenatal diethylstilbestrol exposure and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15, 1509-14.
- Parry, G., Lee, E.Y., Farson, D., Koval, M. and Bissell, M.J., 1985. Collagenous substrata regulate the nature and distribution of glycosaminoglycans produced by differentiated cultures of mouse mammary epithelial cells. *Exp Cell Res*, 156, 487-99.
- Passos, M.C., Ramos, C.F. and Moura, E.G., 2000. Short and long term effects on malnutrition in rats during lactation on the body weight of offspring. *Nutr. Res.*, 20, 1603-1611.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. and 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 Res*, 30, e36.
- Plaut, K., Maple, R., Ginsburg, E. and Vonderhaar, B., 1999. Progesterone stimulates DNA synthesis and lobulo-alveolar development in mammary glands in ovariectomized mice. *J Cell Physiol*, 180, 298-304.
- Qian, X. and Zhao, F.Q., 2014. Current major advances in the regulation of milk protein gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 24, 357-78.
- Quirk, S.J., Gannell, J.E., Fullerton, M.J. and Funder, J.W., 1985. Progestins specifically suppress alpha-lactalbumin synthesis and secretion. *J Steroid Biochem*, 23, 901-5.
- Ramos, J.G., Varayoud, J., Kass, L., Rodriguez, H., Costabel, L., Muñoz-De-Toro, M. and Luque, E.H., 2003. Bisphenol a induces both transient and permanent histofunctional alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in prenatally exposed male rats. *Endocrinology*, 144, 3206-15.
- Ramos, J.G., Varayoud, J., Sonnenschein, C., Soto, A.M., Munoz De Toro, M. and Luque, E.H., 2001. Prenatal exposure to low doses of bisphenol A alters the

- periductal stroma and glandular cell function in the rat ventral prostate. *Biol Reprod*, 65, 1271-7.
- Rayner, J.L., Enoch, R.R. and Fenton, S.E., 2005. Adverse effects of prenatal exposure to atrazine during a critical period of mammary gland growth. *Toxicol Sci*, 87, 255-66.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D. and Jenuwein, T., 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, 406, 593-9.
- Rezaei, R., Wu, Z., Hou, Y., Bazer, F.W. and Wu, G., 2016. Amino acids and mammary gland development: nutritional implications for milk production and neonatal growth. *J Anim Sci Biotechnol*, 7, 20.
- Richter, C.A., Birnbaum, L.S., Farabollini, F., Newbold, R.R., Rubin, B.S., Talsness, C.E., Vandenberg, J.G., Walser-Kuntz, D.R. and vom Saal, F.S., 2007. In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol*, 24, 199-224.
- Rijnkels, M., 2002. Multispecies comparison of the casein gene loci and evolution of casein gene family. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 7, 327-45.
- Rijnkels, M., Elnitski, L., Miller, W. and Rosen, J.M., 2003. Multispecies comparative analysis of a mammalian-specific genomic domain encoding secretory proteins. *Genomics*, 82, 417-32.
- Rijnkels, M., Freeman-Zadrowski, C., Hernandez, J., Potluri, V., Wang, L., Li, W. and Lemay, D.G., 2013. Epigenetic modifications unlock the milk protein gene loci during mouse mammary gland development and differentiation. *PLoS One*, 8, e53270.
- Rijnkels, M., Kabotyanski, E., Montazer-Torbati, M.B., Hue Beauvais, C., Vassetzky, Y., Rosen, J.M. and Devinoy, E., 2010. The epigenetic landscape of mammary gland development and functional differentiation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 15, 85-100.
- Rivera, O.E., Varayoud, J., Rodriguez, H.A., Munoz-de-Toro, M. and Luque, E.H., 2011. Neonatal exposure to bisphenol A or diethylstilbestrol alters the ovarian follicular dynamics in the lamb. *Reprod Toxicol*, 32, 304-12.
- Rivera, O.E., Varayoud, J., Rodriguez, H.A., Santamaria, C.G., Bosquiaz, V.L., Osti, M., Belmonte, N.M., Munoz-de-Toro, M. and Luque, E.H., 2015. Neonatal

- exposure to xenoestrogens impairs the ovarian response to gonadotropin treatment in lambs. *Reproduction*, 149, 645-55.
- Robinson, G.W., McKnight, R.A., Smith, G.H. and Hennighausen, L., 1995. Mammary epithelial cells undergo secretory differentiation in cycling virgins but require pregnancy for the establishment of terminal differentiation. *Development*, 121, 2079-90.
- Rodriguez-Cruz, M., Sanchez, R., Sanchez, A.M., Kelleher, S.L., Sanchez-Munoz, F., Maldonado, J. and Lopez-Alarcon, M., 2011. Participation of mammary gland in long-chain polyunsaturated fatty acid synthesis during pregnancy and lactation in rats. *Biochim Biophys Acta*, 1811, 284-93.
- Rodriguez, H.A., Kass, L., Varayoud, J., Ramos, J.G., Ortega, H.H., Durando, M., Munoz-De-Toro, M. and Luque, E.H., 2003. Collagen remodelling in the guinea-pig uterine cervix at term is associated with a decrease in progesterone receptor expression. *Mol Hum Reprod*, 9, 807-13.
- Rodriguez, H.A., Santambrosio, N., Santamaria, C.G., Munoz-de-Toro, M. and Luque, E.H., 2010. Neonatal exposure to bisphenol A reduces the pool of primordial follicles in the rat ovary. *Reprod Toxicol*, 30, 550-7.
- Rosen, J.M., Wyszomierski, S.L. and Hadsell, D., 1999. Regulation of milk protein gene expression. *Annu Rev Nutr*, 19, 407-36.
- Rossetti, M.F., Varayoud, J., Moreno-Piovanio, G.S., Luque, E.H. and Ramos, J.G., 2015. Environmental enrichment attenuates the age-related decline in the mRNA expression of steroidogenic enzymes and reduces the methylation state of the steroid 5 $\alpha$ -reductase type 1 gene in the rat hippocampus. *Mol Cell Endocrinol*, 412, 330-8.
- Rothschild, T.C., Boylan, E.S., Calhoon, R.E. and Vonderhaar, B.K., 1987. Transplacental effects of diethylstilbestrol on mammary development and tumorigenesis in female ACI rats. *Cancer Res*, 47, 4508-16.
- Rubin, B.S., 2011. Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 127, 27-34.
- Rubin, B.S., Murray, M.K., Damassa, D.A., King, J.C. and Soto, A.M., 2001. Perinatal exposure to low doses of bisphenol A affects body weight, patterns of estrous cyclicity, and plasma LH levels. *Environ Health Perspect*, 109, 675-80.
- Rubin, M.M., 2007. Antenatal exposure to DES: lessons learned...future concerns. *Obstet Gynecol Surv*, 62, 548-55.

- Rudel, R.A., Fenton, S.E., Ackerman, J.M., Euling, S.Y. and Makris, S.L., 2011a. Environmental exposures and mammary gland development: state of the science, public health implications, and research recommendations. *Environ Health Perspect*, 119, 1053-61.
- Rudel, R.A., Gray, J.M., Engel, C.L., Rawsthorne, T.W., Dodson, R.E., Ackerman, J.M., Rizzo, J., Nudelman, J.L. and Brody, J.G., 2011b. Food packaging and bisphenol A and bis(2-ethylhexyl) phthalate exposure: findings from a dietary intervention. *Environ Health Perspect*, 119, 914-20.
- Rudolph, M.C., Monks, J., Burns, V., Phistry, M., Marians, R., Foote, M.R., Bauman, D.E., Anderson, S.M. and Neville, M.C., 2010. Sterol regulatory element binding protein and dietary lipid regulation of fatty acid synthesis in the mammary epithelium. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 299, E918-27.
- Russell, T.D., Palmer, C.A., Orlicky, D.J., Fischer, A., Rudolph, M.C., Neville, M.C. and McManaman, J.L., 2007. Cytoplasmic lipid droplet accumulation in developing mammary epithelial cells: roles of adipophilin and lipid metabolism. *J Lipid Res*, 48, 1463-75.
- Russell, T.D., Schaack, J., Orlicky, D.J., Palmer, C., Chang, B.H., Chan, L. and McManaman, J.L., 2011. Adipophilin regulates maturation of cytoplasmic lipid droplets and alveolae in differentiating mammary glands. *J Cell Sci*, 124, 3247-53.
- Russo, I.H. and Russo, J., 1996. Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ Health Perspect*, 104, 938-67.
- Russo, J., Ao, X., Grill, C. and Russo, I.H., 1999. Pattern of distribution of cells positive for estrogen receptor alpha and progesterone receptor in relation to proliferating cells in the mammary gland. *Breast Cancer Res Treat*, 53, 217-27.
- Russo, J., Tay, L.K. and Russo, I.H., 1982. Differentiation of the mammary gland and susceptibility to carcinogenesis. *Breast Cancer Res Treat*, 2, 5-73.
- Saji, S., Jensen, E.V., Nilsson, S., Rylander, T., Warner, M. and Gustafsson, J.A., 2000. Estrogen receptors alpha and beta in the rodent mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 337-42.
- Saji, S., Sakaguchi, H., Andersson, S., Warner, M. and Gustafsson, J., 2001. Quantitative analysis of estrogen receptor proteins in rat mammary gland. *Endocrinology*, 142, 3177-86.

- Santamaria, C., Durando, M., Munoz de Toro, M., Luque, E.H. and Rodriguez, H.A., 2016. Ovarian dysfunctions in adult female rat offspring born to mothers perinatally exposed to low doses of bisphenol A. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 158, 220-30.
- Schonfelder, G., Friedrich, K., Paul, M. and Chahoud, I., 2004. Developmental effects of prenatal exposure to bisphenol a on the uterus of rat offspring. *Neoplasia*, 6, 584-94.
- Shennan, D.B. and Peaker, M., 2000. Transport of milk constituents by the mammary gland. *Physiol Rev*, 80, 925-51.
- Shi, H., Luo, J., Zhu, J., Li, J., Sun, Y., Lin, X., Zhang, L. and Yao, D., 2013. PPAR gamma Regulates Genes Involved in Triacylglycerol Synthesis and Secretion in Mammary Gland Epithelial Cells of Dairy Goats. *PPAR Res*, 2013, 310948.
- Smith, S., 1994. The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB J*, 8, 1248-59.
- Soto, A.M., Brisken, C., Schaeberle, C. and 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. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 18, 199-208.
- Stoker, C., Beldomenico, P.M., Bosquiazzo, V.L., Zayas, M.A., Rey, F., Rodriguez, H., Munoz-de-Toro, M. and Luque, E.H., 2008. Developmental exposure to endocrine disruptor chemicals alters follicular dynamics and steroid levels in *Caiman latirostris*. *Gen Comp Endocrinol*, 156, 603-12.
- Stoker, C., Rey, F., Rodriguez, H., Ramos, J.G., Sirosky, P., Larriera, A., Luque, E.H. and Munoz-de-Toro, M., 2003. Sex reversal effects on *Caiman latirostris* exposed to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol A. *Gen Comp Endocrinol*, 133, 287-96.
- Streuli, C.H., Schmidhauser, C., Bailey, N., Yurchenco, P., Skubitz, A.P., Roskelley, C. and Bissell, M.J., 1995. Laminin mediates tissue-specific gene expression in mammary epithelia. *J Cell Biol*, 129, 591-603.
- Sweeney, T., 2002. Is exposure to endocrine disrupting compounds during fetal/post-natal development affecting the reproductive potential of farm animals? *Domest Anim Endocrinol*, 23, 203-9.

- Takahashi, O. and Oishi, S., 2000. Disposition of orally administered 2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)propane (Bisphenol A) in pregnant rats and the placental transfer to fetuses. *Environ Health Perspect*, 108, 931-5.
- Taya, K. and Greenwald, G.S., 1981. In vivo and in vitro ovarian steroidogenesis in the pregnant rat. *Biol Reprod*, 25, 683-91.
- Teglund, S., McKay, C., Schuetz, E., van Deursen, J.M., Stravopodis, D., Wang, D., Brown, M., Bodner, S., Grosveld, G. and Ihle, J.N., 1998. Stat5a and Stat5b proteins have essential and nonessential, or redundant, roles in cytokine responses. *Cell*, 93, 841-50.
- Vaissiere, T., Sawan, C. and Herceg, Z., 2008. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing. *Mutat Res*, 659, 40-8.
- van Dijck, J.A., Doorduyn, Y., Bulten, J.H., Verloop, J., Massuger, L.F. and Kiemeneij, B.A., 2009. [Vaginal and cervical cancer due to diethylstilbestrol (DES); end epidemic]. *Ned Tijdschr Geneesk*, 153, A366.
- Vandenberg, L.N., Colborn, T., Hayes, T.B., Heindel, J.J., Jacobs, D.R., Jr., Lee, D.H., Shioda, T., Soto, A.M., vom Saal, F.S., Welshons, W.V., Zoeller, R.T. and Myers, J.P., 2012. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocr Rev*, 33, 378-455.
- Vandenberg, L.N., Chahoud, I., Heindel, J.J., Padmanabhan, V., Paumgarten, F.J. and Schoenfelder, G., 2010. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ Health Perspect*, 118, 1055-70.
- Vandenberg, L.N., Maffini, M.V., Wadia, P.R., Sonnenschein, C., Rubin, B.S. and Soto, A.M., 2007. Exposure to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol-A alters development of the fetal mouse mammary gland. *Endocrinology*, 148, 116-27.
- Vanselow, J., Yang, W., Herrmann, J., Zerbe, H., Schuberth, H.J., Petzl, W., Tomek, W. and Seyfert, H.M., 2006. DNA-remethylation around a STAT5-binding enhancer in the alphaS1-casein promoter is associated with abrupt shutdown of alphaS1-casein synthesis during acute mastitis. *J Mol Endocrinol*, 37, 463-77.
- Varayoud, J., Ramos, J.G., Bosquiazzo, V.L., Lower, M., Munoz-de-Toro, M. and Luque, E.H., 2011. Neonatal exposure to bisphenol A alters rat uterine implantation-associated gene expression and reduces the number of implantation sites. *Endocrinology*, 152, 1101-11.

- Varayoud, J., Ramos, J.G., Bosquiazzo, V.L., Munoz-de-Toro, M. and Luque, E.H., 2008. Developmental exposure to Bisphenol a impairs the uterine response to ovarian steroids in the adult. *Endocrinology*, 149, 5848-60.
- Varayoud, J., Ramos, J.G., Munoz-de-Toro, M. and Luque, E.H., 2014. Long-lasting effects of neonatal bisphenol A exposure on the implantation process. *Vitam Horm*, 94, 253-75.
- Vigizzi, L., Bosquiazzo, V.L., Kass, L., Ramos, J.G., Munoz-de-Toro, M. and Luque, E.H., 2015. Developmental exposure to bisphenol A alters the differentiation and functional response of the adult rat uterus to estrogen treatment. *Reprod Toxicol*, 52, 83-92.
- Vigizzi, L., Ramos, J.G., Kass, L., Tschopp, M.V., Munoz-de-Toro, M., Luque, E.H. and Bosquiazzo, V.L., 2016. A deregulated expression of estrogen-target genes is associated with an altered response to estradiol in aged rats perinatally exposed to bisphenol A. *Mol Cell Endocrinol*, 426, 33-42.
- Vom Saal, F.S. and Hughes, C., 2005. An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environ Health Perspect*, 113, 926-33.
- Vom Saal, F.S., Nagel, S.C., Coe, B.L., Angle, B.M. and Taylor, J.A., 2012. The estrogenic endocrine disrupting chemical bisphenol A (BPA) and obesity. *Mol Cell Endocrinol*, 354, 74-84.
- Vorderstrasse, B.A., Fenton, S.E., Bohn, A.A., Cundiff, J.A. and Lawrence, B.P., 2004. A novel effect of dioxin: exposure during pregnancy severely impairs mammary gland differentiation. *Toxicol Sci*, 78, 248-57.
- Weir, M.L., Oppizzi, M.L., Henry, M.D., Onishi, A., Campbell, K.P., Bissell, M.J. and Muschler, J.L., 2006. Dystroglycan loss disrupts polarity and beta-casein induction in mammary epithelial cells by perturbing laminin anchoring. *J Cell Sci*, 119, 4047-58.
- White, S.S., Stanko, J.P., Kato, K., Calafat, A.M., Hines, E.P. and Fenton, S.E., 2011. Gestational and chronic low-dose PFOA exposures and mammary gland growth and differentiation in three generations of CD-1 mice. *Environ Health Perspect*, 119, 1070-6.
- Wilcox, A.J., Baird, D.D., Weinberg, C.R., Hornsby, P.P. and Herbst, A.L., 1995. Fertility in men exposed prenatally to diethylstilbestrol. *N Engl J Med*, 332, 1411-6.

- Winklehner-Jennewein, P., Geymayer, S., Lechner, J., Welte, T., Hansson, L., Geley, S. and Doppler, W., 1998. A distal enhancer region in the human beta-casein gene mediates the response to prolactin and glucocorticoid hormones. *Gene*, 217, 127-39.
- Wu, W.J., Lee, C.F., Hsin, C.H., Du, J.Y., Hsu, T.C., Lin, T.H., Yao, T.Y., Huang, C.H. and Lee, Y.J., 2008. TGF-beta inhibits prolactin-induced expression of beta-casein by a Smad3-dependent mechanism. *J Cell Biochem*, 104, 1647-59.
- Xu, R., Spencer, V.A. and Bissell, M.J., 2007. Extracellular matrix-regulated gene expression requires cooperation of SWI/SNF and transcription factors. *J Biol Chem*, 282, 14992-9.
- Ye, X., Kuklenyik, Z., Needham, L.L. and Calafat, A.M., 2006. Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 831, 110-5.
- Yoshida, M., Katsuda, S., Tanimoto, T., Asai, S., Nakae, D., Kurokawa, Y., Taya, K. and Maekawa, A., 2002. Induction of different types of uterine adenocarcinomas in Donryu rats due to neonatal exposure to high-dose p-t-octylphenol for different periods. *Carcinogenesis*, 23, 1745-50.
- Zhang, H.Y., Xue, W.Y., Li, Y.Y., Ma, Y., Zhu, Y.S., Huo, W.Q., Xu, B., Xia, W. and Xu, S.Q., 2014. Perinatal exposure to 4-nonylphenol affects adipogenesis in first and second generation rats offspring. *Toxicol Lett*, 225, 325-32.
- Zimmerman-Downs, J.M., Shuman, D., Stull, S.C. and Ratzlaff, R.E., 2010. Bisphenol A blood and saliva levels prior to and after dental sealant placement in adults. *J Dent Hyg*, 84, 145-50.
- Zoeller, R.T., Brown, T.R., Doan, L.L., Gore, A.C., Skakkebaek, N.E., Soto, A.M., Woodruff, T.J. and Vom Saal, F.S., 2012. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society. *Endocrinology*, 153, 4097-110.