

# **I- Introducción**

## 1. PERTURBADORES ENDOCRINOS

### 1.1. Generalidades

Desde la publicación del libro “Primavera silenciosa” (“*Silent Spring*”) de Rachel Carson en 1962, empezó a ser cada vez mayor el interés por ciertos químicos que, introducidos en el medio ambiente, afectarían seriamente la salud de poblaciones animales y del hombre. Recién en 1991, durante la conferencia de Wingspread (Wisconsin, Estados Unidos) se adoptó el término de **perturbadores endocrinos (PE)** (o *endocrine disruptors*) para hacer referencia a aquellas sustancias que tienen la capacidad de imitar o antagonizar la acción de las hormonas endógenas. El primer trabajo publicado al respecto apareció dos años después (Colborn y col., 1993) y comenzó a ser más evidente que la presencia de PEs representa un riesgo para la salud de los animales (silvestres y domésticos) y del hombre, por su capacidad para interferir con la homeostasis endocrina (Colborn y col., 1993).

La Agencia de Protección Ambiental (*Environmental Protection Agency* -EPA-) de Estados Unidos, define a un PE como una “sustancia o mezcla de sustancias exógenas que altera una o más funciones del sistema endocrino y en consecuencia causa efectos adversos en la salud de un organismo intacto, su progenie o subpoblaciones” (USEPA, 1997).

Algunos PEs asociados con efectos adversos sobre el desarrollo y la reproducción animal imitan las acciones del  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) y se hipotetizó que estas sustancias, denominadas genéricamente **xenoestrógenos**, podrían estar asociadas con la mayor incidencia de cáncer de mama, entre otras enfermedades (Davis y col., 1993). También se ha sugerido que los PEs con acción estrogénica, anti-estrogénica o anti-androgénica podrían estar relacionados con ciertas deficiencias/anomalías como el menor conteo espermático, aumento en la incidencia de cáncer de próstata y de testículo, y diversas disfunciones del tracto urogenital masculino (Sharpe y Skakkebaek, 1993; Sharpe y col., 1995).

Quizás el ejemplo más relevante de exposición a xenoestrógenos haya sido el de la administración de dietilestilbestrol (DES) -un potente estrógeno sintético- a mujeres embarazadas con el objetivo de evitar abortos espontáneos. La terapia se aplicó a mujeres de todo el mundo desde los primeros años de la década de 1940. Según el régimen prescripto, se estima que millones de mujeres recibieron altas dosis de esta droga durante su embarazo (National Research Council, 1999). En 1971 se prohíbe utilizar DES en Estados Unidos a raíz de un estudio publicado por Herbst y colaboradores (1971), quienes informan la aparición de adenocarcinoma de células claras de vagina en mujeres jóvenes

cuyas madres habían recibido DES durante el embarazo. Además de esta forma de cáncer, otras anomalías se fueron detectando en los “hijos del DES” a través de los años: disminución de la fertilidad, riesgo de nacimientos prematuros, abortos espontáneos y embarazos ectópicos, criptorquidia (ausencia de descenso testicular) e hipospadia (National Research Council, 1999).

### **1.1.1. Fuentes de exposición**

Los PEs pueden agruparse en tres categorías: 1) químicos sintéticos utilizados en la industria (dioxinas, bifenilos policlorinados -PCBs- hexaclorobenceno, ftalatos, derivados fenólicos: nonilfenol, octilfenol, bisfenol A-BPA-), agricultura (atrazina, diclorodifeniltricloroetano -DDT- y sus derivados, endosulfán, parathion) y otros productos de consumo; 2) químicos sintéticos utilizados como drogas farmacológicas (etinilestradiol, tamoxifeno, DES); 3) químicos naturales presentes en legumbres utilizadas como alimento de humanos y animales (fitoestrógenos) (Pocar y col., 2003). Aunque muchos de estos químicos tienen una actividad hormonal débil si son comparados con las hormonas endógenas, su naturaleza lipofílica y vida media relativamente larga, permiten su acumulación y persistencia en tejidos grasos, aumentando así su concentración y biodisponibilidad (Holliger y col., 1997; Hooper y McDonald, 2000).

La exposición a PEs puede ocurrir a través de una variedad de vías. Humanos y animales pueden verse expuestos involuntariamente por el agua, aire, alimento o suelo contaminados. Si bien debería ser considerada cada exposición a un PE individualmente para determinar si representa un riesgo para la salud, este análisis resulta hipotético. Tanto animales como humanos estamos expuestos a mezclas complejas de estos PEs y las interacciones entre estas sustancias no pueden ser anticipadas en función de la información obtenida para cada PE en particular.

Ambos factores, diversidad de vías de exposición de un mismo PE y el hecho de estar expuestos a varios PE de forma simultánea, dificultan la estimación de las dosis a las que estamos expuestos los seres humanos. No obstante, una exposición humana diaria pudo ser estimada con los datos reunidos en la bibliografía con el correr de los años, algunos ejemplos de la vía de exposición oral (principal vía de exposición en humanos) se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Exposición potencial por vía oral a diferentes estrógenos.

Fuente de exposición <sup>a</sup>	Vía de exposición	Exposición (µg/día)	Referencia
Anticonceptivos orales (ej: etinilestradiol)	Oral	20-50	Hardman y col., 1996
Terapia de reemplazo hormonal (ej: E <sub>2</sub> )	Oral	50-200	Scott y col., 1991
DES, para evitar abortos espontáneos	Oral	5.000-150.000	Dieckmann y col., 1953
BPA en latas de conserva	Oral	6,3	Howe y Borodinsky, 1998; Howe y col., 1998; Wingender y col., 1998.
BPA en envases de bebidas	Oral	< 0,75	Brotos y col., 1995; Howe y Borodinsky, 1998; Howe y col., 1998; Wingender y col., 1998.
BPA en selladores odontológicos	Oral	90-931 en la primera hora	Olea y col., 1996.
Nonilfenol en agua de río	Oral	0,7	Weeks y col., 1996
DDT en la dieta total	Oral	0,01	Gunderson, 1995
PCBs en la dieta total	Oral	0,002	Gunderson, 1995
Fitoestrógenos (100 g de trigo con 2 ppm de zearalenone)	Oral	200	Verdeal y Ryan, 1979
Fitoestrógenos (bioflavonoides totales)	Oral	1.000.000	Kuhnau, 1976

<sup>a</sup>Abreviaturas utilizadas: E<sub>2</sub>: 17β-estradiol; DES: dietilestilbestrol; BPA: bisfenol A; DDT: diclorodifeniltricloroetano; PCBs: bifenilos policlorinados. Modificado de National Research Council, 1999.

### 1.1.2. Mecanismo de acción

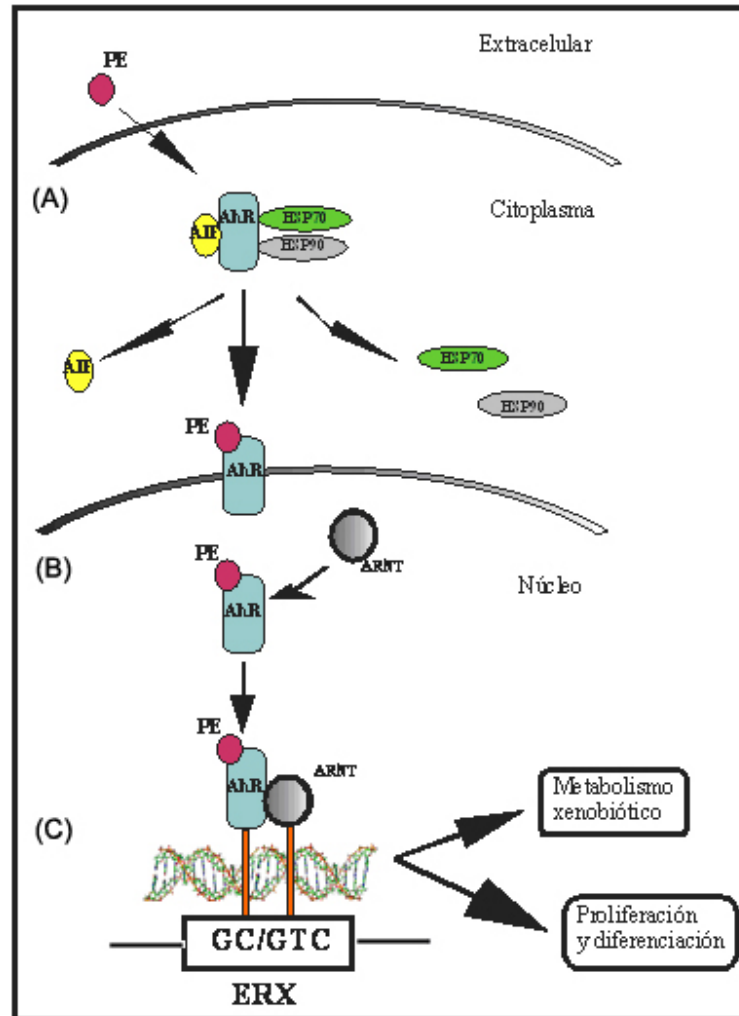
Tres tipos principales de mecanismos de perturbación endocrina pueden citarse (Pocar y col., 2003; <http://e.hormone.tulane.edu/learning/actions.html>):

1- imitación de las hormonas endógenas (como Eg y andrógenos), ya que los PEs pueden iniciar reacciones en el cuerpo que generan respuestas parecidas a las de estas hormonas,

2- bloqueo hormonal, por unión a receptores hormonales específicos, impidiendo la unión de la hormona endógena,

3- generación de reacciones anormales que no ocurren en presencia de hormonas endógenas utilizando las mismas vías que éstas. Los PEs que actúan de esta manera son conocidos como “disparadores” y los más difundidos son las dioxinas y sus derivados.

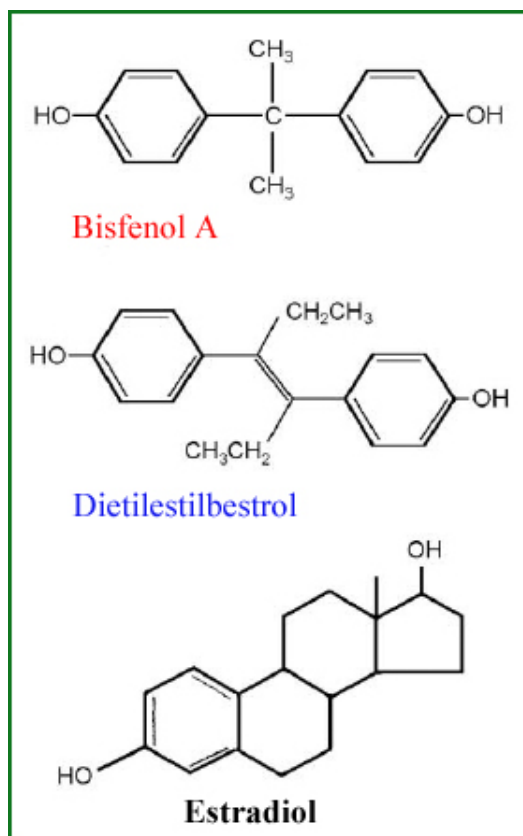
Los estrógenos (Eg) endógenos ejercen su acción a través de la interacción con sus receptores. Los xenoestrógenos poseen la capacidad de unirse a los mismos receptores, alterando la capacidad de la hormona endógena de regular la transcripción de genes estrógeno-dependientes (Sonnenschein y Soto, 1998; Burow y col., 1999). Al igual que ocurre con las hormonas, pequeñas cantidades de PEs pueden afectar el sistema endocrino de animales y humanos. Otro mecanismo caracterizado para la acción de varios PEs, es mediado por el receptor de aril hidrocarburos (AhR, *aryl hydrocarbon receptor*) (Pocar y col., 2003). Este receptor está presente en el citoplasma celular unido a por lo menos tres proteínas adicionales: un factor de interacción AhR (AIF, de inglés *AhR interaction factor*) y dos proteínas de choque térmico 70 y 90 (*heat shock protein*, HSP70 y HSP90). Es muy probable que estas proteínas mantengan al receptor en un estadio sensible a la unión del ligando. Una vez que el ligando (un PE) se une al AhR, las proteínas son desplazadas y de este modo, el receptor ingresa al núcleo para formar un complejo con el translocador nuclear del AhR (ARNT, *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*). El heterodímero así formado adquiere la capacidad de unirse a secuencias específicas del ADN conocidas como elementos de respuesta a xenobióticos (ERX), actuando como un transactivador de expresión génica en una amplia variedad de especies y tejidos. En general estos genes, activados por el AhR, pertenecen a dos grupos funcionales: a) genes que codifican para enzimas que metabolizan drogas (por ejemplo, citocromo P450 1A1), cuya inducción puede alterar la biotransformación de sustancias endógenas y exógenas con consecuencias beneficiosas o deletéreas para el tejido/organismo; b) genes que regulan la proliferación y diferenciación celular, lo que explicaría numerosos efectos observados por exposición a PEs (Fig. 1).



**Figura 1. Mecanismo de acción de PEs, mediado por AhR.** (A) El AhR reside en el citoplasma, formando un complejo con AIF, HSP70 y HSP90. El ligando (PE) difunde desde el compartimento extracelular y se une al AhR. (B) El complejo AhR-PE entra al núcleo y se dimeriza con el ARNT. (C) El nuevo complejo AhR-PE-ARNT se unen a secuencias ERX en el ADN y activan la transcripción de genes blanco. Modificado de Pocar y col., 2003.

## 1.2. Bisfenol A (BPA)

Uno de los xenoestrógenos más estudiados e investigados es el BPA. La potencial exposición a BPA en los humanos es elevada debido a la gran diversidad de compuestos que poseen este químico. El BPA es un compuesto difenólico que contiene dos grupos hidroxilos en posición *para*, característica que lo hace muy semejante al DES (Fig. 2). Se sintetiza por la reacción de dos equivalentes fenólicos con un equivalente de acetona, utilizando ácido clorhídrico como catalizador (Prokop y col., 2004).



**Figura 2. Estructuras químicas de BPA, DES y estradiol.** Es importante resaltar que las estructuras de BPA y DES son más parecidas entre sí que con la del estradiol, indicando que químicos con estructuras distintas pueden tener efectos biológicos semejantes. Modificado de Soto y col., 2008.

El BPA es usado en la manufactura de policarbonatos plásticos y resinas epoxi, como antioxidante en plásticos PVC (policloruro de vinilo) y en la polimerización de estos plásticos (Scientific Committee on Food, European Commission, 2002). Los policarbonatos se emplean en materiales que toman contacto con los alimentos, como botellas retornables de bebidas, mamaderas, utensilios domésticos (platos y tazas), recipientes para conservar alimentos (Scientific Committee on Food, European Commission, 2002; Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food, 2006). Las resinas epoxi se utilizan principalmente en la industria de las pinturas y lacas. Varios estudios demuestran que es potencialmente elevado el riesgo humano de exposición a BPA debido al alto consumo de productos que contienen este químico (Kang y col., 2006). Otra forma de exposición es a través del empleo de sellantes odontológicos que contienen BPA y la filtración del mismo a la saliva del paciente durante la etapa de polimerización (Olea y col., 1996).

La presencia de BPA fue confirmada en distintas muestras humanas: orina (Calafat y col., 2005), plasma fetal y materno, placenta (Ikezuki y col., 2002), calostro (Kuruto-Niwa y col., 2007). Estos datos demuestran la alta posibilidad de exposición perinatal a

BPA. En las dos últimas décadas, numerosos grupos de investigación, utilizando diversos modelos en roedores de laboratorio evaluaron los efectos de la exposición a BPA (Tabla 2). En nuestro laboratorio estudiamos los efectos del BPA administrado prenatalmente o en los primeros días del desarrollo, no sólo en roedores de laboratorio, sino también en especies de interés zootécnico: ovejas (Rivera y col., 2008) y *Caiman latirostris* (yacaré overo) (Stoker y col., 2003; 2008) (Tabla 3).



**Tabla 2.** Efectos de la exposición a BPA en roedores de laboratorio<sup>a</sup>.

Modelo experimental y dosis empleada	Vía de administración	Resultados más relevantes	Referencia
Ratas y ratones preñadas; DG6-DG15; 1.250 mg/kg/d	Intragástrica	Madres: ↓ peso corporal; ↑ mortalidad; ↑ reabsorción de los fetos Crías sobrevivientes: ↓ peso corporal	Morrissey y col., 1987.
Ratones preñadas; DG11-DG17; 2 µg/kg/d	Oral	Crías machos adultos: ↑ peso de la próstata y del tamaño de la glándula prepucial; ↓ peso del epidídimo	Nagel y col., 1997.
Ratas OVX; 40-45 µg/d (durante 3 d)	Subcutánea	Hiperprolactinemia	Steinmetz y col., 1997.
Ratones preñadas; DG11-DG17; 20 µg/kg/d	Oral	Crías machos adultos: ↓ peso del epidídimo; ↓ producción de espermatozoides/g testículo	vom Saal y col., 1998.
Ratas 1d-5d; 100 y 500 µg/d	Subcutánea	Hiperprolactinemia en hembras y machos prepuberales Machos de 30d: ↑ RE $\alpha$ y ↑ RE $\beta$ en área preóptica Hembras de 30d: ↑ RE $\alpha$ en hipotálamo medio basal	Khurana y col., 2000.
Ratas; DG6-21d; 0,1 y 1,2 mg/kg/d	Oral	Crías hembras: ciclos estrales anormales; ↑ peso corporal; ↓ LH plasmática	Rubin y col., 2001.
Ratas; 0d-9d; 1 mg/cría; 4 mg/cría	Subcutánea	1 mg/cría: adelantamiento de la pubertad; ciclos estrales irregulares; ↓ área ocupada por CL; quistes foliculares 4 mg/cría: ↑ ganancia de peso corporal; cornificación vaginal persistente; ausencia de CL	Kato y col., 2003.
Ratas machos; 200 mg/kg/d (durante 4 semanas)* Ratas machos; 20 mg/kg/d (durante 4 semanas)**	*: Subcutánea **: Intrapéritoneal	*: ↓ peso del epidídimo; testículo; próstata y vesícula seminal; ↓ producción diaria de espermatozoides **: ↓ peso de próstata y vesícula seminal	Takahashi y Oishi, 2003.

Ratas; DG6-20d; 4-40-400 mg/kg	Oral	Crías machos de 9 semanas: ↑ testosterona plasmática; sin cambios LH y FSH plasmáticas Crías machos de 39 semanas: ↑ testosterona plasmática dosis-dependiente	Watanabe y col., 2003.
Ratas; OVX; 1º) 10 mg (sacrificio 24 hs posteriores); 2º) 10 mg (sacrificio a las 0, 6, 12 y 24 hs posteriores)	Subcutánea	1º) ↑ ARNm de RP en corteza frontal y temporal del cerebro 2º) ↑ ARNm de RP en corteza frontal a las 6, 12 y 24 hs; ↓ ARNm de RP en corteza temporal a las 6, 12 y 24 hs	Funabashi y col., 2004.
Ratas; DG2-21d; 0,006 y 6 mg/kg/d	Oral	No se observaron efectos sobre el desarrollo uterino; ni sobre la expresión de RE $\alpha$ ; inicio de la pubertad; secreción de gonadotropinas ni regularidad del ciclo estral	Yoshida y col., 2004.
Ratas; DG6-DG21; 0,1 y 50 mg/kg/d	Oral	↓ altura del epitelio uterino (en estro); ↓ expresión de RE $\beta$ ; ↑ expresión de RE $\alpha$ dosis alta	Schönfelder y col., 2004.
Ratones hembras; 15d; 40 mg/kg/d	Subcutánea	No se observaron efectos sobre la edad de inicio de la pubertad; ciclo estral; N° de CL ni diferenciación de la GM	Nikaido y col., 2004.
Ratones hembras; DG9-DG19; 25 y 250 ng/kg/d	Subcutánea	Crías hembras de 3 meses: ↓ peso húmedo de la vagina; ↑ proliferación epitelial de las glándulas endometriales; ↑ RE $\alpha$ en útero; ↑ RP en útero	Markey y col., 2005.
Ratones; DG10-21d; 1 $\mu$ g/ml y 10 $\mu$ g/ml	Oral	En crías hembras y machos de 31d: ↑ peso corporal; ↑ colesterol total; ↑ triglicéridos	Miyawaki y col., 2007.
Ratones; 1d-5d; 10-100-1.000 $\mu$ g/kg/d	Subcutánea	En hembras de 18 meses: ↑ quistes ováricos; hiperplasia endometrial; lesiones proliferativas progresivas en oviducto; patologías uterinas severas (adenomiosis, leiomiomas, pólipos estromales)	Newbold y col., 2007.
Ratones machos; 8-9 semanas de	Subcutánea	↑ expresión de CK10 (inducción de metaplasia escamosa en	Ogura y col., 2007.

edad; 0,2 y 200 mg (durante 3 semanas)		próstata)	
Ratones; 1º)DG8-2d; 250 ng/kg/d 2º) 25d OVX + E <sub>2</sub>	Subcutánea	Crías hembras adultas: alteraciones en la morfología de la GM; ↑ sensibilidad a E <sub>2</sub>	Wadia y col., 2007.
Ratones; DG1-DG7; 10 mg/kg/d	Subcutánea	↓ N° de embriones; ↓ peso del útero; ↓ tasa de supervivencia de crías nacidas	Tachibana y col., 2007.
Ratas; DG8-2d; 2,5-25-250-1.000 µg/kg/d	Subcutánea	En hembras adultas: hiperplasia y CDIS en GM	Murray y col., 2007.
Ratas machos; 1d-2d; 250 µg c/12 hs	Subcutánea	↑ de la expresión de calbindina en neuronas de núcleos sexualmente dismórficos	Patisaul y col., 2007.
Ratas; DG10-DG23; 25 y 250 µg/kg	Oral	En crías hembras adultas: ↑ N° de estructuras mamarias indiferenciadas; cambios en la expresión de genes relacionados con el sistema inmune	Moral y col., 2008.
Ratas; DG7-7d; 2-20-200 mg/kg/d	Oral	En crías machos adultas: no se observaron cambios en distintos órganos andrógeno-dependientes	Howdeshell y col., 2008.

<sup>a</sup> **Abreviaturas utilizadas:** *DG*: día/s de gestación; *d*: día/s de edad; *RE*: receptor para estrógenos; *RP*: receptor para progesterona; *LH*: hormona luteinizante; *FSH*: hormona foliculoestimulante; *CL*: cuerpo/s lúteo/s; *OVX*: ovariectomizada/s; *ARNm*: ácido ribonucleico mensajero; *GM*: glándula mamaria; *N°*: número; *CK*: citoqueratina; *CDIS*: carcinoma ductal in situ; ↑: aumento; ↓: disminución.

**Tabla 3.** Efectos de exposición a BPA, reportados por Luque y colaboradores<sup>a</sup>.

Modelo experimental y dosis empleada	Vía de administración	Resultados más relevantes	Referencia
Ratones preñadas; DG9-DG20; 25 y 250 µg/kg/d	Subcutánea	Crías hembras: diferencias en la tasa de crecimiento de la GM a los 30d; ↑ proliferación epitelial a los 10d y ↓ proliferación estromal a los 180d	Markey y col., 2001.
Ratas preñadas; DG8-DG23; 25 y 250 µg/kg/d	Subcutánea	Crías machos 30d: alteraciones en la funcionalidad de la glándula prostática (↓ expresión de RA en estroma periductal; ↓ expresión de PAP en epitelio); alteraciones en el patrón de diferenciación del estroma prostático	Ramos y col., 2001.
Ratas preñadas; DG8-DG23; 25 y 250 µg/kg/d	Subcutánea	Crías machos 15d: ↑ proliferación del estroma periductal de la próstata; ↑ T sérica Crías machos de 30d: ↓ expresión del área α-SMA (+); ↓ % células RA(+) y ↑ expresión del área vimetina (+) en el estroma periductal de la próstata; ↓ % células epiteliales PAP (+). ↑ ARNm REβ en área preóptica; ↑ PRL sérica Crías machos de 120d: las alteraciones observadas en la próstata de machos de 30d no se mantuvieron; sí hubo un ↑ ARNm REβ en área preóptica	Ramos y col., 2003.
<i>Caiman latirostris</i> ; dosis única 90* µg/huevo y 9** mg/huevo	<i>In ovo</i>	* Machos: modificaciones histomorfológicas de los túbulos seminíferos. ** alteró la determinación sexual, superando el efecto de la temperatura; el 100% de los huevos incubados a temperatura productora de machos resultaron hembras.	Stoker y col., 2003.
Ratones preñadas; DG9-DG20; 25 y 250 ng/kg/d	Subcutánea	Crías hembras: desarrollo retardado de la GM a los 30d; ↑ N° estructuras inmaduras; ↓ apoptosis; ↑ expresión de RP	Muñoz-deToro y col., 2005.
Ratas hembras; 1-7d; 0,05* y 20** mg/kg/d	Subcutánea	En área preóptica; 8d:** ↓ expresión de ARNm y proteína de REα; * ↑ expresión de ARNm y proteína de REα;	Monje y col., 2007

		21d: ** ↑ expresión de ARNm del RE $\alpha$ ; ↓ expresión de la proteína de RE $\alpha$ ; * ↑ expresión de ARNm y proteína del RE $\alpha$ . Ninguna dosis modificó los niveles séricos de E <sub>2</sub> .	
<i>Caiman latirostris</i> ; dosis única 90* μg/huevo y 9** mg/huevo	<i>In ovo</i>	Hembras: * perturbación de la dinámica folicular ovárica; ↑ de los niveles plasmáticos de E <sub>2</sub> y T ** ↑ de la incidencia de folículos multiovulares; ↑ de los niveles plasmáticos de E <sub>2</sub>	Stoker y col., 2008
Corderas cruza (Corriedale x Hampshire Down); 1-14d; 50 μg/kg	Subcutánea	Hembras de 30d: cambios en la dinámica folicular ovárica; ↓ del N° de folículos primordiales asociado con un ↑ del N° de folículos de transición y primarios. Mayor incidencia de folículos poliovulares.	Rivera y col., 2008
Ratas hembras 1°) 1-7d; 0,05* y 20** mg/kg/d 2°) 80d * y ** + OVX + E <sub>2</sub> + Pg	Subcutánea	1°) a los 8d: * y ** ↓ expresión de ARNm de Hoxa 10 y Hoxa 11 en útero; 2°) a los 93d: * ↓ expresión de la proteína del RE $\alpha$ en el estroma subepitelial uterino; ↓ expresión de ARNm de Hoxa 11 en útero; * y **: ↓ expresión de ARNm de Hoxa 10 y Hoxa 11 en útero; ↑ expresión de la proteína de SMRT en el compartimiento estromal uterino	Varayoud et al, 2008

<sup>a</sup> **Abreviaturas utilizadas:** *DG*: día/s de gestación; *d*: día/s de edad; *PAP*: fosfatasa ácida prostática; *RA*: receptor para andrógenos; *RE*: receptor para estrógenos; *RP*: receptor para progesterona; *ARNm*: ácido ribonucleico mensajero; *GM*: glándula mamaria; *N°*: número;  *$\alpha$ -SMA*: actina del músculo liso; *T*: testosterona; *PRL*: prolactina; ↑: aumento; ↓: disminución.

### 1.2.1. Mecanismos de acción y riesgo de exposición

Si bien no está completamente dilucidado el mecanismo de acción del BPA, ensayos bioquímicos que evaluaron la cinética de unión del BPA al RE determinaron que el BPA se une tanto al RE $\alpha$  como al RE $\beta$ , y con una afinidad 10 veces mayor por este último (Gould y col., 1998; Kuiper y col., 1998). Sin embargo, la afinidad del BPA por los RE es aproximadamente 10.000 veces más débil que la del E<sub>2</sub> (Kuiper y col., 1998).

El BPA usaría los mismos receptores que el E<sub>2</sub> y otros Eg. Sin embargo, un mecanismo nuevo fue propuesto hace un par de años e implica al AhR. Nishizawa y colaboradores (2005a, 2005b) demostraron en embriones murinos que el BPA induce la expresión del ARNm no sólo del AhR, sino también de ARNT y de enzimas involucradas en la metabolización de xenobióticos. Este resultado sugiere que el BPA alteraría (indirectamente) el metabolismo catabólico de los Eg, sus metabolitos y de otros PEs (Pocar y col., 2003).

Respecto a la toxicidad del BPA, se estableció como dosis letal 50 (definida como los miligramos de una sustancia por kilogramo de peso de un animal necesarios para matar al 50% de la población) a valores superiores a 2 g/kg de peso corporal (Scientific Committee for Food, European Commission, 2002). En estudios de toxicidad subaguda, subcrónica y crónica con BPA, utilizando modelos con ratas, ratones y perros, las ratas resultaron ser la especie más sensible. Estos animales mostraron ganancias de peso reducidas con exposiciones de 50 mg/kg/d a través de dosis dietarias repetidas. Así se estableció como NOAEL (*No Observed Adverse Effects Level*) una dosis diez veces menor, considerando un factor de “incertidumbre” de 10, quedando establecido este valor en 5 mg/kg/d (Scientific Committee for Food, European Commission, 2002; Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food, 2006). Esta regulación no es considerada por la EPA, ya que no reconoce una NOAEL para BPA, aunque sí ha establecido un valor de LOAEL (*Lowest Observed Adverse Effect Level*) de 50 mg/kg/d (<http://www.epa.gov/iris/subst/0356.htm>; última revisión: diciembre de 2008). En la actualidad, una nueva dosis fue definida, 50  $\mu$ g/kg/d, considerada por la Comisión Europea como la “ingesta diaria tolerable” (TDI, *Tolerable Daily Intake*; Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food, 2006) y como la “dosis segura” según la EPA.

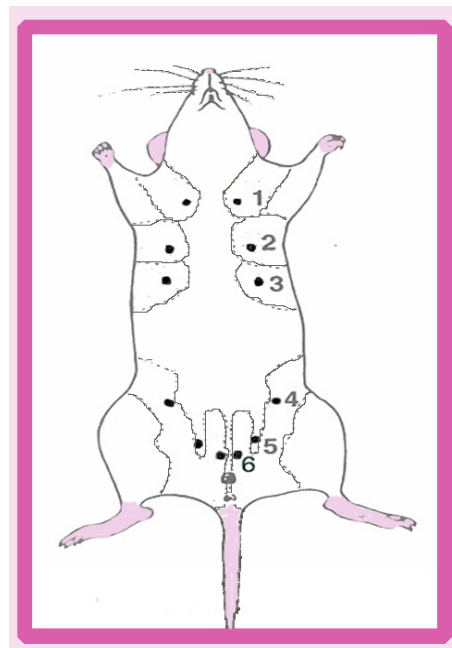
## 2. GLÁNDULA MAMARIA: desarrollo normal y cáncer

La glándula mamaria es el órgano que define a la Clase Mamíferos y su función principal es sintetizar y secretar la leche que servirá para nutrir a las crías recién nacidas.

### 2.1. Generalidades

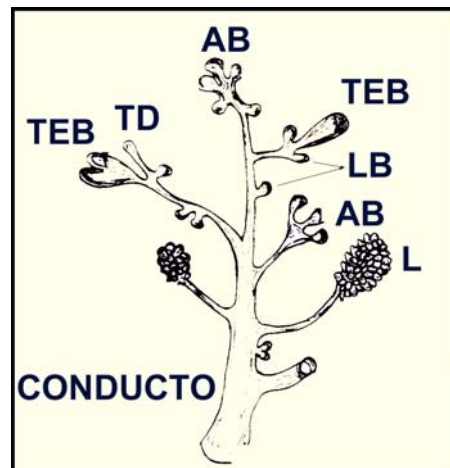
La porción epitelial o parénquima de la glándula mamaria tiene su origen embriológico en el ectodermo, mientras que el estroma circundante y el tejido adiposo, derivan del mesodermo (Imagawa y col., 1990). Como ocurre en otros órganos, el estroma de la glándula mamaria posee vasos sanguíneos y linfáticos,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

La rata posee seis pares de glándulas mamarias, dispuestas bilateralmente en la zona ventral, desde la región cervical hasta la región inguinal. Como se observa en la Figura 3, los pares de glándulas mamarias se denominan por número o bien, según su ubicación: los pares N° 1, 2 y 3 o pares torácicos; par N° 4 o par abdominal y pares N° 5 y 6 o pares inguinales (Russo y Russo, 1978). También es común denominar a los pares N° 4, 5 y 6, en conjunto como cadena abdomino-inguinal. La mayoría de los estudios que describen la morfología de la glándula mamaria están realizados sobre el par N° 4, por ser éste el de más fácil acceso (Masso-Welch y col., 2000).



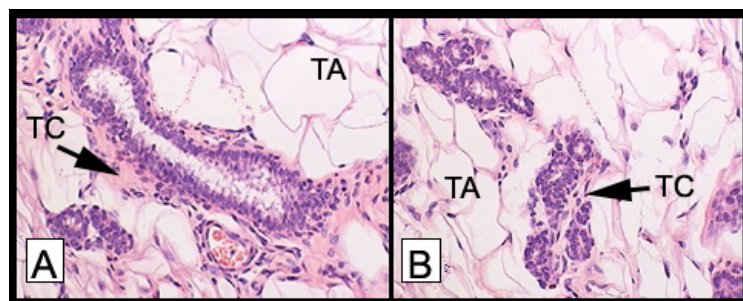
**Figura 3. Representación esquemática de la ubicación de los pezones mamarios en la rata y su correspondiente glándula mamaria subcutánea. Realizado según datos de Masso-Welch y col., 2000.**

En la rata adulta, el parénquima mamario está formado por una red de conductos y alvéolos. Los primeros transportan la leche desde su lugar de síntesis (alvéolos) hacia el pezón. Los conductos principales o mayores poseen ramificaciones dando origen a conductos más pequeños denominados conductillos. Las estructuras más primitivas o inmaduras son los denominados *terminal end buds (TEBs)*; *terminal ducts (TDs)* o *blunt end buds* y *alveolar buds (ABs)* (Fig. 4) (Russo y col., 1982).



**Figura 4. Representación esquemática de las estructuras presentes en la glándula mamaria de la rata.** TEB (*terminal end buds*), AB (*alveolar buds*), LB (*lateral buds*) y L (*lóbulos*). Modificado de Russo y col., 1982.

Cada estructura epitelial está inmersa en una capa de tejido conectivo y todo está rodeado por tejido adiposo (Fig. 5), denominado *fat pad* que se encuentra cubierto por una cápsula de tejido conectivo (Masso-Welch y col., 2000). Existe una continuidad entre el epitelio del pezón y el epitelio escamoso estratificado de la epidermis. La estructura en la cual se observa la transición desde un epitelio estratificado a uno cúbico en mono o bicapa (característico de conductos, conductillos y alvéolos) es el conducto lactífero (Masso-Welch y col., 2000). Este conducto lactífero es el encargado de transportar la leche desde el seno lactífero hasta el pezón.



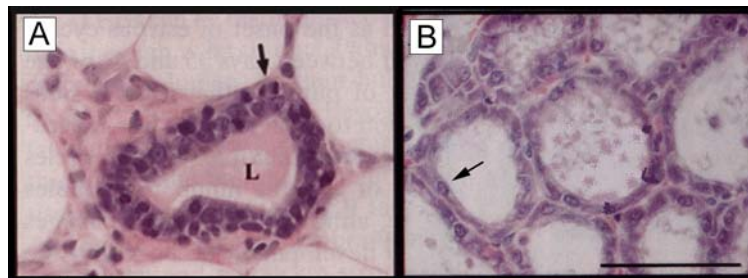
**Figura 5. Fotomicrografía de glándula mamaria de una rata adulta virgen.** Es posible observar que tanto los conductos (A) como los alvéolos (B) se encuentran rodeados por tejido conectivo (TC, flechas) e inmersos en tejido adiposo (TA). Magnificación: 20X. Coloración de Hematoxilina-Eosina (H&E).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



### 2.1.1. Tipos celulares en la glándula mamaria

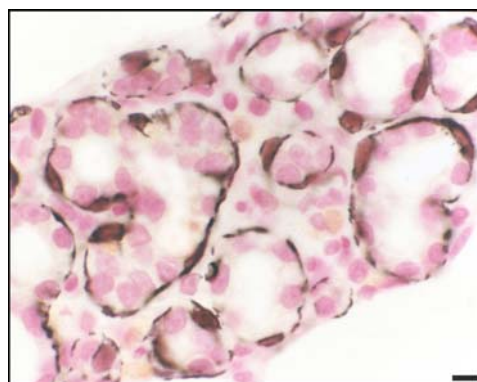
Debido a que múltiples tipos celulares conforman la glándula mamaria, para simplificar su estudio, ésta puede dividirse en dos compartimientos: parénquima (o epitelial) y estroma. El parénquima comprende el **epitelio luminal** de cada una de las estructuras (conductos, *TEBs*, *TDs*, *ABs* y alvéolos) y el **mioepitelio** que lo rodea.

El **epitelio luminal** puede definirse inmunohistoquímicamente por la expresión de citoqueratinas 8, 18 y 19 (Dundas y col., 1991); aunque la forma de las células varíe desde cúbica o columnar (en los conductos) (Figura 6 A) a piramidal (previo a la secreción láctea) o adelgazada (después de la secreción láctea) en los alvéolos (Figura 6 B).



**Figura 6. Fotomicrografía de conducto y alvéolos de glándula mamaria.** En (A) se muestra un conducto con células epiteliales de tipo cúbico (flecha) y en (B), un alvéolo durante el período de lactancia, con células epiteliales adelgazadas (flecha). L: lumen. La barra representa 50  $\mu\text{m}$ . Modificada de Masso-Welch y col., 2000.

La forma, grosor y continuidad del **mioepitelio** varían durante el desarrollo y entre las distintas estructuras epiteliales de la glándula mamaria. Las células mioepiteliales pueden ser distinguidas por su inmunofenotipo debido a que expresan: a) p63 (Barbareschi y col., 2001), b) filamentos intermediarios como vimentina y citoqueratinas 5 y 14, c) proteínas contráctiles como miosina y  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA; *smooth muscle actin*) (Dulbecco y col., 1986; Dundas y col., 1991; Böcker y col., 1992) (Fig. 7).



**Figura 7. Células mioepiteliales en un alvéolo mamario.** Las células mioepiteliales se reconocen por la expresión de p63 y  $\alpha$ -SMA. Se utilizó técnica de doble marcación inmunohistoquímica para p63 (núcleos marrones teñidos con diaminobencidina-DAB-) y  $\alpha$ -SMA (proyecciones citoplasmáticas azul oscuras teñidas con DAB-Níquel). Los núcleos negativos se muestran de color rosado (contracoloración: *nuclear fast red*). La barra representa 20  $\mu\text{m}$ . Modificada de Kass, 2004.

El **estroma de tejido conectivo** que rodea a las distintas estructuras epiteliales, 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).

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.

La glándula mamaria en su conjunto está rodeada por una **cápsula** de tejido conectivo tipo fibrilar altamente vascularizado. Esta cápsula no sólo marca el límite del órgano, sino que además funciona como “zona inhibitoria”, ya que las células epiteliales llegan hasta esta región, pero no la atraviesan durante el desarrollo normal de la glándula mamaria (Knight y Peaker, 1982).

### **2.1.2. Irrigación sanguínea y linfática**

Los **vasos sanguíneos** presentes en la glándula mamaria varían en cuanto a tamaño, forma y abundancia. Los **capilares**, presentan grandes cambios durante el desarrollo de la glándula. Durante la preñez y la lactancia forman un extenso lecho capilar en el estroma intralobular (esto es, dentro del mismo lóbulo, entre distintos alvéolos) (Masso-Welch y col., 2000). En un corte teñido con Hematoxilina-Eosina (H-E), la visualización de los capilares se ve facilitada cuando contienen glóbulos rojos, debido a la tinción eosinófila que estos elementos adquieren.

Los **vasos linfáticos** de tamaño variable también están presentes en la glándula mamaria y la visualización de los mismos es más fácil cuando el plano de corte permite la tinción de los linfocitos que llevan en su interior. En la glándula mamaria abdominal (Nº 4) es característica la presencia de **cadena de nódulos linfáticos** que en secciones teñidas con H-E, es fácilmente distinguible debido a la abundante presencia de linfocitos que adquieren una coloración azul intensa, como producto de su evelada basofilia (Masso-Welch y col., 2000).

### 2.1.3. Períodos críticos del desarrollo e involución de la glándula mamaria

La glándula mamaria alcanza la maduración completa durante la vida adulta. El desarrollo del árbol ductal depende de las interacciones estroma-epitelio, importantes tanto durante el desarrollo embrionario como posnatal (Kass y col., 2007). El estudio del **crecimiento** y **desarrollo** de la glándula mamaria se facilita si se tienen en cuenta distintos estadios bien definidos: prenatal (embrionario y fetal); peripuberal; adultez; gestación y lactancia (Imagawa y col., 1994). Finalizada la lactancia y una vez ocurrido el destete de las crías, la glándula mamaria involuciona hasta adquirir una morfología semejante a la que tenía antes de la preñez.

#### 2.1.3.1. Período prenatal

El patrón de desarrollo fetal de la glándula mamaria es similar entre ratones y ratas. Aproximadamente en la mitad de la gestación tiene lugar el evento que inicia el desarrollo mamario: la formación de la denominada “línea de la leche” que se extiende bilateral y ventralmente desde la zona axilar hasta la inguinal (Robinson y col., 1999). Casi en forma simultánea se desarrollan en cada “línea” estructuras en forma de “placas” de células epidérmicas que posteriormente se introducen en el mesénquima subyacente para dar origen al típico brote (o *bud*) epitelial mamario (Hens y Wysolmerski, 2005). Parte de este proceso involucra la condensación y diferenciación del mesénquima subyacente en un mesénquima mamario denso y especializado que se dispone radialmente alrededor de cada brote epitelial (Hens y Wysolmerski, 2005). Entre los días 11 y 16 de gestación es escaso el crecimiento del brote epitelial. En los últimos días de la gestación las células epiteliales mamarias empiezan a proliferar y se observa la elongación y penetración del brote epitelial hacia el tejido precursor del *fat pad* (Imagawa y col., 1994). Al momento del nacimiento, la glándula mamaria está compuesta por un pequeño árbol ductal, rodeado de tejido conectivo (Imagawa y col., 1994).

#### 2.1.3.2. Período peripuberal

En los roedores ocurre una elevada proliferación asociada a ramificación del sistema de conductos entre el nacimiento y la pubertad (Imagawa y col., 1994). En las crías recién nacidas, la glándula mamaria está formada por un árbol ductal rudimentario con pequeñas estructuras terminales con forma de botón (luego denominadas *TEBs* y *TDs*). Estas estructuras son las que presentan los mayores índices de proliferación y permiten la invasión epitelial hacia el *fat pad* (Imagawa y col., 1994). El período peripuberal, que

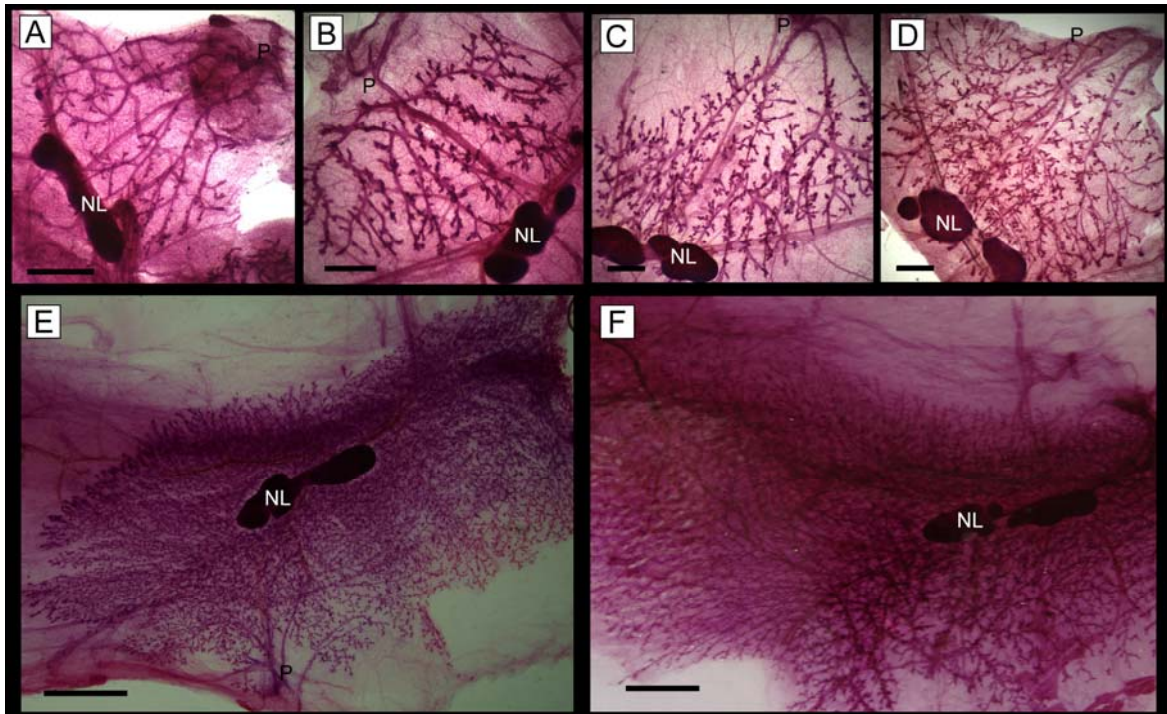
comprende algunas semanas en los roedores y varios años en las niñas, está caracterizado por la presencia de abundantes *TEBs* con elevados índices de proliferación. Aunque estas estructuras desaparecen a medida que la glándula madura, su importancia radica en que son altamente sensibles a la acción de carcinógenos químicos (Russo y col., 1982) y, así, cualquier sustancia y/o evento que prolongue la presencia de *TEBs* o enlentezca su diferenciación, tendría la capacidad de afectar la susceptibilidad de la glándula a la acción de carcinógenos químicos. Inversamente, cualquier evento y/o sustancia que provoque la diferenciación precoz de los *TEBs*, conferiría protección frente al desarrollo de lesiones tumorales (Fenton, 2006).

La pubertad, que en los roedores se determina como el momento en el cual ocurre la apertura vaginal, varía dependiendo de la cepa de rata estudiada, pero generalmente se acepta al período comprendido entre los 35 y 50 días de edad (Ojeda y Urbanski, 1994). Al inicio de la pubertad, los *ABs* se diferencian para formar los lóbulos, que aumentan en número a medida que se van sucediendo los ciclos estrales. Alrededor de los 55 días de edad, el número de lóbulos tiende a permanecer relativamente estable, aunque pequeños cambios histológicos y en el tamaño siguen ocurriendo con cada ciclo estral (Masso-Welch y col., 2000).

#### 2.1.3.3. Etapa adulta

Es difícil establecer un límite definido entre el crecimiento que tiene lugar en la etapa peripuberal y el que ocurre cuando los ciclos estrales se han establecido (hecho que marcaría, en la práctica, la consolidación del patrón adulto). Una característica sobresaliente del período adulto es la disminución de los niveles de proliferación, con síntesis de ADN que ocurre casi exclusivamente en las células alveolares, lo que permitió sugerir que serían estas células las responsables de la renovación celular en la glándula adulta. En general, es más frecuente observar mitosis durante el diestro, a pesar de que la glándula se encuentre morfológicamente más desarrollada durante el estro. Son las células alveolares las que se prepararán para sintetizar los principales componentes de la leche, una vez que la preñez ocurra (Imagawa y col., 1994).

A modo de representación gráfica, en la Figura 8, puede observarse el desarrollo posnatal de la glándula mamaria de una rata virgen de la cepa Wistar.



**Figura 8. Desarrollo posnatal de la glándula mamaria de la rata Wistar.** *Whole-mounts* representativas de glándulas obtenidas de ratas hembras de 5 (A), 15 (B), 20 (C), 30 (D), 50 (E) y 110 (F) días de edad. La cadena de nódulos linfáticos (NL) se observa claramente y en algunas imágenes, también el pezón (P). La barra negra representa 1,0 mm (A-D) y 5 mm (E y F). Realizada según datos de Imagawa y col., 1994; Masso-Welch y col., 2000.

#### 2.1.3.4. Preñez y lactancia

Desde el punto de vista de la importancia reproductiva, este estadio del desarrollo mamario sea quizás el más importante, puesto que garantiza la nutrición y supervivencia de la crías. 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 y col., 1994). Durante los días que dura la gestación (21 a 23 según la cepa de rata), hay un aumento rápido y continuo del epitelio mamario y los *TEBs* (si todavía estuvieran presentes) se dividen para formar *ABs* que darán lugar a los alvéolos (Masso-Welch y col., 2000). En consecuencia, existe un incremento progresivo no sólo en la cantidad de alvéolos presentes (hiperplasia), sino también en el área ocupada por estructuras lobuloalveolares desde el día 9 de gestación (DG9) hasta el nacimiento (Kass, 2004). Junto con esta hiperplasia fisiológica, existe hipertrofia de las células alveolares ya que a medida que acumulan lípidos en su interior aumenta el tamaño del retículo endoplásmico rugoso, aparato de Golgi y vesículas secretoras (Masso-Welch y col., 2000). La proliferación del parénquima mamario también se ve modificada como consecuencia de la gestación, comienza a disminuir alrededor del DG9, cae abruptamente en el DG13 y continúa disminuyendo hasta el parto (Kass, 2004). Durante la lactancia, los alvéolos

adquieren una apariencia esponjosa debido a la presencia de lípidos intracelulares y vesículas secretoras que contienen lactosa. 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. Las luces alveolares contienen miscelas de caseína asociadas con gotas de lípidos (Masso-Welch y col., 2000).

#### 2.1.3.5. Involución post-lactancia

Dado que la preñez induce un desarrollo masivo de las estructuras mamarias alveolares, requerido para la producción de leche; una vez terminada la lactancia ocurre el colapso de las estructuras lobuloalveolares acompañado por la remodelación reductiva de la glándula. Este proceso denominado **involución** está caracterizado por una degradación proteolítica de la matriz extracelular y la pérdida de células epiteliales secretoras, principalmente por **muerte celular programada** (MCP) (Strange y col., 1992; Jaggi y col., 1996). La MCP es una vía eficiente para eliminar fisiológicamente células supernumerarias o no deseadas sin que ocurran eventos inflamatorios tales como los inducidos por la muerte celular necrótica. La MCP puede dividirse en dos fases: el compromiso de una célula para entrar en la vía de muerte y el proceso de muerte real, denominado **apoptosis** (<http://mammary.nih.gov/index.html>). Normalmente, la involución de la glándula mamaria tiene lugar en forma gradual, a medida que las crías son destetadas. Los primeros indicios de apoptosis son detectados ya a los 2 días del destete de las crías (Green y Streuli, 2004).

## 2.2. Regulación hormonal del desarrollo mamario

### 2.2.1. Generalidades

El desarrollo de la glándula mamaria en los roedores comienza en la vida uterina y se completa luego de la gestación. Diversas hormonas y factores de crecimiento controlan el desarrollo mamario.

### 2.2.2. Desarrollo mamario prenatal

Durante este período, la mayor parte del desarrollo mamario tiene lugar en los últimos días de la gestación. Esta etapa parece ser dependiente de andrógenos como puede deducirse de los trabajos que Raynaud realizara en la década de 1940 (Imagawa y col., 1994). Mediante técnicas simples, concluyó que cuando son destruidas las gónadas de fetos

machos en la mitad de la gestación, la ausencia de andrógenos fetales permite el desarrollo de glándulas mamarias con patrón femenino. Inversamente, cuando se administra propionato de testosterona a hembras preñadas o directamente a los fetos, esto produce masculinización del crecimiento mamario en las crías hembras. Sin embargo, los esteroides ováricos Eg y Pg, no son necesarios para el desarrollo de la glándula mamaria durante este período. Durante la vida fetal, las hormonas que demostraron tener mayor influencia en el desarrollo mamario son insulina, corticoides adrenales y prolactina (Imagawa y col., 1994).

### **2.2.3. Desarrollo mamario peripuberal**

En ratas y ratones hembras, el crecimiento de la glándula mamaria es isométrico en las primeras 2 ó 3 semanas de vida (Imagawa y col., 1994). El crecimiento mamario peripuberal es alométrico y está controlado por un entorno hormonal que cambia rápidamente en pocos días, resultando en una glándula mamaria con casi todas las características de una glándula adulta (Fenton, 2006). En ratas prepuberales, el crecimiento ductal (previo a la pubertad) sería independiente de las hormonas ováricas y similar entre machos y hembras (Imagawa y col., 1994). Con el inicio de la pubertad, los niveles de Eg y Pg ováricos aumentan promoviendo el desarrollo de la glándula mamaria a un ritmo cíclico. La elongación de los conductos está estimulada y controlada por los Eg (Fendrick y col., 1998), mientras que la ramificación lateral (*side-branching*) se encuentra regulada por Pg (Shyamala, 1999).

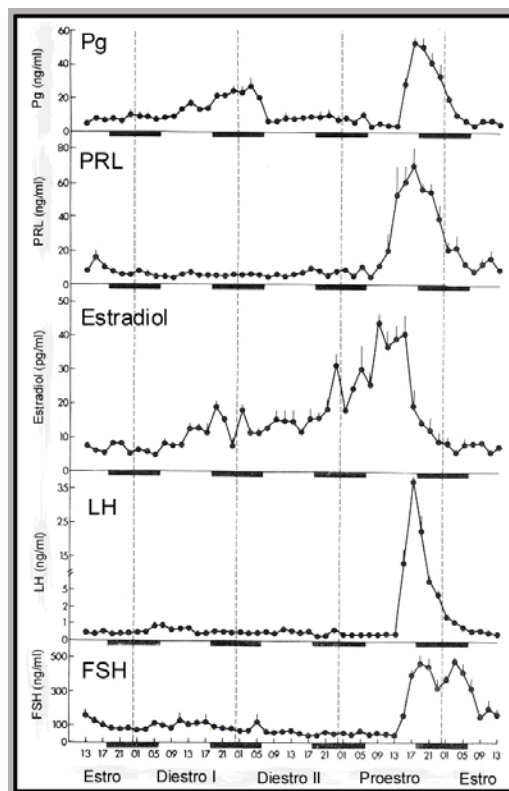
### **2.2.4. Desarrollo mamario adulto.**

El desarrollo de la glándula mamaria en la edad adulta se encuentra influenciado principalmente por las hormonas ováricas (Eg y progesterona -Pg-) y por la prolactina (PRL) cuyos niveles séricos varían de acuerdo al estadio del ciclo estral (Fig. 9). Los niveles séricos de E<sub>2</sub> comienzan a elevarse durante el diestro, alcanzan un pico máximo en proestro y caen durante el estro. Durante el metaestro el cuerpo lúteo secreta Pg que cae durante el segundo día del diestro cuando comienzan a aumentar los niveles de E<sub>2</sub> (Smith y col., 1975); el otro aumento significativo de los niveles de Pg ocurre al medio día del proestro. Por otra parte, la PRL presenta un pico de secreción durante el proestro, manteniendo sus niveles bajos y prácticamente constantes durante las restantes etapas del ciclo estral. Diversos experimentos demostraron que estas hormonas (Eg, Pg y PRL) regulan el desarrollo de la glándula mamaria durante la vida adulta. En ratones ovariectomizados, el tratamiento con Eg estimuló solamente el crecimiento ductal,



mientras que la administración de Eg y Pg o Pg sola indujo tanto crecimiento ductal como desarrollo lobuloalveolar (Imagawa y col., 1994).

Durante la preñez y lactancia, los Eg estimulan la proliferación ductal mientras que la Pg asociada al Eg induce la morfogénesis de los alvéolos (Haslam y Shyamala, 1980). La Pg además, es fundamental para la ramificación lateral (Atwood y col., 2000) y el desarrollo lobuloalveolar en ratonas (Plaut y col., 1999) y en ratas (Darcy y col., 1995). Durante la gestación, en la rata, los niveles séricos de Pg son elevados y se observa una caída abrupta inmediatamente antes del parto (Taya y Greenwald, 1981). Los niveles de PRL aumentan a medida que se acerca el parto y este incremento, asociado con mínimos niveles de Eg y Pg, inicia la lactancia (Rillema, 1998). Un rol inhibitorio de Pg, sobre la liberación de PRL se demostró administrando RU486 (un antagonista de Pg) a ratas preñadas. En estos animales, la secreción de PRL estimuló la síntesis de lactosa y caseína, sólo después de administrar RU486, e impedir la acción de Pg (Deiss y col., 1989).



**Figura 9. Niveles hormonales durante el ciclo estral de la rata.** Progesterona (Pg), prolactina (PRL), estradiol, hormona luteinizante (LH) y hormona foliculoestimulante (FSH). Cada punto representa la media de la concentración de cada hormona con su respectiva desviación estándar. Los números sobre el eje x representan distintos momentos del día, considerando 24 hs de reloj. Las barras en negro sobre el mismo eje representan el período de oscuridad cada 24 hs. Las líneas verticales punteadas señalan la medianoche. Modificado de Smith y col., 1975.

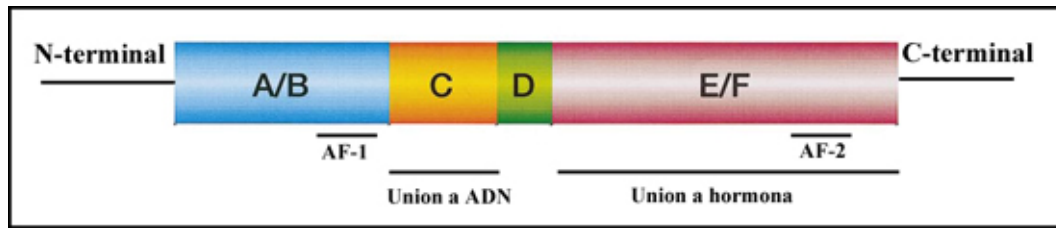


Los esteroides ováricos (Eg y Pg) poseen una reconocida capacidad para actuar como reguladores del crecimiento y la diferenciación celular en diversos órganos y tejidos, ejerciendo su acción a través de sus receptores: receptor para Eg (RE) y para Pg (RP) (Beato y Sánchez-Pacheco, 1996).

### 2.3. Receptores para hormonas esteroideas

Los miembros de la superfamilia de receptores nucleares pueden ser divididos en cuatro clases según su interacción con las HSP, su tendencia a formar homo o heterodímeros y su especificidad de unión al ADN. La **Clase I** comprende los **receptores para esteroides** con un dominio **A/B** más largo (RE, RP, receptores para glucocorticoides, para andrógenos y para mineralocorticoides) que en ausencia de ligando unido son secuestrados en heterocomplejos que contienen HSPs, inmunofilinas y otras chaperonas (Knoblauch y Garabedian, 1999). Después de la unión del ligando (la hormona), las HSPs se disocian del receptor y tiene lugar la dimerización de los mismos. Una vez formados los dímeros, los receptores se unen a elementos de respuesta a hormona (HRE, *Hormone Responsive Element*) en el promotor de genes blanco modulando la tasa de transcripción de los respectivos genes (Dechering y col., 2000). En ausencia de ligando, los receptores se ubican en el núcleo y/o citoplasma, la cantidad presente en el citoplasma depende del tipo de receptor (DeFranco y col., 1991).

Los receptores para hormonas esteroideas contienen cinco dominios (Fig. 10). Una región amino terminal llamada **A/B**, de longitud variable (100–500 aminoácidos) conteniendo una función de activación (AF-1), que contribuye a la actividad transcripcional del receptor y es independiente del ligando. Adyacente a este dominio, se encuentra el dominio **C** de unión al ADN, llamado DBD (*DNA Binding Domain*) que es la zona más conservada entre los distintos receptores. Este dominio posee un motivo de dos dedos de zinc coordinados por ocho residuos de cisteína estrictamente conservados. Una pequeña región bisagra o dominio **D** permite que el receptor cambie su conformación o se pliegue, y se la ha caracterizado como una región hipervariable. En el extremo carboxilo terminal, se localiza el dominio **E/F** o dominio de unión a hormona llamado LBD (*Ligand Binding Domain*), que contiene una función de transactivación 2 (AF-2), dependiente de la presencia del ligando (Pettersson y Gustafsson, 2001). En algunos casos los dominios de unión a hormona funcionan como dominio de represión en ausencia de ligando (Lodish y col., 2000).



**Figura 10. Dominios funcionales de un receptor nuclear de hormonas esteroideas.** Se destacan los dominios que componen las proteínas. Modificado de Muramatsu e Inoue, 2000.

### 2.3.1. Receptores para Eg

El sistema de señalización Eg-RE juega un rol crucial en el desarrollo de las funciones normales del tracto reproductor femenino, las características sexuales secundarias y el comportamiento reproductivo (Muramatsu e Inoue, 2000). Es además conocida la asociación entre Eg-RE en la iniciación y/o desarrollo de una variedad de tumores, principalmente de mama y endometrio.

Los mecanismos moleculares de acción estrogénica están relativamente bien entendidos, hay pocos genes blanco (denominados genes de respuesta primaria) con secuencias ERE (*Estrogen Responsive Elements*) consenso, por ejemplo: RP, PRL, lactoferrina, ovoalbúmina, vitelogenina, c-fos, c-jun, c-myc. Sorprendentemente, hay más genes activados eventualmente por Eg que aparentemente carecen de secuencias ERE, por ejemplo: factor de crecimiento epidérmico, receptor para el factor de crecimiento epidérmico, ciclina D1, BRCA-1 y otros, que en conjunto reciben la denominación de genes de respuesta secundaria (Rollerova y Urbancikova, 2000).

Los primeros pasos en el campo de la bioquímica del RE se dieron con la síntesis de E<sub>2</sub> tritiado apenas comenzada la década de 1960. Estos resultados permitieron demostrar la retención específica de la hormona marcada en células de útero y vagina. Sin embargo, recién en 1986 se clonó un receptor con alta afinidad para el E<sub>2</sub> que recibió el nombre de RE (Green y col., 1986). Diez años después, se clonó el segundo RE que recibió el nombre de RE $\beta$  (Kuiper y col., 1996; Mosselman y col., 1996), quedando el primero como RE $\alpha$ . El RE $\alpha$  es una proteína termolábil de 66 kDa expresada principalmente por los órganos reproductores femeninos: células del estroma ovárico, útero (endometrio), vagina, glándula mamaria normal, células de cáncer de mama y en ciertas áreas del sistema nervioso central, especialmente en hipotálamo (Muramatsu e Inoue, 2000). El rol del RE $\alpha$  fue estudiado utilizando ratones *knock out* ( $\alpha$ ERKO). Tanto machos como hembras  $\alpha$ ERKO fueron viables. Sin embargo, las hembras resultaron infértiles con ovarios poliquísticos y hemorrágicos y ciclos anovulatorios; tanto el útero como la glándula mamaria

desarrollaron normalmente hasta la pubertad, pero resultaron insensibles a  $E_2$  en la vida adulta (Muramatsu e Inoue, 2000). El RE $\beta$  fue clonado a partir de ADNc de próstata de rata (Kuiper y col., 1996) y de testículos humanos (Mosselman y col., 1996). La distribución tisular y el nivel relativo de ARNm del RE $\alpha$  y de ARNm del RE $\beta$ , es bastante diferente entre ratas y humanos (Muramatsu e Inoue, 2000). La expresión predominante de ARNm del RE $\beta$  fue demostrada en células de la granulosa ovárica, próstata, pulmón, hueso, riñón, mucosa intestinal, células endoteliales y cerebro (Kuiper y col., 1997). Numerosos trabajos describieron la importancia fisiológica del RE $\beta$  en la funcionalidad del ovario, durante el desarrollo testicular y la espermatogénesis y una posible implicancia en el cáncer de mama humano (Byers y col., 1997; Dotzlaw y col., 1997; Sasano y col., 1999; van Pelt y col., 1999). El rol definitivo del RE $\beta$  fue dilucidado utilizando ratones hembras *knock out* para el RE $\beta$  ( *$\beta$ ERKO*). Estas hembras presentaban fertilidad reducida y aquellas que lograban la preñez, parían un escaso número de crías en cada camada (Krege y col., 1998). Los ratones machos  *$\beta$ ERKO* no presentaban anomalías durante la etapa reproductiva pero a medida que envejecían mostraban frecuentemente hiperplasias de próstata y vejiga (Muramatsu e Inoue, 2000). Considerando estos resultados en conjunto, parecería que el RE $\beta$  disminuye la sensibilidad general de las células al  $E_2$  y que, en el tracto urogenital, actúa como un modulador de la transcripción génica mediada por RE $\alpha$ . A través de esta vía podría tener un rol protector contra dos eventos muy relacionados entre sí: hiperproliferación y carcinogénesis.

La expresión de los RE en la glándula mamaria se aborda más adelante (sección 2.3.3).

Se postulan cuatro mecanismos de acción para RE (Hall y col., 2001), que serían similares para RE  $\alpha$  y  $\beta$  (Fig. 11):

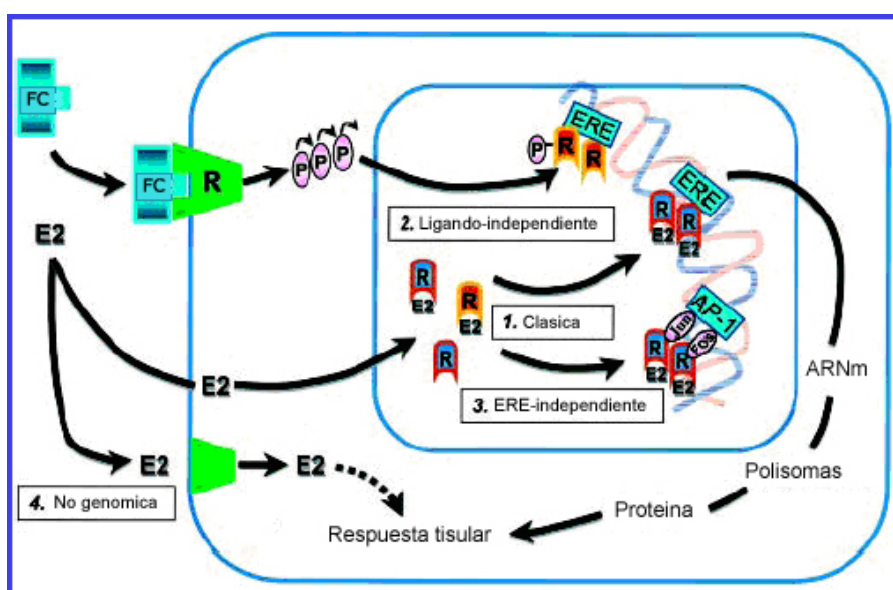
1) *Vía clásica ligando-dependiente*: los complejos  $E_2$ -RE se unen a los EREs en promotores blanco (*target*) conduciendo a un aumento o disminución (*up- o down-regulation*) de la transcripción génica con la consecuente respuesta tisular.

2) *Vía ligando-independiente*: ciertos factores de crecimiento o monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) activan la vía de las quinasas intracelulares promoviendo fosforilación y activación de RE a promotores que contienen EREs en una manera *independiente* de ligando; es decir, en ausencia de la hormona ( $E_2$ ).

3) *Vía ERE-independiente*: los complejos E<sub>2</sub>-RE alteran la transcripción de genes que contienen elementos de respuesta alternativa, como por ejemplo AP-1 a través de la asociación con otros factores de transcripción unidos a ADN (Fos/Jun) los cuales unen el RE activado al ADN, promoviendo un aumento de la transcripción génica.

4) *Vía no genómica*: el E<sub>2</sub> activa un sitio de unión asociado a membrana, posiblemente una forma de RE ligado a vías de traducción de señales intracelulares que generan una respuesta tisular rápida.

Una vez que los RE se unen a un ligando y se forman los dímeros RE-ligando, se reclutan co-activadores y el complejo de transcripción basal, permitiendo la transcripción de los genes blanco (Muramatsu e Inoue, 2000). El RE $\alpha$  puede formar heterodímeros con RE $\beta$  en las células que co-expresan ambos receptores. Por lo tanto, los RE tienen la habilidad de interactuar con los genes blanco formando tres complejos diferentes: homodímeros de RE $\alpha$  (RE $\alpha$ /RE $\alpha$ ), homodímeros de RE $\beta$  (RE $\beta$ /RE $\beta$ ) y heterodímeros RE $\alpha$ /RE $\beta$  (Couse y Korach, 1999; Pavao y Traish, 2001).

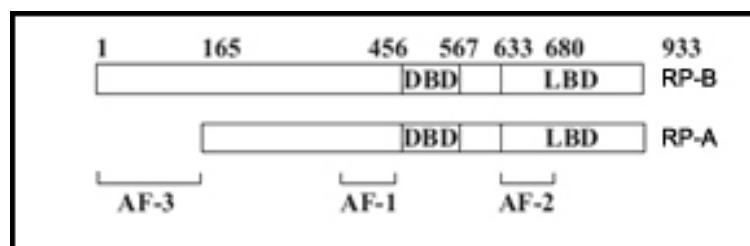


**Figura 11. Mecanismos de acción propuestos para la vía E<sub>2</sub>-RE.** 1) *Vía clásica ligando-dependiente* 2) *Vía ligando-independiente*; 3) *Vía ERE-independiente*; 4) *Vía no genómica*. FC: factor/es de crecimiento; R: receptor; P: fosforilación. Modificado de Hall y col., 2001.

### 2.3.2. Receptores para Pg

El RP se expresa como dos isoformas, RP-A y RP-B derivadas de un único gen. La expresión de ambas isoformas está conservada en roedores y humanos, y se superpone espacio-temporalmente en tejidos reproductores de la hembra. Sin embargo, la relación de

las isoformas individuales varía en estos tejidos como consecuencia del desarrollo, de la condición hormonal y durante la carcinogénesis (Conneely y col., 2002). La diferencia entre ambas isoformas es que el RP-A es una forma truncada del RP-B (Fig. 12); es decir, la proteína RP-B contiene una secuencia adicional de aminoácidos en la región amino-terminal (Gao y Nawaz, 2002).



**Figura 12. Representación esquemática de las dos isoformas del RP: RP-A y RP-B.** Como todos los miembros de la superfamilia de receptores nucleares, poseen un dominio de unión a ADN (DBD), un dominio de unión a ligando (LBD) y dominios con función de activación (AFs). Tomado de Gao y Nawaz, 2002.

En ausencia de Pg, el RP está secuestrado en una forma no-activa asociado con HSP y otras chaperonas celulares. En este estado, el RP está incapacitado para influenciar la tasa de transcripción de los promotores conocidos. Después de la unión con la hormona, el RP sufre una serie de cambios que incluyen: disociación de los complejos con HSP, dimerización, fosforilación y traslocación nuclear; eventos que favorecen la unión a elementos de respuesta a Pg (PRE; *Progesterone Response Elements*) en las regiones regulatorias de los genes blanco. La unión del RP a los PRE es seguida por el reclutamiento de co-activadores y de la maquinaria de transcripción basal, lo cual conduce a un incremento de la transcripción del gen blanco (Gao y Nawaz, 2002). El conocimiento del rol del RP se profundizó gracias al desarrollo de un ratón que carece de ambas isoformas del receptor, ratones *knock-out* (PRKO). Las hembras PRKO presentaron alterado el comportamiento sexual y la regulación neuroendocrina de las gonadotropinas, anovulación, disfunción uterina y escaso desarrollo de la glándula mamaria. Este menor desarrollo de la glándula mamaria se debió a un *branching* reducido y menor diferenciación lobuloalveolar (Conneely y col., 2002).

### 2.3.3. Expresión de RE y RP durante el desarrollo de la glándula mamaria

Los Eg son mitógenos potentes en la glándula mamaria necesarios para el desarrollo normal como, posiblemente, también para la inducción y progresión de carcinomas mamarios (Russo y Russo, 1997). La glándula mamaria de la hembra presenta

una alta división celular durante la pubertad y a lo largo de la vida adulta existen períodos cíclicos de proliferación e involución asociados con cada ciclo estral (Prall y col., 1998). El efecto mitógeno de los Eg ha llevado a estudiar la expresión de los RE en la glándula mamaria, partiendo de la idea que las mismas células que proliferan son las que expresan el RE a través del cual actúa la hormona. Sorprendentemente, se ha observado que durante el crecimiento puberal y el ciclo estral, la mayoría de las células epiteliales mamarias que proliferan no expresan el RE $\alpha$  (Zeps y col., 1998; Clarke y col., 1997a); pero casi todas las células RE $\alpha$  positivas también expresan RP. Además se demostró que los niveles plasmáticos de Eg que inducen el RP son considerablemente menores que los necesarios para inducir proliferación (Clarke y col., 1997b). Teniendo en cuenta estas observaciones, podría suponerse que hay dos tipos de respuesta a Eg en la glándula mamaria: a) una acción **indirecta** del E<sub>2</sub> sobre el epitelio mamario, induciendo a las células del estroma RE $\alpha$  positivas a producir factores de crecimiento que estimulen la división de las células epiteliales y b) un efecto **directo** sobre las células epiteliales que contienen RE $\alpha$  para inducir la expresión del RP a concentraciones más bajas (Wiesen y col., 1999).

Aunque la ontogenia de la expresión de RE $\alpha$ , RE $\beta$  y RP en la glándula mamaria fue descrita con mayor detalle para ratón, es válido suponer que en la glándula mamaria de la rata se observan patrones similares. Es posible detectar RE ( $\alpha$  y  $\beta$ ) entre los 12,5 y 14,5 días de gestación, localizados principalmente en el mesénquima que rodea al brote epitelial inmaduro (Fendrick y col., 1998; Lemmen y col., 1999). Luego del nacimiento, en ratones, el RE $\alpha$  es detectado en el epitelio mamario tan temprano como a los 3 días de edad (Fendrick y col., 1998); mientras que en la rata, la expresión del mismo fue detectada a las 4 semanas de vida posnatal (Saji y col., 2000). Resumiendo en la vida posnatal, la expresión de los RE en la glándula mamaria, varía según la edad y las condiciones fisiológicas del animal. En un animal pre-púber ambos RE están presentes, con más del 40% de las células expresando el RE $\alpha$  y aproximadamente el 25% de las células que co-expresan ambos receptores (Saji y col., 2000). En una hembra adulta virgen, aproximadamente el 20% de las células epiteliales expresan el RE $\alpha$  (Fendrick y col., 1998), mientras que el RE $\beta$  es expresado por el 70% de estas células (Warner y col., 2000). Durante la preñez, más del 70% de las células expresan RE $\beta$ , la expresión del RE $\alpha$  es muy baja y casi no existe co-expresión (Saji y col., 2000). Durante la lactancia, ambos RE son expresados por la mayoría de las células; mientras que luego del destete, la expresión del

RE $\alpha$  es muy baja y el RE $\beta$ , continúa siendo expresado por más del 50% de las células (Saji y col., 2000).

Respecto al RP, por autorradiografía, se observó expresión en el mesénquima mamario de embriones de 20 días (Fendrick y col., 1998). En ratones de 5 semanas de edad, las células del estroma mamario expresan RP, mientras que las células del epitelio recién son positivas a las 7 semanas de vida posnatal (Fendrick y col., 1998). El patrón de expresión temporal de las dos isoformas: RP-A y RP-B, durante el desarrollo de la glándula mamaria de la rata, fue descrito recientemente (Kariagina y col., 2007). Ambas isoformas son expresadas en todas las estructuras mamarias y en todos los estadios del desarrollo (pre-puberal, puberal, adulta, preñez e involución post-lactancia). El porcentaje de células que expresan RP-A es mayor en la pubertad y disminuye en animales preñados, a medida que avanza la gestación. Por el contrario el RP-B presenta un patrón relativamente constante, con mayor expresión durante la preñez y la involución post-lactancia. Aunque un elevado número de células epiteliales expresan ambas isoformas, el porcentaje de células que expresan la isoforma B es mayor en todos los estadios analizados. Durante diferentes estadios del ciclo estral (diestro *vs* estro) no se observaron modificaciones significativas en el patrón de expresión de ninguna de las dos isoformas de RP en la glándula mamaria (Kariagina y col., 2007).

## **2.4. Co-reguladores de receptores nucleares**

Los co-reguladores son moléculas que se unen a los receptores nucleares y actúan como co-activadores o co-represores para la regulación eficiente de la transcripción. En un concepto amplio, se define a los **co-activadores** como moléculas reclutadas por receptores nucleares activados por ligando, que aumentan la transcripción génica. Análogamente, son **co-represores** aquellos factores que interactúan con los receptores nucleares no unidos a ligando reprimen la transcripción de sus genes blanco (McKenna y col., 1999). Por definición, la mayoría de los co-reguladores son limitantes de la velocidad de activación o represión de los receptores nucleares.

### **2.4.1. Co-activadores**

Varias clases y sub-clases de co-activadores han sido identificados de acuerdo con su capacidad para interactuar directamente con receptores nucleares como por su potencial para aumentar la actividad transcripcional de los receptores nucleares. Los co-activadores son reclutados por los receptores nucleares activados unidos al ligando y esto se traduce en

el aumento de la expresión de genes blanco. De este modo, los co-activadores proveen un puente entre los factores de transcripción unidos al ADN y la maquinaria de transcripción general (Lonard y O'Malley, 2006). Es probable que los co-activadores, además de controlar el inicio de transcripción, tengan otras funciones: transporte del ARNm desde el núcleo, traducción del ARNm y modificaciones post-traduccionales de la proteína sintetizada, lo cual demuestra que no actúan solos sino como parte de un complejo multiproteico (Lonard y O'Malley, 2006). En este sentido, el complejo del cual forma parte el coactivador ejecuta la acción final que es “ver a un gen particular expresado como una proteína funcional madura” (Lonard y O'Malley 2006).

SRC-1 (*Steroid Receptor Coactivator -1*) fue el primer co-activador identificado y fue clonado como una proteína de interacción con el LBD del RP (Oñate y col., 1995). Además de SRC-1, GRIP1 (TIF2/SRC-2) y p/CIP (RAC3/ACTR/AIB1/TRAM1/SRC-3) componen la familia SRC. La expresión de SRC-3 fue descrita en distintos órganos del sistema reproductor en ratones hembras de 4 semanas de edad. Tanto los oocitos como las células de músculo liso del oviducto mostraron una fuerte expresión de SRC-3. En la glándula mamaria la expresión de SRC-3 fue alta y localizada principalmente en el parénquima de *end buds* y conductos (Xu y col., 2000). El rol fisiológico de SRC-3 en la glándula mamaria pudo evidenciarse en ratones *knock out*, en los cuales se observó escaso desarrollo de la glándula (retraso en el crecimiento ductal y en la arborización mamaria) (Xu y col., 2000), patrón similar al descrito en ratones *PRKO* y *αERKO*.

A modo de resumen los principales mecanismos de acción de los co-activadores son:

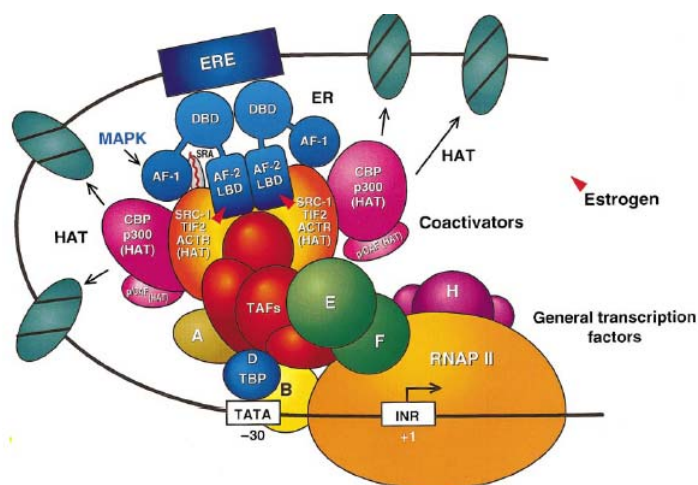
a) **modificadores covalentes de histonas:** varios co-activadores poseen actividad acetil o metiltransferasa. La acetilación o metilación de las histonas modifica las interacciones entre los nucleosomas y el ADN, permitiendo que la maquinaria de transcripción acceda en forma eficiente a la región promotora de los genes, facilitando su transcripción.

b) **complejos de remodelación de la cromatina dependiente de ATP:** tales como Swi/Snf, que alteran la estructura de mayor orden y la posición de los nucleosomas.

c) **componentes del complejo mediador:** TRAP/DRIP que interactúan con la maquinaria de transcripción general para ayudar en el ensamblaje de la maquinaria de preiniciación.



En la Figura 13 se muestra un modelo general de interacción de co-activadores con el RE $\alpha$ .



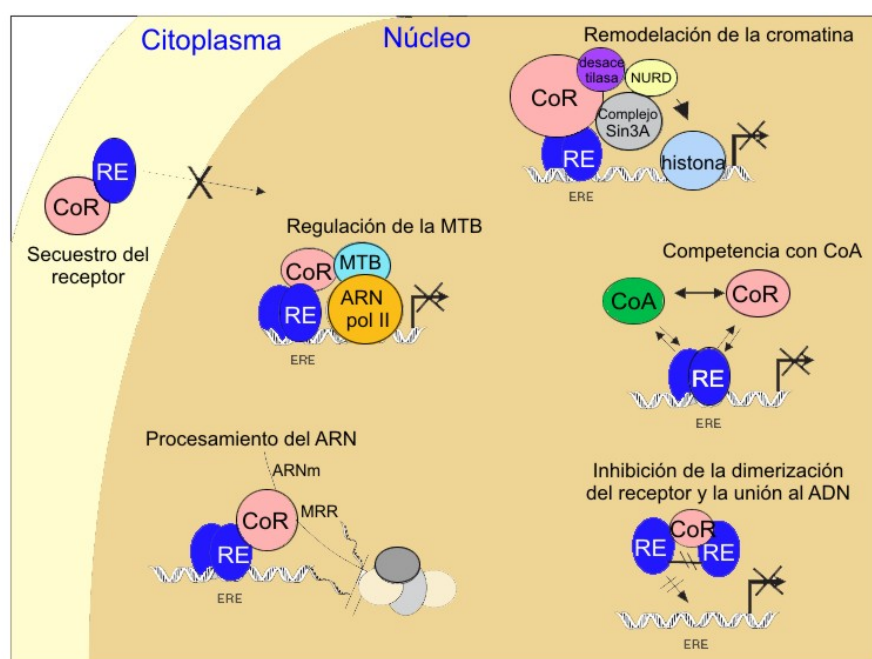
**Figura 13. Mecanismo propuesto para la acción de los co-activadores del RE $\alpha$ .** Cuando está presente la hormona el receptor recluta co-activadores. El complejo receptor-co-activador activa acetiltransferasas de histonas. Las histonas acetiladas se disocian de la cromatina y permiten que el complejo de la maquinaria de transcripción basal se una al ADN y active la transcripción de genes. Tomado de Muramatsu e Inoue, 2000.

#### 2.4.2. Co-represores

Mientras que el rol de los co-activadores del RE $\alpha$  está bien establecido, el papel que desempeñan los co-represores está menos claro. La búsqueda de factores que pudieran conferir represión génica activa ha llevado a la identificación de dos proteínas muy relacionadas: el **co-represor de receptores nucleares** o NCoR (*Nuclear Receptor Co-Repressor*) y el **mediador del silenciamiento del receptor retinoico y tiroideo** o SMRT (*silencing mediator of retinoic acid receptor and thyroid*) (Chen y Evans, 1995). En el caso del complejo receptor tiroideo/receptor del ácido retinoico, los co-represores son liberados una vez que el ligando se ha unido permitiendo el reclutamiento de los co-activadores y el inicio de la transcripción génica (Dobrzycka y col., 2003). Con relación al RE $\alpha$  se creía que se unía al ADN en presencia de ligando y sin la necesidad de co-represores. Sin embargo, un número cada vez mayor de co-represores del RE $\alpha$  ha sido reportado en los últimos años, apoyando la hipótesis de que: a) los co-represores son importantes para mediar las acciones del RE $\alpha$ ; b) la pérdida de los co-represores podría estar involucrada en el desarrollo de cáncer de mama y en la resistencia al tratamiento endocrino del cáncer de mama (Dobrzycka y col., 2003). La mayoría de los co-represores pueden controlar la actividad de los receptores por más de un mecanismo y es posible que la sinergia entre diferentes mecanismos cooperen en la inhibición de la actividad transcripcional

(Dobrzycka y col., 2003). Entre los mecanismos por los que actúan los co-represores descriptos para el RE podemos mencionar (Fig. 14):

- a) **remodelación de la cromatina:** reclutando diferentes complejos de proteínas con actividad desacetilasa de histonas (HDAC),
- b) **interacción con la maquinaria de transcripción basal,**
- c) **competición con los co-activadores por la unión a los receptores,**
- d) **interferencia con la dimerización del receptor y con la unión al ADN,**
- e) **secuestro del receptor en el citoplasma,**
- f) **modificación del procesamiento del ARN.**



**Figura 14. Mecanismo de acción de co-represores del RE.** Un co-represor puede utilizar más de un mecanismo y otros nuevos mecanismos pueden ser descubiertos. **CoR:** co-represor, **CoA:** co-activador, **MRR:** motivo de reconocimiento del ARN, **MTB:** maquinaria de transcripción basal, **ARN pol II:** ARN polimerasa II, **NURD:** deacetilación de histonas y remodelación de nucleosomas. Modificado de Dobrzycka y col., 2003.

Aunque NCoR y SMRT son dos de los co-represores más estudiados, existe poca claridad respecto al papel que desempeñan tanto en condiciones fisiológicas como durante el desarrollo y/o tratamiento de un cáncer hormonodependiente. En la glándula mamaria de la rata, la expresión del ARNm de ambos co-reguladores varía según el estadio fisiológico; siendo esta expresión significativamente más alta en la glándula mamaria post-lactancia que la de un animal virgen (Macejová y col., 2005). Es importante destacar que SMRT y NCoR son co-represores de receptores esteroideos en general y no exclusivos del RE $\alpha$ . Por lo tanto, cualquier alteración -por leve que sea- en los niveles de expresión de uno o ambos

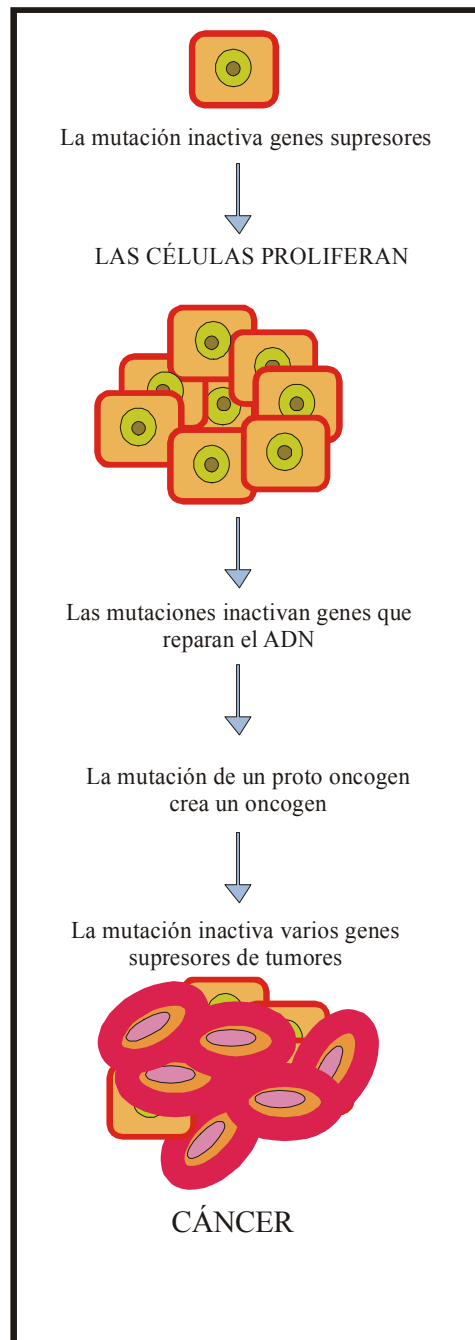
co-represores, podría resultar en cambios transcripcionales significativos responsables de un desarrollo de la glándula mamaria alterado o incluso en el desarrollo de tumores.

### 3. CARCINOGENÉISIS

#### 3.1. Generalidades

Existen tres teorías que permiten explicar el inicio del cáncer: 1) la **teoría de las mutaciones somáticas** señala que la acumulación progresiva de alteraciones genéticas resulta en una tasa de crecimiento superior a la de las células normales; 2) la **teoría epigenética** propone un origen fetal para la enfermedad, y que los cambios en el epigenoma tienen un rol central en la carcinogénesis; 3) la **teoría de la organización tisular** postula que el cáncer surge como consecuencia de alteraciones a nivel tisular, éstas modifican la interacción entre células y tejidos vecinos durante el desarrollo embrionario y la vida adulta (Sonnenschein y Soto, 2008). Las dos primeras teorías (de las mutaciones somáticas y epigenética) suponen que el cáncer se origina en una única célula que sufrió cambios genéticos o epigenéticos, lo que finalmente resulta en un crecimiento desregulado. En cambio, según la teoría de la organización tisular, el cáncer es un fenómeno supracelular comparable a la organogénesis descontrolada; y las mutaciones no serían necesarias para el desarrollo neoplásico. Las dos últimas teorías (epigenética y de la organización tisular) son de interés en el campo de la investigación de los PEs.

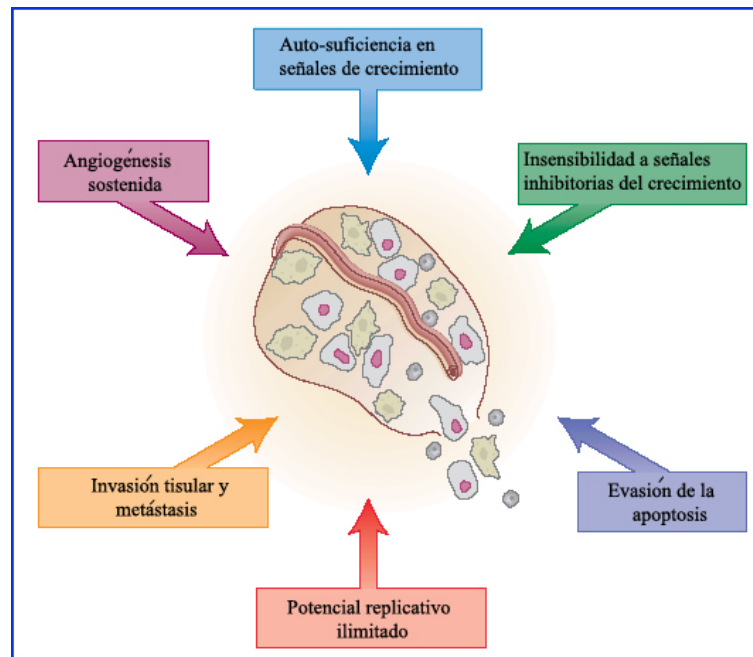
Actualmente, de acuerdo con la teoría de la mutación somática, se sabe que más de una mutación sería necesaria para el proceso de carcinogénesis. De hecho, una serie de mutaciones en múltiples genes origina un tipo celular que prolifera con mayor frecuencia y escapa a los mecanismos normales de control, ampliando las posibilidades para futuras mutaciones (Fig. 15). Estas células “alteradas” pueden originar un tumor y, en algunos casos, estas células migran del tumor primario a nuevos sitios (metástasis), formando un tumor secundario que por lo general tiene mayor impacto sobre la salud (Lodish y col., 2000).



**Figura 15. Múltiples mutaciones originan el cáncer de acuerdo con la teoría de la mutación somática.** El cáncer es causado por una serie de mutaciones y cada mutación altera de algún modo el comportamiento de la célula. Esquema realizado según datos de Lodish y col., 2000.

Los cambios genéticos asociados con la carcinogénesis alteran propiedades fundamentales de las células (Fig. 16) permitiendo que éstas evadan los controles normales del crecimiento y finalmente adquieran el fenotipo de una célula cancerosa (Lodish y col., 2000). Los genes que regulan la división celular y la diferenciación deben estar dañados y sus funciones alteradas. En términos generales estos genes son los denominados **proto-oncogenes** (i.e.: factor de crecimiento epidérmico y fibroblástico,  $p21^{ras}$ , factores de

transcripción *fos*, *jun*, *myc*), **genes supresores de tumores** (i.e.: Rb, p53, APC) y **genes que controlan la apoptosis** (i.e.: bcl-2, bax, bad, bid) (Kumar y col; 2006).



**Figura 16. Cambios celulares asociados con el cáncer.** Durante la carcinogénesis, seis propiedades fundamentales se alteran para generar un fenotipo canceroso de alta agresividad/malignidad. Modificado de Lodish y col., 2000.

### 3.2. El rol de los carcinógenos

En el proceso de carcinogénesis hay dos componentes principales: el carcinógeno y el tejido blanco.

Carcinógeno es cualquier sustancia o agente capaz de aumentar significativamente la incidencia de tumores, en cualquier dosis y por cualquier vía de administración en cualquier especie (Perantoni, 1998). Esta acción puede deberse a su capacidad para dañar el genoma, las funciones celulares (procesos metabólicos) o la organización tisular. Debe tenerse en cuenta que, generalmente, los roedores muestran una susceptibilidad mayor a los carcinógenos que los humanos y esto podría sobreestimar la capacidad carcinógena de algunas sustancias.

Un gran número de agentes produce daño genético e induce la transformación neoplásica de las células. Entre estos agentes se encuentran: 1) carcinógenos químicos (i.e: agentes alquilantes y acilantes, hidrocarburos aromáticos policíclicos y heterocíclicos, aminas aromáticas, amidas, colorantes azoicos); 2) energía radiante (i.e: rayos UV, radiación ionizante); 3) virus oncogénicos y algunos otros microbios (i.e: virus del

papiloma humano, virus Epstein-Barr, virus tipo 1 de la leucemia; *Helicobacter pylori*) (Kumar y col; 2006).

Para estudiar el proceso de la carcinogénesis, de acuerdo con la teoría de la mutación somática, se la divide en diferentes estadios: **iniciación**, **promoción**, **progresión** (Anisimov, 2007). Durante la **iniciación**, ocurren cambios irreversibles en el genotipo de la célula “iniciada” que conducen a una función alterada. El carcinógeno o sus metabolitos activos interactúan con el ADN celular para producir ácidos nucleicos alterados, llamados aductos, responsables de generar mutaciones. Si el genoma es replicado antes de que las enzimas de reparación puedan corregir el daño, la ADN polimerasa copia la secuencia dañada/mutada y se fija permanentemente un error heredable en el genoma (Perantoni, 1998). Durante la **promoción**, una célula iniciada (latente e inmortalizada) adquiere rasgos fenotípicos de una célula transformada (maligna) y por influencia de diversos factores puede progresar a célula tumoral. Un carcinógeno no sólo afecta a la célula blanco sino que influencia muchos otros factores en el micro-ambiente de la célula blanco creando condiciones favorables para la promoción de la célula dañada. A diferencia de la iniciación, la promoción requiere exposición prolongada a un agente promotor no mutagénico, siendo este proceso reversible en gran medida (Anisimov, 2007). Finalmente, otro evento permite el crecimiento selectivo permanente de las células iniciadas aumentando el número de mutaciones y las probabilidades de que se tornen neoplásicas, esto genera en la masa tumoral subpoblaciones de células tumorales. Este estadio es llamado **progresión**.

### 3.3. Carcinogénesis mamaria

El cáncer de mama es el tumor más comúnmente diagnosticado entre las mujeres de todo el mundo y es la segunda causa de mortalidad por cáncer (Parkin y col., 2005). Una de las características de la enfermedad es que se trata de un tumor clasificado como hormonodependiente, pudiendo o no expresar RE y RP, siendo esta expresión de gran importancia para definir el pronóstico y el tratamiento (Hayes y col., 2001).

#### 3.3.1. Hormonas y cáncer de mama

Es sabido que los Eg, progestágenos y andrógenos, ya sea sintéticos o naturales, están involucrados en el desarrollo de distintos tipos de cáncer (Li y col., 1991). La exposición a Eg a lo largo de la vida de una mujer fue identificada como uno de los principales **factores de riesgo** para desarrollar cáncer de mama. Los resultados de estudios

epidemiológicos sugieren que el entorno endocrino intrauterino puede también tener influencia en la predisposición de un individuo a la carcinogénesis. En el caso de embarazos múltiples, cada feto está expuesto durante su vida intrauterina a elevados niveles de Eg, lo cual está asociado con mayor incidencia de cáncer de mama en las mujeres con esta situación (Ekbom y col., 1992; Braun y col., 1995; Weiss y col., 1997). Por el contrario, las hijas e hijos nacidos de madres que tuvieron preeclampsia (caracterizada por elevada presión sanguínea materna y reducida producción placentaria de Eg) presentaron menor incidencia de cáncer de mama (Braun y col., 1995) y de próstata (Ekbom y col., 1996), respectivamente. En la actualidad, los **factores de riesgo** más estudiados están relacionados con aspectos genéticos (i.e.: los genes *BRCA1* y *BRCA2*, implicados en un alto porcentaje de cáncer de mama familiar), el estilo de vida (consumo de grasas, tabaco, alcohol, vida sedentaria), radiaciones y campos electromagnéticos (ya sea ocupacional o accidental), el tiempo total de vida fértil y la historia reproductiva (Sasco y col., 2003).

Respecto al tiempo total de vida fértil, la duración total de la actividad ovárica parece ser un factor crítico que estaría relacionado con un mayor estímulo de los esteroides ováricos. Existe vasta evidencia epidemiológica que demuestra que un inicio temprano de los ciclos menstruales está asociado con riesgo incrementado de padecer cáncer de mama en la vida adulta. Mientras que una menopausia temprana reduce el riesgo de padecer la enfermedad (Sasco y col., 2003). Diversos modelos *in vitro* e *in vivo* abordaron el estudio de la influencia hormonal en el desarrollo de tumores mamarios. En ratas, es posible inducir una elevada incidencia de tumores mediante tratamiento prolongados con Eg (Nandi y col., 1995; Ravoori y col., 2007; Mense y col., 2008) siendo la respuesta mayor cuando se expone a animales más jóvenes, cuando la glándula no está aún completamente diferenciada y el índice de proliferación es elevado (Russo y Russo, 1998). A diferencia de la rata, en ratones el tratamiento prolongado con Eg generalmente conduce al desarrollo de tumores sólo en presencia del virus del tumor mamario murino (MMTV, *Mouse Mammary Tumor Virus*) (Nandi y col., 1995). En ratones el tratamiento con Pg y sus derivados (como el acetato de medroxiprogesterona), administrados en animales BALB/c vírgenes, inducen el desarrollo de carcinomas ductales metastáticos dependientes o no de Pg (Lanari y col., 1986; Molinolo y col., 1987; Kordon y col., 1993; Lanari y col., 2001).

Durante mucho tiempo se estableció una asociación entre cáncer de mama y nuliparidad. Además, datos experimentales, clínicos y epidemiológicos señalaban al período comprendido entre la menarca y la primera gestación completa como una

“ventana” de susceptibilidad para desarrollar la enfermedad. Por lo tanto, el embarazo a una edad temprana conferiría protección, mientras que la nuliparidad (asociada o no con infertilidad) incrementaría el riesgo de padecer cáncer de mama (Russo y Russo, 1998). Existen trabajos en ratas que demuestran que la administración de un régimen hormonal que imite los cambios de la preñez, induce un estadio refractario en la glándula mamaria que la torna más resistente al desarrollo de tumores inducidos por carcinógenos químicos. Estos resultados refuerzan el rol protector de la gestación respecto al cáncer de mama (Abrams y col., 1998; Sivaraman y col., 1998; 2001; Sivaraman y Medina, 2002). Sin embargo, en la actualidad no existe consenso respecto a la influencia de la nuliparidad en la aparición de cáncer de mama y algunos trabajos reportan que el riesgo en las mujeres infértiles no es distinto al de la población general (Cetin y col., 2008).

### 3.3.2. Modelos de carcinogénesis química

En los últimos 50 años, se utilizaron diferentes modelos *in vivo* e *in vitro*, para estudiar la biología del cáncer y para desarrollar y evaluar estrategias de prevención. Los carcinógenos químicos más usados en ratas para inducir cáncer de mama son: *N*-methyl-*N*-nitrosourea (NMU), 7,12-dimethylbenz( $\alpha$ )anthracene (DMBA), diethylnitrosoamine (DEN) o azoxymethane (Macejová y Brtko, 2001). *In vitro*, distintas líneas celulares de cáncer de mama humano fueron estudiadas (Lacroix y LeClercq, 2004). De todos los modelos mencionados los más utilizados son los que emplean DMBA y NMU. A pesar de diferencias en las dosis, vías de administración y características histológicas de los tumores generados (Tabla 4), ambas drogas son consideradas carcinógenos eficaces con similitud en el número, incidencia y latencia de las lesiones producidas (McCormick y col., 1982).

Los cambios inducidos por el carcinógeno están en relación con la estructura de la glándula mamaria al momento de su administración. La susceptibilidad es máxima cuando el carcinógeno es administrado a animales con una edad comprendida entre 45 y 60 días, que coincide con el período en el cual los *TEBs* están activamente diferenciándose a *ABs* (Russo y Russo, 1996). Una vez administrado cualquiera de ambos carcinógenos, los *TEBs* que aún están presentes en la glándula, sufren una transformación hacia proliferaciones intraductales (PID) también denominadas hiperplasias ductales (HD) o conductos hiperplásicos. Estas alteraciones son consideradas el primer paso en el proceso de tumorigénesis, razón por la cual, reciben la denominación de lesiones pre-neoplásicas (Russo y Russo, 1996). Estas lesiones, son fácilmente distinguibles de los conductos mamaros normales, debido a que están caracterizadas por un aumento en el número de



capas epiteliales (Singh y col., 2000). Así, es posible clasificar a las HD como: **leve** (cuando el epitelio se encuentra formado por tres o cuatro capas), **moderada** (si existen más de cuatro capas de células epiteliales), **florida** (cuando la luz de la estructura se encuentra cubierta por células epiteliales) (Singh y col., 2000). La importancia en la detección de estas PID/HD radica en que pueden progresar a carcinoma ductal *in situ* (CDIS) y luego a adenocarcinoma (AC) en un lapso de tiempo muy breve o incluso las HD pueden evolucionar a AC, evitando el estadio de CDIS (Thompson y col., 1998). Sin embargo, no todas las PID/HD evolucionan a lesiones más agresivas, entonces ¿cómo se explica este comportamiento? La razón es que se han descrito dos tipos de PID/HD; las denominadas “iniciadas” que no producen una respuesta en el estroma circundante a la lesión y que no presentan ningún cambio luego de un período prolongado de observación; y las “iniciadas + promovidas”, caracterizadas por producir una marcada reacción estromal consistente en la deposición de colágeno y la infiltración de mastocitos y linfocitos. Son estas últimas PID/HD las que se sugiere que progresarán a CDIS y AC (Russo y Russo, 1996).

**Tabla 4.** Características de los carcinógenos más empleados en los modelos de carcinogénesis de mama en rata<sup>a</sup>.

Droga	NMU	DMBA
Características		
Vida media	30 min	14 días
Vía de administración	Intraperitoneal	Intragástrica
Dosis más frecuente*	50 mg/kg	125 mg/kg
Aparición de los primeros tumores**	60 días post-carcinógeno	60 días post-carcinógeno
Tipo de tumores	Dependientes de hormonas (principalmente Eg)	Dependientes de hormonas (principalmente PRL)
Comportamiento tumoral <sup>b</sup>	Agresivos, localmente invasivos. Capaces de metastatizar	Alto porcentaje de tumores benignos. Baja frecuencia de metástasis.

\*: Las dosis varían según la cepa de rata utilizada y la respuesta esperada.

\*\* : Depende de la susceptibilidad de la cepa utilizada y de la dosis administrada.

<sup>a</sup>: Thompson, 2000.

<sup>b</sup>: Liska y col., 2000.

### **3.3.3. El modelo de tumores inducidos por NMU**

Apenas iniciada la década del '90; Thompson y Adlakha (1991) optimizaron el modelo de inducción de tumores en ratas de la cepa Sprague-Dawley de 50 días de edad. Hasta ese momento, la forma más común de administrar el carcinógeno era mediante inyecciones intravenosas (iv) o subcutáneas (sc), manipulación que implicaba un riesgo considerable para técnicos o bioteristas poco entrenados. Un nuevo método de inyección, intraperitoneal (ip) fue probado y los resultados demostraron que la administración ip de NMU induce tumores en una manera dosis-dependiente y que esta vía es la más rápida proveyendo un método simple y reproducible, siempre que el carcinógeno sea preparado y manipulado adecuadamente. Otra variante del modelo de inducción de tumores por NMU fue inyectar el carcinógeno a ratas pre-puberales (de 21 días de edad) para acelerar la aparición de tumores (Thompson y col., 1995). Si bien este modelo logró reducir el tiempo de espera entre la administración de la droga y la aparición de las primeras lesiones (aproximadamente unos 35 días); el modelo original nunca fue desechado ni completamente reemplazado. Esto último se debe a que cuando son inyectados animales de 50 días de edad con el carcinógeno, la glándula mamaria también está siendo sometida a la acción de las hormonas ováricas endógenas (Eg y Pg) que podrían modificar el curso de la enfermedad tumoral.

### **3.3.4. El rol del estroma durante el desarrollo de tumores mamarios**

Las interacciones estroma-epitelio, mediadas por la matriz extracelular, desempeñan un rol clave en la función normal de la glándula mamaria (Bissell y Barcellos-Hoff, 1987). Una de las teorías de la carcinogénesis, postula que el cáncer puede ser una respuesta fisiológica a un micro-ambiente estromal anormal (Barcellos-Hoff y Medina, 2005). Este micro-ambiente anormal podría considerarse “permisivo” para el proceso de carcinogénesis llevando a la selección de células con características de supervivencia alteradas. El estroma mamario desempeñaría un rol relacionado más con la etapa de progresión que con la de iniciación (Barcellos-Hoff y Medina, 2005). Si bien el cáncer de mama parece originarse principalmente en las células epiteliales, el estroma participaría activamente en la transformación maligna. La participación del estroma contempla: una marcada respuesta desmoplásica caracterizada por activación de fibroblastos, infiltración de células del sistema inmune (leucocitos y mastocitos), secreción aumentada de factores de crecimiento y citoquinas, activa angiogénesis, síntesis y remodelación elevadas de la matriz que se manifiestan como un aumento de la rigidez de la misma (Kass y col., 2007).

Los mastocitos son células efectoras multifuncionales del sistema inmune que producen y liberan una amplia variedad de mediadores. Estas células están comprometidas en promover la angiogénesis en tejidos del sistema reproductor (Varayoud y col., 2004) y en tumores (Aoki y col., 2003). Si bien el rol preciso en el crecimiento tumoral está poco claro, existen trabajos que señalan a los mastocitos como mediadores de la proliferación tumoral aumentada y como facilitadores de la invasión tumoral promoviendo el proceso de colagenólisis. Esta última función fue sugerida luego de inhibir la degranulación de mastocitos y observar que se impedía el crecimiento tumoral (Dabbous y col., 1986, 1991, 1995). El citoplasma de los mastocitos está ocupado por gránulos conteniendo, entre otras sustancias, heparina. Cuando ocurre la liberación de los gránulos, la heparina o fragmentos de ella, pueden unirse a la superficie de las células endoteliales y actuar como mitógeno promoviendo la angiogénesis. De este modo, la degranulación podría influir en la progresión de la glándula mamaria normal hacia la pre- y malignidad modificando las interacciones estroma-epitelio ya sea estimulando la angiogénesis o mediante la degradación de la matriz extracelular (Aoki y col., 2003; Dabbous y col, 1986; Folkman, 1986).

Finalmente, podemos concluir que el estroma inmediatamente adyacente a un tumor no es un elemento estructural pasivo que produce una respuesta inmune para rechazar al tumor. Se trata más de un elemento que participa activamente y contribuye a la progresión tumoral (Kurose y col., 2001). Se adoptó el término “estromatogénesis” para referirse a la reacción que ocurre en el compartimiento estromal y que acompaña la transformación epitelial hacia una condición neoplásica (Cukiermann, 2004).

### **3.3.5. Angiogénesis y tumores mamarios**

Otro evento clave en la progresión tumoral es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura pre-existente, proceso conocido como angiogénesis (Folkman, 1982). En la glándula mamaria se demostró que la formación de una red vascular en el estroma precede a la invasión epitelial (Brown y col., 1999). Diversos factores de crecimiento, liberados en el estroma por las células tumorales e inmunes, conducen el proceso de neovascularización. Uno de estos factores es el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF, *Vascular Endotelial Growth Factor*), sobreexpresado en lesiones pre- y neoplásicas mamarias, comparado con las estructuras glandulares normales (Viacava y col., 2004).

El VEGF está involucrado en varios procesos fisiológicos como en el aumento de la permeabilidad vascular y la capacidad para estimular la proliferación de las células endoteliales (Ziche y col., 1997), además de promover la supervivencia y migración de las mismas (Ferrara y Davis-Smyth, 1997 y Gupta y col., 1999). El VEGF-A (o simplemente VEGF) pertenece a una familia de genes que incluyen al factor de crecimiento de la placenta, al factor de crecimiento derivado de las plaquetas y a VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E (Meyer y col., 1999). El VEGF, como ya se mencionó, está implicado en el proceso de angiogénesis, mientras que el VEGF-C y el VEGF-D participan en la generación de vasos linfáticos (Byrne y col., 2005). El VEGF es producido por las células endoteliales, macrófagos, linfocitos y una variedad de otros tipos celulares (Ferrara y Davis-Smyth, 1997).

En la glándula mamaria de ratonas, se reportó la existencia de las isoformas VEGF<sub>188</sub>, VEGF<sub>164</sub> y VEGF<sub>120</sub> (Pepper y col., 2000; Hovey y col., 2001) que presentan un aminoácido menos que las correspondientes variantes del humano y se expresan diferencialmente de acuerdo con el compartimiento y estadio de desarrollo. En murinos, las isoformas 120 y 164 son expresadas en estroma y en epitelio mamario en distintos estadios del desarrollo. Ambas muestran un aumento durante la preñez y lactancia y disminuyen su expresión durante la involución post-lactancia (Pepper y col., 2000; Hovey y col., 2001). En conjunto, la expresión del VEGF en la glándula mamaria es mayor en el epitelio ductal que en el estroma (Pepper y col., 2000).

La regulación que las hormonas esteroideas ováricas (Eg y Pg) ejercen sobre la expresión del VEGF no está claramente definida. Existen trabajos que demuestran que Eg inducen la expresión del VEGF, tanto en sistemas *in vivo* (Kazi y col., 2005) como *in vitro* (Ruohola y col., 1999; Takei y col., 2002). Específicamente, el E<sub>2</sub> induce la expresión del VEGF en el útero (Rockwell y col., 2002) y en la glándula mamaria (Stoner y col., 2000; 2004; Koduri y col., 2006) de la rata. Este efecto está probablemente mediado por el ERE presente en la región promotora del VEGF (Hyder y Stancel, 2000). Respecto al rol de la Pg, también se ha observado que promueve la expresión del VEGF en el útero durante la implantación. Utilizando una línea celular de tumor de mama humano (T47-D), se observó que la Pg aumenta la expresión del gen del VEGF, mediado por RP-B (Wu y col., 2004). Así, los tumores que expresan el RP-B en elevados porcentajes podrían producir más VEGF y como consecuencia, tener una elevada tasa de angiogénesis haciendo más difícil el manejo terapéutico de los mismos.

La relación entre la expresión del VEGF y el grado de vascularización/angiogénesis en lesiones mamarias pre-invasivas está en discusión (Hicken y col., 2001; Viacava y col., 2004). En este sentido, recientemente se demostró una correlación positiva entre la expresión del VEGF y la densidad micro-vascular (una medida de vascularización) en carcinomas ductales mamarios humanos (Pavlakis y col., 2008).

#### **4. EXPOSICIÓN A PERTURBADORES ENDOCRINOS Y GLÁNDULA MAMARIA**

Como ya se mencionó y se desprende de los datos que se muestran en las Tablas 3 y 4; existe aún una elevada controversia respecto de los efectos de la exposición a BPA sobre distintos órganos y variables hormonodependientes. Por ejemplo, respecto a los efectos del BPA sobre la glándula mamaria, se han reportado resultados muy diversos (y utilizando un amplio rango de concentraciones) que incluyen desde la ausencia de modificaciones (Nikaido y col., 2004) hasta la inducción de hiperplasias ductales y el desarrollo de carcinomas ductales *in situ* (Keri y col., 2007; Murray y col., 2007), cambios en la morfología y aumento de la sensibilidad de la glándula al E<sub>2</sub> (Markey y col., 2001; Muñoz-de-Toro y col., 2005; Murray y col., 2007; Wadia y col., 2007; Moral y col., 2008).

Sin embargo, el BPA no es el único PE con el cual se obtienen, a primera vista, resultados tan dispares. Es muy común el hecho de que al evaluar un PE en diferentes dosis, con distintos modelos de exposición y en períodos diferentes del desarrollo se torne difícil la extracción de una conclusión unánime. Cuando se evaluó el potencial de un fitoestrógeno (genisteína) para afectar la susceptibilidad de la glándula mamaria frente a un carcinógeno químico, se llegó a la conclusión de que este PE administrado con la dieta puede disminuir la incidencia de tumores mamarios (cuando se da antes de la pubertad) (Hilakivi-Clarke y col., 1999a; Lamartiniere, 2002) o puede no tener ningún rol, ni protector ni promotor; cuando es administrado sólo en la vida adulta (Lamartiniere, 2002). Como confirmación de la importancia no sólo de la vía sino también del momento de exposición, se demostró que la administración de genisteína por vía subcutánea a ratas preñadas, resultó en un aumento de la incidencia de tumores mamarios en las crías hembras, luego de la exposición a un carcinógeno (Hilakivi-Clarke y col., 1999b).

Los compuestos organoclorados, utilizados como pesticidas y en procesos industriales, son otro ejemplo de PEs que, aún en dosis muy pequeñas tienen la capacidad de actuar como agonista de los Eg. Por ello, los estudios epidemiológicos los han

relacionado con la mayor incidencia de cáncer de mama en la población altamente expuesta a los mismos (Wolff y Toniolo, 1995; Cassidy y col., 2005). Coincidiendo con estos datos, recientemente hemos reportados niveles elevados de diversos compuestos organoclorados en la grasa adyacente a tumores de mama; lo cual sugiere que estos residuos de compuestos organoclorados, generan un microambiente estrogénico que sería responsable del comportamiento tumoral. (Muñoz-de-Toro y col., 2006a).

Así, más allá de los interrogantes que se puedan plantear respecto a la mayoría de los PEs, cada vez hay más evidencias de que estas sustancias interfieren en la homeostasis del sistema endocrino. Precisamente, debido a los múltiples efectos reportados para los PEs que dependen de numerosas variables (dosis, edad, tiempo y vía de exposición) es que la mayoría de los datos epidemiológicos presentan debilidades y fallas o carencias que complican la interpretación de los resultados obtenidos. Por ello, es necesario recurrir a modelos animales en los cuales podamos controlar un gran número de variables, unificando criterios que nos permitan extraer conclusiones más robustas. En virtud de los antecedentes expuestos, la glándula mamaria es un órgano sensible a la acción de los PEs, aunque aún no hayan podido obtenerse datos concluyentes.