

## EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN PERINATAL A UNA MEZCLA DE AGROQUÍMICOS SOBRE EL DESARROLLO DE LA PRÓSTATA VENTRAL DE RATAS POST-PUBERALES

Reato, Débora

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

Director/a: Dra. Altamirano, Gabriela A.

Codirector/a: Dra. Gómez, Ayelén L.

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: próstata, glifosato, propiconazole

### INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, el uso de agroquímicos se ha diversificado y expandido significativamente a nivel mundial. El glifosato es el ingrediente activo de herbicidas de amplio espectro, utilizados para eliminar malezas. Datos experimentales muestran que la exposición neonatal a glifosato durante la gestación y lactancia (Romano y col., 2012) y/o la exposición desde el período prepuberal hasta la pubertad (Dallegrave y col., 2007) inducen efectos adversos en el sistema reproductor de ratas macho, lo cual sugiere que podría tratarse de un perturbador endócrino.

Por otro lado, se ha demostrado que el propiconazole, fungicida utilizado en el control de la roya de la soja, genera efectos de perturbación endócrina *in vitro* (Goetz y col., 2009). Por lo tanto, este fungicida presenta la potencialidad de incrementar o disminuir los efectos producidos por el glifosato cuando ambos compuestos son administrados conjuntamente. En base a estos antecedentes, este trabajo se enfocará en estudiar los efectos de una exposición a una mezcla de propiconazole y glifosato (ProGli) sobre el desarrollo y funcionalidad de la próstata ventral en ratas post-puberales.

### OBJETIVOS

- Evaluar si la exposición perinatal (gestación + lactancia) a una mezcla de ProGli induce alteraciones en el desarrollo y funcionalidad de la próstata ventral de ratas post-puberales.

**Título del proyecto:** Efectos de la exposición al filtro UV benzofenona-3 sobre el desarrollo glandular peri-puberal en ratones hembras y machos

**Instrumento:** PICT

**Año de la convocatoria:** 2019

**Organismo financiador:** Agencia I+D+i

**Directora:** Dr. Gabriela A. Altamirano

## METODOLOGÍA

### Diseño experimental

Ratas hembras adultas de la cepa Wistar preñadas (F0) fueron expuestas perinatalmente por vía oral desde el día 9 de gestación (DG9) hasta el destete (día post-natal 21 – DPN21) a: a) una dieta control y aceite de sésamo por vía intragástrica (Control) y b) a una dieta suplementada con 4 mg/kg peso corporal/día de glifosato + 4 mg/kg peso corporal/día de propiconazole por vía intragástrica (ProGli). Luego las crías machos F1 fueron mantenidas en condiciones estándares de bioterio hasta su sacrificio en DPN60, en el cual se obtuvieron muestras de próstata ventral. Por cada punto experimental se analizó una cría por camada y al menos 8 animales por grupo experimental.

### Muestras de tejidos

Al momento del sacrificio, se diseccionó el complejo prostático/uretral junto con las vesículas seminales, se registró el peso húmedo del complejo, y luego se separó la próstata ventral: se fijó en formol buffer al 4% por 6 h para su posterior procesamiento histológico. Una vez realizado el procesamiento histológico de las muestras de próstata ventral, se realizaron cortes histológicos de 5  $\mu$ m de espesor que fueron destinados para realizar una tinción con hematoxilina-eosina (H&E) o inmunohistoquímica (IHQ).

### Análisis histo-morfológico

El análisis histológico se realizó en muestras de próstata ventral teñidas con H&E, en las cuales se evaluó el desarrollo ductal y la presencia de lesiones prostáticas (hiperplasias y/o atrofas) (Ramos y col., 2001).

### Inmunohistoquímica

Se realizaron ensayos de IHQ para evaluar la expresión de: a) Ki67 como marcador del índice de proliferación celular, b) los receptores hormonales del receptor de estrógeno beta (ESR2) y de andrógenos (AR), c) alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA) para analizar el estroma periductal y d) la fosfatasa ácida prostática (FAP) como marcador de actividad secretora (Ramos y col., 2001). El porcentaje de células positivas para Ki67, ESR2 y AR fue cuantificado utilizando un microscopio Olympus con objetiva de 40X, se cuantificaron al menos 2000 células por corte, mientras que  $\alpha$ -SMA y FAP fueron cuantificadas por densidad óptica integrada (DOI). Los resultados se expresan en unidades arbitrarias. Las mediciones se realizaron con el software ImageJ.

### Análisis estadísticos

Los resultados experimentales fueron analizados con test paramétricos (t de Student) y no paramétricos (Mann-Whitney *test*) seleccionados específicamente para cada experimento, un  $p < 0.05$  fue considerado significativo en todos los casos.

## RESULTADOS

### Efectos de la exposición perinatal a una mezcla de agroquímicos sobre la histología de la próstata ventral de ratas macho post-puberales



Tanto en las ratas controles como en las expuestas perinatalmente a ProGli se identificaron conductos hiperplásicos, los cuales se caracterizan por presentar un aumento de la celularidad epitelial (dos o más capas de células epiteliales). El porcentaje de conductos con hiperplasias fue mayor en la próstata ventral de ratas tratadas con ProGli comparada con los animales controles (Control:  $1.31 \pm 0.42\%$  vs ProGli:  $4.44 \pm 0.55\%$ ;  $p < 0.05$ ). Aún más, los conductos hiperplásicos observados en la próstata de los controles presentaron zonas puntuales de hiperplasias moderadas (entre dos y tres capas de células epiteliales). Por el contrario, en las próstatas de ratas tratadas con ProGli se encontraron numerosos sitios de hiperplasias moderadas a extensas (más de tres capas de células epiteliales), que a menudo ocupaba una gran área del lumen epitelial.

Otra de las alteraciones frecuentemente observada en la próstata ventral fue la atrofia epitelial, en la que los conductos están revestidos por un epitelio cúbico a escamoso compuesto por células epiteliales con escaso citoplasma, y rodeado de tejido conectivo denso. En la próstata ventral de la mayoría de los animales expuestos al tratamiento fue posible observar un mayor porcentaje de conductos revestidos parcial o completamente por un epitelio atrófico comparadas con las ratas del grupo control, en las cuales se detectó solo un conducto con epitelio parcialmente atrófico en algunos de los animales (Control:  $0.97 \pm 0.42\%$  vs. ProGli:  $4.31 \pm 1.49\%$ ;  $p < 0.05$ ).

### Efectos de la exposición perinatal a ProGli sobre los conductos e hiperplasias epiteliales de la próstata ventral de ratas post-puberales.

En la próstata ventral de los animales post-puberales se evaluó la proliferación celular (Ki67) y la expresión proteica de ESR2, AR,  $\alpha$ -SMA y FAP. En los conductos sin lesiones no se observaron diferencias significativas entre los animales expuestos a ProGli y los controles en todos los marcadores evaluados. En cambio, en los conductos hiperplásicos se observó un aumento en el índice de proliferación celular y una disminución en la expresión proteica de ESR2 en los animales expuestos a ProGli en comparación con las hiperplasias detectadas en el grupo control (Tabla 1).

**Tabla 1. Marcadores de proliferación y diferenciación en los conductos sin lesiones e hiperplásicos de la próstata ventral de ratas post-puberales expuestas perinatalmente a ProGli.**

Marcador evaluado	Conductos sin lesiones		Hiperplasias	
	Control	ProGli	Control	ProGli
Ki67 <sup>1</sup>	$5.77 \pm 1.06$	$5.97 \pm 0.95$	$6.80 \pm 1.07$	$12.61 \pm 1.77^*$
ESR2 <sup>1</sup>	$71.34 \pm 10.07$	$64.69 \pm 5.76$	$77.74 \pm 3.66$	$50.48 \pm 8.31^*$
AR <sup>1</sup>	$84.97 \pm 4.59$	$76.50 \pm 7.07$	$82.23 \pm 10.54$	$73.84 \pm 9.50$
$\alpha$ -SMA <sup>2</sup>	$0.21 \pm 0.01$	$0.23 \pm 0.01$	$0.40 \pm 0.02$	$0.45 \pm 0.02$
FAP <sup>2</sup>	$0.56 \pm 0.06$	$0.60 \pm 0.07$	$0.68 \pm 0.06$	$0.54 \pm 0.08$

\* $p < 0.05$  (t test entre el grupo Control y ProGli)

<sup>1</sup> Los resultados están expresados como el porcentaje de células positivas.

<sup>2</sup> Los resultados están expresados como unidades arbitrarias de densidad óptica integrada (DOI). Los valores se expresaron como la media  $\pm$  SEM de 8-10 machos F1/grupo,

### Caracterización de los conductos atróficos en la próstata ventral post-puberal de ratas expuestas perinatalmente a ProGli

En la mayoría de las ratas expuestas a ProGli se encontraron más de dos conductos con epitelio atrófico en los cuales se evaluaron la marcación de Ki67, ESR2, AR,  $\alpha$ -SMA y FAP. Considerando que en el grupo control se observó solo un conducto con epitelio parcialmente atrófico en algunos animales y que no existieron diferencias significativas en ninguno de los marcadores evaluados en los conductos sin lesiones entre grupos experimentales, el análisis estadístico se realizó en el grupo ProGli entre los conductos sin lesiones y los atróficos. Los conductos con epitelio atrófico presentaron una menor expresión del ESR2 y una mayor expresión de  $\alpha$ -SMA comparado con los conductos prostáticos sin lesiones del grupo ProGli (Tabla 2).

**Tabla 2. Marcadores de proliferación y diferenciación en los conductos atróficos de la próstata ventral de ratas post-puberales expuestas perinatalmente a ProGli**

Marcador evaluado	Conductos sin lesiones	Conductos atróficos
Ki67 <sup>1</sup>	5.97 $\pm$ 0.95	9.95 $\pm$ 2.69
ESR2 <sup>1</sup>	64.69 $\pm$ 4.70	28.49 $\pm$ 10.91*
AR <sup>1</sup>	76.50 $\pm$ 7.07	78.57 $\pm$ 11.38
$\alpha$ -SMA <sup>2</sup>	0.23 $\pm$ 0.01	0.63 $\pm$ 0.05 †
FAP <sup>2</sup>	0.60 $\pm$ 0.07	0.64 $\pm$ 0.04

\* $p < 0.05$  (t *test* entre conductos sin lesiones y atróficos del grupo ProGli).

† $p < 0.05$  (Mann-Whitney *test* entre conductos sin lesiones y atróficos del grupo ProGli).

<sup>1</sup> Los resultados están expresados como el porcentaje de células positivas.

<sup>2</sup> Los resultados están expresados como unidades arbitrarias de densidad óptica integrada (DOI).

Los valores se expresaron como la media  $\pm$  SEM de 8-10 machos F1/grupo.

## CONCLUSIONES

La exposición perinatal (gestación + lactancia) a una mezcla de agroquímicos (propiconazole y glifosato) induce alteraciones en el desarrollo de la próstata ventral de ratas post-puberales, evidenciado por la presencia de lesiones prostáticas, como hiperplasias y atrofias. Además, la expresión de ESR2 disminuyó con el tratamiento con ProGli en ambas lesiones detectadas, siendo esta disminución aún mayor en los conductos con epitelio atrófico.

## BIBLIOGRAFÍA

Dallegrave, E.; Mantese, F.D.; Oliveira, R.T.; Andrade, A.J.; Dalsenter, P.R.; Langeloh, A. 2007. Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats, Arch Toxicol 81(9) 665-673.

Goetz, A.K.; Dix, D.J. 2009. Toxicogenomic effects common to triazole antifungals and conserved between rats and humans, Toxicology and applied pharmacology 238(1) 80-9.

Ramos, J.G.; Varayoud, J.; Sonnenschein, C.; Soto, A.M.; Muñoz De Toro, M.; Luque, E.H. 2001. Prenatal exposure to low doses of bisphenol A alters the periductal stroma and glandular cell function in the rat ventral prostate, Biology of reproduction 65(4) (2001) 1271-7.

Romano, M.A; Romano, R.M.; Santos, L.D.; Wisniewski, P; Campos, D.A.; Souza, P.B.; Viau, P.; Bernardi, M.M.; Nunes, M.T.; Oliveira, C.A. 2012. Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression, Arch Toxicol 86(4) 663-673.