



EXPOSICIÓN POSNATAL A AGROQUÍMICOS SOBRE EL DESARROLLO Y LA DIFERENCIACIÓN DEL ÚTERO

Ramiro Alarcón

Doctorado en Ciencias Biológicas

Director: Dr. Enrique H. Luque

Co-Directora: Dra. María M. Milesi

Lugar de realización: Instituto de Salud y Ambiente del Litoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

Fecha de la defensa: 11 de mayo de 2020

ralarcon@fbc.unl.edu.ar

Resumen

Actualmente, existe preocupación por el impacto de los contaminantes ambientales que, aún a bajas dosis, pueden interferir con la acción hormonal con efectos adversos en la salud. La exposición a estos compuestos, denominados disruptores o perturbadores endocrinos (PE), en periodos críticos puede alterar el desarrollo, la diferenciación y la funcionalidad uterina, afectando la salud reproductiva. Entre estos contaminantes se encuentran dos de los agroquímicos más utilizados en el país en la última década: el endosulfán y los herbicidas a base de glifosato (HBG).

El endosulfán es un insecticida y acaricida organoclorado, prohibido en Argentina desde 2013, que aún puede detectarse en el ambiente, y en tejidos animales y del humano. Los efectos nocivos del endosulfán sobre la salud son diversos, y ha sido clasificado como PE. Sin embargo, hay escasos reportes de sus efectos sobre la salud reproductiva de la hembra. Previamente, empleando un ensayo uterotrópico, demostramos la actividad estrogénica del endosulfán. Asimismo, reportamos los efectos adversos de la exposición posnatal a bajas dosis de endosulfán en el desarrollo y diferenciación del útero en el periodo prepuberal, y en el periodo pre-implantatorio.

Los HBG representan al agroquímico más utilizado a nivel mundial. Su principal uso es el control de malezas tanto en áreas urbanas como rurales. Su uso intensivo y la aparición de malezas resistentes, derivó en un aumento en la dosis y la frecuencia de su aplicación. Actualmente, el glifosato genera preocupación sobre sus efectos en la salud. Se demostró *in vitro* que el glifosato o los HBG alteran la proliferación celular, la apoptosis, y la esteroidogénesis. También se observaron efectos de PE sobre testículo, ovario, útero y glándula mamaria. En trabajos previos, mediante ensayo uterotrópico, reportamos la actividad estrogénica de un HBG. También se demostró que la exposición neonatal de ratas a un HBG por vía sc afecta el desarrollo uterino prepuberal, y aumenta la tasa de pérdidas posimplantatorias afectando la deciduización.

Considerando los antecedentes mencionados, y como objetivo general de la presente tesis, nos propusimos evaluar los efectos de la exposición posnatal a estos agroquímicos sobre el desarrollo y la diferenciación del útero, empleando dos modelos animales diferentes.

Primero, estudiamos los efectos de una exposición neonatal a una baja dosis de endosulfán [600 µg/kg pc/día, cada 48 h del día posnatal (DPN) 1 al 7 por vía sc] sobre la diferenciación miometrial uterina en el periodo pre-implantatorio [día gestacional (DG) 5] y la funcionalidad del miometrio durante el parto. En DG5, observamos que la exposición neonatal a endosulfán redujo el espesor de los miometrios circular y longitudinal, y del tejido conectivo intersticial, la organización del colágeno y el área ocupada por vasos. El tratamiento disminuyó la proliferación celular, y la expresión de Wnt7a y Hoxa10. Aunque los animales parieron el DG23, el tratamiento adelantó el inicio del parto y la expresión de genes asociados. Estos resultados indican que la exposición neonatal a endosulfán altera la adaptación miometrial en el DG5 y en el parto.

En otro capítulo de la tesis estudiamos los efectos de la exposición neonatal de corderas de raza frisona a un HBG sobre el desarrollo uterino en el periodo prepuberal. Comparamos los efectos del HBG (2 mg de glifosato/kg pc/día, cada 24 h del DPN1 al DPN14) sobre el desarrollo del útero ovino empleando dos vías diferentes de administración, oral vs. subcutánea. Se obtuvieron muestras de suero en el DPN15, y de suero y útero en el DPN45. En los animales control no se observó glifosato en las muestras de suero de DPN15 o DPN45; mientras que, en el grupo HBG se detectó glifosato en DPN15 y no en DPN45. En las corderas expuestas al HBG hubo una menor proliferación celular, sin alteraciones en la histomorfología uterina. En conclusión, nuestros resultados demuestran que la exposición neonatal de corderas a una baja dosis de un HBG redujo la actividad proliferativa del útero, independientemente de la vía de administración.

Considerando los resultados obtenidos, investigamos los mecanismos que podrían estar relacionados con la menor proliferación celular. Para ello, corderas frisonas fueron tratadas por vía sc empleando el mismo diseño experimental (HBG: 2 mg de glifosato/kg pc/día). Similar a lo antes descrito no hubo cambios en la histología y una menor proliferación celular asociada con una mayor expresión de IGFBP-3 y de p27 en los animales tratados. Asimismo, en el grupo HBG se alteró la expresión de los receptores esteroides, y disminuyó la expresión de Wnt5a, -7a y β-catenina, de Hoxa10 y de Foxa2. Demostramos que la exposición neonatal de corderas a una baja dosis de un HBG disminuye la proliferación celular, al aumentar la expresión de moléculas moduladoras de la proliferación, y desregulando la expresión de proteínas involucradas en el desarrollo uterino en el periodo prepuberal.

En conjunto, los resultados demuestran que la exposición a compuestos con actividad de PE durante periodos críticos genera alteraciones en el desarrollo y la diferenciación a largo plazo. Esto último tendría consecuencias adversas para la salud reproductiva, afectando la cadena productiva de la industria pecuaria.

Abstract

NEONATAL EXPOSURE TO AGROCHEMICALS AND ITS EFFECTS ON DEVELOPMENT AND DIFFERENTIATION OF THE UTERUS

Nowadays, concern about the exposure to agrochemicals during development and its effects on reproductive health have arisen. Endosulfan and glyphosate-based herbicides (GBH) are two of the most used agrochemicals in Argentina. Previously, we reported the neonatal exposure effects to these agrochemicals on uterine development and the consequences on pregnancy. Here, we reported the effects of postnatal exposure to endosulfan or GBH using two animal models. First, we evaluated the neonatal exposure on uterine myometrial adaptation during peri-implantation [gestational day (GD) 5] and parturition. To this, female Wistar rats were exposed during the first week of life to a low endosulfan dose. On GD5, we observed that exposure altered the myometrial histology. Although all animals delivered on GD23, an advancement in the parturition time together with higher expression of labor-related gene. Our results shows that neonatal exposure to endosulfan alters the myometrial adaptation on GD5 and during labor. Later we investigate the effects of GBH, in environmentally relevant dose, on prepubertal ovine uterine development. To this, we first compare the effects on uterine development using two different administration routes (oral vs. sc). We observed a decreased uterine cell proliferation regardless exposure route. Then, using sc exposure we evaluated which mechanisms might be related with the decreased proliferation. We observed an increased cell-cycle molecule expression and altered development-related protein expression. Our data shows that GBH deregulates the uterine development in the sheep. Present thesis demonstrate that agrochemical exposure alters uterine development with adverse consequences on female fertility.