



ALTERACIONES EN LA ANGIOGÉNESIS EN LA REGIÓN DECIDUAL DURANTE LA POST-IMPLANTACIÓN POR EXPOSICIÓN A FORMULACIONES COMERCIALES DE GLIFOSATO.

Cagliaris, María Luz

Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL), Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Santa Fe, Argentina.

Directora: Ingaramo, Paola I.

Área: Ciencias de la Salud

Palabras claves: Angiogénesis, Post-implantación, Glifosato

INTRODUCCIÓN

La exposición a agroquímicos se ha asociado con alteraciones en la fertilidad. En Argentina, los herbicidas a base de glifosato (HBG) son los más utilizados (Aparicio et al., 2013) y pueden tener efectos nocivos sobre la salud (Silva et al., 2019; Van Bruggen et al., 2018). Estudios in vivo sugieren que los HBG son un potente perturbador endócrino (Gasnier et al., 2009) y dado que el útero es uno de los principales órganos blancos de algunos perturbadores endócrinos, nuestra hipótesis propone que la exposición post natal temprana podría interferir con el normal desarrollo y diferenciación uterina con efectos a largo plazo sobre la fertilidad. Previamente demostramos que ratas expuestas a un HBG durante los primeros días postnatales (PN) presentaban pérdidas embrionarias y alteraciones en la decidua durante la gestación (Ingaramo et al., 2017; Ingaramo et al., 2016). El deterioro de la neovascularización y remodelación vascular en las primeras etapas de la preñez podría conducir a un fracaso en la preñez; debido a esto, cambios en la expresión de factores angiogénicos en el útero, podrían estar asociados a estas fallas durante la gestación.

La angiogénesis decidual es principalmente regulada a través del factor de crecimiento del endotelio vascular VEGF, cuya secreción es regulada a través del receptor de progesterona (PR) (Kim et al., 2013). El factor VEGF además es regulado por las enzimas iNOS y COX2 las cuales además están reguladas por la hormona progesterona (Bujis et al., 2017; Reijnders et al., 2018).

OBJETIVOS

- Investigar si ocurren defectos en la angiogénesis decidual en el período post-implantación, día de gestación 9 (DG9), en ratas expuestas neonatalmente a HBG.

Título del proyecto: Efectos de una exposición postnatal temprana a formulaciones comerciales de glifosato sobre la remodelación uterina de ratas en gestación.

Instrumento: CAI+D

Año convocatoria: 2016

Organismo financiador: UNL

Director/a: Ingaramo, Paola

METODOLOGÍA

Crías hembra de ratas de la cepa Wistar recibieron en los días 1, 3, 5 y 7 PN por vía s.c. sol. fisiológica (Control, n=8) o solución comercial de HBG (2 mg/kg/día de glifosato, n=8). A los 90 días PN se aparearon con machos fértiles y se definió como día 1 de preñez al día en que se observaron espermatozoides en el extendido vaginal. Las hembras preñadas fueron sacrificadas al día gestacional 9 (DG9) en cámara de dióxido de carbono y guillotizadas; al momento del sacrificio, se les diseccionó el útero y se extrajeron los sitios de implantación (SI) (figura 1), que se pesaron y se procesaron de dos maneras: I) se almacenaron a -80°C para posterior extracción de ARN y estudios de biología molecular y II) se fijaron en formaldehído 4% (6 hs) e incluyeron en parafina para estudios histomorfológicos e inmunohistoquímicos. Se usó IHQ doble (Nestina/Ki67) para cuantificar la neoformación de vasos (Nestina positiva) y evaluar proliferación (Ki67+) tanto en vasos de la zona anti-mesometrial (AM) como en el epitelio luminal (EL), glandular (EG) y el estroma subepitelial (ES) de la región mesometrial (M). La expresión de ARNm de iNOS y COX2 se cuantificó por qRT-PCR y la expresión de VEGF en SI por IHQ.

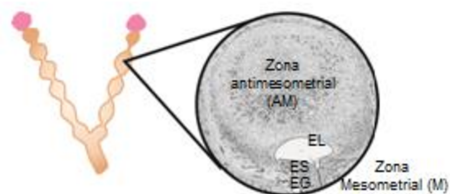


Figura 1: Corte transversal de un sitio de implantación en DG9

RESULTADOS

En SI del grupo HBG, la expresión de VEGF disminuyó en la región M (EG 20% y ES 28%, $p < 0,05$ vs control) y disminuyó también en la región AM (38%, $p < 0,05$) (figura 2).

En estudios anteriores se había comprobado una disminución de receptores de progesterona en grupos tratados con herbicida a base de glifosato, y dado que la progesterona regula VEGF, se puede asociar la disminución de receptores de progesterona con una falla en la regulación de este factor angiogénico. La expresión del ARNm de COX2 e iNOS en el grupo HBG fue menor de 71% ($p < 0,05$) y 58% ($p < 0,05$), respectivamente (figura 3), la disminución de COX2 e iNOS en ratas expuestas a HBG podría estar relacionada con la menor expresión de VEGF, debido a que regulan su expresión.

Además, COX2 e iNOS también se encuentran reguladas por progesterona, entonces su disminución podría estar relacionada con la disminución de receptores de progesterona observada en estudios previos.

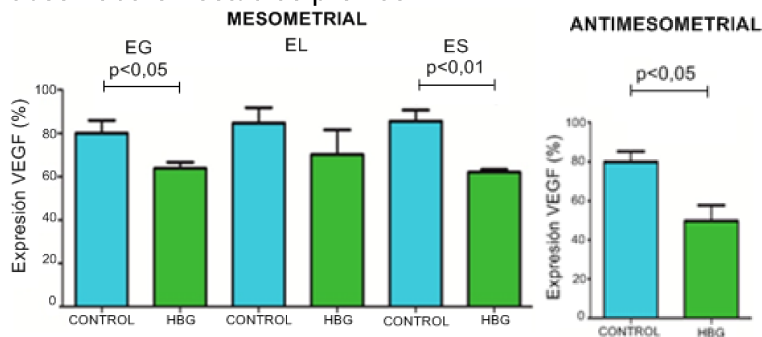


Figura 2: Expresión de VEGF (%) en región mesometrial y antimesometrial, en grupo tratado con HBG con respecto a grupo control.

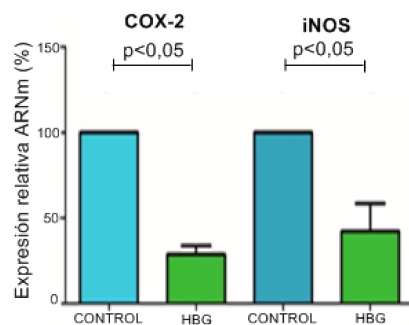


Figura 3: Expresión de ARN mensajero de COX2 e iNOS en grupo tratado con HBG con respecto a grupo control.

En el grupo HBG se observó una disminución del diámetro de vasos en AM (29%, $p < 0,05$) y M (31%, $p < 0,05$) (figura 4) y fue menor el área vascular solo en AM (52%, $p < 0,05$) en grupos tratados con herbicida, con respecto al control (figura 5). La disminución del área vascular solo en la región AM se puede asociar al patrón espacio temporal de angiogénesis característico del proceso de decidualización, ya que situándonos en el día gestacional 9, la zona mesometrial está comenzando a desarrollarse, y tal vez no se observaron cambios debido a que primero ocurren cambios moleculares que anteceden a los cambios morfológicos; además se puede asociar al tipo celular de cada zona y la sensibilidad de las mismas al herbicida a base de glifosato.

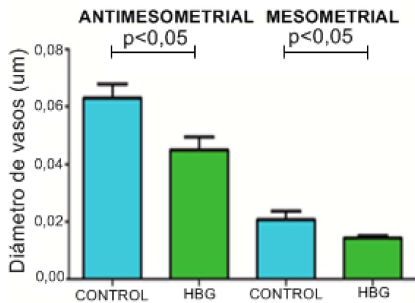


Figura 4: Diámetro de vasos (µm) en región AM y M, en grupo tratado con HBG con respecto a grupo control.

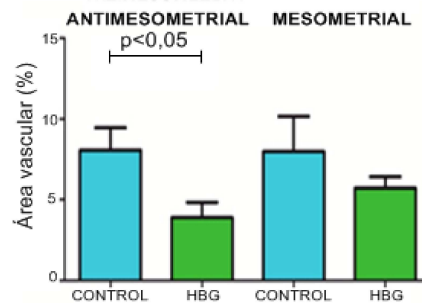
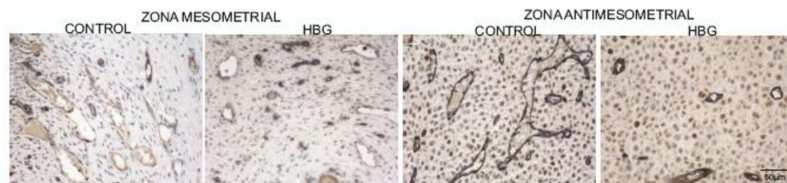


Figura 5: Área vascular (%) en región AM y M, en grupo tratado con HBG con respecto a grupo control.

Microfotografías representativas de las IHQdoble (ki67/nestina)



Mediante el estudio de nestina, se analizan los vasos en neoformación, se observó una disminución de los vasos nestina positiva en AM (46%, $p < 0,05$) en ratas expuestas a HBG (figura 6) y su disminución puede estar asociada a la disminución del área vascular observada en la región AM. Con respecto a Ki-67, en ratas en el grupo HBG, la proliferación de vasos disminuyó en M (53%, $p < 0,05$) (figura 7) y ésta disminución se puede asociar a la disminución de la angiogénesis evaluada por VEGF en la región mesometrial.

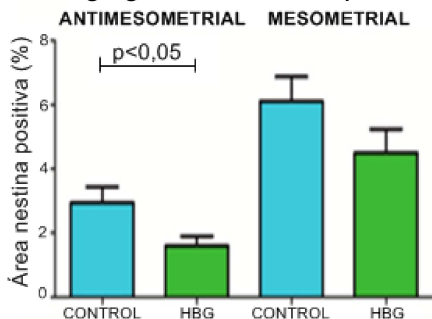


Figura 6: Área nestina positiva (%) en región AM y M, en grupo tratado con HBG con respecto a grupo control.

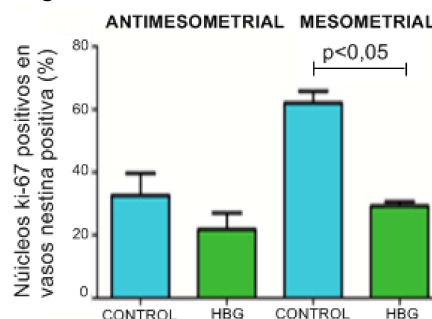


Figura 7: Núcleos ki-67 positivos en vasos nestina positiva (%) en región AM y M, en grupo tratado con HBG con respecto a grupo control.

CONCLUSIONES

Los resultados demuestran que la exposición neonatal a HBG interfiere, a largo plazo, con el mecanismo de angiogénesis decidual y esto estaría relacionado con una menor expresión de COX2 e iNOS; estas alteraciones podrían explicar, en parte, las pérdidas embrionarias observadas durante la gestación.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Aparicio, V. C., De Geronimo, E., Marino, D., Primost, J., Carriquiriborde, P., & Costa, J. L. (2013). Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Chemosphere*, 93(9), 1866-1873.

Buijs, N., Oosterink, J. E., Jessup, M., Schierbeek, H., Stolz, D. B., Houdijk, A. P., . . . van Leeuwen, P. A. (2017). A new key player in VEGF-dependent angiogenesis in human hepatocellular carcinoma: dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1. *Angiogenesis*, 20(4), 557-565.

Gasnier, C., Dumont, C., Benachour, N., Clair, E., Chagnon, M. C., & Seralini, G. E. (2009). Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Toxicology*, 262(3), 184-191.

Ingaramo, P. I., Varayoud, J., Milesi, M. M., Guerrero Schimpf, M., Alarcon, R., Munoz-de-Toro, M., & Luque, E. H. (2017). Neonatal exposure to a glyphosate-based herbicide alters uterine decidualization in rats. *Reprod Toxicol*, 73, 87-95.

Ingaramo, P. I., Varayoud, J., Milesi, M. M., Schimpf, M. G., Munoz-de-Toro, M., & Luque, E. H. (2016). Effects of neonatal exposure to a glyphosate-based herbicide on female rat reproduction. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Reproduction*, 152(5), 403-415.

Kim, M., Park, H. J., Seol, J. W., Jang, J. Y., Cho, Y. S., Kim, K. R., . . . Koh, G. Y. (2013). VEGF-A regulated by progesterone governs uterine angiogenesis and vascular remodelling during pregnancy. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *EMBO Mol Med*, 5(9), 1415-1430.

Reijnders, D., Liu, C. C., Xu, X., Zhao, A. M., Olson, K. N., Butler, S. D., . . . Sones, J. L. (2018). Celecoxib restores angiogenic factor expression at the maternal-fetal interface in the BPH/5 mouse model of preeclampsia.

Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Physiol Genomics*, 50(5), 385-392. Silva, V., Mol, H. G. J., Zomer, P., Tienstra, M., Ritsema, C. J., & Geissen, V. (2019). Pesticide residues in European agricultural soils - A hidden reality unfolded. *Sci Total Environ*, 653, 1532-1545.

Van Bruggen, A. H. C., He, M. M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K. C., Finckh, M. R., & Morris, J. G., Jr. (2018). Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. [Review]. *Sci Total Environ*, 616-617, 255-268.