

# **LA EXPOSICIÓN PERINATAL A GLIFOSATO PURO O UNA FORMULACIÓN COMERCIAL ALTERA MECANISMOS MOLECULARES UTERINOS INVOLUCRADOS EN LA IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA**

**Guillermina Pacini**

*Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL) CONICET – UNL*

**Área Temática:** Ciencias Biológicas

**Sub-área:** Bioquímica

**Grupo:** X

**Palabras clave:** Glifosato, Útero, Subfertilidad

---

## **INTRODUCCIÓN**

El glifosato es el principio activo de una gran variedad de herbicidas no selectivos de amplio espectro. Las formulaciones comerciales de glifosato incluyen otros compuestos que actúan como adyuvantes. Si bien estas sustancias son clasificadas como inertes, se ha demostrado que los formulados de glifosato son más tóxicos que el compuesto en su grado técnico (Mesnage et al., 2014). En un estudio reciente, detectamos que la exposición perinatal a un herbicida a base de glifosato (HBG), administrado por vía oral en una dosis de 200 mg/kg/día (NOAEL, EPA), produjo subfertilidad como consecuencia de fallas en la implantación embrionaria, e indujo anomalías congénitas transgeneracionales (Pacini et al., 2016).

## **OBJETIVOS**

Investigar y comparar los efectos de la exposición perinatal (durante la gestación y lactancia) a una dosis baja de glifosato puro o de un HBG sobre la fertilidad de la rata hembra a través de la evaluación de su aptitud reproductiva. En aquellos grupos experimentales en los que se detecten fallas en la implantación, evaluaremos los mecanismos moleculares uterinos afectados en el periodo pre-implantatorio.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Animales y tratamientos**

Ratas preñadas (F0) de la cepa Wistar fueron expuestas desde el día de gestación 9 (DG9) hasta el final de la lactancia (día lactacional 21) a una dosis baja de glifosato puro (Gli) o de un HBG por vía oral a través del alimento. La dosis estudiada corresponde a la dosis referencia (RfD, EPA) de 2 mg de glifosato/kg/día. Cuando las crías hembras F1 alcanzaron la madurez sexual, fueron preñadas con machos de fertilidad comprobada y sacrificadas en dos etapas de la gestación: i) en DG19 para realizar un test de fertilidad y ii) en DG5 (período pre-implantatorio) para evaluar mecanismos moleculares uterinos afectados en el proceso de implantación.

### **Evaluación de la aptitud reproductiva**

A partir del día postnatal 90, las hembras F1 fueron colocadas con machos de fertilidad comprobada. Aquellos animales que durante 3 semanas consecutivas de haberlos puesto a preñar no presentaron espermatozoides, fueron considerados no preñados y con este dato se calculó el porcentaje de preñez. Aquellas hembras que resultaron preñadas fueron sacrificadas en DG19 para realizar un test de fertilidad. En primer lugar, se realizó la visualización directa de los ovarios bajo lupa estereoscópica

---

CientiBeca: "Estudio comparativo de los efectos del glifosato puro y sus formulaciones comerciales sobre la receptividad uterina"

**Director:** Milesi, María Mercedes

**Co-Director:** Lorenz, Virginia

(Leica) para determinar el número de cuerpos lúteos (CLs), lo cual indica el número de ovocitos ovulados. Luego, se identificaron y cuantificaron los sitios de implantación y de reabsorciones fetales en los cuernos uterinos (Varayoud et al., 2011; Milesi et al., 2015). Por último, se determinó la tasa de pérdidas embrionarias pre-implantatorias, definida como:  $[(N^{\circ} \text{ CLs} - N^{\circ} \text{ sitios de implantación}) / N^{\circ} \text{ CLs}] \times 100$ .

### **Evaluación de la diferenciación funcional uterina en el período pre-implantatorio**

En los grupos experimentales en los que se detectó una disminución de los sitios de implantación, se realizaron diferentes determinaciones en el período pre-implantatorio para investigar los mecanismos moleculares uterinos afectados. Para ello, un grupo de animales preñados sometidos a los tratamientos descriptos, se sacrificaron en la mañana del DG5 (la implantación embrionaria en nuestros animales ocurre en la tarde del DG5). Al momento del sacrificio, porciones de útero fueron congeladas en N<sub>2</sub> líquido y mantenidas a -80°C hasta la extracción del ARN total, mientras que otras fueron procesadas hasta su inclusión en parafina. A partir de dichas muestras se llevaron a cabo las siguientes determinaciones:

#### **a) Características histomorfológicas del útero**

Cortes uterinos de 5 µm fueron teñidos con hematoxilina-eosina para evaluar características histomorfológicas tales como: altura del epitelio luminal, número de estructuras glandulares, y espesor de estroma subepitelial y miometrio. La evaluación morfométrica se realizó utilizando el programa de análisis de imágenes, Image Pro Plus 5.0.2.9 con kit de captura Pro-Series 128 (Media Cybernetics) (Ramos et al., 2003; Milesi et al., 2012).

#### **b) Expresión de genes vinculados al proceso de implantación**

La expresión de genes involucrados en el proceso implantatorio, tales como, receptores de hormonas esteroideas (receptor de estrógeno alfa (REα) y receptor de progesterona (RP)), el gen homeótico Hoxa10 y la citoquina LIF (leukemia inhibitory factor), se determinó a nivel de ARNm mediante transcripción reversa seguida de PCR en tiempo real (RT-qPCR). La expresión génica se cuantificó por el método de la curva estándar relativa (Milesi et al., 2017).

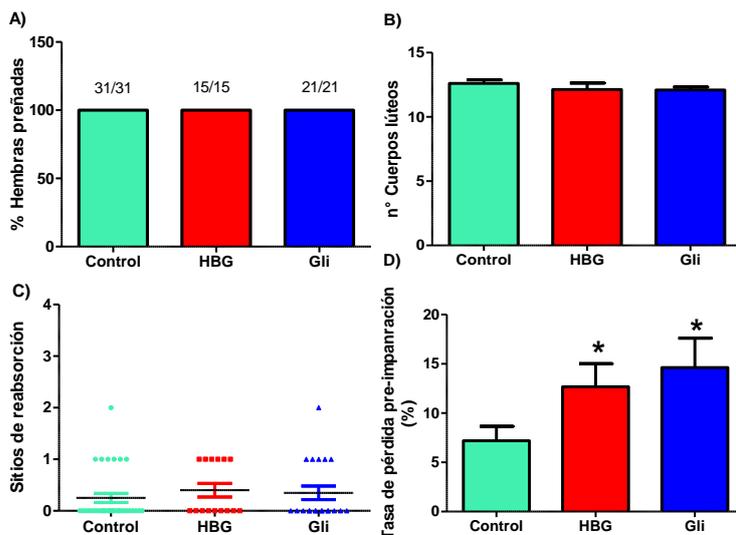
#### **Análisis estadístico**

Los resultados se expresaron como el valor promedio ± SEM. Los datos del test de fertilidad se analizaron mediante el test de varianza (ANOVA) de un solo factor y el test de Tukey para la posterior comparación de medias. El resto de los datos se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal - Wallis, y se utilizó el post test de Dunn para la comparación de pares de grupos.

## **RESULTADOS**

### **La exposición perinatal a Gli o HBG provoca subfertilidad**

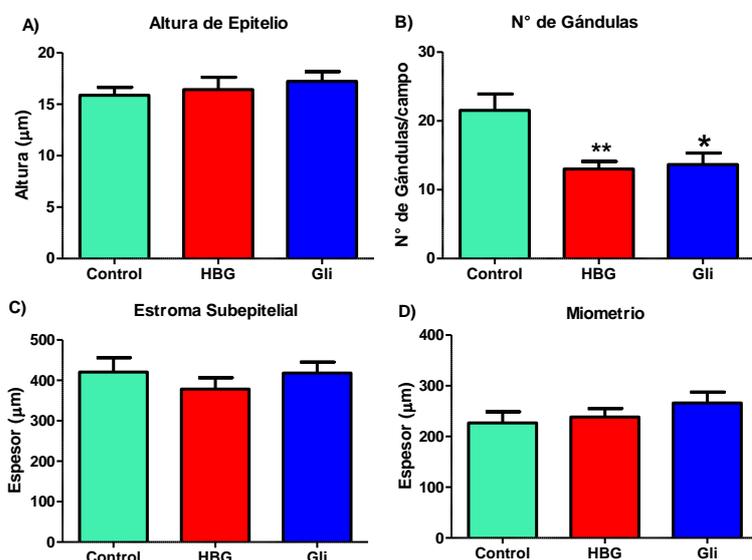
La exposición perinatal a Gli o HBG no afectó el porcentaje de hembras preñadas como se observa en la Figura 1-A. A su vez, no se detectaron diferencias en el número de cuerpos lúteos (CLs/rata: 11-13), lo que indica que la funcionalidad ovárica no resultó afectada por los diferentes tratamientos (Figura 1-B). En forma similar, no se encontraron diferencias en el número de sitios de reabsorción, sugiriendo que el tratamiento con Gli o HBG no afecta el desarrollo y/o crecimiento embrionario post-implantación (Figura 1-C). Sin embargo, se detectó un incremento en el porcentaje de pérdidas embrionarias pre-implantatorias en los grupos expuestos a Gli o HBG (Figura 1-D). Esto pone en evidencia que ambos tratamientos indujeron subfertilidad como consecuencia de la disminución del número de sitios de implantación.



**FIGURA 1.** Evaluación de la aptitud reproductiva de hembras F1 expuestas perinatalmente a Gli o HBG. A) Porcentaje de hembras preñadas. B) Número de cuerpos lúteos. C) Número de sitios de reabsorciones fetales. D) Tasa de pérdida embrionaria pre-implantatoria. (Promedio  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$  vs. control)

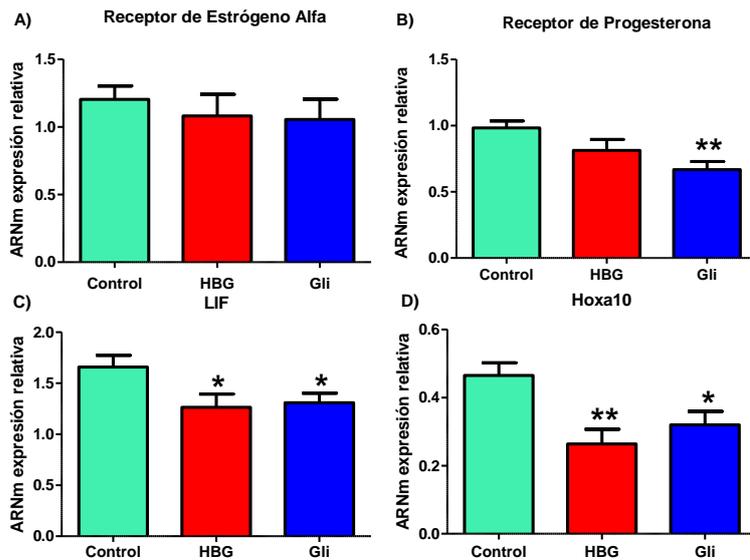
### La exposición perinatal a Gli o HBG altera la diferenciación funcional uterina en el período pre-implantatorio

Para dilucidar los mecanismos uterinos afectados que desencadenaron las fallas implantatorias como resultado de la exposición a Gli o HBG, se evaluaron las características histomorfológicas del útero y la expresión de genes vinculados al proceso de implantación. Parámetros como la altura del epitelio luminal (Figura 2-A) y el espesor del estroma subepitelial (Figura 2-C) y del miometrio (Figura 2-D) no mostraron diferencias entre los grupos experimentales. Por el contrario, la exposición a Gli o HBG provocó una disminución del número de glándulas endometriales (Figura 2-B).



**FIGURA 2.** Características histomorfológicas del útero en animales expuestos perinatalmente a Gli o HBG. A) Altura del epitelio luminal. B) N° de glándulas endometriales. C) Espesor de estroma subepitelial. D) Espesor de miometrio. (Promedio  $\pm$  SEM; \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$  vs. control)

En cuanto a la expresión de moléculas críticas para la implantación embrionaria, en la Figura 3-A se muestra que no hubo diferencias en los niveles de transcritos del RE $\alpha$  entre los grupos experimentales. Sin embargo, se detectó una menor expresión del RP en los animales expuestos a Gli en relación al grupo control (Figura 3-B). Asimismo, ambos tratamientos (HBG y Gli) produjeron una disminución de la expresión tanto de LIF (Figura 3-C) como de Hoxa 10 (Figura 3-D).



**FIGURA 3.** Determinación de la expresión de genes vinculados al proceso de implantación en animales expuestos perinatalmente a Gli o HBG mediante RT-qPCR. A) Receptor de estrógeno alfa (REα), B) Receptor de progesterona (RP), C) LIF, D) Hoxa10. (Promedio ± SEM; \*\*p<0.01, \*p<0.05 vs. control)

### CONCLUSIÓN

En base a los resultados obtenidos, podemos concluir que la exposición perinatal a bajas dosis de glifosato puro o de un formulado comercial a base de glifosato produce subfertilidad en ratas hembras, evidenciada por un menor número de crías implantadas en el útero. Las fallas implantatorias provocadas por la exposición a estos compuestos están asociadas a alteraciones en la diferenciación del útero durante el período pre-implantatorio, caracterizadas por un menor número de glándulas endometriales y una alteración de la expresión de genes claves (RP, Hoxa10, y LIF) para la preparación del útero hacia el estado receptivo. La disminución de la expresión de LIF en los grupos tratados se correlaciona con el menor número de glándulas detectadas, ya que esta molécula se expresa principalmente en glándulas en el período pre-implantatorio. Finalmente, los resultados del presente trabajo demuestran que el glifosato es el principal causante de los efectos observados.

### BIBLIOGRAFÍA

- Mesnage, R., Defarge, N., Spiroux de Vendômois, J., & Séralini, G. E., 2014. Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. *BioMed research international*, 1-8
- Milesi, M.M., Alarcón, R., Ramos, J.G., Muñoz-de-Toro, M., Luque, E.H., & Varayoud, J., 2015. Neonatal exposure to low doses of endosulfan induces implantation failure and disrupts uterine functional differentiation at the pre-implantation period in rats. *Molecular and cellular endocrinology*, 401, 248-259.
- Milesi, M.M., Varayoud, J., Bosquiazzo, V.L., Muñoz-de-Toro, M., & Luque, E.H., 2012. Neonatal exposure to low doses of endosulfan disrupts the expression of proteins regulating uterine development and differentiation. *Reproductive Toxicology*, 33(1), 85-93.
- Milesi, M.M., Varayoud, J., Ramos, J.G., & Luque, E.H., 2017. Uterine ERα epigenetic modifications are induced by the endocrine disruptor endosulfan in female rats with impaired fertility. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 454, 1-11.
- Pacini, G., Varayoud, J., Alarcón, R., Luque, E.H., & Milesi, M.M., 2016. Perinatal exposure to a glyphosate based herbicide causes implantation failures and transgenerational induction of congenital anomalies in rats. *Medicina*, 76(1), 274.
- Ramos, J. G., Varayoud, J., Kass, L., Rodríguez, H., Costabel, L., Muñoz-de-Toro, M., & Luque, E. H., 2003. Bisphenol A induces both transient and permanent histofunctional alterations of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in prenatally exposed male rats. *Endocrinology*, 144(7), 3206-3215.
- Varayoud, J., Ramos, J. G., Bosquiazzo, V. L., Lower, M., Munoz-de-Toro, M., & Luque, E. H., 2011. Neonatal exposure to bisphenol A alters rat uterine implantation-associated gene expression and reduces the number of implantation sites. *Endocrinology*, 152(3), 1101-1111.