

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de
MAGÍSTER EN SALUD AMBIENTAL

“Efectos de la exposición neonatal a un formulado de glifosato sobre el ovario de la oveja (*Ovis aries*)”

Ing. Agr. Gisela H. Dioguardi

Director de Tesis: Oscar E. Rivera

Co-director de Tesis: Enrique H. Luque

Facultad de Ciencias Agrarias – Universidad Nacional de Lomas de Zamora

-2020-

*A mis padres **Mari y Alberto**, por su amor incondicional*

*A mi compañero **Facundo** y mi hija **Luna**, por compartir mis sueños*

*A mi hermano **Leonardo** y a mi sobrinos **Matías y Federico** por su compañía*

Agradecimientos

A mi director el **Dr. Oscar Rivera**, especialmente por su enorme y constante compromiso con mi formación, por su infinita paciencia y ayuda, por alentarme siempre y darme la confianza necesaria. Y sobre todo gracias por su invaluable tiempo dedicado a este proyecto.

A mí Co-Director **Dr. Enrique Luque**, por brindarme su ayuda, su tiempo y su confianza.

A las autoridades de la **Facultad de Ciencias Agrarias y a la Universidad Nacional de Lomas de Zamora** por apoyar la formación de sus docentes.

Al **Consejo Interuniversitario Nacional**, por brindarme la beca para la finalización del presente Trabajo de Tesis.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral especialmente **a los integrantes del Instituto de Salud y Ambiente del Litoral** por su colaboración.

A mis **compañeras de Maestría** por el apoyo, su afecto y amistad, porque siempre me hicieron sentir en casa.

A mis **compañeros de la Cátedra de la Facultad de Ciencias Agrarias** por su tiempo y dedicación para revisar la tesis.

PUBLICACIONES

Publicaciones *full paper*:

- R Alarcón, P Ingaramo, OE Rivera, **GH Dioguardi**, MR Repetti, LD Demonte, MM Milesi, J Varayoud , M Muñoz-de-Toro, EH Luque (2019) Neonatal exposure to a glyphosate-based herbicide alters the histofunctional differentiation of the ovaries and uterus in lambs. *Mol Cell Endocrinol* 482:45-56.

- R Alarcón, OE Rivera, PI Ingaramo, MV Tschopp, **GH Dioguardi**, MM Milesi, M Muñoz-de-Toro, EH Luque (2020) Neonatal exposure to a glyphosate-based herbicide alters the uterine differentiation of prepubertal ewe lambs. *Environ Pollut* 265(Pt B):114874.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	i
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	vii
I- INTRODUCCIÓN.....	1
1.- <i>Los ovarios</i>.....	2
1.1.- Desarrollo embrionario y fetal del ovario en la oveja.....	2
1.1.1.- Origen de los ovocitos en la oveja.....	3
1.1.2.- Foliculogénesis.....	4
1.1.2.1.- Ensamblado folicular.....	4
1.1.2.2.- Activación folicular.....	5
1.1.2.3.- Formación de folículos preantrales y antrales.....	6
1.2.- Desarrollo ovárico postnatal: etapa prepuberal.....	7
2.- <i>Marcadores asociados al ciclo celular</i>.....	8
3.- <i>Perturbadores Endocrinos</i>.....	8
3.1.- Generalidades.....	8
3.2.- Efecto de PEs sobre animales de interés zootécnico	10
3.2.1- Importancia de los PEs en el desarrollo del ovario.....	11
3.3.- Glifosato.....	12
3.3.1.- La exposición a glifosato y su importancia en la salud humana y de los animales.....	13
4.- <i>La oveja como modelo animal de investigación en reproducción</i>.....	14
5.- <i>Importancia de la oveja en la producción animal</i>.....	15

II- OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	18
Objetivo general.....	19
Objetivos Específicos.....	19
Hipótesis.....	19
III- MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
1.-Experimento 1: Efectos de la exposición postnatal temprana a bajas dosis de HBG sobre el desarrollo del ovario de la cordera (administración subcutánea vs. oral).....	21
1.1.- Diseño experimental.....	21
1.2.-Animales.....	22
1.3.-Elección de la dosis de glifosato.....	24
1.4.-Obtención de muestras de ovario.....	24
1.4.1.-Procesamiento de las muestras de ovario.....	25
1.4.2.-Obtención de cortes histológicos.....	26
1.4.3.-Estudio morfométrico.....	27
1.4.4.- Evaluación de folículos atrésicos.....	30
1.4.5.-Evaluación de proliferación celular.....	30
1.4.6.-Cuantificación del marcador de proliferación celular.....	31
1.5.-Obtención de muestras de suero.....	31
1.6.-Determinación en suero de glifosato y AMPA.....	31
2.-Experimento 2: Efecto de la exposición postnatal temprana a bajas dosis de HBG sobre el desarrollo del ovario de la cordera (administración subcutánea)	31
2.1.- Diseño experimental.....	32
3.- Análisis Estadísticos.....	33
IV. RESULTADOS.....	34

1.- Experimento 1: Exposición a HBG por vía subcutánea vs oral y desarrollo del ovario.....	35
1.1.-Peso ovárico	35
1.2.-Recuento folicular	36
1.2.1.- Desarrollo folicular en corderas tratadas con HBG por ambas vías de exposición... ..	36
1.2.2.- Incidencia de FMOs en corderas tratadas con HBG por ambas vías....	36
1.3.- Proliferación celular y atresia folicular.....	37
1.3.1.- Expresión de Ki67 en corderas expuestas a HBG por ambas vías.....	37
1.3.2.- Incidencia de folículos atrésicos en corderas tratadas con HBG por ambas vías.....	39
1.4.- Glifosato y AMPA en suero de corderas expuestas a HBG por ambas vías....	39
2.- Experimento 2: Exposición a HBG por vía subcutánea vs oral y desarrollo del ovario.....	40
2.1.-Peso ovárico.....	40
2.2.- Recuento folicular.....	41
2.2.1.- Desarrollo folicular en corderas expuestas con HBG.....	41
2.2.2.- Incidencia de FMOs en corderas tratadas con HBG.....	42
2.3.-Proliferación celular y atresia folicular.....	43
2.3.1.- Expresión de Ki67 en corderas tratadas con HBG por vía subcutánea	43
2.3.2.- Folículos atrésicos en los animales tratados con HBG.....	43
V- DISCUSIÓN.....	45
VI- CONCLUSIONES.....	53
VII-BIBLIOGRAFÍA.....	55

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

°C	Grados Celcius
A	Andrógenos
ADN	Acido desoxirribonucleico
AMPA	Acido aminometilfosfónico
b-HCH	b-hexachlorocyclohexane
BrdU	bromo-desoxiuridina
CDKI	Inhibidores de Kinasas dependientes de ciclinas
CDKN1A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A
CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C
CDKN1B	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
CDKs	Kinasas dependientes de ciclinas
CGPs	Células germinales primitivas
DDT	Diclorodifeniltricloroetanol
DES	Dietilelbestrol
DPN	Dia posnatal
DRf	Dosis de referencia
E2	17 β estradiol
EFSA	European Food Safety Authority
Eg	Estrógenos
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FDA	Food and Drug Administration, USA
FMOs	Folículos multiovulares
FNTα	Factor de necrosis tumoral
FOP	Falla Ovárica Prematura
FSH	Hormona foliculo estimulante
G	Gramo/s

HAM	Hormona antimülleriana
HBG	Herbicida a base de glifosato
HCB	Hexachlorobenzene
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
IdU	iodo- desoxiuridina
Kg	Kilogramo/s
LH	Hormona luteinizante hipofisaria
MCM-2	minichromosome maintenance protein 2
Mg	Miligramo/s
MTT	3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
P	Progesterona
p,p´DDE	p,p´dichlorodipenyldichloroethylene
p21	Kinasa dependiente de Ciclina ó CDKN1A
p27	Kinasa dependiente de Ciclina ó CDKN1B
p57	Kinasa dependiente de Ciclina ó CDKN1C
PBS	Phosphate Buffer Solution
PCBs	Bifenilos policlorados
PCNA	antígeno nuclear de proliferación celular
PE	Perturbador endócrino
RE	Receptor de estrógeno
RR	resistentes al glifosato
SOP	Síndrome del Ovario Poliquístico
XTT	2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

Resumen

Los ovarios son las gónadas femeninas responsables de la producción cíclica de ovocitos fertilizables y de mantener una producción adecuada de los esteroides sexuales, estrógenos y progesterona. El folículo ovárico es una estructura formada por un ovocito rodeado por diferentes capas de células somáticas. La foliculogénesis es el proceso mediante el cual los folículos ováricos inmaduros (denominados folículos primordiales) se desarrollan y se convierten en folículos preovulatorios o mueren por atresia. Este proceso se inicia durante la vida embrionaria y continúa a lo largo de la vida reproductiva de la hembra; los folículos atraviesan diferentes etapas de crecimiento y desarrollo, hasta que se produce la ovulación o entran en atresia.

Durante el desarrollo embrionario y postnatal temprano del ovario ocurre el ensamblado folicular (formación de los folículos primordiales) y la activación folicular (transición de folículos primordiales a folículos primarios). Por lo tanto, esta etapa del desarrollo folicular es un período crítico, durante el cual la exposición a compuestos químicos con actividad hormonal (denominados perturbadores endócrinos, PEs) puede alterar la diferenciación organogénica del ovocito y del folículo e inducir cambios permanentes en la estructura y función del ovario, con consecuencias adversas para la salud reproductiva de la hembra.

El glifosato es el ingrediente activo de una serie de formulados con actividad herbicida de amplio espectro, que se utilizan de forma masiva en todo el mundo para controlar las malezas en áreas tanto urbanas como rurales. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer de la Organización Mundial de la Salud informó que “hay suficientes evidencias de carcinogenicidad en animales de laboratorio”, por lo que lo clasificó en el año 2015 como “probable carcinógeno para el ser humano” (Grupo 2A). Por otro lado, hay estudios que sugieren que los herbicidas en base a glifosato (HBG) pueden tener actividad estrogénica a dosis bajas (s.: ambientalmente relevantes) y ser clasificados como Pes.

Los trabajos de investigación en especies de interés zootécnico tienen la doble importancia tanto biomédica como comercial. Los animales destinados a producción (como la oveja) y debido a que en condiciones naturales pastan en los campos, son altamente susceptibles a la contaminación con herbicidas como los HBG; por lo que resulta de gran importancia investigar los efectos adversos sobre la salud animal y como estos afectan su producción.

Los antecedentes de las consecuencias de la exposición a glifosato y sus formulaciones comerciales, en su mayoría están limitados a los efectos sobre el desarrollo y la funcionalidad del tracto reproductor masculino. Por el contrario, los estudios sobre el aparato genital femenino son escasos. En base a esto, en la presente tesis decidimos estudiar la influencia de la exposición postnatal a bajas dosis de un HBG sobre la diferenciación y desarrollo del ovario de la cordera.

Nuestra hipótesis de trabajo postula que la exposición a agroquímicos con potencial actividad xenoestrogénica (como los formulados en base a glifosato) en períodos hormono-sensibles del desarrollo postnatal temprano induce alteraciones en procesos críticos relacionados con la histomorfología normal de los ovarios, afectando negativamente la capacidad funcional del órgano en la vida adulta.

Para ello, fueron expuestas corderas desde el nacimiento hasta el día postnatal (DPN) 14 con solución fisiológica (control) o una formulación comercial a base de glifosato en una dosis de 2 mg de glifosato/kg/día (en el orden de magnitud de la dosis segura para glifosato de 1mg/kg/día, definida por la EPA). El primer objetivo fue desarrollar un modelo animal de exposición postnatal a un herbicida a base de glifosato comparando la vía de exposición subcutánea con la vía oral. En el DPN 45 (30 días después de finalizar con el tratamiento con HBG) se extrajeron los ovarios y se determinó su peso y el de las corderas. Los ovarios se incluyeron en parafina y en cortes seriados teñidos con picosirius se evaluaron el desarrollo folicular, la incidencia de Folículos Multiovulares (FMOs) y el porcentaje de folículos atrésicos. En otros cortes de ovario, por medio de inmunohistoquímica para Ki67, se evaluó el índice de proliferación celular en los folículos ováricos. En estas mismas corderas, en los DPN 15 y DPN 45 se tomaron muestras de suero para cuantificar los niveles circulantes de glifosato y su metabolito AMPA.

En ambas vías de exposición postnatal con HBG no se modificó el peso de las corderas ni de los ovarios en el DPN 45. Las corderas expuestas a HBG presentaron un menor porcentaje de folículos primordiales, esta reducción en la población de folículos primordiales estuvo asociada a un incremento en las dos categorías subsiguientes de folículos en crecimiento, folículos de transición y folículos primarios. Por lo que podemos sugerir que la exposición a HBG durante éste periodo estimuló el proceso de reclutamiento inicial (activación) y disminuyó la reserva de folículos primordiales. Además, en las corderas expuestas a HBG, se observó un incremento en la incidencia de FMOs y de folículos atrésicos. La mayor incidencia de FMOs estaría indicando que el tratamiento con HBG alteró el proceso normal de ensamblado

folicular originando un aumento en la formación de estas estructuras foliculares particulares. La mayor proporción de folículos atrésicos en las corderas tratadas con HBG sería como consecuencia de la aceleración del proceso de reclutamiento folicular. Además, independientemente de la vía de administración de HBG, los ovarios de las corderas tratadas mostraron un mayor porcentaje de células en proliferación (evaluado por expresión de Ki67) de las células de la granulosa y de la teca de los folículos antrales pequeños.

Los niveles de glifosato en suero al final del período de exposición (DPN15) fueron semejantes en las corderas expuestas por vía subcutánea y vía oral. En el DPN45, los niveles séricos de glifosato estaban por debajo del límite de detección en todos los grupos experimentales. No se observaron niveles detectables de AMPA en el DPN15 ni en el DPN45 (día en que se obtuvieron los ovarios) en ninguno de los grupos experimentales. Para investigar si los animales experimentales habían sido expuestos a glifosato de manera no intencional a la que se aplicó experimentalmente, se midieron los niveles de glifosato y de AMPA en el agua de bebida de las corderas. No se detectaron niveles de ninguna de las drogas mencionadas.

Se realizó un segundo experimento utilizando el mismo diseño experimental pero utilizando solo la vía sc, ya que ambas vías de administración habían resultado con los mismos niveles circulantes de glifosato y producido los mismos efectos adversos en los tejidos estudiados. Se seleccionó la vía sc ya que es más simple su administración y se garantiza la inyección del producto. El objetivo de este segundo experimento fue profundizar los estudios del efecto que produce el HBG sobre el ovario y tracto reproductor de la cordera, investigando las vías de señalización y los genes responsables de las alteraciones en la proliferación celular en el ovario y el útero que habíamos demostrado previamente. La primera etapa de este segundo experimento fue repetir la evaluación de los parámetros estudiados en el primer experimento (recuento folicular, incidencia de FMOs, y proliferación celular) obteniéndose los mismos resultados utilizando un número mayor de animales experimentales.

En la presente tesis decidimos investigar el efecto de un HBG sobre el ovario siendo nuestra intención utilizar una exposición que semeje las condiciones “ambientales” o condiciones en las cuales los ovinos se encuentran expuestos. No fue nuestro objetivo conocer cual/es de los componentes del formulado es el responsable del efecto observado. Por ello, los resultados presentados no sabemos si son debidos

al glifosato, a los co-formulantes, o a la mezcla de ambos. Estudios futuros con un diseño experimental adecuado son necesarios para responder este interrogante.

Los efectos observados en la presente tesis a nivel del ovario como resultado de la exposición neonatal a HBG (alteración de la relación porcentual entre los distintos tipos foliculares, aumento de la proliferación de las células de la granulosa, aumento del porcentaje de FMOs, aumento de la atresia folicular) se considera que son el resultado de alterar vías de señalización estrogénicas y que estas alteraciones se mantuvieron aun cuando la exposición al químico había cesado (conocido como efecto organizacional y permanente). Estas dos características permiten sugerir que el HBG puede ser clasificado como un perturbador endocrino. Sería muy interesante realizar futuros estudios utilizando el mismo protocolo de exposición a HBG pero dejando a las corderas que sean adultas para investigar las alteraciones ováricas y los diferentes parámetros de su fertilidad. El conocer los efectos de la contaminación con un herbicida ampliamente utilizado en nuestro país, como es el caso de los HBG, sobre la fertilidad de especies de interés zootécnico es de gran importancia para la producción animal.

Nuestros resultados aportan nuevas evidencias a favor de la potencial actividad adversa de los HBG y de su posible mecanismo de acción como PE. Creemos que esta información contribuirá al desarrollo de políticas sanitarias y de prevención que minimicen el riesgo para la salud animal y humana que implica la exposición a este agroquímico. Como también políticas para minimizar o evitar las consecuencias adversas sobre la producción animal.

Por último, consideramos que para este herbicida, al igual que para tantos otros compuestos con actividad de PE a los que estamos expuestos, sería muy importante para nuestra salud y la del ecosistema tener en cuenta el principio de precaución: *“Cuando haya peligro de daño grave o irreversible, la ausencia de información o certeza científica no deberá utilizarse como razón para postergar la adopción de medidas eficaces para impedir la degradación del medio ambiente”*.

ABSTRACT

The ovaries are the female gonads responsible for the cyclical production of fertilizable oocytes and for the maintenance of adequate production of sex steroids, estrogens and progesterone. The ovarian follicle is a structure formed by an oocyte surrounded by different layers of somatic cells. Folliculogenesis is the process by which immature ovarian follicles (called primordial follicles) either develop into pre-ovulatory follicles or die of atresia. This process begins during embryonic life and continues throughout the female's reproductive life; the follicles go through different stages of growth and development, until ovulation occurs or they enter atresia.

It is during embryonic and early postnatal development of the ovary, that the follicular assembly (formation of primordial follicles) and follicular activation (transition from primordial follicles to primary follicles) occur. Therefore, this stage of follicular development is a critical period, during which exposure to chemical compounds with hormonal activity (called endocrine disruptors, EDCs) can alter the organogenetic differentiation of the oocyte and the follicle, therefore inducing permanent changes in the structure and function of the ovary, with adverse consequences for the reproductive health of the female.

Glyphosate is the active ingredient in a number of broad spectrum herbicidal formulations, which are used massively worldwide to control weeds in both urban and rural areas. The International Agency for Research on Cancer of the World Health Organization reported that "there is sufficient evidence of carcinogenicity in laboratory animals", which is why it classified it in 2015 as "probable human carcinogen" (Group 2A). On the other hand, there are studies that suggest glyphosate-based herbicides (GBH) may have estrogenic activity at low doses (s: environmentally relevant) and be classified as PEs.

Research experiments on species of zootechnical interest are of dual biomedical and commercial importance. Animals intended for production (such as sheep) and because they graze in the fields under natural conditions, are highly susceptible to contamination with herbicides such as GBH; therefore it is of great importance to investigate the adverse effects on animal health and how these affect its production.

The background information on the consequences of exposure to glyphosate and its commercial formulations is mostly limited to the effects on the development and functionality of the male reproductive tract. On the contrary, studies on the female

genital apparatus are scarce. Taking this into consideration, in this thesis we decided to study the influence of postnatal exposure at low doses of a GBH on the differentiation and development of the lamb ovary.

Our hypothesis puts forward the idea that exposure to agrochemicals with potential xenoestrogenic activity (such as those formulated based on glyphosate) in hormone-sensitive periods of early postnatal development induces alterations in critical processes related to the normal histomorphology of the ovaries, negatively affecting the ability function of the organ in adult life which would have adverse consequences on fertility and animal production.

For this purpose, lambs were exposed from birth to postnatal day (PND) 14 with physiological solution (control) or a commercial formulation based on glyphosate in a dose of 2 mg of glyphosate / kg / day (in the order of magnitude of the safe dose for glyphosate of 1mg / kg / day, defined by the EPA). The first objective was to develop an animal model of postnatal exposure to a glyphosate-based herbicide comparing the subcutaneous route of exposure vs the oral route. In PND 45 (30 days after the end of GBH treatment), the ovaries were removed and their weight and that of the lambs were determined. The ovaries were embedded in paraffin and follicular development, the incidence of Multiovular Follicles (MOFs) and the percentage of atresic follicles were evaluated in serial sections stained with picosirius. In other ovarian sections, using Ki67 immunohistochemistry, the rate of cell proliferation in the ovarian follicles was evaluated. In these same lambs, serum samples were taken in PND 15 and PND 45 to quantify the circulating levels of glyphosate and its metabolite AMPA.

In both routes of postnatal exposure with GBH, the weight of the lambs and the ovaries did not change in the PND 45. The lambs exposed to GBH had a lower percentage of primordial follicles, this reduction in the population of primordial follicles was associated with a increase in the two subsequent categories of growing follicles, transition follicles and primary follicles. Therefore, we can suggest that exposure to GBH during this period stimulated the initial recruitment process (activation) and decreased the reserve of primordial follicles. Furthermore, in the lambs exposed to GBH, an increase in the incidence of MOFs and atresic follicles was observed. The higher incidence of MOFs would be indicating that treatment with GBH altered the normal follicular assembly process, causing an increase in the formation of these particular follicular structures. The higher proportion of atresic follicles in the lambs treated with GBH would be as a consequence of the acceleration of the follicular recruitment process. Furthermore, regardless of the route of administration of GBH, the

ovaries of the treated lambs showed a higher percentage of proliferating cells (evaluated by Ki67 expression) of the granulosa and theca cells of the small antral follicles.

Serum glyphosate levels at the end of the exposure period (PND15) were similar in lambs exposed subcutaneously and orally. In PND45, serum glyphosate levels were below the detection limit in all experimental groups. No detectable levels of AMPA were observed in PND15 or PND45 (day the ovaries were obtained) in any of the experimental groups. To investigate whether the experimental animals had been exposed to glyphosate unintentionally to what was applied experimentally, glyphosate and AMPA levels were measured in the drinking water of the lambs. No levels of any of the mentioned chemicals were detected.

A second experiment was performed using the same experimental design but using only the sc route, since both routes of administration had resulted in the same circulating levels of glyphosate and produced the same adverse effects on the tissues studied. The sc route was selected since its administration is simpler and the injection of the product is guaranteed. The objective of this second experiment was to pursue further studies on the effect that HBG produces on the lamb's ovary and reproductive tract, investigating the signaling pathways and genes responsible for the alterations in cell proliferation in the ovary and uterus that we had previously demonstrated. The first stage of this second experiment was to repeat the evaluation of the parameters studied in the first experiment (follicular count, incidence of MOFs and cell proliferation) obtaining the same results using a larger number of experimental animals.

In the present thesis we decided to investigate the effect of a GBH on the ovary, our intention being to use an exposure that resembles the "environmental" conditions or conditions in which the sheep are exposed. It was not our objective to know which component of the formulation is responsible for the observed effect. Therefore, it is not known if the results presented are due to glyphosate, co-formulants, or a mixture of both. Future studies with an adequate experimental design are necessary to answer this question.

The effects observed in the present thesis at the ovary level as a result of neonatal exposure to GBH (alteration of the percentage relationship among the different follicular types, increased proliferation of granulosa cells, increased percentage of MOFs, increased follicular atresia) considers that they are the result of altering estrogenic signaling pathways and that these alterations were maintained even

when exposure to the chemical had ceased (known as permanent and organizational effect). These two characteristics suggest that GBH can be classified as an endocrine disruptor. It would be very interesting to carry out future studies using the same GBH exposure protocol but leaving the lambs to be adults to investigate the ovarian alterations and the different parameters of their fertility. Awareness of the effects of contamination with a widely used herbicide in our country, such as GBH, on the fertility of species of zootechnical interest is of great importance for animal production.

Our results provide new evidence in favor of the potential adverse activity of GBHs and their possible mechanism of action as EDC. We believe that this information will contribute to the development of health and prevention policies that minimize the risk to animal and human health that exposure to this agrochemical implies. As well as policies to minimize or avoid adverse consequences on animal production.

Finally, we consider that for this herbicide, as for so many other compounds with EDC activity to which we are exposed, it would be very important for our health and that of the ecosystem to take into account the precautionary principle: *“When there is danger of damage serious or irreversible, the absence of information or scientific certainty should not be used as a reason to postpone the adoption of effective measures to prevent the degradation of the environment”*.

-Introducción-

1.- Los ovarios

Los ovarios son las gónadas femeninas responsables de la producción cíclica de ovocitos (huevos) fertilizables y de mantener una producción adecuada de los esteroides sexuales, estrógenos (Eg) y progesterona (P) [1]. Estas hormonas participan en numerosos procesos fisiológicos tales como el desarrollo y diferenciación del tracto genital, el mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios y la libido, el transporte de ovocitos y espermatozoides al lugar de la fecundación, el tránsito de los embriones asegurando su implantación exitosa, el desarrollo del útero durante la gestación, etc. [1, 2]. La síntesis y secreción de hormonas ováricas se encuentra regulada por el sistema neuroendócrino y controlada por los mecanismos de retroalimentación que operan en el eje hipotálamo-hipofiso-gonadal [3].

Los ovarios presentan cambios morfofisiológicos significativos durante el desarrollo embrionario, fetal y postnatal temprano que están controlados hormonalmente.

1.1.- Desarrollo embrionario y fetal del ovario en la oveja

El desarrollo embrionario de los ovarios comienza alrededor del día 23 de gestación (duración de la gestación en la oveja: 145 días) en las crestas genitales que se encuentran en la región mesonéfrica (lugar de los futuros riñones). En este lugar se cumplen numerosos eventos celulares, tales como la migración de las células germinales primordiales desde el saco vitelino hacia las crestas genitales para formar parte de la gónada indiferenciada (futuro ovario). Esta gónada indiferenciada cuando el sexo genotípico del embrión es XX se transforma en ovario. Durante el período fetal el ovario presenta una serie de ondas de crecimiento folicular y de atresia folicular, además de mitosis y apoptosis de las células germinales [4].

En el ovario de las hembras mamíferas ocurren pérdidas significativas en el número de células germinales durante la vida intrauterina y desde el nacimiento hasta la pubertad. En la oveja, desde la mitad de la gestación y hasta el nacimiento, la cantidad de células germinales disminuye unas 10 veces [5]. De esta forma, la población de ovogonias en el ovario fetal de la oveja es originalmente de alrededor de 900.000 y al momento del nacimiento se ha reducido a alrededor de 100.000 [5]. La pérdida prenatal de células germinales parece ser un mecanismo universal de selección en todos los vertebrados mamíferos estudiados y se produce mediante apoptosis [6].

1.1.1.- Origen de los ovocitos en la oveja

Como en todas las hembras de mamíferos, los ovocitos se originan a partir de un grupo de células epiblasticas no alineadas que durante la gastrulación se diferencian en células germinales primitivas (CGPs) [7]. Estas células se desplazan hasta el endodermo del saco vitelino, proliferando y migrando desde este saco a través del intestino primitivo hasta ubicarse en la porción caudal del embrión. Finalmente, llegan a las crestas genitales para ser parte de la gónada indiferenciada, formando los pliegues o primordios gonadales ubicados ventralmente a la región mesonéfrica (proceso que ocurre en el día 23 de gestación en la oveja). No está aún claramente definido si esta migración es por movimientos ameboideos de las células o si son empujadas por el crecimiento de los tejidos vecinos [8]. Una vez que las CGPs llegan a las crestas genitales, inician un proceso de diferenciación en ovogonias (alrededor del día 55 de gestación) [4], con una elevada actividad mitótica [9]. En un ovario en formación, la división mitótica de las CGPs forma grupos de ovogonias las que se relacionan unas con otras por puentes citoplasmáticos intercelulares. Estas ovogonias se rodean de células somáticas derivadas del mesonefros formando nidos de células germinales (*clusters*), también llamados cordones corticales [10]. Ya en los nidos, las ovogonias inician el proceso de la primera meiosis con la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN) para convertirse en ovocitos primarios. Por lo que las ovogonias atraviesan por los subsecuentes estadios de la profase I de la meiosis I (preleptoteno, leptoteno, zigoteno y paquiteno) para quedar arrestadas en el estadio de diploteno hasta el momento de la ovulación. En este estadio temprano de la meiosis I, los ovocitos son extremadamente vulnerables, muchos de ellos degeneran por apoptosis. Los ovocitos que sobrevivan dentro del folículo ovárico hasta la pubertad, estarán en condiciones de alcanzar un grado tal de maduración y crecimiento que les permitirá responder al estímulo de la hormona luteinizante hipofisaria (LH) para completar su proceso meiótico y convertirse en una célula haploide [10].

Actualmente se considera que el ovocito cumple un papel relevante en la organización folicular durante los procesos que conducen hasta la ovulación porque colabora con el desarrollo del folículo [11, 12]. Se ha determinado que tiene una activa participación en el desarrollo y la diferenciación de las células de la granulosa, aumenta la sensibilidad de éstas a las gonadotrofinas hipofisarias, estimula la diferenciación de las células de la teca, promueve la expansión del *cumulus ooforus* y la ruptura final de la pared folicular durante la ovulación. Por su parte, las células de la granulosa son indispensables para el crecimiento del ovocito, la meiosis y la maduración citoplasmática [11]. Al alcanzar su umbral de tamaño, el ovocito suprime la

capacidad de las células de la granulosa de promover su propio crecimiento [13]. Esto último indica que el ovocito no sólo determina el crecimiento del folículo sino también, indirectamente, su propio crecimiento. Podemos destacar que la maduración del ovocito y el desarrollo folicular son un excelente ejemplo de mecanismos de control parácrino con intercambio de información entre ambas estructuras.

1.1.2.- Foliculogénesis

Generalidades

Se llama folículo ovárico a la estructura formada por un ovocito rodeado por una o más capas de células somáticas. La foliculogénesis es el proceso mediante el cual los folículos ováricos inmaduros (primordiales) se desarrollan y se convierten en folículos preovulatorios o mueren por atresia [14]. Este proceso se inicia durante la vida embrionaria y continúa a lo largo de la vida reproductiva de la hembra; los folículos pasan por diferentes etapas de crecimiento y desarrollo, hasta que se produce la ovulación o entran en atresia [15].

Durante el desarrollo embrionario y postnatal temprano del ovario se cumplen dos procesos importantes [16, 17]:

- 1.- el **ensamblado folicular** (formación de los folículos primordiales)
- 2.- la transición de folículos primordiales a folículos primarios (reclutamiento inicial o **activación folicular**)

1.1.2.1.- Ensamblado folicular

La fase inicial de la foliculogénesis conocida como “**ensamblado folicular**” está regulada por factores de crecimiento que actúan de manera parácrina e influenciada por concentraciones locales de hormonas esteroides. Durante la etapa prenatal, los ovocitos están dispuestos en grupos denominados “nidos o *clusters*”. Luego, dependiendo de la especie animal, el ensamblado folicular ocurre durante la gestación (ej.: oveja, vaca, mujer) o luego del nacimiento (ej.: rata, ratón). Durante este proceso un grupo de ovocitos muere por apoptosis y los que sobreviven se rodean de una capa simple de células somáticas planas (células inmaduras de la granulosa o también llamadas pregranulosa) formando los folículos primordiales [18] (Figura 1). Los ovocitos que no completan el ensamblado folicular permanecen en grupos de dos o más y son rodeados por las células somáticas planas y se los conoce como folículos multiovulares.

Se considera que la población de folículos primordiales (reserva de folículos ováricos) se forma durante la vida fetal y neonatal y que, una vez establecida, esta

población no prolifera. Sin embargo, hay algunos grupos de investigación que sostienen que hay formación de ovocitos a lo largo de la vida adulta de la hembra [19]. Apoyando esta observación se ha demostrado que, en reptiles, hay proliferación de células germinales en la gónada luego del nacimiento [20]. Para gran parte de la comunidad científica, desde el momento del nacimiento se establece la reserva de folículos primordiales que se convertirán en la fuente de gametas femeninas durante la vida reproductiva de la hembra [5].

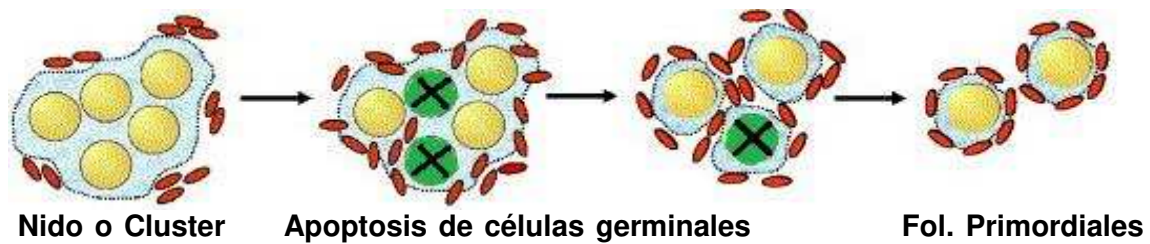


Figura 1. Proceso de ensamblado folicular. En verde se resaltan los ovocitos que mueren por apoptosis. En el extremo derecho del esquema se muestran los folículos primordiales formados, rodeados por las células de la pregranulosa. (Modificada de Rivera, 2014, Tesis Doctoral).

En la oveja, el ensamblado folicular comienza alrededor del día 75 de gestación [4, 21]. Se cree que la supervivencia de un ovocito depende de la capacidad de completar el proceso del ensamblado folicular para formar un folículo primordial [22]. Los factores endócrinos, que se presumen originados en el ovario, pueden influir y controlar este proceso. Se ha demostrado que en él intervienen varios factores de crecimiento tales como el factor de necrosis tumoral alfa ($FNT\alpha$), neurotrofinas, inhibinas, y el factor de diferenciación y crecimiento 9 (*Growth differentiation factor 9*) [23, 24]. Además de estos factores de crecimiento también actúa la hormona antimülleriana (HAM) que ejerce un efecto inhibitorio sobre el desarrollo folicular temprano. Las hormonas esteroides también controlan la foliculogénesis. Se ha demostrado, en estudios *in vivo* e *in vitro*, que tanto la P como el 17β estradiol (E2) alteran el ensamblado folicular inhibiendo el proceso de apoptosis de ovocitos en la rata [18].

1.1.2.2.- Activación folicular

La **activación** es un proceso complejo en la biología del ovario y poco se conoce acerca de su mecanismo de control. Esta fase incluye el crecimiento de algunos folículos primordiales mientras que otros permanecen quiescentes por meses, años o décadas dependiendo de la especie animal [1]. De esta forma, los folículos

primordiales que inicialmente se mantienen quiescentes son gradualmente reclutados a lo largo de la vida reproductiva de la hembra.

El proceso de **activación** comienza alrededor del día 100 de gestación en la oveja y es cuando se inicia la transición de folículo primordial a primario. Se trata de un proceso irreversible que incluye la transformación de las células de la granulosa de planas a cuboides (Figura 2).

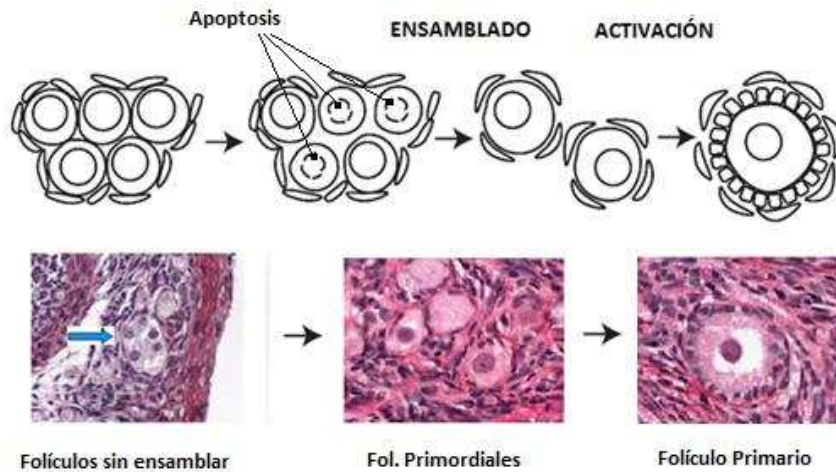


Figura 2. Proceso de ensamblado folicular y activación de folículos primordiales en la oveja. (Representación esquemática modificada de Kezele y col., 2005).

Los mecanismos de **ensamblado folicular** y **activación** están regulados localmente por factores de crecimiento y hormonas esteroides (ej: P, Eg, andrógenos - A-) que, en todas las especies de mamíferos estudiadas, son independientes de la acción de las gonadotrofinas hipofisarias (Hormona Folículo Estimulante –FSH- y LH) [16]. De modo que en esta etapa temprana, la foliculogénesis es estimulada por otros factores, muchos de los cuales son aún desconocidos [25].

Como resultado de una activación inapropiada, se han descrito ciertos desórdenes reproductivos [17]. Por lo tanto, es fundamental que los mecanismos que controlan el ensamblado y la activación folicular sean normales, tanto para establecer el adecuado inicio de la vida reproductiva de la hembra (en la pubertad) como para que tenga un período de fertilidad prologando. **Ensamblado** y **activación folicular** están reconocidos como los momentos más importantes y críticos de la foliculogénesis y se especula que son los que van a afectar directamente la duración de la vida reproductiva de la hembra [17].

1.1.2.3.- Formación de folículos preantrales y antrales

Para el día 120 de desarrollo embrionario de la oveja, se verifica la presencia de folículos preantrales o secundarios caracterizados por contener varias capas de

células de la granulosa; y a partir del día 135 empiezan a observarse folículos antrales o terciarios [4]. En este período el ovocito comienza a crecer en diámetro, la capa de células de la granulosa prolifera y se hace evidente la presencia de las células de la teca, que provienen de las células del estroma y constituyen la capa más externa de la estructura del folículo. Sin bien los folículos preantrales son sensibles a la FSH, en ausencia de ésta son capaces de seguir madurando hasta el estadio de folículo antral.

El folículo antral está caracterizado por la presencia de un espacio lleno de líquido (*antro*). El líquido folicular es una fuente importante de sustancias reguladoras y moduladoras (esteroides, factores de crecimiento, enzimas, lipoproteínas) que provienen de la sangre y de las secreciones de las células foliculares. Durante el período postnatal temprano pueden observarse en el ovario de la cordera, un número variable de folículos antrales [4]. Específicamente, a los 30 días de edad se observa un pico en el número de folículos antrales distribuidos por todo el ovario [26].

Se ha estudiado la concentración de FSH en corderas desde el nacimiento y durante las primeras semanas de vida, demostrando que aquellas corderas de razas ovinas genéticamente más prolíficas tienen niveles séricos de FSH comparativamente más altos que las menos prolíficas [27]. También se ha demostrado que existe una correlación positiva entre fertilidad y los niveles de FSH presentes en la etapa postnatal temprana [28].

1.2.- Desarrollo ovárico postnatal: etapa prepuberal

Se define a la etapa prepuberal como al período comprendido entre el nacimiento y la pubertad. Los ovarios de las corderas incrementan su tamaño paulatinamente, dependiendo de la raza, presentando numerosos folículos en desarrollo de diferentes tamaños. Los folículos continúan su crecimiento a través de toda la vida o al menos hasta que la reserva se agota. Desde el nacimiento y hasta la pubertad las corderas no muestran conducta de estro ni ovulación, aunque se ha observado secreción pulsátil de LH en corderas de 11 semanas de edad y concentraciones crecientes de FSH desde las semanas 3 a 11 de vida [29]. Varios experimentos realizados en corderas han demostrado un número elevado de folículos antrales al nacimiento [30, 31]. En observaciones realizadas cada 4 semanas, desde el nacimiento hasta las semanas 24 y 33, se observó que el número de folículos antrales es alto y constante desde las 4-8 semanas de edad. Luego, este número disminuye manteniéndose relativamente estable hasta la primera ovulación en la pubertad (aproximadamente 180 días de edad) [30, 32]. Desde el nacimiento y hasta la pubertad el número de folículos primordiales se reduce a un tercio debido a las ondas de crecimiento folicular que terminan en atresia [5].

2.- Marcadores asociados al ciclo de división celular

El ciclo de división celular es un conjunto ordenado de eventos en la vida de la célula que culmina con un aumento de su tamaño y la división en dos células hijas. La progresión de este ciclo está controlada por un grupo de proteínas conocidas como ciclinas y las enzimas asociadas a ellas que se llaman kinasas dependientes de ciclinas (CDKs). La actividad de los complejos ciclina-CDKs está regulada por los inhibidores de CDKs. Mientras que las ciclinas activan a las CDKs, sus inhibidores (CDKI), de los que existen muchos, las silencian y ejercen un control negativo sobre el ciclo celular. La familia CIP/WAF de los CDKI, está compuesta por tres proteínas llamadas p21 (CDKN1A), p27 (CDKN1B) y p57 (CDKN1C), que inhiben en forma extensa a las CDKs. En la última década se ha producido un enorme avance en el conocimiento de los mecanismos de control de la proliferación celular en los que interviene un complejo engranaje de moléculas y vías interrelacionadas [33].

Hay varios métodos usados para evaluar la proliferación celular, los que se pueden aplicar al estudio de tejidos normales, o como herramienta de diagnóstico y pronóstico en varios tipos de cáncer como también para medir la respuesta a una sustancia potencialmente tóxica. Las técnicas disponibles miden los niveles o síntesis de ADN (v.g Brdu, IdU) el metabolismo celular (MTT, XTT) o la expresión de proteínas específicas que se expresan durante los diferentes estadios del ciclo de división celular. Dentro de éstas últimas podemos mencionar la evaluación de la expresión de PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular), MCM-2 (minichromosome maintenance protein 2) y Ki67 [34]. En todos estos casos es necesario recurrir a técnicas de inmunomarcación para identificar estas moléculas y a un posterior conteo celular. Ki67 es una proteína estrictamente asociada al ciclo de división celular. Durante la interfase, el antígeno Ki67 se expresa en el núcleo de una célula que ingresa en el ciclo de división celular [35]. Ki67 se encuentra presente durante todas las fases del ciclo de división celular (G1, S, G2, y mitosis), estando ausente durante la fase de quiescencia (G0) [36].

3.-Perturbadores Endocrinos

3.1.- Generalidades

El término perturbador endocrino (*endocrine disrupter*) se acuñó en 1991, durante la Conferencia de Wingspread (Wisconsin, Estados Unidos), 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 data de 1993, y a partir de él comenzó a hacerse más evidente que la presencia de PEs en el ambiente podía representar un riesgo para la salud humana y animal [37].

Según la Agencia de Protección Ambiental (*Environmental Protection Agency – EPA-*) de Estados Unidos se define a un PE como una **“sustancia o mezcla de sustancias exógenas que altera una o más funciones del sistema endócrino y en consecuencia causa efectos adversos en la salud de un organismo intacto, su progenie o subpoblaciones”** [38].

Los PEs pueden clasificarse en tres grupos [39]: 1) químicos sintéticos utilizados en la industria PCBs (bifenilos policlorados), dioxinas, hexaclorobenceno, ftalatos, derivados fenólicos como nonilfenol, octilfenol, bisfenol A (BPA); y en agricultura atrazina, DDT (diclorodifeniltricloroetanol) y sus derivados, endosulfan, parathion, 2) químicos sintéticos utilizados como drogas farmacológicas, etinilestradiol, tamoxifeno, dietilelbestrol (DES); 3) químicos naturales presentes en vegetales utilizados como alimento por el hombre y los animales (fitoestrógenos).

Los herbicidas a base de glifosato podrían ser clasificados como PEs, en base a estudios que muestran que HBG o glifosato pueden tener actividad estrogénica a dosis bajas y ambientales relevantes [40, 41, 42, 43].

El descubrimiento de la existencia de sustancias químicas en el ambiente con actividad agonista/antagonista de hormonas endógenas despertó el interés en conocer sus efectos sobre el desarrollo y la capacidad reproductiva en animales de la fauna, especies de interés zootécnico y en seres humanos [44, 45]. Aunque todo el sistema endocrino puede verse implicado en esta alteración, la información disponible sobre la perturbación hormonal causada por químicos con actividad estrogénica (conocidos como xenoestrógenos) es, cualitativa y cuantitativamente, la más abundante [44].

Algunos PEs que han sido asociados con efectos sobre el desarrollo y la reproducción imitan la actividad del Eg y se hipotetizó que estas sustancias podrían estar asociadas a varias patologías reproductivas como deficiencias y anomalías en la calidad espermática, aumento de la incidencia de cáncer de próstata, mama y testículo y otras disfunciones reproductivas en el macho [46, 47].

La mayor parte de la evidencia actual sugiere que los mamíferos son más susceptibles a los PEs durante la vida fetal y postnatal temprana que cuando son adultos [48,49]. Esto podría deberse a una mayor susceptibilidad de las células del feto durante los procesos de mayor proliferación celular y diferenciación, o a que los mecanismos endocrinos que controlan estos procesos o al sistema inmune que no está aun completamente desarrollado, favorecen que se produzcan efectos adversos en el feto/neonato en desarrollo [50]. Actualmente existe consenso acerca de los riesgos de la exposición de fetos y neonatos a PEs en períodos de alta sensibilidad como es la formación/diferenciación de órganos y tejidos durante el desarrollo [51].

Existe un paradigma en los estudios clásicos de toxicología que asume que luego de la exposición a un químico, el organismo responderá en un sentido monotónico. Esto es: “a mayor dosis, mayor efecto adverso”. Sin embargo, en experimentos de curvas dosis-respuesta *in vivo* usando hormonas o PEs es común encontrar respuestas con forma de “U” o de U invertida, conocidas como “no monotónicas” [52]. Numerosos PEs presentan curvas dosis-respuesta no monotónicas por lo que es muy importante tener presente este concepto cuando se evalúan resultados de estos químicos con acción hormonal.

3.2.- Efecto de PEs sobre animales de interés zootécnico

Contrariamente a lo que ocurre con animales de laboratorio y de la fauna, es poca la atención que hasta el momento se le ha dado al efecto de los PEs sobre los animales de interés zootécnico. Estos animales están altamente expuestos a una gran variedad de agroquímicos. Hay autores que han obtenido datos experimentales que sugieren que algunos agroquímicos podrían ser clasificados como PEs [53, 54, 55, 20]. Se han demostrado alteraciones reproductivas en ovinos, porcinos y bovinos debidas a PEs que afectan significativamente los rendimientos económicos de la reproducción a gran escala [56]. Específicamente, se han descrito modificaciones en el tracto reproductor de cerdos expuestos *in utero* a xenoestrógenos, tales como hiperplasia y queratinización del epitelio del cuello uterino [56]. En rodeos ovinos que pastan en praderas ricas en leguminosas con alta concentración de fitoestrógenos, se ha observado infertilidad permanente debida a malformaciones irreversibles en la morfología del cuello uterino responsable de un deficiente transporte/capacitación de los espermatozoides [57]. Otro antecedente importante son los numerosos casos de infertilidad temporaria o permanente en animales engordados en *feed-lots* usando dietas con altas concentraciones de xenoestrógenos o por el uso de anabólicos que actuarían como PEs [58, 59, 56]. Además de la exposición a químicos con actividad hormonal a través del aire, suelo, alimentos y agua de bebida, los animales de interés zootécnico reciben baños de inmersión con antiparasitarios, cuyas fórmulas comerciales contienen principios activos con actividad endocrina demostrada. En ensayos *in vitro* se detectó que pesticidas organoclorados produjeron una disminución en la maduración de ovocitos e inhibieron la síntesis de Eg y P en células de la granulosa de bovinos [60, 61]. Una fuente de exposición frecuente de las crías a compuestos químicos con actividad endocrina es a través de su almacenamiento en la grasa corporal de la madre, estos compuestos lipofílicos se han acumulado a lo largo de la vida de la madre. Durante la gestación estos compuestos pueden movilizarse y pasar a circulación general atravesando la placenta para llegar al feto en desarrollo y

tener efectos de PE [62]. Estos compuestos también pueden pasar a la leche materna y afectar el desarrollo postnatal temprano de la cría [62]. Todos estos antecedentes sugieren que las especies de interés zootécnico están altamente expuestas a agroquímicos y que estos compuestos pueden ser clasificados como PEs.

En nuestro país, el nivel de exposición de los animales de interés zootécnico, de la fauna y del hombre a los agroquímicos ha crecido de manera exponencial [63]. Entre los años 1991 y 1997 el incremento en la utilización de agroquímicos en la República Argentina fue de 39.3 millones a 124 millones de Kg. [63]. En 2016 el volumen de agroquímicos utilizado ascendió a 300 millones de litros [64]. Apoyando esto último, se ha detectado una alta concentración de organoclorados en la grasa mamaria de mujeres que habitan el Litoral Sur argentino [65]. En este último trabajo se pudo determinar la presencia de p,p'-dichlorodiphenyldichloroethylene (p,p'-DDE) en el 100% de los pacientes (siendo este compuesto un metabolito del DDT, se demuestra que todas las mujeres estuvieron expuestas a DDT), hexachlorobenzene (HCB) (86.8%), y β -hexachlorocyclohexane (β -HCH) (75.0%). Además, se observó que estos altos niveles de organoclorados se correlacionan directamente con la ingesta de grasa animal y de pescado de río. Estudios realizados en esta misma región del Litoral Sur de Argentina demuestran que la exposición a agroquímicos se asocia con un aumento de patologías reproductivas detectadas en trabajadores rurales varones, tales como: impotencia, oligospermia y disfunciones eréctiles [66, 67]. Esto último genera gran preocupación teniendo en cuenta que en el Río Reconquista (Buenos Aires, Argentina) se han detectado niveles de pesticidas entre 40 a 400 veces superiores a los límites legales establecidos para la protección de la vida acuática [68]. Este incremento en la exposición a pesticidas ha sido bien documentado durante los últimos treinta años, aunque las consecuencias reales a largo plazo son difíciles de determinar. De cualquier manera, los antecedentes que demuestran estas altas concentraciones de agroquímicos contaminando el ambiente en nuestro país, claramente están indicando la importancia de realizar estudios en especies de interés zootécnico para evaluar el impacto de estos posibles PEs sobre la salud humana y animal.

3.2.1- Importancia de los PEs en el desarrollo del ovario

Alteraciones en el proceso normal de la foliculogénesis pueden afectar funciones reproductivas tales como: anovulación, infertilidad, disminución de la fecundidad, deficiencia de estrógeno y falla ovárica prematura [69].

En ratón se ha demostrado que la exposición intrauterina a DES provoca un efecto estimulador en la transición de folículo primordial a primario (activación) [70]. Un efecto similar con reducción en la reserva ovárica folicular fue demostrado

recientemente por exposición neonatal a este xenoestrógeno, tanto en ratas [71] como en corderas [72]. La exposición a BPA, un químico presente en los plásticos y clasificado como PE, induce en el ovario de mamíferos alteraciones en la meiosis con aneuploidia [73, 74], aumentando el número de folículos antrales en el ovario y con mayor incidencia de bursas ováricas hemorrágicas [75]. Además, la exposición postnatal a altas dosis de BPA provocó un aumento en la incidencia de FMOs en ratones [76]. En hembras de *Caiman latirostris* expuestas *in ovo* a una única dosis baja de BPA (1.4 ppm), hubo un incremento en el porcentaje de folículos ováricos tipo III (de estadio avanzado de maduración) y FMOs [20]. Utilizando un modelo de exposición postnatal en ratas se observó que BPA disminuye el número de folículos primordiales en el estadio prepuberal [71].

Estudios en ovejas muestran que, la exposición prenatal a BPA reduce el peso de la cría al momento del nacimiento y que, en ovejas adultas, provoca hipergonadotropismo y que la temporada reproductiva termina más tarde [77]. Recientemente, en esta misma especie, se ha demostrado que la exposición posnatal temprana a BPA altera la dinámica folicular, la esteroidogénesis ovárica y la respuesta del ovario a un estímulo gonadotrófico [72, 78].

3.3.- Glifosato

El glifosato (N-fosfometil glicina) fue sintetizado en la década del '50 (Figura 3). A partir de 1974 bajo el nombre de Roundup (Monsanto, St.Louis, Missouri) fue vendido por primera vez a los agricultores. Desde entonces su volumen de aplicación ha aumentado aproximadamente 100 veces debido a su eficacia para controlar malezas por sus propiedades desecantes y, principalmente, por el desarrollo de variedades de semillas transgénicas resistentes a glifosato. Fue desarrollado para reemplazar o reducir el uso de otros herbicidas que habían causado problemas bien documentados asociados al daño de semillas por aglutinación con riesgos para la salud humana. Inicialmente los test de toxicidad de glifosato sugerían un bajo riesgo para especies animales que no eran blanco de su acción, incluidos los mamíferos, lo que derivó en que los entes regulatorios a nivel mundial fijaran límites altos de exposición como aceptables. El uso extendido de este herbicida creció al ritmo del desarrollo de semillas transgénicas de maíz, oleaginosas (soja y canola) alfalfa y otras; así como con la creciente utilización de granos como componentes en raciones de alimento balanceado para alimentación animal [79]. De acuerdo con la EFSA (*European Food Safety Authority*), el glifosato tiene una baja toxicidad observada por exposición oral, dérmica o inhalatoria [80]. Sin embargo, actualmente existe controversia en relación al riesgo que significa para la salud la exposición a glifosato

[81, 82]. Estudios epidemiológicos y en animales expuestos, realizados en la última década, señalan la necesidad de reconsiderar la toxicidad de formulados que contienen glifosato [83]. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) dependiente de la OMS (Organización Mundial de la Salud) ha clasificado a este herbicida como “probablemente carcinogénico en humanos” y la FDA (*Food and Drug Administration*, USA) informó que comenzará en breve a analizar su concentración en alimentos [84].

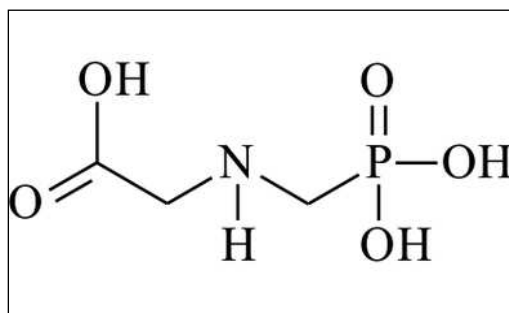


Figura 3. Formula química del glifosato: N-fosfonometil glicina

Actualmente el herbicida más ampliamente utilizado en el mundo son los HBG, con un aumento significativo de 67 millones/kg en 1995 a 826 millones/kg en 2014 [80]. Tanto el barbecho químico (control de malezas entre dos sembrados) en cultivos con siembra directa, como el mantenimiento de los cultivos transgénicos RR (resistentes al glifosato), se realizan con herbicidas en base a glifosato. En Argentina, el uso de HBG es de alrededor de 180 a 200 millones de litros por año [85, 64]. A pesar de que el glifosato tiene una baja persistencia ambiental, las altas concentraciones y la frecuencia de la aplicación pueden tener un impacto negativo en el medio ambiente [86]. Tanto el glifosato como su metabolito (ácido aminometilfosfónico, AMPA) han sido detectados en altas concentraciones en aguas superficiales (0.1 a 0.7 mg/L), sedimentos y suelo (0.5 a 5 mg/kg) en el área principal de siembra de soja de nuestro país [87, 85].

3.3.1.- La exposición a glifosato y su importancia en la salud humana y de los animales

Según el último relevamiento sobre el uso de agroquímicos y su efecto sobre la salud realizado en la Provincia de Buenos Aires por la Defensoría del Pueblo y la UNLP [88], los herbicidas fueron el principal agroquímico utilizado (entre el 70 al 97%) seguido de los insecticidas.

Durante los últimos años, ha surgido una gran preocupación sobre el impacto de la contaminación ambiental de HBG en la salud animal y humana [89, 83, 90]. Los

estudios *in vitro* e *in vivo* han sugerido que la exposición neonatal a HBG puede provocar efectos adversos sobre la salud [91, 92, 93, 94]. Una serie de estudios, algunos recientes, permitirían clasificar a los HBG como PEs, principalmente por trabajos que muestran que HBG o glifosato pueden tener actividad estrogénica a dosis bajas o “ambientales relevantes” [40, 41, 42, 43].

Se ha demostrado que el ovario, el útero y la glándula mamaria en animales domésticos son susceptibles a los efectos adversos de los PEs [56, 23, 72, 78]. Las ratas hembras expuestas durante la primera semana de vida a HBG presentan un desarrollo uterino alterado e hiperplasia del epitelio luminal en el período prepuberal [95]. Recientemente, se demostró que la exposición neonatal a una dosis baja de HBG en ratas causa pérdidas embrionarias posteriores a la implantación al alterar las vías de señalización uterina que controlan la reacción decidual [96, 97]. En las ovejas, no hay estudios sobre los efectos de la exposición a HBG en el tracto reproductivo femenino.

Recientemente, se ha demostrado que la exposición a HBG altera el crecimiento y desarrollo ovárico en crustáceos [98]. En la ratona preñada la exposición a glifosato puro o Roundup® alteró la función ovárica, la esteroidogénesis y la distribución normal de sexos de los fetos [99]. En cerdas, en estudios de exposición *in vitro*, se observó una alteración en la función de las células de la granulosa y adiposas del ovario [100]. En bovinos la exposición *in vitro* a HBG afectó la proliferación de la granulosa y la esteroidogénesis ovárica [101].

El glifosato posee un alto impacto ambiental, tanto en el medio rural como urbano, y el estudio de sus efectos en distintas especies animales es de gran importancia para nuestro país por su amplio uso en la agricultura. Como señalamos anteriormente, estudios previos sugieren que dicho agroquímico podría ser clasificado como PE [42, 40, 41, 43] pudiendo inducir efectos adversos durante el desarrollo/diferenciación de órganos y tejidos (especialmente los relacionados con el sistema reproductor). En las ovejas, no hay estudios sobre los efectos de la exposición a HBG en el tracto reproductivo femenino ni sus consecuencias sobre la producción animal. En la presente Tesis se investigan los efectos de este agroquímico durante el desarrollo neonatal del ovario en ésta especie de interés zootécnico (*Ovis aries*).

4.- La oveja como modelo animal de investigación en reproducción

La gran mayoría de los trabajos científicos biomédicos se realizan en animales de laboratorio, utilizando especialmente como modelo animal a la rata o el ratón por las ventajas que ofrece su manejo más sencillo y económico, como por su ciclo reproductivo y vital más corto. Las crías de los roedores son consideradas “altriciales”

por nacer muy inmaduras, prácticamente ciegas, sin los conductos auditivos abiertos, sin pelo y con una movilidad y desarrollo muy limitado. En cambio, las crías de las especies denominadas “precociales” nacen con un grado de desarrollo y maduración mayor. La oveja se encuentra entre las especies consideradas precociales al igual que el perro, el conejo y el humano entre otras.

Esta diferencia entre especies (altriciales vs. precociales) hace que resulte cuestionable, en algunos casos, la extrapolación de resultados experimentales entre unas y otras. Especialmente cuando se quiere estudiar la influencia de la exposición a un químico en un momento determinado del desarrollo de un órgano, por ejemplo el ovario. Esta es otra de las razones por la que decidimos utilizar a la oveja como modelo animal en nuestros experimentos.

La oveja (*Ovis aries*) es un mamífero rumiante. Es un animal dócil por naturaleza. Un ejemplar adulto presenta un tamaño relativamente grande (30 a 80 kg según la raza y sexo) lo que facilita su manipulación quirúrgica [102]. Tiene una vida media larga (aproximadamente 15 años) y en la hembra, el período de gestación dura 145 días. En la anatomía y fisiología de su aparato reproductor se asemeja más a la mujer que a la de los roedores.

El feto ovino muestra una secuencia y un tiempo de desarrollo ovárico similar al observado en el humano [103, 104, 10, 105]. A diferencia de los roedores, el ovario fetal ovino sintetiza estrógenos (Eg) que cumplen un rol importante en el desarrollo de las células germinales [106]. Además, algunas especies de rumiantes son susceptibles de padecer, de forma natural, afecciones reproductivas similares a las de la mujer [107]. Por estas y otras razones, la oveja es utilizada como uno de los modelos animales de elección para estudiar patologías reproductivas tales como el Síndrome del Ovario Poliquístico (SOP) [108, 109] y la FOP (Falla Ovárica Prematura). A este interés se le agrega la importancia que tienen los estudios en ovinos para mejorar aspectos de la producción animal de esta misma especie como la de otros rumiantes.

5.- Importancia de la oveja en la producción animal

Las ovejas fueron introducidas por los europeos en la pampa húmeda. Hacia fines del siglo XIX, se expandieron hacia la estepa patagónica. Dado que son animales con una alta adaptabilidad a ambientes extremos (escasas precipitaciones y bajas temperaturas), y al no tener competencia por el uso del suelo, se produjo una rápida dispersión del ganado ovino por el territorio patagónico. Posteriormente, la expansión de la frontera agrícola y el crecimiento de la ganadería vacuna desplazaron aún más a la actividad ovina de la región pampeana [110].

La población ovina argentina se halla integrada por razas de distintas aptitudes: laneras (Merino), carniceras (Hampshire Down, Southdown, Scottish Black Face), lecheras (Frisona, Manchega, Pampinta), doble propósito (lana y carne) (Corriedale, Romney Marsh, Ideal, Lincoln), triple propósito (carne, lana y leche) (Texel), peleteras (Karakul). Más del 50% del stock ovino argentino corresponde a razas productoras de lana (Merino) y doble propósito (Corriedale, Romney Marsh, Lincoln) y Criolla. Sólo una raza es netamente productora de carne, la Hampshire Down, y en los últimos años se han comenzado a criar razas destinadas a la producción de leche (Frisona, Manchega y Pampinta) [111].

Según FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) para 2014, se registraron 1.210 millones de ovejas a nivel mundial, siendo China, Australia e India los principales países poseedores de ganado ovino. En este contexto, el stock ovino argentino representa el 1,2% del stock mundial. Actualmente, la actividad ovina se concentra principalmente en la región Patagónica, con el 67% del stock nacional. Seguidamente, se halla la región Pampeana con el 11%, la región Mesopotámica con el 10%, el Noroeste con 5%, en tanto que el 7% corresponde al resto del país [112].

La Región Patagónica tiene grandes limitantes agroecológicas, donde la producción ovina es casi la única actividad, teniendo una fuerte orientación hacia lana. Se crían ovinos en sistemas de producción extensivos, basados en la utilización del pastizal natural. La raza predominante es Merino, seguida por Corriedale y sus cruza.

El resto de la producción ovina del país se concentra en la provincia de Buenos Aires que corresponde a la Región Centro con 45.298 unidades productivas y 2.700.000 cabezas; en la Mesopotamia (Región NEA) con 37.288 unidades productiva y 2.100.000 cabezas y en la Región Noroeste con 16.871.000 unidades productivas y 924.000 cabezas, en sistemas de producción mixtos [111]. La Provincia de Buenos Aires presenta las mejores condiciones competitivas, tanto edafoclimáticas que permiten una explotación intensiva, como de comercialización debido a su cercanía a los principales centros de consumo. La cría ovina en la región extra-patagónica, tiene actualmente un rol secundario, falta de aplicación de tecnologías modernas de producción y en muchas ocasiones el rebaño se halla relegado al autoconsumo.

Es importante destacar que la producción extensiva de ovinos, principalmente concentrada en la región patagónica, podría estar expuesta a diferentes contaminantes ambientales que la afecten negativamente. Si bien esta región, comparativamente, posee una menor actividad agrícola; es probable que la alta

contaminación del suelo, aguas superficiales y aire de la región pampeana lindante afecte también a la región patagónica. Sería recomendable contar con trabajos de investigación que permitan conocer los niveles de contaminación con agroquímicos en la región patagónica y que podrían estar afectando la producción ovina de esta región.

-Objetivos e Hipótesis-

Objetivo general

El objetivo de esta tesis fue investigar los efectos de la exposición a un formulado que contiene glifosato (Roundup Full II®) durante períodos de alta susceptibilidad como lo es el desarrollo postnatal temprano, con especial énfasis en la evaluación de los efectos sobre el desarrollo/diferenciación del ovario de la oveja.

Objetivos Específicos

En hembras de *Ovis aries* (oveja doméstica) prepuberales, expuestas durante las dos primeras semanas de vida a un herbicida a base de glifosato, se investigará:

- a.- El porcentaje de folículos de cada categoría realizando el recuento de cada una de las poblaciones foliculares (primordiales, de transición, primarios, preantrales pequeños, preantrales grandes y antrales pequeños).
- b.- Si se producen alteraciones en la fracción de células foliculares en proliferación, evaluando la expresión del marcador Ki67 por inmunohistoquímica.
- c.- El porcentaje de folículos atrésicos y la incidencia de FMOs.
- d.- Los valores séricos de glifosato y de AMPA por medio de cromatografía líquida de alta eficacia y espectrometría de masas en tándem.

Hipótesis

La hipótesis de trabajo postula que la exposición a agroquímicos con potencial actividad xenoestrogénica en períodos hormono-sensibles del desarrollo postnatal temprano induce alteraciones en procesos críticos relacionados con la histomorfología normal de los ovarios, afectando negativamente la capacidad funcional del órgano en la vida adulta.

-Materiales y Métodos-

Todos los procedimientos fueron revisados y autorizados por el Comité de Uso y Cuidado de Animales de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina) en el marco del PICT 2014-1628".

Para desarrollar los objetivos propuestos, el trabajo se dividió en 2 experimentos:

1.- Experimento 1: Efectos de la exposición postnatal temprana a bajas dosis de HBG sobre el desarrollo del ovario de la cordera (administración subcutánea vs. oral)

Diseñamos un primer experimento con el objetivo de desarrollar un modelo animal de exposición postnatal a un herbicida a base de glifosato comparando las vías de administración: oral vs subcutánea para evaluar los efectos de la exposición postnatal a un HBG. En el DPN 45 (30 días después de finalizado el periodo de exposición a HBG) se determinó el peso del ovario, se evaluaron parámetros que determinan el desarrollo folicular (recuento folicular, incidencia de FMOs, porcentaje de folículos atrésicos), se evaluó el índice de proliferación celular (por Ki67). Además en el DPN 15 y DPN 45 se tomaron muestras de suero para cuantificar los niveles circulantes de glifosato y su metabolito AMPA.

1.1.- Diseño experimental

Luego del nacimiento se identificaron las corderas y se asignaron al azar a alguno de los grupos experimentales tratados diariamente desde el DPN 1 (día del nacimiento) al 14:

Grupo Control sc (scC): se les administró vía subcutánea solución fisiológica (vehículo) (n=6);

Grupo Control o (oC): se les administró vía oral solución fisiológica (vehículo) (n=6);

Grupo scHBG: se les administro vía subcutánea una formulación comercial de glifosato disuelto en solución fisiológica a razón de 2 mg/kg/día (n=6).

Grupo oHBG: se les administro vía oral una formulación comercial de glifosato disuelto en solución fisiológica a razón de 2 mg/kg/día (n=6). (Figura 4).

Las administraciones orales se realizaron con una pistola dosificadora Lider Matic de 5 cc (Villa Nueva SA, Argentina) (Figura 5).

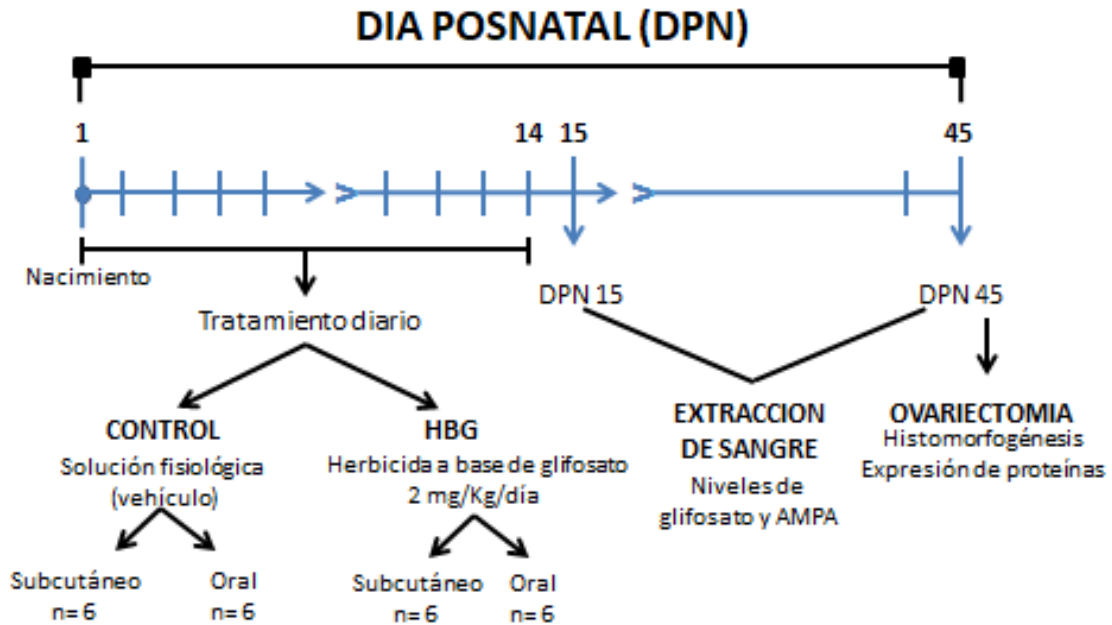


Figura 4. Experimento 1: Diseño experimental



Figura 5. Pistola dosificadora (Lider Matic® de 5 cc -Villa Nueva SA, Argentina).

1.2.- Animales

Todos los experimentos se llevaron a cabo entre los años 2014 y 2017 en una granja experimental de la Universidad Nacional de Lomas de Zamora (Buenos Aires, Argentina). Para obtener los animales experimentales se utilizaron hembras de la raza ovina Frisona (de 2 a 4 años de edad) alimentadas sobre pastura natural con baja proporción de trébol. Dichas hembras recibieron servicio natural con machos de la misma raza durante la temporada reproductiva (desde marzo a junio) (Figura 6).



Figura.6 Oveja y corderas raza Frisóna.

Durante los períodos de gestación y lactancia los animales no recibieron suplementación alimenticia. Para los experimentos se seleccionaron las corderas nacidas durante los meses de Agosto y Septiembre de cada año provenientes de partos únicos. No se utilizaron mellizos para evitar la eventual influencia sobre los fetos que podría producir un ambiente hormonal uterino producto de una gestación con fetos de diferente sexo [113]. Si bien no se determinó la concentración de fitoestrógenos en la pastura, se asume que todos los animales (controles y tratados) estuvieron expuestos a los mismos niveles de fitoestrógenos ya que la alimentación fue la misma. Tanto las madres como las crías permanecieron bajo condiciones naturales durante todo el experimento. Todos los animales experimentales fueron pesados el día del nacimiento y el DPN 45. Al momento de nacer las corderas fueron identificadas con caravanas numeradas de colores, que mantuvieron durante todo el tiempo que duraron los experimentos (Figura 7).



Figura 7. Identificación de las corderas: A cada una de las corderas se le colocó una caravana de color numerada en la oreja para permitir su correcta individualización.

1.3.- Elección de la dosis de glifosato

La formulación de glifosato utilizada fue Roundup Full II® (Argos SRL, Santa Fe, Argentina), una formulación líquida soluble en agua que contiene 54 g de glifosato en 100 ml de formulación comercial. La dosis de 2 mg/kg pv/día está en el orden de magnitud de la dosis de referencia (DRf) de 1 mg/kg pv/día reasignada recientemente para glifosato por la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU (EPA, 2017), apoyada por estudios in vivo con roedores de laboratorio [114].

La elección de la dosis de HBG utilizada en los experimentos se realizó luego de una evaluación en base a publicaciones científicas que demostraron altos niveles de glifosato en nuestro país en aguas superficiales, suelo, forrajes, semillas etc. [85, 115, 87, 116, 117]. Los trabajos mencionados reflejan la contaminación ambiental por el herbicida en Argentina y avalan la utilización de la dosis seleccionada de 2mg/kg. Esa estimación de la concentración “ambientalmente relevante” basada en la bibliografía fue la que se administró a las corderas teniendo en cuenta el peso corporal.

1.4.- Obtención de muestras de ovario

La ovariectomía a las corderas se realizó el DPN 45. Todo el material utilizado durante la cirugía fue previamente esterilizado. Dado que para otros estudios también se obtuvo el útero completo, cada animal fue sacrificado por la administración i.v. de una sobredosis de pentobarbital sódico (Euthanyle®, Lab. Brouwer, Argentina). Luego se lo colocó en la mesa de cirugía en posición decúbito dorsal, sujetándolo por sus extremidades. Se esquiló la zona abdominal e inguinal, se higienizó la zona con agua y jabón, se desinfectó con una solución de iodopovidona colocando luego un campo quirúrgico. (Figura 8 A y B).

Se practicó una incisión con bisturí en la línea media de la piel de la zona abdominal e inguinal. Por divulsión del tejido subcutáneo se separó la piel del tejido muscular subyacente. Para ingresar a la cavidad abdominal se debió atravesar la pared muscular y el peritoneo, para ello se realizó una incisión en la “línea blanca” que corresponde a la fascia que une a los músculos rectos del abdomen. Con separadores se desplazaron lateralmente los bordes de la herida y se buscaron los cuernos uterinos con pinza anatómica de punta roma.

Una vez localizados los ovarios (que se encuentran próximos al extremo craneal de cada cuerno uterino), se los obtuvo evitando cualquier tipo de presión innecesaria (Figura 8 C)

Por último, los ovarios se disecaron bajo lupa para separarlos de posibles restos de tejidos adyacentes (meso-ovario, oviducto, tejido adiposo) (Figura 8 D) y se

pesaron en balanza analítica. Los valores obtenidos (expresados en gr.) se ajustaron al peso corporal de cada cordera (expresados en kg.).



Figura 8. Fotografías que ilustran las distintas etapas durante la ovariectomía bilateral en una cordera de 45 días de edad (DPN 45). A) Esquilado de zona abdominal e inguinal, B) Desinfección y colocación de campo quirúrgico, C) Exposición de útero, oviductos y ovarios, D) Disección de ovarios.

1.4.1.- Procesamiento de las muestras de ovario

Los ovarios fueron seccionados longitudinalmente en dos mitades para asegurar su mejor contacto con el líquido fijador. Se fijaron por inmersión en una solución de formol al 4% tamponada a pH 7,5 con una solución de fosfato 0,05 M (PBS, *Phosphate Buffer Solution*) durante 6 hs. a temperatura ambiente, respetando la proporción recomendada de fijador/muestra (20:1) para permitir una adecuada conservación morfológica del tejido. Luego se realizaron dos lavados con PBS (pH 7,5) de 10 min. cada uno y se almacenaron los tejidos en una solución de alcohol 70° a temperatura ambiente. El procedimiento hasta su inclusión en tacos de parafina se realizó según lo descrito por Junqueira [118]: deshidratación en alcoholes de graduación creciente, clarificación en xilol e inclusión en parafina (Tabla 1).

Tabla 1. Protocolo de procesado histológico

Paso	Tiempo (hs)
Deshidratación	
<i>Alcohol al 96% (I)</i>	1
<i>Alcohol al 96% (II)</i>	2
<i>Alcohol al 100% (I)</i>	1
<i>Alcohol al 100% (II)</i>	1
<i>Alcohol al 100% (III)</i>	Toda la noche
Aclaramiento	
<i>Xilol (I)</i>	2
<i>Xilol (II)</i>	2
<i>Xilol (III)</i>	2
Impregnación	
<i>Parafina (I)</i>	2 o toda la noche
<i>Parafina (II)</i>	1
<i>Parafina (III)</i>	1

1.4.2.- Obtención de cortes histológicos

Se realizaron cortes de 5 μm de espesor, un corte cada cuarenta secciones, utilizando un micrótopo rotativo manual Leika Jung 2025. Los cortes se montaron en portaobjetos pre-tratados con adhesivo tisular (3-aminopropil trietoxysilano, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) y se secaron en estufa a 37°C durante 24 hs. (Figura 9).

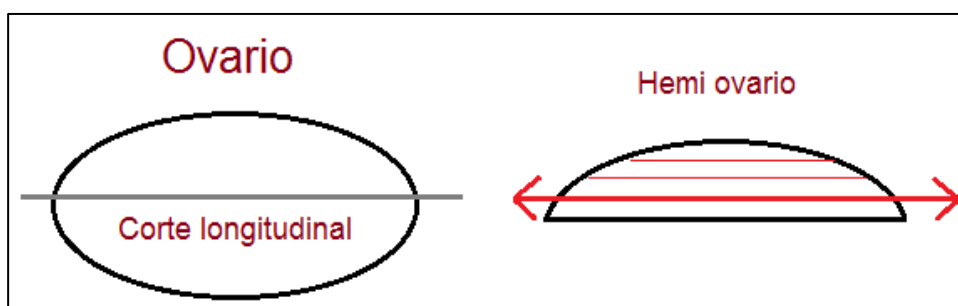


Figura 9. Cortes histológicos de ovario de cordera: Representación esquemática del modo en que se realizaron los cortes seriados. (La flecha roja indica el sentido de los cortes histológicos).

1.4.3.- Estudio morfométrico

Para el estudio morfométrico los cortes ováricos fueron teñidos con picrosirius-hematoxilina (Tabla 2) para identificar con precisión las diferentes estructuras del ovario, cuantificar el número y tipo de folículo ovárico.

Tabla 2. Protocolo de coloración Picrosirius-Hematoxilina

Paso	Tiempo (Min)
Desparafinización	
<i>Xilol (i)</i>	5
<i>Xilol (ii)</i>	2
<i>Xilol (iii)</i>	1
Hidratación	
<i>Alcohol al 100% (i)</i>	1
<i>Alcohol al 96% (ii)</i>	1
<i>Alcohol al 70% (i)</i>	1
Tinción	
<i>Lavar con agua corriente</i>	2
<i>Picrosirius</i>	10
<i>Lavar con agua corriente</i>	1
<i>Hematoxilina de harris durante 30 segundos</i>	
<i>Lavar con agua corriente</i>	3
Deshidratar	
<i>Alcohol al 70% (i)</i>	1
<i>Alcohol al 96% (ii)</i>	1
<i>Alcohol al 100% (i)</i>	1
Clarificar	
<i>Xilol (i)</i>	2
<i>Xilol (ii)</i>	5
Montaje	

Se estableció el porcentaje de folículos en cada estadio, considerando cada categoría y FMOs sobre el total de folículos (sanos y atrésicos). Para la identificación y recuento se utilizó un microscopio óptico de transmisión Olympus BH2 (microscopio Olympus BH2, Olympus, Tokio, Japón) con una lente objetiva de 40X.

Los folículos fueron clasificados de acuerdo a los siguientes criterios morfológicos previamente establecidos [119, 72]: **folículos primordiales**: ovocitos

rodeados con una capa de células de la granulosa planas, **folículos de transición**: con una capa de una mezcla de células de la granulosa planas y cuboides; **folículos primarios**: de una a menos de dos capas completas de células de la granulosa cuboides; **folículos preantrales pequeños**: de dos a menos de cuatro capas completas de células de la granulosa cuboides; **folículos preantrales grandes**: de cuatro a menos de seis capas completas de células de la granulosa y **folículos antrales pequeños**: con más de seis capas de células cuboides y un antro completamente formado (Figura 10).

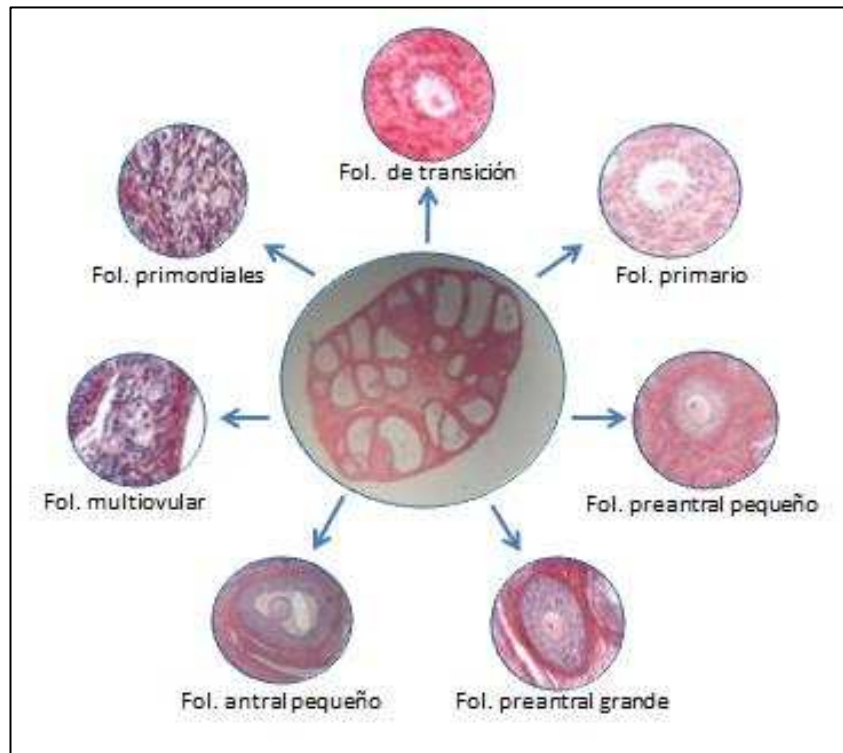


Figura 10. Clasificación morfológica de los folículos ováricos de la cordera: Se realizó siguiendo los criterios previamente descritos (Lundy y col., 1999; Rivera y col., 2011).

Para evitar que un mismo folículo fuera contado más de una vez en diferentes cortes histológicos, sólo se contaron aquellos folículos que contenían el ovocito con su núcleo.

Para determinar la mejor manera de analizar los resultados del recuento folicular diseñamos una prueba piloto con dos corderas control de 45 días de edad. En estas corderas se extrajeron ambos ovarios (derecho e izquierdo), se seccionaron en partes iguales siguiendo el eje mayor del órgano (o sea el “ecuador”) con la ayuda de un microscopio estereoscópico. Se obtuvieron cuatro hemi ovarios de cada cordera y se realizaron cortes histológicos seriados cada 200 µm hasta completar la muestra. El número de cortes obtenidos (a diferentes profundidades) varió de acuerdo al volumen

de cada hemi ovario. Se tiñieron los cortes con picosirius y se contaron los folículos de cada estadio de desarrollo. Se estableció el porcentaje relativo de cada tipo folicular para cada ovario sumando los resultados obtenidos de cada hemi ovario. Este resultado se comparó con el obtenido de contar sólo las cuatro (4) primeras profundidades de cada hemi ovario. Ambos procedimientos se encuentran graficados en la Figura 11 demostrando que los resultados son equivalentes. En base a esta prueba piloto el resto de los estudios del recuento folicular fueron evaluados en cada hemi ovario contando las cuatro (4) primeras profundidades. De esta manera el otro hemi ovario pudo ser almacenado en nitrógeno líquido para estudios futuros de biología molecular.

También se evaluó el ensamblado de folículos primordiales (“*nest breakdown*”) de acuerdo a criterios establecidos con anterioridad [76, 120]. Para ello se contaron aquellos folículos con más de un ovocito incluido dentro de la capa de células de la granulosa, definidos como FMOs, y que identifican un ensamblado folicular incompleto. La incidencia de FMOs se expresó en relación al número total de folículos.

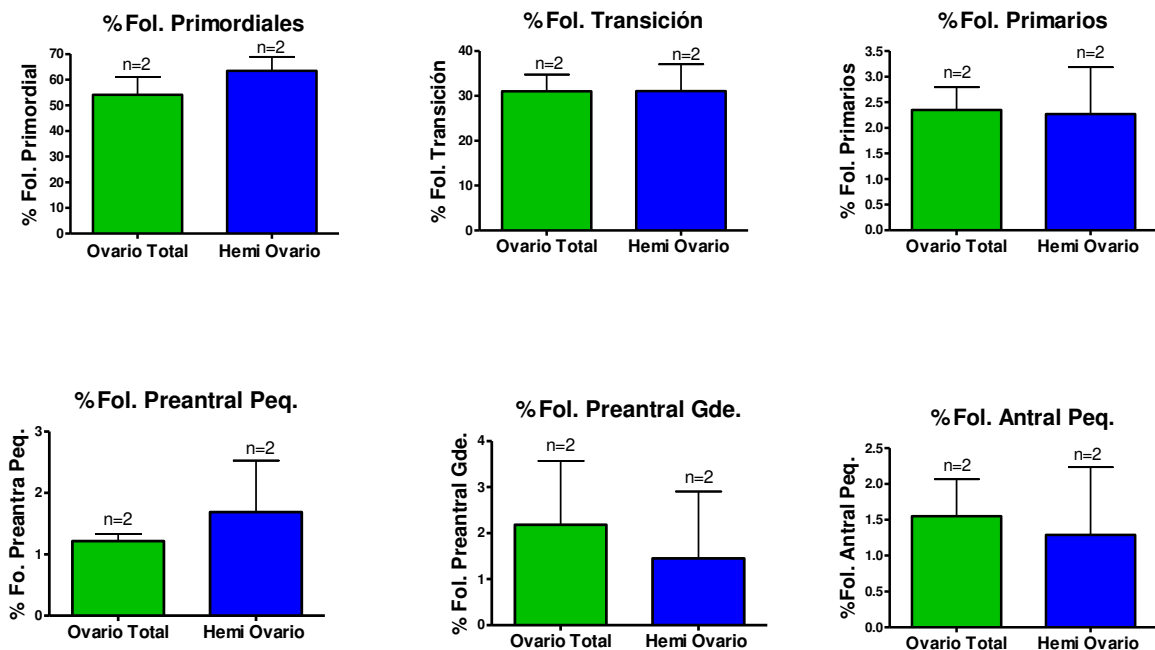


Figura 11. Prueba piloto, en dos corderas control, comprando dos formas diferentes de cuantificación del porcentaje de folículos ováricos. Los resultados demuestran que contar el porcentaje de folículos en todo el ovario *versus* cuatro (4) cortes en un hemi ovario son equivalentes.

1.4.4.- Evaluación de folículos atrésicos

Resulta dificultoso distinguir signos morfológicos de atresia en la mayoría de las categorías foliculares estudiadas a excepción de la categoría de mayor grado de desarrollo (antrales pequeños). Para esta última categoría el criterio utilizado para distinguir a los folículos saludables de los atrésicos fue morfológico e inmunohistoquímico. Los folículos clasificados como saludables mostraron una capa de células de la granulosa de apariencia compacta y bien organizada, con numerosas figuras mitóticas y ocasionales o raras células picnóticas. En contraste, la atresia folicular está caracterizada por una amplia desintegración de la capa de células de la granulosa y rara presencia o ausencia de células mitóticas. En los folículos antrales pequeños atrésicos el resto de la capa de células de la granulosa consistió casi completamente de núcleos picnóticos y cuerpos apoptóticos. Aunque en la mayoría de los folículos atrésicos se encontraron estas características histomorfológicas, en el presente estudio, y para evitar errores en la clasificación, se definió como folículos antrales pequeños atrésicos a aquellos folículos que presentaban $\leq 1\%$ de reacción inmunohistoquímica positiva a Ki67 en las células de la granulosa [121].

1.4.5.-Evaluación de proliferación celular

Para ello se utilizó una técnica inmunohistoquímica estándar (avidina-biotina-peroxidasa) para evaluar la expresión de Ki67 en las células de la granulosa y teca de los ovarios [122, 72]. Brevemente, las secciones ováricas (5 μm de grosor) se desparafinaron y se rehidrataron en etanol, y luego se sometieron a un pretratamiento con microondas y buffer citrato para la recuperación antigénica del tejido. La actividad de peroxidasa endógena y los sitios de unión no específicos se bloquearon adecuadamente. Las muestras se incubaron en una cámara húmeda primero con el anticuerpo primario específico (durante 14-16 h a 4 °C) y luego con el anticuerpo secundario conjugado con biotina (durante 30 min a temperatura ambiente). Las reacciones se desarrollaron usando el método de estreptavidina-biotina peroxidasa y diaminobenzidina (Sigma) como sustrato cromogénico. El anticuerpo primario era un anticuerpo policlonal de conejo anti-Ki67 purificado por afinidad, generado y optimizado en nuestro laboratorio [72, 78]. Las muestras se contracoloraron con hematoxilina de Mayer (Biopur, Rosario, Argentina), se deshidrataron y se montaron con medio de montaje permanente (Eukitt, Sigma). Cada ensayo de inmunohistoquímica incluyó controles positivos y negativos (en los cuales el anticuerpo primario fue reemplazado por el suero no inmune de la especie utilizada para generar el anticuerpo primario).

1.4.6.- Cuantificación del marcador de proliferación celular

La expresión de Ki67 se cuantificó en secciones de tejido utilizando un microscopio Olympus BH2 con un objetivo Dplan 100x (apertura numérica = 1,25; Olympus). Se midió el índice de proliferación de las células de la granulosa y la teca considerando el porcentaje de células Ki67 positivas en relación con el número total de células de cada tipo celular [72].

Se evaluaron todos los folículos sanos (sin signos de atresia), totalizando al menos 500 células ubicadas en cinco campos visuales diferentes elegidos al azar para cada tipo folicular (folículos preantral y antral). Para esto se usó un ocular con una grilla cuadrículada que se colocó sobre las células de la granulosa y de la teca.

Los cálculos se realizaron siguiendo los criterios morfométricos previamente descritos [123, 124]. **La proliferación celular se contó en al menos 10 campos seleccionados al azar por corte histológico, y se evaluaron dos cortes por cordera (separadas 50 µm entre sí).**

1.5.- Obtención de muestras de suero

Se obtuvieron muestras de sangre periférica por punción yugular en el DPN 15 y 45. La sangre fue recolectada en tubos de vidrio y mantenida refrigerada a 5°C hasta su llegada al laboratorio (menos de 1 hora). Luego fueron colocadas en estufa a 37°C durante 30 minutos hasta la retracción del coágulo. Por último, fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos y se procedió a separar el suero que se mantuvo a - 80°C hasta su uso.

1.6.- Determinación en suero de glifosato y AMPA

Para investigar si los animales experimentales habían sido expuestos a glifosato de manera no intencional a la que se aplicó experimentalmente, se midieron los niveles de glifosato y de AMPA en el agua de bebida de las corderas. Las determinaciones en suero y agua de bebida fueron realizadas por la Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina) en el Laboratorio del Programa de Investigación y Análisis de Residuos y Contaminantes Químicos (PRINARC, FIQ - UNL). La descripción del procedimiento y las drogas utilizadas fueron publicadas en Milesi et al., 2018 [114].

2.- Experimento 2: Efecto de la exposición postnatal temprana a bajas dosis de HBG sobre el desarrollo del ovario de la cordera (administración subcutánea)

Se realizó un segundo experimento utilizando el mismo diseño experimental pero utilizando solo la vía sc, ya que ambas vías de administración habían resultado

con los mismos niveles circulantes de glifosato y producido los mismos efectos adversos en los tejidos estudiados. Se seleccionó la vía sc ya que es más simple su administración y se garantiza la inyección del producto. El objetivo de este segundo experimento fue profundizar los estudios del efecto que produce el HBG sobre el ovario y tracto reproductor de la cordera, investigando las vías de señalización y los genes responsables de las alteraciones en la proliferación celular en el ovario y el útero que habíamos demostrado previamente. Para cumplir con este objetivo se tomaron muestras de estos órganos y se conservaron en nitrógeno líquido (N₂) para ser utilizadas en futuras determinaciones. La primera etapa de este segundo experimento fue repetir la evaluación de los parámetros estudiados en el primer experimento (recuento folicular, incidencia de FMOs y atrésicos, y proliferación celular) utilizando los mismos protocolos y un mayor número de animales.

2.1.- Diseño experimental

Luego del nacimiento, las corderas se identificaron y fueron asignadas al azar a dos grupos experimentales. Las corderas recibieron un tratamiento postnatal diario por vía subcutánea desde el DPN 1 (día del nacimiento) al DPN 14:

Grupo Control (C): se les administró solución fisiológica (vehículo) (n=10);

Grupo HBG: se les administró una formulación comercial de glifosato disuelto en solución fisiológica a razón 2 mg/kg/día (n=12) (Figura 12).

Los ovarios fueron estudiados el DPN 45.

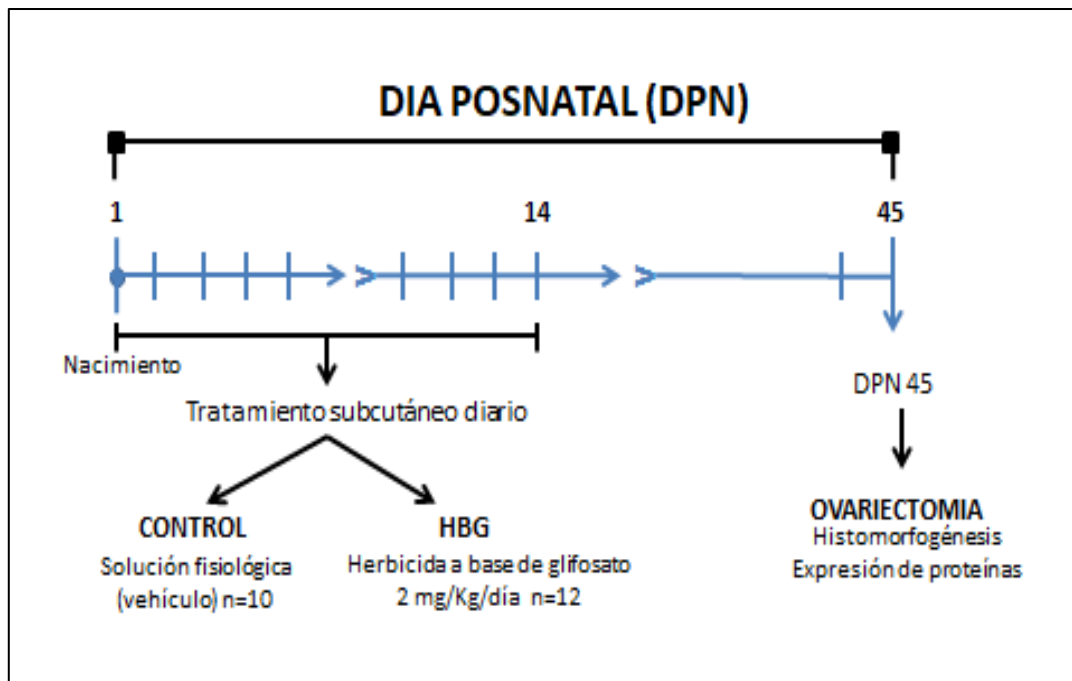


Figura 12. Experimento 2: Diseño experimental

3.- Análisis Estadísticos

Todos los datos fueron calculados como el promedio de la media \pm SEM. Para obtener el grado de significación (testando la hipótesis de que la respuesta no fue homogénea a lo largo de los tratamientos) se utilizó el test de Kruskal-Wallis para el primer experimento y para el segundo experimento el de Mann Whitney. En el primer experimento se usó el post test de Dunn *post hoc* para establecer el grado de significación entre el grupo control y los tratados. Como resultado estadísticamente significativo fue aceptado un valor de $P < 0.05$. Para simplificar el análisis y considerando que los resultados obtenidos en los animales controles expuestos por vía subcutánea y oral fueron similares, se agruparon ambos en un solo grupo control.

El análisis del peso ovárico entre los grupos experimentales fue realizado comparando el peso ovárico (g) / peso de la cordera (kg).

-Resultados-

1.- Experimento 1: Exposición a HBG por vía subcutánea vs oral y desarrollo del ovario

1.1.- Peso ovárico

Para expresar los resultados de manera más precisa, el efecto de la exposición postnatal a HBG sobre el peso ovárico, se ajustó de acuerdo al peso de cada cordera. Siguiendo este criterio, los resultados se calcularon como la relación del peso del ovario en relación al peso vivo del animal. La exposición postnatal a HBG no modificó el peso de los animales ni el de los ovarios en las corderas el DPN 45 en ninguna de las dos vías de exposición utilizadas (Figura 13 y tabla 3).

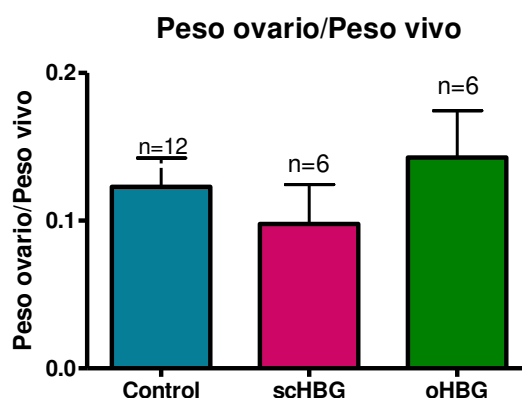


Figura 13. Relación peso ovario/peso vivo (g/kg) en el DPN 45 de corderas control y expuestas a HBG por la vía subcutánea (scHBG) y oral (oHBG).

Tabla 3. Peso de animales y ovarios en corderas expuestas a HBG por vía subcutánea (scHBG) y oral (oHBG).

Variable	CONTROL	scHBG	oHBG
Peso al nacimiento (Kg)	4.4 ± 0.2	4.5 ± 0.2	4.3 ± 0.5
Peso DPN 45 (Kg)	13.4 ± 1.3	13.9 ± 3.3	11.8 ± 2.1
Peso del ovario DPN 45 (g)	1.5 ± 0.2	1.2 ± 0.2	1.8 ± 0.4
Peso relativo del ovario (g/Kg)	0.12 ± 0.02	0.09 ± 0.02	0.14 ± 0.03

Los valores se expresan como la media ± SEM. *p<0.05 vs. control.
DPN: día postnatal

1.2.- Recuento folicular

1.2.1.- Desarrollo folicular en corderas tratadas con HBG por ambas vías de exposición

Se observó una disminución en el porcentaje de folículos primordiales en corderas expuestas a HBG tanto por vía subcutánea como por vía oral (scHBG: $57,82 \pm 3,9$; oHBG: $62,7 \pm 5,4$ C: $87,85 \pm 2,7$; $p=0,0007$). Esta disminución estuvo acompañada por un aumento en el porcentaje de folículos de transición (scHBG: $36,6 \pm 3,3$; oHBG: $30,7 \pm 4,6$ C: $6,8 \pm 1,7$; $p=0,0004$) y folículos primarios (scHBG: $4,4 \pm 0,9$; oHBG: $5,2 \pm 1$ C: $1,4 \pm 0,2$; $p=0,0044$). Por lo tanto, la exposición a HBG durante éste periodo estimuló el proceso de reclutamiento inicial (activación) y disminuyó la reserva de folículos primordiales (Figura 14).

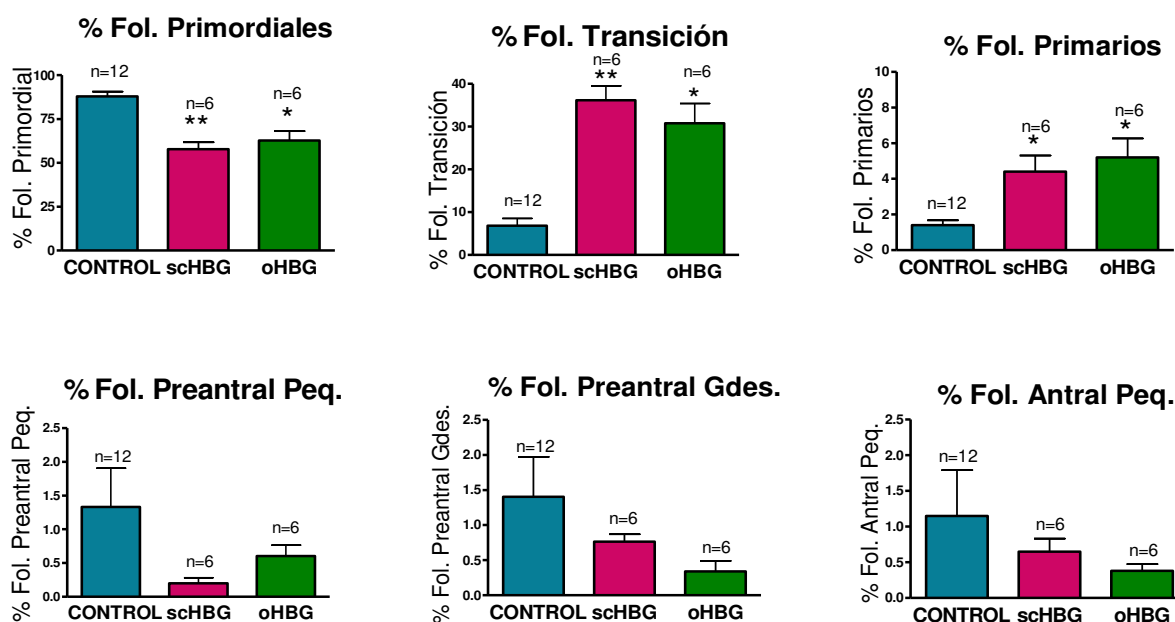


Figura 14. Desarrollo folicular en corderas tratadas con HBG por ambas vías de exposición. La exposición a HBG tanto por vía subcutánea como por la vía oral promovió la activación folicular aumentando la población de folículos de transición y folículos primarios, al mismo tiempo, disminuyó el porcentaje de folículos primordiales (baja la reserva de estos folículos) en el ovario de corderas en el DPN 45. (* indica diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

1.2.2.- Incidencia de FMOs en corderas tratadas con HBG por ambas vías

Al evaluar la presencia de FMOs en las corderas observamos que los animales expuestos a HBG por ambas vías tenían un incremento en la incidencia (scHBG: $1,28 \pm 0,4$; oHBG: $1,13 \pm 0,3$ C: $0,11 \pm 0,06$; $p=0,0012$) (Figura 15 A). Este resultado estaría indicando que el tratamiento alteró el proceso de ensamblado folicular

originando la formación de estas estructuras foliculares con más de un ovocito en su interior (Figura 15 B).

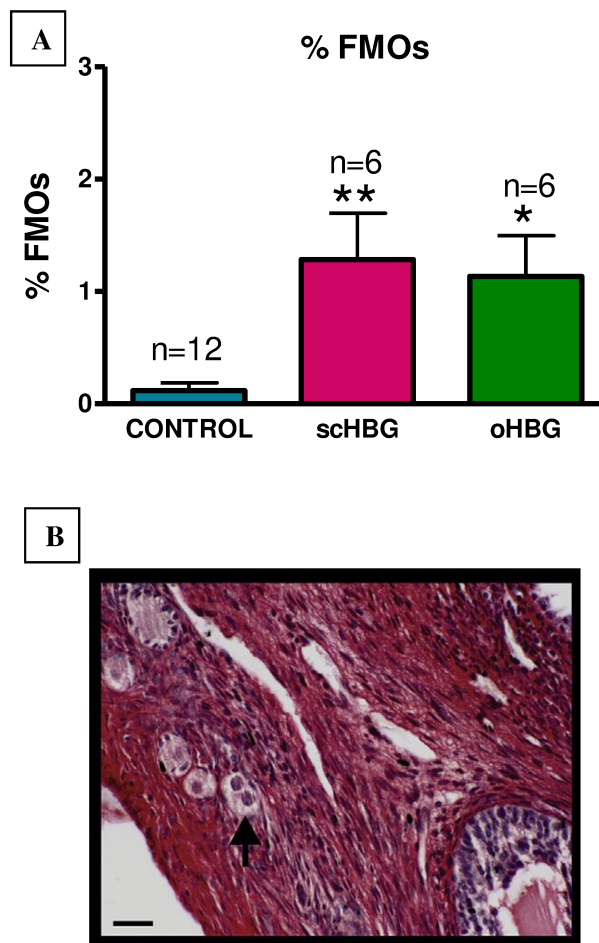


Figura 15. Incidencia de folículos multiovulares (FMOs) en ovarios de corderas expuestas postnatalmente a HBG por ambas vías. **A** Porcentaje de FMOs en relación al total de folículos. Los datos se expresan como el promedio \pm SEM. (* indica diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$). **B** Fotomicrografía representativa del ovario de una cordera expuesta a HBG subcutáneamente que muestra un FMO en la etapa de folículo primordial con dos ovocitos (flecha). Barra de escala = 50 μ m.

1.3.-Proliferación celular y atresia folicular

1.3.1.- Expresión de Ki67 en corderas expuestas a HBG por ambas vías

La inmunomarcación de esta proteína se limita al núcleo de células en proliferación. La expresión de Ki67 se observó en células de la granulosa y de la teca interna de los folículos preantrales (grandes y pequeños) no observándose diferencias significativas entre los grupos experimentales. Los ovarios de las corderas expuestas a HBG por vía subcutánea y por vía oral mostraron un mayor porcentaje de células en

proliferación en la granulosa (scHBG: $43,21 \pm 5,1$; oHBG: $52,81 \pm 11,1$ C: $26,3 \pm 5,5$; $p=0,0429$) y de la teca interna (scHBG: $11,05 \pm 1,6$; oHBG: $28,7 \pm 4,8$ C: $4,9 \pm 0,9$; $p=0,0005$) de los folículos antrales pequeños (Figura 16).

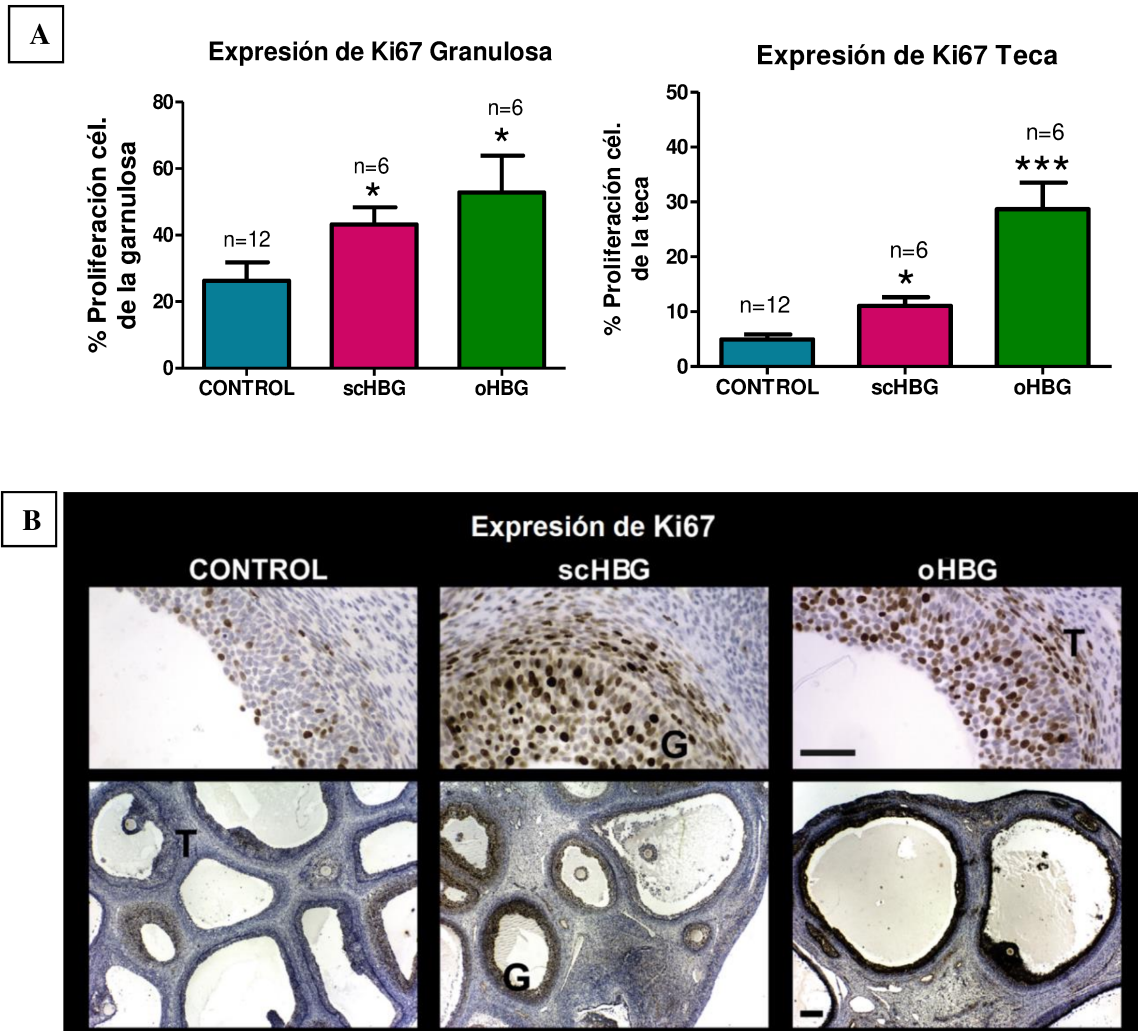


Figura 16. A: Exposición postnatal a HBG y proliferación de las células de la granulosa y de la teca en folículos antrales pequeños de ovarios de corderas en DPN 45. La expresión inmunohistoquímica de Ki67 se usó como marcador de proliferación celular. (*indica diferencias estadísticamente significativas, $p < 0,05$). **B:** Efecto de la exposición postnatal a HBG sobre la expresión de Ki67 (marcador de proliferación celular) en folículos ováricos de corderas de DPN 45. Fotomicrografías representativas de secciones ováricas inmunomarcadas con anticuerpos específicos contra Ki67 mostrando positividad nuclear en células de la granulosa y/o células de la teca en folículos antrales pequeños a mayor (barra de escala = $200 \mu\text{m}$) y a menor escala (barra de escala = $50 \mu\text{m}$). Teca interna interna (T); Granulosa (G).

1.3.2.- Incidencia de folículos atrésicos en corderas tratadas con HBG por ambas vías

Se observó un aumento en el porcentaje de folículos atrésicos antrales en corderas expuestas a HBG independientemente de la vía de administración utilizada (scHBG: 44,13±4; oHBG: 44.32±2,9 C: 29±3,7; $p=0,0103$) (Figura 17).

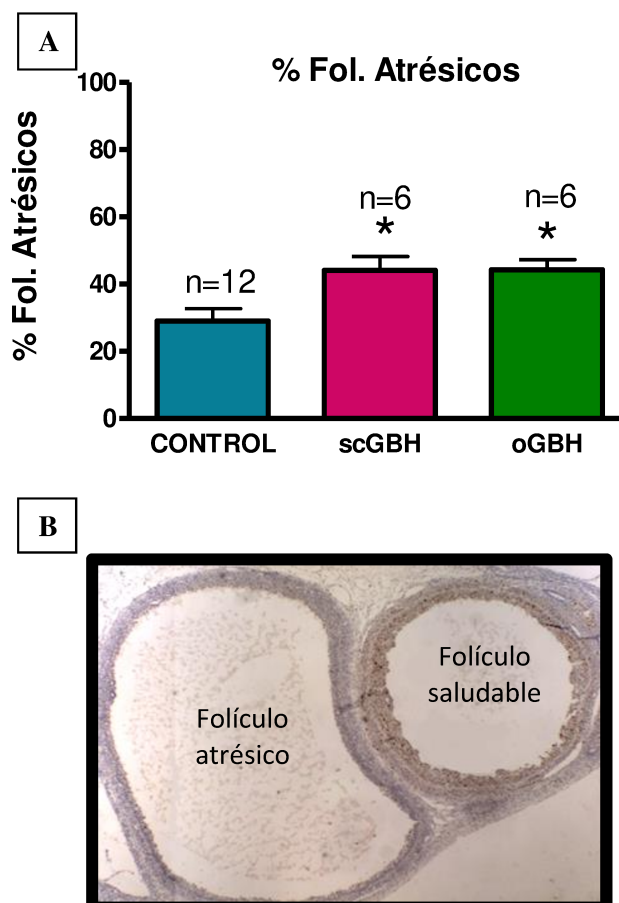


Figura 17. A. Efecto de la exposición postnatal a HBG por ambas vías y atresia de folículos antrales en ovarios de corderas de DPN 45. Ambas vías de exposición con HBG presentaron un incremento de folículos atrésicos (* indica diferencias estadísticamente significativas, $p<0.05$). B. Fotomicrografía representativa de folículos antrales pequeños atrésico y saludable.

1.4.- Glifosato y AMPA en suero de corderas expuestas a HBG por ambas vías

Como se explicó en M&M las corderas control expuestas con vehículo por ambas vías, se agruparon en un solo grupo ya que los resultados eran iguales.

Los niveles de glifosato en suero al final del período de exposición (DPN 15) fueron menores en las corderas expuestas por vía subcutánea a HBG ($123,9 \pm 101,1$

$\mu\text{g/L}$) que las expuestas por vía oral ($255,3 \pm 182,2 \mu\text{g/L}$). Si bien hubo una tendencia, esta diferencia no alcanzó a ser estadísticamente significativa, posiblemente porque el número de animales/grupo fue bajo para estudios en este tipo de especies. El grupo control presentó valores de glifosato en DPN 15 por debajo del límite de detección del ensayo (Tabla 4). En el DPN 45, momento de la obtención de los ovarios para su estudio los niveles séricos de glifosato estaban por debajo del límite de detección en todos los grupos experimentales (Tabla 4).

Con respecto a AMPA, no se encontraron niveles detectables ni en el DPN15 ni en DPN45 en ninguno de los grupos experimentales.

En cuanto al agua de bebida no se encontraron niveles detectables de glifosato y AMPA.

Tabla 4. Niveles séricos de glifosato y AMPA en los grupos experimentales

Variable	CONTROL	scHBG	oHBG
Glifosato en suero DPN 15 ($\mu\text{g/l}$)	N/D	$123,9 \pm 101,1^*$	$255,3 \pm 182,2^*$
AMPA en suero DPN 15 ($\mu\text{g/l}$)	N/D	N/D	N/D
Glifosato en suero DPN 45 ($\mu\text{g/l}$)	N/D	N/D	N/D
AMPA en suero DPN 45 ($\mu\text{g/l}$)	N/D	N/D	N/D

Los valores se expresan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$ vs. control.

N/D: no detectable

scHBG: exposición subcutánea

oHBG: exposición oral

DPN: día postnatal

2.-Experimento 2: Exposición a HBG por vía subcutánea sobre el desarrollo del ovario

2.1.-Peso ovárico

La exposición postnatal a HBG no modificó el peso de los ovarios de las corderas en el DPN 45. Se observó una tendencia a la disminución en la relación peso ovario/peso vivo en las corderas tratadas con HBG pero que no alcanzó a ser estadísticamente significativa (Figura 18).

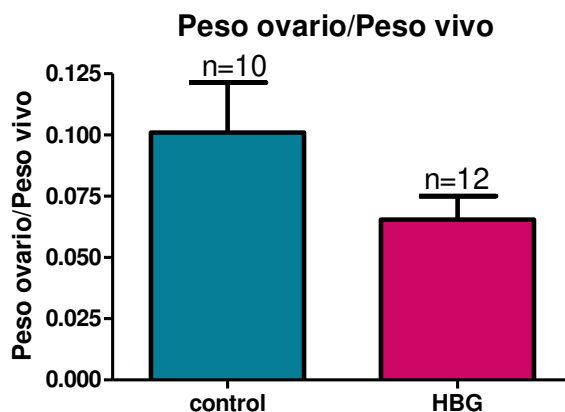


Figura 18. Relación peso ovario/peso (g/kg) vivo en el DPN 45 de corderas controles y expuestas postnatalmente a HBG.

2.2.- Recuento folicular

2.2.1.- Desarrollo folicular en corderas expuestas con HBG

Las corderas expuestas a HBG por vía subcutánea presentaron menor porcentaje de folículos primordiales (HBG: 73 ± 5 ; C: $90,5 \pm 3$; $p=0,002$). Esta reducción en la población de folículos primordiales estuvo asociada a un incremento en las dos categorías subsiguientes de folículos en crecimiento: folículos de transición (HBG: $18,5 \pm 2,5$; C: $3,7 \pm 0,6$; $p=0,001$) y folículos primarios (HBG: $3,8 \pm 1,8$; C: $1,2 \pm 0,3$; $p=0,02$) (Figura 19).

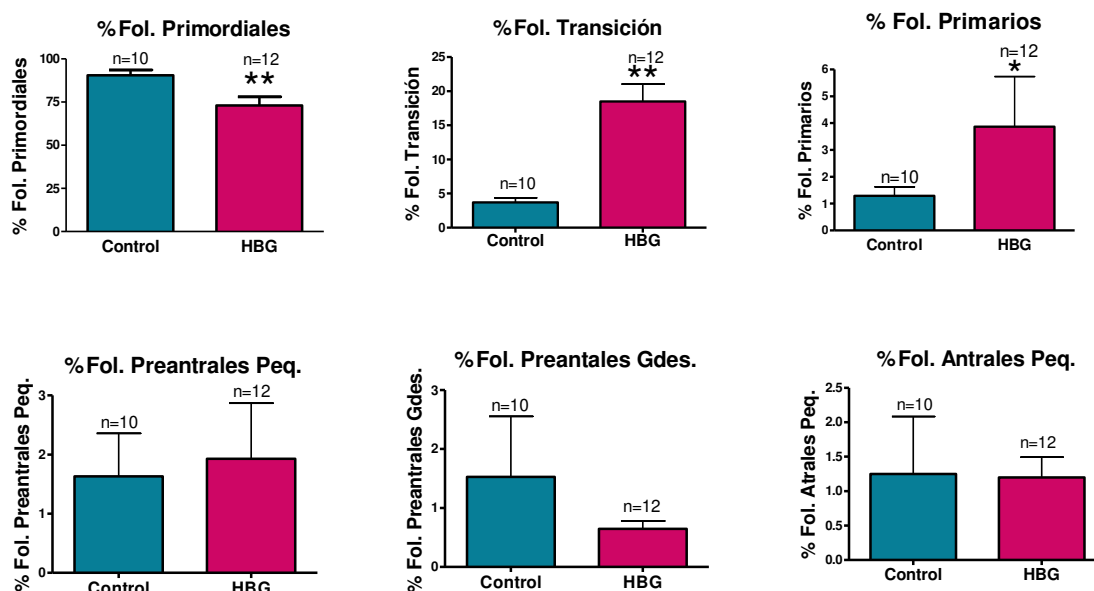


Figura 19. Incidencia de las diferentes poblaciones de folículos ováricos entre los grupos experimentales. La exposición a HBG por vía subcutánea estimuló el proceso de activación y disminuyó la reserva de folículos primordiales en el ovario de corderas en el DPN 45. (* indica diferencias estadísticamente significativas, $p<0.05$).

2.2.2.- Incidencia de FMOs en corderas tratadas con HBG

En las corderas expuestas a HBG por vía subcutánea se observó un incremento en la incidencia de FMOs (HBG: $0,8 \pm 0,2$; C: $0,2 \pm 0,1$; $p=0,009$). Este resultado estaría indicando que el tratamiento alteró el proceso normal de ensamblado folicular originando un aumento en la formación de estas estructuras foliculares particulares (Figura 20). Los FMOs que se observaron presentaban dos o tres ovocitos dentro del mismo folículo, los ovocitos tienen un tamaño similar entre sí y se los observa con morfología saludable. La gran mayoría de las veces se los observó en estadio de folículo primordial rodeados de una capa plana de células de la granulosa, siendo menos frecuente observarlos en otros estadios del desarrollo folicular (Figura 21).

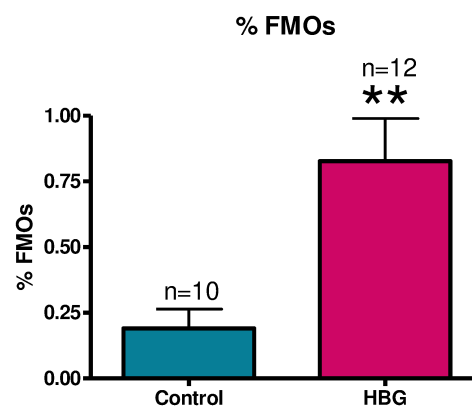


Figura 20. Incidencia de FMOs en los ovarios de corderas expuestas postnatalmente a HBG por vía subcutánea. El gráfico muestra el porcentaje de FMOs en relación al número total de folículos. Los datos se expresan como el promedio de la media \pm SEM. (*indica diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$).

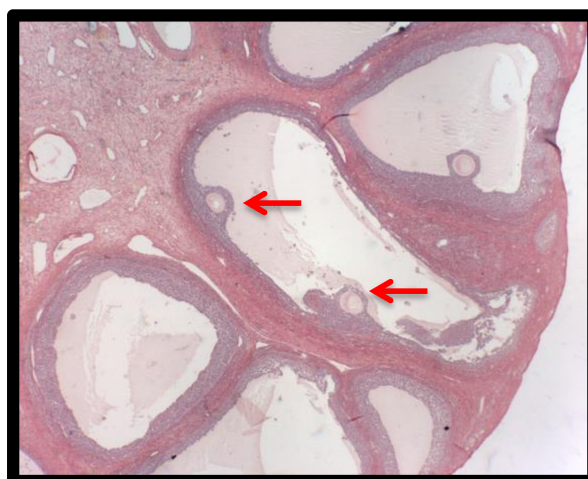


Figura 21. Fotomicrografía representativa del ovario de cordera expuesta a HBG por vía subcutánea que muestra un FMO en la etapa de folículo antral pequeño con dos ovocitos (flechas). Magnificación: 400x.

2.3.- Proliferación celular y atresia folicular

2.3.1.- Expresión de Ki67 en corderas tratadas con HBG por vía subcutánea

Los animales tratados con HBG tuvieron un mayor índice de proliferación en las células de la granulosa (CG) (HBG: $52,3 \pm 5,6$; C: $32,1 \pm 6,1$; $p=0,043$) y de la teca interna (HBG: $12,3 \pm 1,45$; C: $7,1 \pm 1,03$; $p=0,014$) de los folículos antrales pequeños. (Figura 22).

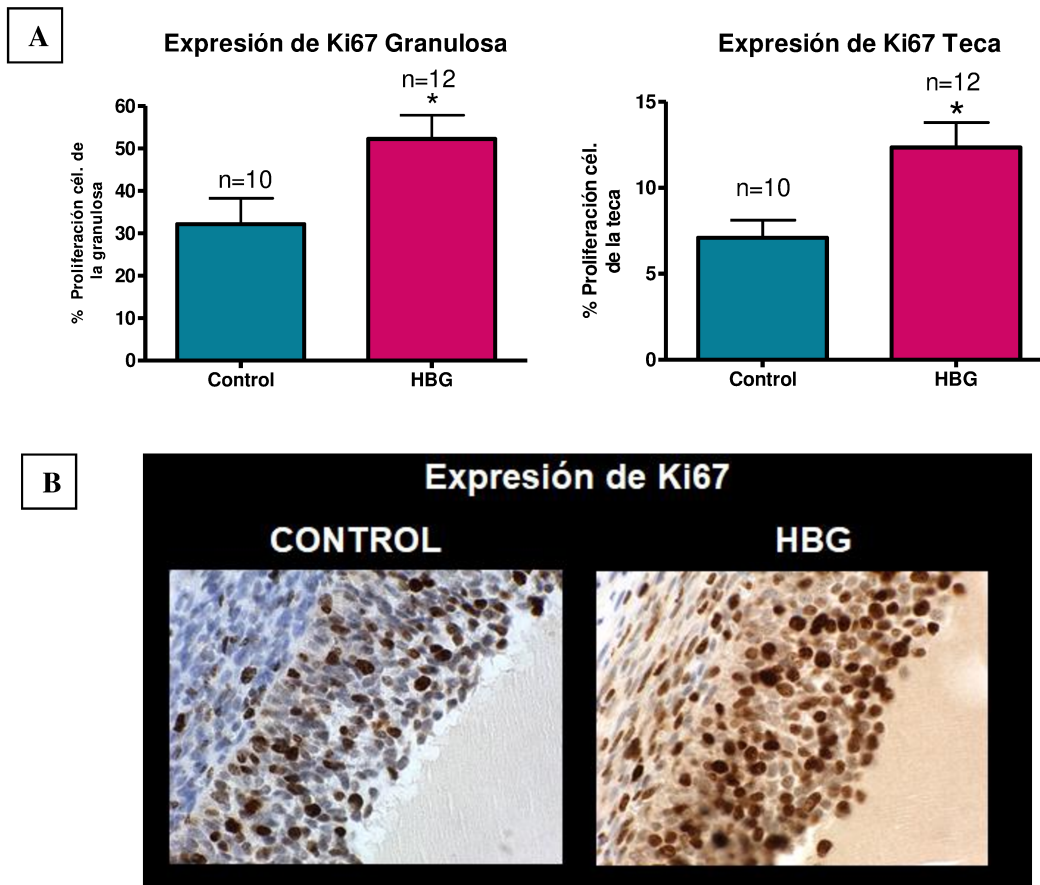


Figura 22: Exposición postnatal a HBG por vía subcutánea y proliferación celular de la granulosa y de la teca en folículos antrales pequeños de ovarios en DPN 45. A. El gráfico de barras demuestra que la exposición con HBG incrementó la proliferación de las células de la granulosa y de la teca (* indica diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.05$). B. Fotomicrografías representativas de la expresión inmunohistoquímica de Ki67 en las células de la granulosa y teca del ovario de corderas en DPN 45. Magnificación: 600x

2.3.2.- Folículos atrésicos en los animales tratados con HBG

Se contaron los folículos atrésicos de acuerdo con los parámetros morfológicos o por el porcentaje de células de la granulosa positivas para Ki67. Los resultados de ésta cuantificación mostraron un aumento significativo del porcentaje de folículos

atrésicos (HBG: $39,9 \pm 3,3$; C: $25 \pm 4,8$; $p=0,02$) en el DPN 45 de las corderas tratadas con HBG (Figura 23).

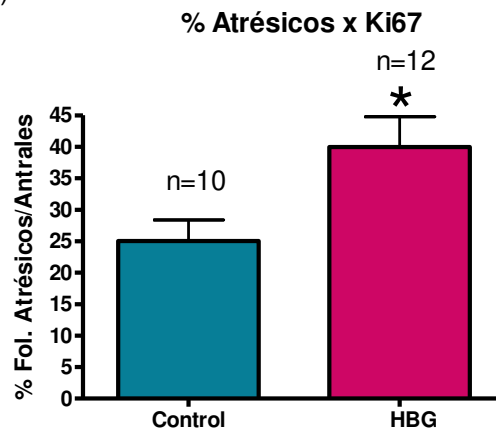


Figura 23. Efecto de la exposición postnatal a HBG sobre la atresia de folículos antrales en ovarios de corderas en el DPN 45.

-Discusión-

En la presente tesis estudiamos los efectos de la exposición neonatal a una baja dosis de HBG administrado por dos vías diferentes: vía oral versus vía subcutánea, sobre el desarrollo y funcionalidad de los ovarios de corderas. Además, se evaluaron los niveles de glifosato y AMPA en el agua de bebida y en el suero de las corderas para conocer cómo se comportaban estos compuestos de acuerdo con la vía de exposición utilizada. Los resultados con relación a los niveles séricos de glifosato y de AMPA demuestran que los animales controles no tratados con HBG tenían valores negativos o por debajo del límite de detección del ensayo, demostrando que las corderas no estuvieron ambientalmente expuestas al agroquímico. Las corderas expuestas a HBG no tuvieron valores circulantes de AMPA y los niveles séricos de glifosato al final del período de exposición (DPN15) fueron similares independientemente de la ruta de administración. La exposición a HBG alteró el desarrollo normal del ovario y estas alteraciones fueron similares tanto en corderas expuestas por vía oral como subcutánea.

Distintos estudios demostraron un aumento en la ganancia de peso corporal en ratonas hembras expuestas a PEs clasificados como xenoestrógenos [125, 126] mientras que otros autores no observaron cambios en este parámetro [127, 128]. En corderas, la exposición a dos conocidos xenoestrógenos (BPA ó DES) no modificó el peso corporal medido a los 30 días de edad [72]. En el presente trabajo tampoco observamos cambios en el peso corporal en el DPN45 en los grupos expuestos a HBG en ninguna de las dos vías de exposición utilizadas. En relación al peso de los ovarios de corderas expuestas a BPA se observó una disminución en el peso ovárico cuando éste fue ajustado al peso vivo [72], los mismos resultados se observaron en ratonas preñadas expuestas a glifosato [99]. Sin embargo, en nuestro estudio, las corderas expuestas a HBG no presentaron cambios en el peso del ovario aislado ni cuando fue ajustado al peso vivo del animal. Sí se observó una tendencia a una disminución del peso ovárico en las corderas tratadas con HBG pero que no alcanzó a ser estadísticamente significativa.

Si bien la administración oral es la más representativa de la vía natural de exposición, se seleccionó también la vía de exposición subcutánea de HBG para estar seguros de que la dosis elegida ingresaba totalmente al organismo del animal. No existe información acerca de los procesos de absorción, metabolismo y excreción de HBG en corderas. En vacas lecheras expuestas oralmente a glifosato se observó una posible degradación microbiana en el rumen del glifosato que se metabolizó a AMPA [129]. En un trabajo realizado por Taylor y col. (2008) [130] utilizando ratonas hembra de 3 días de

edad se demostró que la exposición a BPA durante los primeros días de vida postnatal la vía de administración seleccionada no afectaba los niveles circulantes del químico. Estos autores no observaron diferencias en la concentración sérica de BPA, independientemente, de que éste se administrara oralmente o por la vía subcutánea. Los autores concluyeron que, a esta edad, las enzimas hepáticas no están operativas de la misma manera que en el animal adulto por lo que esta vía de metabolización no se encuentra activa. En las corderas expuestas durante las dos primeras semanas de vida postnatal tampoco observamos cambios en los niveles circulantes de glifosato empleando las dos vías de administración, por lo que podemos sugerir que -al igual que los roedores- las corderas no tendrían diferencia en las vías metabólicas a esta edad.

El desarrollo folicular del ovario puede ser clasificado en diferentes fases: independiente de las gonadotropinas (folículo primordial, de transición, primario y secundario), de respuesta a gonadotropinas (transición de folículo preantral a antral temprano) y dependiente de las gonadotropinas (crecimiento más allá de folículo antral temprano) [131, 132]. Se ha demostrado que el ovario de la cordera es sensible a los PE durante la vida intrauterina [77, 133] ó durante la vida postnatal temprana [72]. La exposición postnatal temprana a dos conocidos xenoestrógenos (DES ó BPA) alteran el recuento folicular y afectan la respuesta a un tratamiento de estimulación gonadotrófico en la cordera, lo que permitió sugerir que químicos con actividad hormonal podrían ser responsables de problemas de fertilidad en la hembra [72, 78]. Además, sugerimos [78] que el desarrollo folicular es un *end point* sensible a la perturbación endocrina con químicos estrogénicos. Teniendo en cuenta esta propuesta, en el presente trabajo de tesis se investigaron los efectos sobre el ovario de otro posible PE, el HBG. Como se había demostrado para el BPA y el DES, la exposición postnatal temprana de bajas dosis de HBG también alteró el desarrollo folicular de las corderas y lo hizo de una manera equivalente al de los xenoestrógenos. En las corderas con HBG observamos una disminución en el porcentaje de folículos primordiales, un incremento en el de folículos de transición y primarios (activación folicular) y mayor proliferación celular en células de la granulosa y teca de folículos en estadios más avanzados. Las corderas expuestas a HBG presentaron una disminución en el porcentaje de folículos antrales “saludables” y mayor número de folículos antrales atrésicos. Estas alteraciones fueron similares a las descritas por la exposición neonatal a xenoestrógenos en la cordera [72] y en ratonas preñadas expuestas a glifosato [99]. Estos resultados permiten sugerir que el HBG podría estar

afectando el desarrollo folicular por medio de una acción estrogénica; aunque para demostrar esta hipótesis hace falta realizar nuevos experimentos.

Otro *end point* sensible al efecto de xenoestrógenos sobre el ovario es la inducción de FMOs [71, 72]. Como ya señalamos, uno de los eventos más importantes durante la foliologénesis ovárica es el ensamblado folicular [131]. Durante éste proceso algunos de los ovocitos que conforman los nidos mueren por apoptosis y otros se rodean de células de la pregranulosa formando los folículos primordiales. Teniendo en cuenta que los FMOs son ovocitos que no se separan y que quedan incluidos en los nidos (clusters) [134], la proporción de FMOs puede ser usada como un índice del grado de éxito en el proceso de ensamblado folicular y de inhibición de la ruptura de los nidos (*nest breakdown*) [135, 136]. En nuestro estudio, los ovarios de las corderas neonatalmente expuestas a HBG presentaron un incremento en la incidencia de FMOs y éste efecto fue también independiente de la vía de administración utilizada. Como antecedente, se ha demostrado que los ovarios de corderas expuestas neonatalmente [72] o ratones expuestos prenatalmente o neonatalmente a compuestos estrogénicos presentan un aumento en la incidencia de FMOs [76, 137, 138]. La mayor incidencia de FMOs tiene consecuencias directas sobre la fertilidad de la hembra. Se demostró en ratón que los ovocitos de estos folículos tienen menor poder fecundante [139] y su capacidad para ovular también ha sido cuestionada [140]. En roedores, se ha informado que el incremento de FMOs podría estar inducido por altos niveles de estrógenos o exposición a sustancias con actividad estrogénica durante el desarrollo neonatal [137, 138, 71]. Si bien los mecanismos a través de los cuales HBG induce la formación de FMOs en las corderas son hasta el momento desconocidos, la mayor incidencia de FMOs en los animales expuestos, aporta información que podría ser importante y de utilidad para su clasificación como potencial PE con actividad estrogénica. Además, en base a resultados previos sobre el efecto de HBG [96, 97, 95, 43], y considerando que la exposición a HBG en estadios tempranos de desarrollo del ovario producen un aumento en la población de FMOs y alteración en el recuento folicular (aceleración del mecanismo de activación de folículos primordiales), sugerimos que la exposición postnatal temprana de HBG produce un efecto permanente (organizacional). Este efecto permanente, posiblemente ocurrido a nivel genómico, podría ser la causa de una reducción de la reserva folicular ovárica afectando la ciclicidad reproductiva futura y ser responsable de una menor fertilidad de las ovejas.

En nuestro experimento, la determinación de los niveles séricos de glifosato y AMPA al finalizar el tratamiento (DPN15) y en el DPN45 resultó en niveles no detectables tanto en el grupo control como en el agua de bebida de las corderas, indicando que no existió contaminación ambiental de los animales con el herbicida. Los niveles séricos de glifosato en las corderas de DPN15 (al finalizar el periodo de exposición al HBG) tanto por vía oral como por la vía subcutánea fueron similares. En estudios realizados en diferentes especies se determinó que la biodisponibilidad oral de glifosato se encuentra entre un 15% y un 36% [141, 142], siendo de un 23% en la rata [143], mientras que la biodisponibilidad oral de glifosato en rumiantes adultos llega al 30% [143]. Esta variación podría atribuirse a las diferencias anatómicas y funcionales de sus aparatos digestivos (las ratas son animales monogástricos y los rumiantes tienen un estómago policavitario) que podrían influir en la velocidad de distribución y de absorción entre las especies. En relación a éste antecedente, esperábamos encontrar una menor concentración sérica de glifosato en las corderas expuestas oralmente que en aquellas expuestas por vía subcutánea; sin embargo, las concentraciones de glifosato fueron similares para ambas vías de exposición, pudiendo atribuirse este resultado a que usamos animales jóvenes (corderas), que en esta etapa del desarrollo se comportan como monogástricos.. En un experimento realizado en vacas lecheras alimentadas con forraje conteniendo glifosato se determinaron los niveles de glifosato y AMPA en contenido duodenal, materia fecal, orina y leche [129], estos autores informan que los animales consumieron entre 0,08 y 6,67 mg/día de glifosato, que la principal vía de eliminación de glifosato fue a través de la materia fecal (61%), orina (8%), no siendo detectado en leche. También estimaron la retención promedio de glifosato en 31% y observaron una conversión ruminal del glifosato en AMPA, su principal metabolito. En nuestro estudio, no medimos las concentraciones de glifosato en materia fecal, contenido duodenal, leche y orina. Además, consideramos que la medición en rúmen carecía de significado ya que en la cordera, a los 15 días de edad, éste órgano digestivo no está ni anatómicamente ni funcionalmente completamente desarrollado [144].

En estudios en rata, se observó la presencia de AMPA en suero luego de la exposición oral a glifosato sugiriendo que podría deberse a la conversión de glifosato a AMPA por los microorganismos intestinales [141] en esta especie monogástrica. Teniendo en cuenta que la metabolización de glifosato y AMPA ocurrió en vacas adultas con desarrollo pleno de los preestómagos [129], la ausencia de AMPA en el suero de nuestras corderas podría deberse a una escasa o nula actividad ruminal y/o a una limitada

actividad microbiana intestinal debido a su corta edad (DPN15). En el DPN45 (30 días después de finalizado el periodo de exposición) de las corderas que habían sido tratadas con HBG durante los 15 primeros días posnatales, ni glifosato ni AMPA se detectó en el suero. Esto se explicaría por la corta vida media del glifosato y su baja bioacumulación debido a su naturaleza hidrofílica [141, 142, 145]. Además, en estudios realizados en cerdos y vacas expuestos a una mezcla glifosato-AMPA (relación 9:1) por vía oral a dosis desde 40 a 400 mg/kg no presentan restos del agroquímico 28 días después de finalizada la exposición a HBG [142]. A modo comparativo, podemos decir que los niveles séricos de glifosato que detectamos en nuestras corderas expuestas por vía oral o subcutánea son mayores que los detectados en alimentos para perros, o en potenciales fuentes de exposición de los humanos a través de alimento o agua contaminados [79, 146]; incluso son mayores a los descritos en orina de mujeres de zonas urbanas y rurales de Indiana, EE. UU. [147]. Kongtip y col. (2017) [148] informaron elevados niveles de glifosato en la sangre de mujeres embarazadas (0,2 – 189,1 ng/mL) y en sangre de cordón umbilical (0,2 – 94,9 ng/mL) en tres provincias de Tailandia. Los niveles séricos observados en nuestras corderas expuestas, por ambas vías, están en el orden de magnitud de los niveles publicados para las mujeres tailandesas [148]. Por último, los niveles de AMPA, el principal metabolito del glifosato, en las corderas expuestas al HBG por vía oral o subcutánea fueron menores al límite de detección, tanto en el DPN15 como el DPN45.

Dado que en esta tesis decidimos investigar el efecto de un HBG sobre el ovario y nuestra intención fue semejar las condiciones “ambientales”, no se diseñaron experimentos para conocer cual/es de los componentes del formulado era el responsable del efecto observado. Por lo tanto, los resultados que describimos no sabemos si son debidos al glifosato, a los co-formulantes, o a la mezcla de ambos. Otro aspecto importante es destacar que las formulaciones comerciales de glifosato difieren entre marcas y países en la concentración del principio activo (glifosato) y en los otros componentes de la formula. Además, en muchos casos las formulaciones están protegidas por patentes y se desconoce su composición. Por lo tanto, no podemos hacer extensivos los efectos aquí reportados a otras formulaciones de glifosato.

En su conjunto, nuestros resultados son importantes porque aportan evidencias científicas acerca de los efectos adversos de la exposición a HBG sobre el sistema reproductor femenino en una especie doméstica como es la oveja. Los resultados obtenidos nos permiten sugerir que el HBG actuó como un PE con efectos estrogénicos.

En un estudio *in vitro* se describen efectos de los HBG actuando como PE por activación del receptor de estrógeno (RE) [149]. También en estudios *in vivo*, se han descrito efectos adversos sobre el desarrollo mamario, uterino y la fertilidad de la hembra por la exposición neonatal a HBG [150, 95, 97, 114].

Los trabajos de investigación que se llevan a cabo utilizando especies de interés zootécnico tienen doble importancia: biomédica y comercial. Los animales destinados a producción (como la oveja) y debido a que en condiciones naturales pastan en los campos, son altamente susceptibles a ser contaminados con herbicidas como los HBG; por lo que resulta de gran importancia conocer los efectos adversos sobre la salud animal como sus consecuencias productivas. A pesar de que nuestro país es un gran productor ganadero, no hay estudios que evalúen la reducción de las tasas de fertilidad y su impacto sobre la productividad económica asociado con los efectos de la exposición a agroquímicos que contaminan el ambiente y los animales [151]. La gran diversidad de contaminantes a los que están expuestos los animales a campo, las distintas formas en que estos químicos podrían actuar (aditiva, sinérgica o antagónica) representan una importante dificultad a la hora de demostrar e interpretar esas asociaciones [151]. Además de todo lo mencionado también deben considerarse las distintas vías de exposición a la que están expuestos los animales de interés zootécnico a campo (ingestión de alimento y líquidos, inhalación, contacto directo) y las tasas de absorción, distribución, metabolización y excreción. Dado que los PE con actividad estrógenica actúan a través de los receptores esteroides, los efectos pueden ser “organizacionales” ó “activacionales” [152]. Los efectos organizacionales son aquellos que ocurren como resultado de la exposición al PE durante el desarrollo prenatal o los primeros días de vida, y tienen como consecuencia un cambio permanente en la función de un órgano o de un sistema. Mientras que los activacionales son cambios temporarios en la actividad de un sistema que se producen como resultado de la exposición al PE cuando el desarrollo de ese sistema ya se ha completado. Los cambios activacionales cesan cuando la exposición al compuesto químico desaparece, volviendo el sistema a las condiciones previas. Si los cambios observados en nuestro experimento (falta en la respuesta ovárica, aumento de la atresia folicular) por el efecto disruptor de HBG resultaran de tipo organizacional (permanentes), podrían entonces mantenerse en el tiempo afectando negativamente la función reproductiva de la oveja adulta. Sería muy interesante realizar futuros estudios utilizando el mismo protocolo de exposición a HBG pero evaluando las alteraciones ováricas en la hembra adulta, para definir las consecuencias y alcance de estos efectos.

En este sentido, también resulta de gran interés conocer el momento de exposición y la vía (prenatal vía placentaria, postnatal por leche materna, etc.) para predecir si los efectos serán transitorios o permanentes [153].

La importancia del empleo de ovinos como modelo animal para el estudio de los efectos de la exposición neonatal a PE radica, no solo en la potencial repercusión económica, sino en las similitudes que posee con la mujer en los procesos del desarrollo ovárico [154]. La anatomía y fisiología de aparato reproductor de la oveja se asemeja más a la mujer que a los roedores. El feto ovino muestra una secuencia y un tiempo de desarrollo ovárico similar al observado en el humano [155, 104, 10, 105] y, a diferencia de los roedores, el ovario fetal ovino sintetiza estrógenos (Eg) que cumplen un rol importante en el desarrollo de las células germinales [106]. La exposición neonatal a hormonas esteroideas o compuestos con actividad estrogénica (DES o BPA) pueden alterar el normal desarrollo del ovario [71, 72] y ser responsables de patologías reproductivas similares a las de la mujer tales como neoplasias, fibromas, endometriosis, Síndrome del Ovario Poliquístico y falla ovárica prematura entre otras [69, 156, 157, 158]. Los resultados de nuestro estudio aportan nuevos indicios acerca del comportamiento como PE de los HBG, alterando el recuento folicular ovárico de la cordera de forma similar a lo que producen dos reconocidos xenoestrógenos (DES ó BPA), utilizando el mismo diseño experimental. Finalmente cabe agregar que, aunque no disponemos de estudios acerca de los efectos de la exposición a HBG sobre la fertilidad de la oveja, las alteraciones observadas podrían comprometer la fertilidad de la hembra adulta y de esta forma afectar la productividad de la majada.

Existe preocupación mundial por la creciente exposición a sustancias catalogadas como estrógenos ambientales. Consideramos que estos hallazgos contribuirán al desarrollo de políticas sanitarias y de prevención que minimicen el riesgo para la salud humana y animal que implica la exposición a este agroquímico. Sin lugar a dudas, el compromiso de los organismos regulatorios en la adopción de estas políticas y en la búsqueda de alternativas más seguras es una necesidad ineludible.

Por último, consideramos que para el herbicida en estudio como para tantos otros compuestos con actividad de PE a los que estamos expuestos, sería muy importante para nuestra salud y la del ecosistema tener en cuenta el principio de precaución: “Cuando haya peligro de daño grave o irreversible, la ausencia de información o certeza científica no deberá utilizarse como razón para postergar la adopción de medidas eficaces para impedir la degradación del medio ambiente” [159].

-Conclusiones-

Los resultados obtenidos en esta tesis nos permiten extraer las siguientes conclusiones:

- La exposición durante las primeras semanas de vida postnatal en corderas es un período de alta susceptibilidad a los efectos de perturbadores endocrinos, al menos para investigar los efectos sobre el ovario.
- La exposición postnatal temprana a dosis bajas de HBG alteró el desarrollo normal del ovario y estas alteraciones fueron similares tanto en corderas expuestas por vía oral como subcutánea. Los efectos detectados en este trabajo de tesis, al igual que en publicaciones previas con otras especies animales, indican la necesidad de una revisión de los niveles de seguridad fijados por los organismos de control como seguras para los formulados en base a glifosato.
- Algunos de los cambios detectados en el ovario (aumento de la proliferación de las células de la granulosa y de la activación folicular) son similares a los producidos por dos conocidos xenoestrógenos (DES ó BPA) lo que refuerza la evidencia de que los formulados en base a glifosato podrían tener actividad estrogénica.
- Para prevenir problemas en la salud y en el ecosistema consideramos que para el herbicida estudiado en esta tesis, como para otros compuestos con actividad de PE a los que estamos expuestos, sería importante tener en cuenta el principio de precaución: “Cuando haya peligro de daño grave o irreversible, la ausencia de información o certeza científica no deberá utilizarse como razón para postergar la adopción de medidas eficaces para impedir la degradación del medio ambiente”.

-Bibliografía-

- [1] AN Hirshfield, (1991) Development of follicles in the mammalian ovary. *Int. Rev Cytol* 124: 43–101.
- [2] McDonald's (2009) *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. Fifth edition, Iowa State Press.
- [3] EA McGee, AJ Hsueh (2000) Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 21: 200-214.
- [4] KP McNatty, P Smith, NL Hudson, DA Heath, DJ Tisdall, WS O, R Braw-Tal (1995) Development of the sheep ovary during fetal and early neonatal life and the effect of fecundity. *J. Reprod Fertil* 49: 123-135. Review.
- [5] JE Fortune (2003) The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Science* 78: 135-163.
- [6] JMJ Aerts, PEJ Bols (2009) Ovarian follicular dynamics: review with emphasis on the bovine species. Part I: folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reprod Domest Anim* 45: 171-179.
- [7] SF Gilbert (2000) In: Gilbert SF., editor. *Developmental biology*. Sunderland, MA: Sinauer Associates Ltd. 585-617.
- [8] B Freeman (2003) The active migration of germ cells in the embryos of mice and men is a myth. *Reproduction* 125: 635-43.
- [9] H Picton, D Briggs, R Gosden (1998) The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinol* 145: 27–37.
- [10] HT Sawyer, P Smith, DA Heath, JL Juengel, SJ Wakefield, KP McNatty (2002) Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biol Reprod* 66: 1134-50.
- [11] R van den Hurk, J Zhao. (2005) Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 63: 1717-51.
- [12] M Binelli, BD Murphy (2010) Coordinated regulation of follicle development by germ and somatic cells. *Reprod Fert Dev* 22: 1-2.
- [13] MM Matzuk, KH Burns, MM Viveiros (2002) Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Eppig JJ. Science. 21: 2178-80. Review.*
- [14] O Oktem, B Urman (2010) Understanding follicle growth in vivo. *Hum Reprod* 25: 2944-54.
- [15] RA Picazo, AS López (1995) Desarrollo folicular en el ovario de la especie ovina. *Invest. Agrar.: Prod. Sanid. Anim.* 10: 77-93.
- [16] MA Driancourt (2001) Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology* 55: 1211-1239.

- [17] MK Skinner (2005) Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update* 11: 461-71
- [18] P Kezele, MK Skinner (2003) Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. *Reprod Dev* 144: 3329.
- [19] J Johnson, J Canning, TKaneko, JK Pru, JL Tilly (2004) Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 428: 145-150.
- [20] C Stoker, PM Beldoménico, VL Bosquiazzo, MA Zayas, F Rey, H Rodríguez, M Muñoz-de-Toro, EH Luque (2008) Developmental exposure to endocrine disruptor chemicals alters follicular dynamics and steroid levels in *Caiman latirostris*. *Gen Comp Endocrinol* 156: 603-12.
- [21] TS Hussein, DA Froiland, F Amato, JG Thompson, RB Gilchrist (2005) Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *J. Cell Sci* 118: 5257-5268.
- [22] SJ Martins da Silva, RA Bayne, N Cambray, PS Hartley, AS McNeilly, RA Anderson (2004) Expression of activin subunits and receptors in the developing human ovary: activin A promotes germ cell survival and proliferation before primordial follicle formation. *Dev Biol* 266: 334-345.
- [23] LJ Morrison, JL Marcinkiewicz (2002) Tumor necrosis factor alpha enhances oocyte/follicle apoptosis in the neonatal rat ovary. *Biol Reprod* 66: 450-457.
- [24] GA Dissen, ANHirshfield, S Malamed, SR Ojeda (1995) Expression of neurotrophins and their receptors in the mammalian ovary is developmentally regulated: changes at the time of folliculogenesis. *Endocrinology* 136: 4681-4692.
- [25] JE Fortune (2002) Activation of primordial follicles. En: Eppig J, Hegele-Hartung C.H.; Less I. M. (Eds.) *The future of the oocyte, basic and clinical aspects*. Springer, Nueva York, EEUU. 11-21.
- [26] R Tassel, WA Chamley, JP Kennedy (1978) Gonadotrophin levels and ovarian development in the neonatal ewe lamb. *Aust. J Biol Sci* 31: 267-273.
- [27] A Jorio, JC Mariana, A Lahlou-Kassi, M Hilali (1999) Pattern of FSH secretion from birth to 4 months of age in two Moroccan ewe breeds varying in prolificacy. *Small Rumin Res* 31: 135-140.
- [28] L Bodin, B Bibe, M Blanc, G Ricordeau (1988) Genetic relationship between prepubertal plasma FSH levels and reproductive performance in Lacaune ewe lambs. *Genet Sel Evol* 20: 489-498.
- [29] DL Foster, FJ Karsh (1975) Development of mechanism regulating preovulatory surge of luteinizing-hormone in sheep. *Endocrinology* 97: 1205-1209.
- [30] JP Kennedy, CA Worthington, ER Cole (1974) The post-natal development of the ovary and uterus of the Merino lamb. *J Reprod Fert* 36: 275-82.

- [31] RB Land (1978) Reproduction in young sheep - some genetic and environmental sources of variation. *J Reprod Fert* 52: 427-436.
- [32] A Gonzalez-Bulnes, RM Garcia-Garcia, V Castellanos, J Santiago-Moreno, C Ariznabarreta, V Dominguez (2003) Influence of maternal environment on the number of transferable embryos obtained in response to superovulatory FSH treatments in ewes. *Reprod Nutr Dev* 43: 17-28.
- [33] B Alberts, D Bray, K Hopkin, A Johnson, J Lewis, M Raff, K Roberts, P Walter (2011) Introducción a la Biología Celular.
- [34] T Scholzen, J Gerdes (2000). "The Ki-67 protein: from the known and the unknown". *J Cell Physiol* 182: 311–322
- [35] S Cuylen, C Blaukopf, AZ Politi, T Müller-Reichert, B Neumann, I Poser, J Ellenberg, AA Hyman DW Gerlich DW (2016). "Ki-67 acts as a biological surfactant to disperse mitotic chromosomes". *Nature* 535: 308–312
- [36] S Bruno, Z Darzynkiewicz (1992). "Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells". *Cell Proliferation* 25: 31–40.
- [37] T Colborn, FS vom Saal, AM Soto (1993) Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 1: 378-384.
- [38] USEPA (United States Environmental Protection Agency) (1997) Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. EPA/630/R-96/012. February 1997. US EPA, Washington, U.S.A.
- [39] P Pocar, TA Brevini, B Fisher, F Gandolfi (2003) The impact of the endocrine disruptors on oocyte competence. *Reproduction* 125: 313-325.
- [40] N Benachour, H Sipahutar, S Moslemi, C Gasnier, C Travert, GE Seralini (2007) Time- and dose-dependent effects of roundup on human embryonic and placental cells. *Arch Environ Contam Toxicol* 53:126-133.
- [41] C Gasnier, C Dumont, N Benachour, E Clair, MC Chagnon, GE Seralini (2009) Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology* 262:184-191.
- [42] S Thongprakaisang, A Thiantanawat, N Rangkadilok, T Suriyo, J Satayavivad (2013) Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. *Food Chem Toxicol* 59:129-136.
- [43] J Varayoud, M Durando, JG Ramos, MM Milesi, PI Ingaramo, M Munoz-de-Toro, EH Luque (2017) Effects of a glyphosate-based herbicide on the uterus of adult ovariectomized rats. *Environ Toxicol* 32:1191-1201.
- [44] A Soto, C Sonnenschein (1996) Environmental sex hormones mimics and antagonists. *Comm Toxicol* 5: 329-346

- [45] National Research Council, USA. (1999) *Hormonally Active agents in the Environment*. National Academy Press, New York.
- [46] RM Sharpe, N Skakkebaek (1993) Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341: 1392-1395.
- [47] RM Sharpe, JS Fisher, MM Millar, S Jobling, JP Sumpter (1995) Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. *Environ. Health Perspect.* 103: 1136-1143.
- [48] HA Bern (1992) The Fragile Fetus. In *Chemically-Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection*. Colborn T. and Clements C., eds., Princeton Scientific Publishing, 9-15.
- [49] CM Markey, BS Rubin, AM Soto, C Sonnenschein (2002) Endocrine disruptors: from Wingspread to environmental developmental biology. *J. Steroid Biochem. Mol Biol* 83: 235-244.
- [50] TM Crisp, ED Clegg, RL Cooper, WP Wood, DG Anderson, KP Baetcke, JL Hoffmann, MS Morrow, DJ Rodier, JE Schaefer, LW Touart, MG Zeeman, YM Patel (1998) Environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. *Rev Environ Health* 106: 11-56.
- [51] LN Vandenberg, MV Maffini, C Sonnenschein, BS Rubin, AM Soto (2009) Bisphenol-A and the great divide: a review of controversies in the field of endocrine disruption. *Endocr Rev* 30: 75-95.
- [52] WV Welshons, SC Nagel, FS vom Saal (2006) Large effects from small exposures. III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology* 147: 56–69.
- [53] Y Combarrous (2017) Endocrine Disruptor Compounds (EDCs) and agriculture: The case of pesticides. *Comptes Rendus Biologies* 340: 406-40.
- [54] R McKinlay, JA Plant, JNBell, N Voulvoulis (2008) Endocrine disrupting pesticides: Implications for risk assessment. *Environment International* 34:168-83
- [55] MM Milesi, R Alarcon, JG Ramos, M Muñoz-de-Toro, EH Luque, J Varayoud (2015) Neonatal exposure to low doses of endosulfan induces implantation failure and disrupts uterine functional differentiation at the pre-implantation period in rats. *Mol Cell Endocrinol* 401:248-259.
- [56] T Sweeney (2002) Is exposure to endocrine disrupting compounds during fetal/post-natal development affecting the reproductive potential of farm animals?. *Domest Anim Endocrinol* 23: 203-209
- [57] N Adams (1990) Permanent infertility in ewes exposed to plant oestrogens. *Aust. Vet. J.* 67: 197-202.
- [58] N Adams (1995) Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. *J Anim Sci* 73: 1509-1515.

- [59] J McLachlan (2001) Environmental signaling: What Embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocr Rev* 22: 319-341.
- [60] U Tiemann, R Pöhland, F Schneider (1996) Influence of organochlorine pesticides on physiological potency of cultured granulosa cells from bovine preovulatory follicles. *Theriogenology* 46: 253-265.
- [61] H Alm, H Torner, U Tiemann, W Kanitz (1998) Influence of organochlorine pesticides on maturation and postfertilization development of bovine oocytes in vitro. *Reprod Toxicol* 2: 559-563.
- [62] RM Bigsby, A Caperell-Grant, BV Madhukar (1997) Xenobiotics released from fat during fasting produces estrogenic effects in ovariectomized mice. *Cancer Res* 57: 865-9.
- [63] WA Pengue (2000) Cultivos transgénicos ¿Hacia dónde vamos? *Lugar Editorial S.A., Buenos Aires, Argentina*.
- [64] CASAFE (2014) Mercado Argentino 2014 de productos fitosanitarios. Disponible en: <http://www.casafe.org/publicaciones/estadisticas/> Acceso: 20 Junio 2019.
- [65] M Muñoz-de-Toro, HR Beldoménico, SR García, C Stoker, JJ De Jesús, J.PM Beldoménico, JG Ramos, EH Luque (2006) Organochlorine levels in adipose tissue of women from a Littoral region of Argentina. *Environ Res* 102: 107-112.
- [66] A Oliva, A Spira, L Multigner (2001) Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. *Hum Reprod* 16: 1768-1776.
- [67] A Oliva, A Giami, L Multigner, L. (2002) Environmental agents and erectile dysfunction: a study in a consulting population. *J Androl* 23: 546-550.
- [68] MF Rovedatti, PM Castane, ML Topalian, A Salibian (2001) Monitoring of organochlorine and organophosphorus pesticides in the water of the Reconquista River (Buenos Aires, Argentina). *Water Res.* 35: 3457-3461.
- [69] E Diamanti-Kandaraki, JP Bourguignon, LC Giudice, H Hauser, GS Prins, AM Soto, T Zoeller, AC Goreet (2009) Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr Rev* 30: 293-342.
- [70] RJ Wordinger, J Derrenbacker (1989) In utero exposure of mice to diethylstilbestrol alters neonatal ovarian follicle growth and development. *Acta Anat. (Basel)* 134: 312-8.
- [71] HA Rodríguez, N Santambrosio, CG Santamaría, M Muñoz-de-Toro, EH Luque, E.H. (2010) Neonatal exposure to bisphenol A reduces the pool of primordial follicles in the rat ovary. *Reprod Toxicol* 30: 550-557.
- [72] OE Rivera, J Varayoud, HA Rodríguez, M Muñoz-de-Toro, EH Luque (2011) "Neonatal exposure to bisphenol A or diethylstilbestrol alters the ovarian follicular dynamics in the lamb". *Reprod Toxicol* 32: 304– 312.

- [73] PA Hunt, KE Koehler, M Susiarjo, CA Hodges, A Ilagan, RC Voigt, S Thomas, BF Thomas, TJ Hassold (2003) Bisphenol A exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Current Biology* 13: 546-553.
- [74] M Susiarjo, TJ Hassold, E Freeman, PA Hunt (2007) Bisphenol A exposure in utero disrupts early oogenesis in the mouse. *PLoS Genet.* 3: 63-70.
- [75] MV Maffini, BS Rubin, C Sonnenschein, AM Soto (2006) Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A. *Mol. Cell Endocrinol* 254-255: 179-186.
- [76] A Suzuki, A Sugihara, K Uchida, T Sato, Y Ohta, Y Katsu, H Watanabe, T Iguchi (2002) Developmental effects of perinatal exposure to bisphenol-A and diethylstilbestrol on reproductive organs in female mice. *Reprod Toxicol* 16: 107-116.
- [77] M Savabieasfahani, K Kannan, O Astapova, NP Evans, V Padmanabhan (2006) Developmental programming: differential effects of prenatal exposure to bisphenol-A or methoxychlor on reproductive function. *Endocrinology* 147: 5956-5966.
- [78] OE Rivera, J Varayoud, HA Rodríguez. (2015). Neonatal exposure to xenoestrogens impairs the ovarian response to gonadotropin treatment in lambs. *Reproduction* 149:645-55.
- [79] J Zhao, S Pacenka, J Wu (2018). Detection of glyphosate residues in companion animal feeds. *Environ. Pollut.* 243 (Pt B), 1113–1118.
- [80] CM Benbrook (2016) Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ Sci Eur* 28:1-15.
- [81] R Mesnage, A Phedonos, M Biserni, M Arno, S Balu, JC Corton, R Ugarte, MN Antoniou (2017) Evaluation of estrogen receptor alpha activation by glyphosate-based herbicide constituents. *Food Chem Toxicol* 108 (Pt A):30-42.
- [82] SH Bai, SM Ogbourne (2016) Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. *Environ Sci Pollut Res Int* 23:18988–19001.
- [83] JP Myers, MN Antoniou, B Blumberg (2016). Concerns over use of glyphosatebased herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environ Health* 15, 19.
- [84] FDA (2016) Pesticides. Disponible en: <http://civileats.com/2016/02/17/fda-to-start-testing-for-glyphosate-in-food/> Acceso: 28 de junio 2018.
- [85] VC Aparicio, E De Geronimo, D Marino, J Primost, P Carriquiriborde, JL Costa (2013) Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere* 93:1866-1873.
- [86] L Mamy, B Gabrielle, E Barriuso (2010) Comparative environmental impacts of glyphosate and conventional herbicides when used with glyphosate-tolerant and nontolerant crops. *Environ Pollut Barking Essex* 158, 3172–3178.

- [87] PJ Peruzzo, AA Porta, AE Ronco (2008) Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environ Pollut* 156:61-66.
- [88] UNLP (2013) Relevamiento de la utilización de agroquímicos en la provincia de Buenos Aires. Mapa de situación e incidencia sobre la salud. Disponible en: http://www.agro.unlp.edu.ar/sites/default/files/paginas/informe_agroquimicos_comprimido.pdf Acceso: 28 junio 2018
- [89] R Annett, HR Habibi, A Hontela, A (2014) Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *J Appl Toxicol* 34: 458–479.
- [90] AL Williams, RE Watson, JM DeSesso (2012) Developmental and reproductive outcomes in humans and animals after glyphosate exposure: a critical analysis. *J Toxicol Environ Health B Crit. Rev.* 15: 39–96.
- [91] RM Romano, MA Romano, MM Bernardi, PV Furtado, CA Oliveira (2010) Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. *Arch Toxicol* 84:309-317.
- [92] E Clair, R Mesnage, C Travert, GE Séralini (2012) A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells in vitro, and testosterone decrease at lower levels. *Toxicol Vitro* 26: 269–279.
- [93] M Chłopecka, M Mendel, N Dziekan, W Karlik, (2014) Glyphosate affects the spontaneous motoric activity of intestine at very low doses – in vitro study. *Pestic Biochem Physiol* 113: 25–30.
- [94] B Ford, B Bateman, LA Gutierrez-Palominos, R Park, DK Nomura (2017) Mapping proteome-wide targets of glyphosate in mice. *Cell Chem. Biol.* 24: 133–140.
- [95] M Guerrero Schimpf, MM Milesi, PI Ingaramo, EH Luque, J Varayoud (2017) Neonatal exposure to a glyphosate based herbicide alters the development of the rat uterus. *Toxicology* 376:1-14.
- [96] PI Ingaramo, J Varayoud, MM Milesi, M Guerrero Schimpf, M Muñoz-De-Toro M, EH Luque (2016) Effects of neonatal exposure to a glyphosate-based herbicide on female rat reproduction. *Reproduction* 152: 403-415.
- [97] PI Ingaramo, J Varayoud, MM Milesi, M Guerrero Schimpf, R Alarcón, M Muñoz-de-Toro, EH Luque (2017) Neonatal exposure to a glyphosate-based herbicide alters uterine decidualization in rats. *Reprod Toxicol* 73: 87-95.
- [98] I Avigliano, D Canosa, L Medesani, E Rodríguez (2018) Effects of Glyphosate on Somatic and Ovarian Growth in the Estuarine Crab *Neohelice granulata*, During the Pre-Reproductive Period. *Water Air Soil Pollut* 229:1-9.
- [99] X Ren , R Li , J Liu , K Huang, S Wu, Y Li, C Li. (2018) Effects of glyphosate on the ovarian function of pregnant mice, the secretion of hormones and the sex ratio of their fetuses. *Environ Pollut Dec*; 243 (Pt B): 833-841.

- [100] P Gigante, M Berni, S Bussolati, F Grasselli, S Grolli, R Ramoni, GBasini (2018) Glyphosate affects swine ovarian and adipose stromal cell functions. *Anim Reprod Sci* 195: 185-196
- [101] MC Perego, LF Schutz, F Caloni, C Cortinovia, M Albonico, LJ Spicer (2017) Evidence for direct effects of glyphosate on ovarian function: glyphosate influences steroidogenesis and proliferation of bovine granulosa but not theca cells in vitro. *J Appl Toxicol* 37:692-698.
- [102] JP Scheerlinck, KJ Snibson, VM Bowles, P Sutton (2008) Biomedical applications of sheep models: from asthma to vaccines. *Trends in Biotechnol* 5: 259-266.
- [103] J Pryse-Davies y CJ Dewhurst (1971) The development of the ovary and uterus in the foetus, newborn and infant: a morphological and enzyme histochemical study. *J Pathol* 103: 5.
- [104] JL Juengel, HR Sawyer, PR Smith, LD Quirke, DA Heath, S Lun, SJ Wakefield, KP McNatty (2002) Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. *Mol Cell Endocrinol* 191: 1-10.
- [105] M De Felice, ML Scaldaferri, D Farini (2005) Adhesion molecules for mouse primordial germ cells. *Front Biosci* 10: 541-551.
- [106] M Pannetier, S Fabre, F Batista, A Kocer, L Renault, G Jolivet, B Mandon-Pepin, C Cotinot, R Veitia, E Pailhoux (2006) FOXL2 activates P450 aromatase gene transcription: towards a better characterization of the early steps of mammalian ovarian development. *J Mol Endocrinol* 36: 399-413.
- [107] DJ Kesler, HA Garverick (1982) Ovarian cysts in dairy cattle: a review. *J Anim Sci.* 55:1147-59.
- [108] T Steckler, J Wang, FF Bartol, SK Roy, V Padmanabhan (2005) Fetal programming: prenatal testosterone treatment causes intrauterine growth retardation, reduces ovarian reserve and increases ovarian follicular recruitment. *Endocrinology* 146: 3185-93.
- [109] V Padmanabhan, M Manikkam, S Recabarren, D Foster (2006) Prenatal testosterone excess programs reproductive and metabolic dysfunction in the female. *Mol. Cell. Endocrinol* 246: 165-174.
- [110] INTA (2013) La Producción Ovina en la Argentina Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/inta> Acceso: 12 diciembre 2019.
- [111] SENASA Ovinos. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/senasa/programas-sanitarios/cadenaanimal/ovinos> Acceso: 20 de junio 2019
- [112] INDEC Censo Nacional Agropecuario (2018). Disponible en: https://www.indec.gob.ar/ftp/cuadros/publicaciones/cna2018_resultados_preliminares.pdf Acceso: 1 de diciembre 2019.
- [113] F vom Saal, F Bronson (1978) In utero proximity of female mouse fetuses to males: Effect on reproductive performance during later life. *Biol Reprod* 19: 842-853.

- [114] MM Milesi, V Lorenz, G Pacini, MR Repetti, LD Demonte, J Varayoud, EH Luque (2018) Perinatal exposure to a glyphosate-based herbicide impairs female reproductive outcomes and induces second-generation adverse effects in Wistar rats. *Arch Toxicol* 92:2629-2643
- [115] MC Arregui, A Lenardon, D Sanchez, MI Maitre, R Scotta, S Enrique (2004) Monitoring glyphosate residues in transgenic glyphosate-resistant soybean. *Pest Manag Sci* 60 :163-166.
- [116] Test-Biotech (2013) High levels of residues from spraying with glyphosate found in soybeans in Argentina. Disponible en: <http://www.testbiotech.org/en/node/926> Acceso: 12 Junio 2018.
- [117] JE Primost, DJG Marino, VC Aparicio, JL Costa, P Carriquiriborde (2017) Glyphosate and AMPA, "pseudo-persistent" pollutants under real-world agricultural management practices in the Mesopotamic Pampas agroecosystem, Argentina. *Environ Pollut* 229:771-779.
- [118] LCU Junqueira, MMS Junqueira (1983) Técnicas básicas en citología e histología. (Eds: Livraria Editora Santos) São Paulo, Brasil.
- [119] T Lundy, P Smith, A O'Connell, NL Hudson, KP McNatty (1999) Populations of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. *J Reprod Fert* 115: 251-62.
- [120] KL Britt, PK Saunders, SJ McPherson, ML Misso, ER Simpson, JK Findlay (2004) Estrogen actions on follicle and early follicle development. *Biol Reprod* 71: 1712-23.
- [121] PD Jolly, PR Smith, DA Heath, NL Hudson, S Lun, LA Still (1997) Morphological evidence of apoptosis and the prevalence of apoptotic versus mitotic cells in the membrane granulosa of ovarian follicles during spontaneous and induced atresia in ewes. *Biol Reprod* 56: 837-846.
- [122] MM Muñoz de Toro, MV Maffini, L Kass, EH Luque (1998) Proliferative activity and steroid hormone receptor status in male breast carcinoma. *J Steroid Biochem Mol Biol* 67:333-339.
- [123] HJG Gundersen, P Bagger, TF Bendtsen, SM Evans, L Korbo, N Marcussen, A MØLLer, K Nielsen, JR Nyengaard, B Pakkenberg, FB SØRensen, A Vesterby, M J West (1988) The new stereological tools: Disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *Journal of pathology, microbiology and immunology* 96 : 857-881.
- [124] JG Ramos, J Varayoud, VL Bosquiazzo, EH Luque, M Muñoz-de-Toro (2002) Cellular turnover in the rat uterine cervix and its relationship to estrogen and progesterone receptor dynamics. *Biol Reprod* 67:735-742.
- [125] KL Howdeshell, AK Hotchkiss, KA Thayer, JG Vandenberg, FS vom Saal (1999) Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* 401: 763-764.

- [126] Y Nikaido, K Yoshizawa, N Danbara, M Tsujita-Kyutoku, T Yuri, N Uehara (2004) Effects of maternal xenoestrogen exposure on development of the reproductive tract and mammary gland in female CD-1 mouse offspring. *Reprod Toxicol* 18: 803-811
- [127] H Kato, T Ota, T Furuhashi, Y Ohta, T Iguchi (2003) Changes in reproductive organs of female rats treated with bisphenol A during the neonatal period. *Reprod Toxicol* 17: 283-288.
- [128] H Tinwell, J Haseman, PA Lefevre, N Wallis, J Ashby (2002) Normal sexual development of two strains of rat exposed in utero to low doses of bisphenol A. *Toxicol Sci* 68: 339-348.
- [129] D von Soosten, U Meyer, L Hüther, S Dänicke, M Lahrssen-Wiederholt, H Schafft, M Spolders, G Breves (2016) Excretion pathways and ruminal disappearance of glyphosate and its degradation product aminomethylphosphonic acid in dairy cows. *J Dairy Sci* 99:5318-5324.
- [130] JA Taylor, WV Welshons, FS vom Saal (2008) No Effect of Route of Exposure (Oral; Subcutaneous Injection) on Plasma Bisphenol A throughout 24 hr after Administration in Neonatal Female Mice. *Reprod Toxicol* 25: 169-176.
- [131] EA McGee, AJ Hsueh (2000) Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 21: 200-14.
- [132] M Orisaka, K Tajima, BK Tsang, F Kotsuji (2009). Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. *J Ovarian Res* 2: 9.
- [133] PA Fowler, NJ Dora, H McFerran, MR Amezaga, DW Miller, RG Lea, P Cash, AS McNeilly, NP Evans, C Cotinot, RM Sharpe, SM Rhind (2008) In utero exposure to low doses of environmental pollutants disrupts fetal ovarian development in sheep. *Mol Hum Reprod* 14: 269-280
- [134] ME Pepling (2006) From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *Genesis* 44: 622-32.
- [135] JL Tilly (2003) Ovarian follicle counts – not as simple as 1, 2, 3. *Reprod Biol Endocrinol* 1: 11.
- [136] C Tingen, A Kim, TK Woodruff (2009). The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. *Mol Hum Reprod* 15: 795–803.
- [137] WN Jefferson JF Couse, E Padilla-Banks, K Korach, R Newbold (2002). Neonatal exposure to genistein induces estrogen receptor (ER) alpha expression and multiocyte follicles in the maturing mouse ovary: evidence for ERbeta-mediated and nonestrogenic actions. *Biol. Reprod.* 67: 1285–1296.
- [138] JL Kipp, SM Kilen, S Bristol-Gould, TK Woodruff, KE Mayo (2007). Neonatal exposure to estrogens suppresses activin expression and signaling in the mouse ovary. *Endocrinology* 148:1968–1976.

- [139] T Iguchi, Y Fukazawa, Y Uesugi, N Takasugi (1990) Polyovular follicles in mouse ovaries exposed neonatally to diethylstilbestrol in vivo and in vitro. *Biol Reprod* 43: 478-84.
- [140] KC Silva-Santos, MM Seneda (2011) Multiocyte follicles in adult mammalian ovaries. *Anim Reprod* 8: 58-67.
- [141] A Anadón, MR Martínez-Larrañaga, MA Martínez, VJ Castellano, M Martínez, MT Martín, MJ Nozal, JLBernal (2009) Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. *Toxicol Lett* 190:91-95.
- [142] AL Van Eenennaam, AE Young (2017) Detection of dietary DNA, protein, and glyphosate in meat, milk, and eggs. *J Anim Sci* 95:3247-3269.
- [143] M Krüger, W Schrödl, J Neuhaus, AA Shehata (2013) Field Investigations of Glyphosate in Urine of Danish Dairy Cows. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology* 3:1-7.
- [144] RL Baldwin, EE Connor (2017) Rumen Function and Development. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 33:427-439.
- [145] JS Bus (2015) Analysis of Moms Across America report suggesting bioaccumulation of glyphosate in U.S.mother's breast milk: Implausibility based on inconsistency with available body of glyphosate animal toxicokinetic, human biomonitoring, and physico-chemical data. *Regul Toxicol Pharmacol* 73 :758-764.
- [146] KR Solomon (2016) Glyphosate in the general population and in applicators: a critical review of studies on exposures. *Crit Rev Toxicol* 46 :21-27.
- [147] S Parvez, RR Gerona, C Proctor, M Friesen, JL Ashby, JL Reiter, Z Lui, PD Winchester (2018) Glyphosate exposure in pregnancy and shortened gestational length: a prospective Indiana birth cohort study. *Environ Health* 17:23.
- [148] P Kongtip, N Nankongnab, R Phupancharoensuk, C Palarach, D Sujirarat, S Sangprasert, M Sermsuk, N Sawattrakool, SR Woskie (2017) Glyphosate and Paraquat in Maternal and Fetal Serums in Thai Women. *J. Agromedicine* 22:282-289.
- [149] R Mesnage, A Phedonos, M Biserni, M Arno, S Balu, JC Corton, R Ugarte, MN Antoniou (2017) Evaluation of estrogen receptor alpha activation by glyphosate-based herbicide constituents. *Food Chem Toxicol* 108 (Pt A):30-42.
- [150] GA Altamirano, MB Delconte, AL Gomez, PI Ingaramo, VL Bosquiazzo, EH Luque, M Muñoz-de-Toro, L Kass (2018) Postnatal exposure to a glyphosate-based herbicide modifies mammary gland growth and development in Wistar male rats. *Food Chem Toxicol* 118:111-118
- [151] KD Sinclair, KMD Rutherford, JM Wallace, JM Brameld, R Stöger, R Alberio, D Sweetman, DS Gardner, VEA Perry, CL Adam, CJ Ashworth, JE Robinson, CM Dwyer (2016) Epigenetics and developmental programming of welfare and production traits in farm animals. *Reprod Fertil Dev* 28 :1443-1478.

- [152] NJ MacLusky, F Naftolin (1981) Sexual differentiation of the central nervous system. *Science* 211: 1294–303
- [153] M Bellingham, C McKinnell, PA Fowler, MR Amezcaga, Z Zhang, SM Rhind, C Cotinot, B Mandon-Pepin, NP Evans, RM Sharpe (2012) Foetal and post-natal exposure of sheep to sewage sludge chemicals disrupts sperm production in adulthood in a subset of animals. *Int J Androl* 35:317-329.
- [154] D Monniaux, F Clément, R Dalbiès-Tran, A Estienne, S Fabre, C Mansanet, P Monget (2014) The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: What is the link? *Biol Reprod* 90:1-11.
- [155] J Pryse-Davies, CJ Dewhurst (1971) The development of the ovary and uterus in the foetus, newborn and infant: a morphological and enzyme histochemical study. *J Pathol* 103: 5.
- [156] JA McLachlan, E Simpson, M Martin (2006) Endocrine disrupters and female reproductive health. *Best. Pract. Res. Clin. Endocr. Metab.* 20: 63-75.
- [157] TJ Woodruff, A Carlson, JM Schwartz, LC Giudice (2008) Proceedings of the summit on environmental challenges to reproductive health and fertility: executive summary. *Fertil Steril* 89: 281-300.
- [158] P Mendola, LC Messer, K Rappazzo (2008) Science linking environmental contaminant exposures with fertility and reproductive health impacts in the adult female. *Fertil Steril* 89: 81-94.
- [159] Ley General de Ambiente N° 25675, Artículo 4, 6 de Noviembre de 2002