

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

Exposición posnatal a agroquímicos sobre el desarrollo y la diferenciación del útero

Lic. Ramiro Alarcón

Director de Tesis: Dr. Enrique H. Luque

Co-directora de Tesis: Dra. María M. Milesi

Lugar de realización: Instituto de Salud y Ambiente del Litoral - Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas - Universidad Nacional del Litoral

-2019-

*A la memoria de mis abuelos:
Elsa, Teresa, Orlando y Vitorio*

AGRADECIMIENTOS

A la **Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas** y a la **Universidad Nacional del Litoral**, por haber hecho posible la realización de esta tesis y por darme la posibilidad de realizar mis carreras de grado y de posgrado.

Al **Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas** por la beca doctoral otorgada, que me permitió abocarme en este trabajo.

A la dirección del **Instituto de Salud y Ambiente del Litoral**, antes el Dr. Enrique H. Luque y actualmente la Dra. Mónica Muñoz-de-Toro, quienes generosamente me abrieron las puertas de su laboratorio.

A mi Director, el **Dr. Enrique H. Luque** quien confió en mí, me guió y me aconsejó, por confiar en mí, ayudarme a resolver mis inquietudes y motivarme a crecer.

A mi Co-directora, la **Dra. María Mercedes Milesi** por sus consejos, aportes y sugerencias. Por sus enseñanzas en la mesada, y por la confianza otorgada.

A mis compañeros del **ISAL**, a todas las personas que están y que estuvieron, por todos los momentos de trabajo y de ocio compartidos a lo largo de estos años. ¡Por más pádel, peñas y salidas... Salud!

Al **Dr. Oscar E. Rivera** y a **Gisela H. Dioguardi** por su ayuda con los tratamientos y el cuidado de los animales y en la obtención de las muestras.

A mis amigos de la vida, esos con quienes comparto anécdotas desde la infancia o la adolescencia. A **Lucas, Guille, Mansu, Martín, Pupi, Santi y Seba**, y en particular a **Máximo y Merengue**.

A mis compañeros y amigos de la **FBCB**, en particular a Fer, Leo y Santi. A los de la **Asociación de Biotecnología** y del flamante **Colegio de Biotecnólogos** de Santa Fe.

A **Gastón**, un gran amigo, quien me bancó muchas veces durante mis cursos de posgrado y congresos, dándome un lugar donde quedarme y acompañándome en los ratos libres.

A **Romi Cangrú**, por ayudarme con sus correcciones de inglés y su buena onda en todo momento.

A **Clari**, mi pareja, por su compañerismo, su alegría, sus palabras, su comprensión y todo nuestro amor. Por todo lo compartido juntos: ¡Prost!

A mi clan, **mi familia... Mis viejos, mi hermana, mi hermano, mi cuñado...** Por estar siempre, por comprenderme y apoyarme a cada momento. Por sus consejos y su ayuda... Y a las dos alegrías más grandes, **mi hermoso ahijado Joa y su bello hermano Jere**, que me enseñan y enamoran día a día.

A todos aquellos con los que he compartido momentos a lo largo de estos 5 años, y me ayudaron a crecer.

PUBLICACIONES

Alarcón R, Varayoud J, Luque EH, Milesi MM. “Effect of neonatal exposure to endosulfan on myometrial adaptation during early pregnancy and labor in rats”. *Mol Cell Endocrinol* 491:110435, 2019. doi: 10.1016/j.mce.2019.04.015

Alarcón R, Ingaramo PI, Rivera OE, Dioguardi GH, Repetti MR, Demonte LD, Milesi MM, Varayoud J, Muñoz-de-Toro M, Luque EH. “Neonatal exposure to a glyphosate-based herbicide alters the histofunctional differentiation of the ovaries and uterus in lambs”. *Mol Cell Endocrinol* 482:45-56, 2019. doi: 10.1016/j.mce.2018.12.007

INDICE

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS	i	
RESUMEN.....	iii	
ABSTRACT	viii	
INTRODUCCIÓN		
1. Diferenciación organogenética del útero en el periodo prenatal	1	
2. Diferenciación organogenética posnatal uterina	2	
2.1. Desarrollo posnatal uterino en roedores	2	
2.2. Desarrollo posnatal uterino en corderas.....	3	
3. Regulación de la diferenciación organogenética del tracto reproductor femenino	5	
3.1. Genes de la familia Wnt.....	5	
3.2. Genes de la familia Hox.....	7	
3.3. Factor de transcripción Foxa2	9	
3.4. Receptores esteroideos.....	10	
3.4.1. Receptor de estrógenos	13	
3.4.2. Receptor de progesterona.....	14	
4. Compuestos químicos que contaminan el ambiente y que afectarían la fertilidad.....	14	
4.1. Perturbadores endocrinos y pesticidas	14	
4.2. Endosulfán	16	
4.2.1. Efectos del endosulfán sobre la reproducción y el desarrollo	16	
4.3. Herbicidas a base de glifosato.....	18	
4.3.1. Efectos de herbicidas a base de glifosato sobre la reproducción y el desarrollo	19	
OBJETIVOS GENERALES	25	
CAPITULO I		
EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN NEONATAL A ENDOSULFÁN SOBRE LA ADAPTACIÓN MIOMETRIAL UTERINA EN EL PERIODO PRE-IMPLANTATORIO Y EL PARTO EN RATAS.....		26
INTRODUCCIÓN.....	29	
OBJETIVOS.....	31	
MATERIALES Y MÉTODOS.....	32	
1. Animales y diseño experimental	32	
2. Obtención de muestras y procesado histológico	33	
3. Características histomorfológicas del útero en el DG5.....	34	
4. Estudio de la organización de colágeno en el DG5	36	
4.1. Determinación del área birrefringente relativa.....	36	
5. Proliferación celular y expresión de proteínas involucradas en la adaptación miometrial uterina en el DG5	37	
6. Cuantificación de la proliferación celular y de la expresión de proteínas.	38	

7.	Evaluación de la expresión de genes relacionados con la activación miometrial durante el parto mediante qRT-PCR.....	40
7.1.	Extracción de ARN total.....	40
7.2.	Transcripción Reversa	41
7.3.	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR).....	41
7.4.	Electroforesis en geles de agarosa.....	43
8.	Análisis estadístico.....	43
	RESULTADOS	44
	La exposición neonatal a endosulfán altera la organización estructural del miometrio durante el periodo pre-implantatorio.	44
	El endosulfán altera la proliferación de las células miometriales en el DG5	46
	La exposición neonatal a endosulfán alteró la expresión de proteínas involucradas en la diferenciación miometrial durante el periodo pre-implantatorio.....	47
	El endosulfán alteró el inicio del parto y la expresión de genes asociados a las contracciones uterinas durante el parto	49
	DISCUSIÓN.....	50
	CAPITULO II	
	EXPOSICIÓN NEONATAL DE CORDERAS A UN HBG:	
	EFFECTOS COMPARATIVOS DE DOS VIAS DE ADMINISTRACIÓN: ORAL VS SUBCUTÁNEA.....	54
	INTRODUCCIÓN.....	55
	OBJETIVOS.....	57
	MATERIALES Y MÉTODOS.....	58
1.	Animales y tratamiento.....	58
2.	Obtención de suero.....	59
3.	Obtención de muestras uterinas.	59
4.	Determinación de los niveles de glifosato	60
4.1.	En muestras de agua	60
4.2.	En suero de corderas.....	60
5.	Características histomorfológicas del útero.....	61
6.	Evaluación de la proliferación celular en el útero.....	62
7.	Evaluación de la expresión génica mediante qRT-PCR	62
7.1.	Extracción de ARN total y transcripción reversa	62
7.2.	PCR en tiempo real.....	63
8.	Análisis estadístico.....	64
	RESULTADOS	65
	Niveles de glifosato y AMPA	65
	La exposición neonatal no modifica el peso uterino ni el peso corporal del animal	65
	La exposición al HBG no modificó la histomorfoloía uterina en corderas prepuberales.....	66
	La exposición al HBG disminuyó la proliferación celular	67

El tratamiento con HBG no modificó la expresión de genes involucrados en el desarrollo uterino	68
DISCUSIÓN.....	69
CAPITULO III	
EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN NEONATAL DE CORDERAS A UN HBG SOBRE EL DESARROLLO UTERINO	72
INTRODUCCIÓN.....	73
OBJETIVOS.....	75
MATERIALES Y MÉTODOS.....	76
1. Animales y tratamiento.....	76
2. Obtención de muestras uterinas.	77
3. Generación de un anticuerpo anti-Foxa2.....	78
3.1. Western blot.....	78
4. Características histomorfológicas del útero	78
5. Evaluación de la expresión proteica por inmunohistoquímica	79
5.1. Evaluación de la expresión de moléculas involucradas en la proliferación celular.....	80
5.2. Cuantificación de la expresión de proteínas involucradas en el desarrollo uterino.....	81
6. Inmunofluorescencia doble.....	81
7. Evaluación de la expresión génica mediante qRT-PCR	82
7.1. Extracción de ARN total y transcripción reversa	82
7.2. PCR en tiempo real.....	82
8. Análisis estadístico.....	83
RESULTADOS	84
Caracterización y validación del anticuerpo anti-Foxa2	84
La exposición al HBG disminuye la proliferación celular en el útero de corderas prepuberales	85
La exposición al HBG induce moléculas que modulan la proliferación celular	86
El tratamiento con un HBG altera la expresión de marcadores moleculares del desarrollo uterino.....	89
DISCUSIÓN.....	94
CONCLUSIONES DE LOS CAPITULOS II Y III.....	99
CONSIDERACIONES FINALES.....	100
BIBLIOGRAFÍA	105

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

DE	Día embrionario
TRF	Tracto reproductor femenino
DPN	Día posnatal
α-SMA	α actina de músculo liso
Wnt5a	Miembro de la familia <i>Wingless-related MMTV integration site 5 A</i>
Wnt7a	Miembro de la familia <i>Wingless-related MMTV integration site 7 A</i>
EL	Epitelio luminal
EG	Epitelio glandular
ES	Estroma subepitelial
M	Miometrio.
Hox	<i>Homeobox</i>
Hoxa10	<i>Homeobox A10</i>
Fox	<i>Forkhead box</i>
Foxa2	<i>Forkhead box A 2</i>
E₂	17 β -estradiol
P₄	Progesterona
RE	Receptor de estrógenos
REα	Receptor de estrógenos α
REβ	Receptor de estrógenos β
ESR1	Gen del receptor de estrógenos α
ESR2	Gen del receptor de estrógenos β
RP	Receptor de progesterona
KO	<i>Knockout</i>
PE	Perturbador endócrino
DES	Dietilstilbestrol
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
POPs	Contaminantes orgánicos persistentes
HBG	Herbicidas a base de glifosato
kg-pc	Kilogramo de peso corporal

NOEL	Nivel de efectos no observables
RfD	Dosis de referencia
ADI	Ingesta diaria admisible
AMPA	Ácido aminometilfosfónico
DG	Día gestacional
BPA	Bisfenol A
SMC	Células del músculo liso
CAPs	Proteínas asociadas a las contracciones
OXTR	Receptor de oxitocina
PTGFR	Receptor de prostaglandina F2 α
Cx-43	Conexina 43
PBS	Buffer fosfato salino
H-E	Hematoxilina - eosina
P-H	Picrosirius - hematoxilina
DOI	Densidad óptica integrada
PCBs	Bifenilos policlorados
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IGF-2	<i>Insulin-like growth factor 2</i>
IGF-1R	Receptor del <i>insulin-like growth factor 1</i>
IGFBP	Proteína de union al <i>insulin-like growth factor</i>
IGFBP-3	Proteína de union al <i>insulin-like growth factor 3</i>
FST	Folistatina
ACVR2A	Receptor de activinas 2A
PRLR	Receptor de prolactina
EPA	Agencia de protección ambiental de los EE. UU.
ACTB	β -actina
LOQ	Límite de cuantificación
LOD	Límite de detección
IHQ	Inmunohistoquímica

RESUMEN

El desarrollo del útero y el grado de madurez histológica al nacer entre la mujer y las diferentes especies animales es diferente; sin embargo, el único proceso de desarrollo posnatal en común a todas las especies es el desarrollo de las glándulas uterinas. En los roedores recién nacidos, el útero al nacer presenta un epitelio luminal y un mesénquima que luego se diferencia en estroma subepitelial, y en los miometrios circular y longitudinal. Luego, entre el día posnatal (DPN) 5 y el DPN21, se produce el desarrollo de las glándulas uterinas o adenogénesis. En la oveja, se pueden observar el epitelio, estroma y miometrio uterino luego del nacimiento, como también las carunculares. El principal proceso de desarrollo posnatal en el útero ovino es la adenogénesis, que comienza en la primera semana de vida y finaliza en el DPN56. En ambas especies, durante este periodo crítico del desarrollo, la exposición a compuestos con actividad de perturbador endócrino (PE) puede alterar el desarrollo y la diferenciación, e inducir cambios en la funcionalidad, repercutiendo negativamente en la salud reproductiva.

Actualmente, hay gran preocupación por el impacto de los contaminantes ambientales sobre la salud reproductiva. Los contaminantes ambientales, naturales o sintéticos, que aún a bajas dosis interfieren con la acción hormonal se denominan PE. Entre los contaminantes ambientales que se comportan como PE se encuentran los pesticidas, siendo la gran mayoría con efecto insecticida o herbicida. Asimismo, muchos de estos insecticidas y herbicidas se emplean, o han sido empleados, en la actividad agrícola para el control de plagas y malezas. En Argentina, dos de los agroquímicos más empleados en las últimas décadas son el endosulfán y los herbicidas a base de glifosato (HBG).

El endosulfán es un insecticida y acaricida organoclorado, con gran capacidad de bioacumularse y biomagnificarse a lo largo de las redes tróficas. Por ello, a pesar de estar prohibido en Argentina desde 2013, todavía puede encontrarse endosulfán y sus metabolitos en el ambiente, y en tejido animal y humano. Los efectos nocivos del endosulfán sobre la salud abarcan neurotoxicidad, hepatotoxicidad, nefrotoxicidad y toxicidad reproductiva. El endosulfán también posee actividad como PE, lo cual se ha demostrado *in vitro* e *in vivo*. Es importante destacar que, aunque existe abundante información sobre los efectos del endosulfán sobre la salud reproductiva del macho, los reportes de los efectos del éste compuesto sobre la hembra son escasos. En estudios de nuestro laboratorio, hemos demostrado en ratas adultas ovariectomizadas que la exposición a endosulfán imita la acción de estrógenos administrados en dosis no uterotrópicas. Previamente, también demostramos los efectos adversos de la exposición posnatal a bajas dosis de endosulfán en la expresión de proteínas involucradas en el desarrollo y diferenciación del útero en el periodo prepuberal, y que induce fallas en la implantación alterando el crecimiento y diferenciación endometrial en el periodo pre-implantatorio.

Los HBG representan a los agroquímicos más empleados a nivel mundial y en nuestro país. Su principal uso es el control de malezas tanto en áreas urbanas como rurales, aunque también se emplean como disecantes antes de la cosecha. La generación de cultivos genéticamente modificados para que resistan los efectos del herbicida impulsó la comercialización y uso; sin embargo, la aparición de malezas resistentes también derivó en un aumento en la dosis y la frecuencia de su aplicación. El glifosato es rápidamente degradado a ácido aminometilfosfónico (AMPA); aunque, debido a su elevada frecuencia de aplicación, se considera a los HBG y sus metabolitos como “pseudo-persistentes”. Actualmente, se sigue considerando al glifosato y a los HBG inocuos para la salud; no obstante, hay un creciente número de estudios que reportan los efectos adversos sobre la salud. Se demostró mediante ensayos *in vitro*, en cultivos primarios y en líneas celulares, que el principio activo o los formulados comerciales (HBG) alteran la proliferación celular, la apoptosis, y la esteroidogénesis. También se han reportado efectos sobre testículo, ovario, útero y glándula mamaria, indicando su potencial actividad como PE. En un estudio realizado por nuestro grupo, en un modelo de rata adulta ovariectomizada observamos que un HBG modifica la expresión de genes estrógeno-sensibles similar a los inducidos por 17β -estradiol en dosis no uterotrópicas. Asimismo, en otros estudios reportamos que la exposición neonatal de ratas a un HBG por vía subcutánea induce hiperplasia luminal uterina y altera la expresión de moléculas clave del desarrollo uterino prepuberal, y que aumenta el porcentaje de pérdidas posimplantatorias en asociación con alteraciones en la expresión de moléculas relacionadas con el proceso de decidualización. Por otro lado, empleando un modelo de exposición perinatal (durante la gestación y lactancia), observamos que disminuye el número de sitios de implantación en la F1; mientras que la F2 (crías nacidas de la F1) presentaron retraso del desarrollo, menor peso y longitud fetal, mayor peso de la placenta y una mayor incidencia de anomalías congénitas.

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

Primero, evaluamos los efectos de una exposición neonatal a una baja dosis de endosulfán sobre la diferenciación miometrial uterina en el periodo pre-implantatorio y la activación miometrial durante el parto. Para ello, ratas hembra de la cepa Wistar fueron inyectadas por vía subcutáneas cada 48 h desde el día posnatal (DPN) 1 al DPN7 con aceite (vehículo) o con endosulfán en una dosis de 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal/día. En el DPN90, las hembras se alojaron con machos de fertilidad comprobada. Se definió como día gestacional (DG) 1, al momento en el que se observaron espermatozoides en el extendido vaginal. Los animales preñados se asignaron a uno de los dos experimentos para evaluar: **i)** la diferenciación miometrial uterina en el DG5 determinando la histomorfología, la proliferación de las

células miometriales, y la expresión de proteínas involucradas con el proceso de adaptación miometrial que permite la implantación embrionaria (receptor de estrógenos α , RE α ; receptor de progesterona, RP; Wnt7a y Hoxa10); ii) el inicio del parto, y la actividad miometrial uterina durante el trabajo de parto (DG23), determinando la expresión de genes asociados a las contracciones (receptor de oxitocina, OXTR; receptor de prostaglandinas F2 α , PTGFR; y Conexina-43, Cx-43). En el DG5, observamos que la exposición neonatal a endosulfán alteró la histoarquitectura miometrial reduciendo el espesor de los miometrios circular y longitudinal, y del tejido conectivo intersticial, junto con una disminución de la organización del colágeno y del área relativa ocupada por vasos. El tratamiento redujo la proliferación celular en ambas capas miometriales, en asociación una menor expresión de Wnt7a en los miometrios circular y longitudinal, y de Hoxa10 en el miometrio longitudinal. Aunque todos los animales parieron en el DG23, la exposición a endosulfán indujo un adelantamiento del parto, junto con un aumento en la expresión de los genes OXTR, PTGFR y Cx-43. Nuestros resultados indican que la exposición neonatal a endosulfán induce alteraciones en la adaptación miometrial en el periodo pre-implantatorio y el parto. Estas alteraciones podrían estar asociadas con los efectos del endosulfán sobre la implantación embrionaria y el adelantamiento en el inicio del parto.

En segundo lugar, estudiamos los efectos de la exposición neonatal de corderas a un HBG sobre el desarrollo uterino en el periodo prepuberal. Por un lado, comparamos los efectos del HBG sobre el desarrollo del útero ovino empleando dos diferentes vías de administración, oral vs. subcutánea. Para ello, corderas de la raza frisona fueron expuestas desde el DPN1 al DPN14, cada 24 h, a solución fisiológica o a un HBG (Roundup Full II®, 54% p/v de glifosato) en una dosis de 2 mg de glifosato/kg peso corporal/día administradas por vía oral o subcutánea. Se determinó la presencia de glifosato y de su metabolito, AMPA, en muestras de suero obtenidas en el DPN15 y el DPN45. Los úteros se extrajeron y se pesaron en el DPN45. En cortes histológicos de útero se determinó la histomorfología uterina y la expresión de Ki67 como marcador de proliferación celular. Además, se evaluó la expresión de genes relacionados con el desarrollo uterino (receptor de estrógenos α , ESR1; receptor de estrógenos β , ESR2; RP; *insulin-like growth factor 1*, IGF-1; IGF-2; receptor de los IGF, IGF-1R; folistatina, FST; y el receptor de activina 2 A, ACVR2A). Se detectó glifosato, pero no AMPA, en las muestras de suero en el DPN15; en el DPN45, no se detectó ni glifosato ni AMPA en el suero de las corderas. En los animales control no se detectó glifosato ni AMPA en DPN15 o DPN45. La exposición al HBG no afectó el peso del útero, ni la histomorfología uterina. En las corderas expuestas al HBG observamos una menor proliferación celular, sin alteraciones en la expresión de los genes estudiados. Los resultados obtenidos fueron similares entre los animales expuestos por vía oral con los expuestos por vía subcutánea. En conclusión, nuestros resultados demuestran que la exposición neonatal de corderas a una baja dosis de un HBG redujo la actividad proliferativa del útero, independientemente de la vía de administración.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, investigamos los mecanismos que podrían estar relacionados con la menor proliferación celular. Para ello, corderas de la raza frisona fueron inyectadas diariamente por vía subcutánea, desde el DPN1 al DPN14, con solución fisiológica o con un HBG (Roundup Full II®), en una dosis de 2 mg de glifosato/kg peso corporal/día. El criterio de elección de la vía subcutánea se realizó con base en los resultados anteriores, y debido a que empleando esta vía de exposición nos permite asegurar los niveles de administrados a las corderas experimentales y resulta más simple que la vía oral. En el DPN45, se obtuvieron las muestras uterinas con el fin de evaluar: **i)** histomorfología uterina; **ii)** la proliferación celular, empleando la inmunodetección de Ki67; **iii)** la expresión de moléculas involucradas en el proceso de proliferación celular y del desarrollo uterino por inmunohistoquímica y por biología molecular. Se determinó, mediante qRT-PCR, la expresión de IGF-1, IGF-2, IGF-1R, del *IGF binding protein 3* (IGFBP-3); y de dos isoformas del receptor de prolactina, isoformas corta y larga. Empleando inmunohistoquímica, evaluamos la expresión de moléculas relacionadas con el ciclo de proliferación celular como el inhibidor de ciclinas dependientes de cinasas 1B, p27^{KIP}; y de proteínas involucradas en el desarrollo uterino (receptor de estrógenos α , RE α ; RP, Wnt5a, Wnt7a, β -catenina, Hoxa10 y Foxa2). Similar a lo observado en el experimento anterior, no observamos alteraciones en la histomorfología de los animales tratados, pero si una disminución en la proliferación celular. La menor actividad proliferativa está asociada, al menos en parte, con una mayor expresión de IGFBP-3 y de p27. Asimismo, en las corderas expuestas al HBG observamos una menor expresión del RE α en los epitelios luminal y glandular (EL y EG, respectivamente) y en el estroma subepitelial (ES), una disminución de la expresión del RP en el EL, y una mayor expresión del RP en EG y ES. En el útero de nuestras corderas control observamos que los Wnt se expresaron en ambos epitelios y en el estroma; mientras que β -catenina se observó en la membrana plasmática de los epitelios luminal y glandular. La exposición neonatal al HBG redujo la expresión de Wnt5a en el EG, de Wnt7a en el ES y de β -catenina en los EL y EG. Por último, observamos que la exposición neonatal al HBG disminuyó la expresión de Hoxa10 en el ES y de Foxa2 en el EG. Podemos sugerir que alteraciones evidenciadas en la expresión de moléculas que regulan el desarrollo y diferenciación uterina contribuyen a la menor proliferación celular observada en las corderas expuestas al HBG. Nuestros resultados demuestran que los efectos de la exposición neonatal de corderas a una baja dosis de un HBG sobre la proliferación celular, se relaciona con el aumento en la expresión de moléculas moduladoras de la proliferación, y con las alteraciones observadas en la expresión de proteínas involucradas en el desarrollo uterino en el periodo prepuberal.

En conjunto, los resultados de la presente tesis aportan nuevas evidencias sobre los efectos de dos de los agroquímicos más utilizados en las últimas décadas en el país. También sugieren que la exposición a compuestos con actividad de PE durante periodos críticos puede producir alteraciones en el desarrollo

y la diferenciación a largo plazo, con consecuencias adversas para la salud reproductiva. Asimismo, consideramos que nuestros resultados contribuyen a comprender el potencial impacto de la exposición a PE sobre la cadena productiva de la industria pecuaria.

ABSTRACT

Uterine development at birth differs between women and different animal species. The uterine gland development is the only developmental process which is shared across the human and other animal species. At birth, the rodent uterus has a luminal epithelium and a mesenchyme. Later, the mesenchymal differentiation forms the stromal and myometrial compartments. Uterine gland development takes place between postnatal day (PND) 5 and PND21. On the other hand, the ovine uterus has a luminal epithelium, stromal and myometrium, as well as the caruncles. The principal neonatal developmental process in the ovine uterus is the glandular development, which begins during the first week and finishes at PND56. In both, rodents and ewe lambs, the exposure to endocrine disruptor chemicals (EDCs) during critical developmental periods, might alter the development and the differentiation and induce changes in uterine functionality. These alterations could have long-term effects on reproductive health.

Nowadays, there is a great concern has focused on health effects caused by environmental pollutants. Natural or synthetic pollutants which can interfere with hormonal action are classified as EDCs. The EDCs can affect hormonal actions even at low doses of exposure. Many pesticides are classified as EDCs, and the majority are insecticides and herbicides. Moreover, the insecticides or herbicides classified as EDCs have been employed in agricultural control of plagues and weeds. Some other agrochemicals are still in use. In Argentina, endosulfan and glyphosate-based herbicides (GBH) have been the most employed in the last decades.

Endosulfan is an organochlorine insecticide and acaricide which bioaccumulates and biomagnifies through trophic nets. Despite of the fact that endosulfan has been banned in Argentina since 2013, the pesticide and its metabolites can be found in the environment, and in human and animal tissues. Endosulfan has several adverse effects on health and its toxicity has been reported on reproductive health as well as neurotoxicity, hepatotoxicity, nephrotoxicity among others. *In vitro* and *in vivo* studies showed that endosulfan act as an EDC. Moreover, several studies reported the effects of endosulfan on male reproductive health, but fewer investigations have focused on endosulfan effects in female reproductive health. We have previously showed that, in adult ovariectomized rats, endosulfan exposure mimics the estrogen action in non-uterotrophic doses. Moreover, we also reported that neonatal exposure to low doses of endosulfan alters the expression of molecules involved in uterine development and differentiation during prepubertal period and induces implantation failures by disrupting the endometrial development and differentiation in the pre-implantation period.

The GBHs are the most widely employed agrochemicals in Argentina and around the world. GBHs are mainly used for weeds control in urban and rural areas, but also as pre-harvest desiccants. The GBH sales and use have been boosted by the introduction of genetically modified crops. However, there is also

an increase in the application rate and frequency of GBHs as consequence of the increased glyphosate-resistant weeds. Glyphosate is rapidly degraded into aminomethylphosphonic acid in soil, but GBHs and its metabolites are considered as “pseudo-persistent” under current practices. GBHs have been presented as one of the safest agrochemicals in history; however, there is a growing evidence of health adverse effects of glyphosate alone and its commercial formulations. *In vitro* studies showed that glyphosate and GBHs alter cellular proliferation and apoptosis rates and disrupt steroidogenesis. By using animal models, it has been shown that GBHs may act as EDC on testis, ovaries, uterus and mammary gland. We reported that GBH exposure alters the estrogen-sensitive gene expression similarly to non-uterotrophic estradiol doses. We also reported that neonatal exposure of rats to GBH through subcutaneous injections induces luminal epithelial hyperplasia and alters the expression of key molecules involved in prepubertal uterine development. In addition, we showed that neonatal exposure of rats to GBH through subcutaneous injections induces post-implantation losses in association with altered protein expression of molecules involved in uterine decidualization. Using a different approach, we showed that perinatal (gestational and lactational) exposure reduces the number of implantation sites in the F1; while the F2 (offspring of F1) showed delayed growth, lower fetal and longitudinal weight, higher placental weight and increased incidence of congenital anomalies.

Considering all the above mentioned, our aim was to investigate the effects of the postnatal exposure to agrochemicals on development and differentiation of the uterus, using two different animal models.

First, we studied the neonatal exposure effects to a low dose of endosulfan in the myometrial adaptation during early pregnancy and labor. Newborn female rats were subcutaneously injected with corn oil (vehicle) or 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight/day of endosulfan on PND1, 3, 5 and 7. On PND90, the rats were mated to evaluate: **i**) myometrial differentiation on gestational day (GD) 5 by assessment of histomorphology, cell proliferation and protein expression of molecules involved in myometrial adaptation for embryo implantation (estrogen receptor α , ER α ; , Wnt7a and Hoxa10); **ii**) the timing of parturition and myometrial activation during labor by determining the uterine expression of contraction-associated genes (oxytocin receptor, OXTR; prostaglandin F 2α receptor, PTGFR; and Connexin-43, Cx-43). We showed that neonatal exposure to endosulfan decreased the circular and longitudinal myometrial thickness, as well as the interstitial connective tissue, together with lower collagen organization and blood vessels relative area during the pre-implantation period. In addition, endosulfan exposure decreased smooth muscle cell proliferation in association with a lower Wnt7a expression in both myometrial layers, and a downregulation of Hoxa10 in longitudinal myometrium. Despite that female gave birth on GD23, an advancement in the initiation of labor was observed in endosulfan-exposed females. This alteration

was related to an increased expression of OXTR, PTGFR and Cx-43. In conclusion, our results show that neonatal exposure to endosulfán induce long-term effects in the myometrial adaptation during early pregnancy and labor. These alterations could be associated with the endosulfan effects on embryo implantation process and the timing of labor.

Secondly, we also evaluated the neonatal exposure effects of a GBH on uterine development of ewe lambs during prepubertal period. Our aim was to compare the effects of oral and subcutaneous exposure to a GBH on uterus of prepubertal ewe lambs. Therefore, Friesian ewe lambs were exposed to a subcutaneous or to an oral dose of GBH (Roundup Full II; dose of 2 mg glyphosate/kg body weight/day) or to saline solution (vehicle) from PND1 to PND14. Serum glyphosate and AMPA concentrations were measured on PND15 and PND45. The uteri were removed and weighed on PND45. Uterine histomorphology features were evaluated by picosirius-hematoxylin staining. Cell proliferation was assessed by immunodetection of Ki67. Gene expression of molecules involved in uterine development (estrogen receptor α , ESR1; estrogen receptor β , ESR2; progesterone receptor, PR; insulin-like growth factor 1, IGF-1; IGF-2, IGF receptor, IGF-1R; follistatin, FST; and activin receptor 2A, ACVR2A) were determined by qRT-PCR. Glyphosate but not AMPA was detected in exposed lamb serum on PND15, while neither glyphosate nor AMPA were detected on PND45. Controls were negative for glyphosate and AMPA on PND15 and PND45. GBH exposure did not affect uterine weight nor uterine histomorphology. The exposure of ewe lambs to GBH decreased the cell proliferation in all the uterine compartments but no alterations in gene expression were detected. It is worth mentioning that adverse effects were similar between both exposed groups. To sum up, our results show that neonatal exposure of ewe lambs to a low dose of GBH decreased the proliferative activity in the uterus, independently of the administration route.

Considering our previous results, we investigated which mechanisms could be involved with the decreased cell proliferation in the uterus of the GBH-exposed ewe lambs. To achieve this, Friesian ewe lambs were subcutaneously injected with saline solution (vehicle) or with a GBH (Roundup Full II) in a dose of 2 mg glyphosate/kg body weight/day, from PND1 to PND14. The criteria for the selection of the administration route was made taking our previous results into account, due to the fact that the administered dose corresponds to the experimental dose and that always is administered the same dose. Uterine samples were obtained in order to evaluate: **i)** uterine histomorphology; **ii)** cell proliferation by immunodetection of Ki67; **iii)** the expression of molecules involved in cell proliferation and uterine development by immunohistochemistry (IHC) and by qRT-PCR. The expression of IGF-1, IGF-2, IGF-1R, IGF binding protein 3 (IGFBP-3) and the two prolactin receptor isoforms (PRLR short and long) were determined by qRT-PCR. The cyclin-dependent kinase inhibitor 1B, p27^{KIP}; and molecules involved in uterine development (estrogen receptor α , ER α ; PR, Wnt5a, Wnt7a, β -catenin, Hoxa10 and Foxa2) were

assessed by IHC. Similar to our previous results, a decreased cell proliferation rate was observed in all uterine compartments of GBH-exposed lambs, but no changes were observed in uterine histomorphology. We also observed an increased IGFBP-3 and p27 expression in the treated animals, which can be correlated with the decreased proliferative activity. The neonatal exposure to the GBH alters the expression of steroid receptors by downregulating the expression of ER α in luminal and glandular epithelia (LE and GE, respectively) and subepithelial stroma (SS), while PR expression was decreased in LE but upregulated in GE and SS. In control animals, Wnt5a and Wnt7a is expressed in LE, GE and SS, while β -catenin is highly expressed in cytoplasmic membranes of LE and GE. In addition, GBH treatment decreased the expression of Wnt5a in the GE, of Wnt7a in SS and β -catenin in LE and GE. Furthermore, the GBH-exposed animals showed a lower expression of Hoxa10 in SS and Foxa2 in GE as compared with controls. In conclusion, our results show that neonatal exposure of ewe lambs to a low dose of GBH decreased cell proliferation and altered expression of molecules involved in regulation of cell cycle and development and differentiation in the uterus at prepubertal period.

Finally, the result of this thesis shed light on the effects of the most employed agrochemicals over the last decades in Argentina. In addition, our results also suggest that EDC exposure during critical periods of development and differentiation might have adverse long-term effects, with detrimental consequences for reproductive health. We also consider that this thesis provides more comprehension of the potential impact of agrochemicals with EDC activity on livestock productive chains.

INTRODUCCIÓN

*“Hay que cuestionar lo dado,
esa es la función del saber”*

Cornelius Castoriadis

Esta página ha sido dejada intencionalmente en blanco

El útero es un órgano fundamental para la reproducción en mamíferos. Entre sus principales funciones fisiológicas podemos mencionar: i) el transporte, almacenamiento y maduración de espermatozoides; ii) la provisión de un ambiente adecuado para la implantación, supervivencia, y desarrollo del embrión y las membranas extraembrionarias asociadas; y, iii) la contracción rítmica de la musculatura uterina, necesaria para la expulsión de las crías durante el parto.

1. Diferenciación organogenética del útero en el periodo prenatal

El sexo cromosómico o genético de un embrión se determina en el momento de la fecundación, sin embargo, el desarrollo de las características morfológicas masculinas o femeninas recién se inicia en la sexta o séptima semana de gestación en los humanos, en el día embrionario (DE) 11,5 en el ratón, o en el DE34 en las ovejas [1]. En efecto, durante el desarrollo embrionario temprano los dos sexos son indistinguibles y los embriones poseen dos pares de conductos genitales: los conductos mesonéfricos o de Wolff, y los conductos paramesonéfricos o de Müller [2].

El sexo masculino se origina con la diferenciación de los conductos de Wolff, produciéndose el desarrollo de los órganos reproductivos internos y externos. Estos cambios se producen debido a la expresión del gen *Sry* (del inglés: *Sex-determining Region of the Y chromosome*) [3,4] y a la posterior producción de hormonas en los testículos: i) hormona anti-Mülleriana (HAM), también conocida como MIS (del inglés: *Müllerian-inhibiting substance*), secretada por las células de Sertoli, ii) testosterona, secretada por las células de Leydig y, iii) el factor de crecimiento tipo Insulina 3 (Insl3, del inglés: *Insulin-Like growth factor 3*) [1,2]. Por el contrario, en el sexo femenino, ocurre la diferenciación y desarrollo de los conductos de Müller y la atrofia de los conductos de Wolf; a partir de los conductos de Muller se desarrollarán los órganos y tejidos del tracto reproductor femenino (TRF), y se caracteriza por la ausencia de las hormonas mencionadas y del gen *Sry* [5].

Antes del nacimiento, los conductos Müllerianos de la rata y del ratón son histológicamente indiferenciados y de apariencia homogénea, y consisten de un epitelio simple sostenido por un mesénquima indiferenciado [1,6,7]. Por otro lado, en las ovejas, en el DE90 se producen nódulos aglandulares que luego formarán las carúnculas, mientras que entre el DE135 y el DE150 comienzan a formarse invaginaciones superficiales, en el epitelio luminal (EL) intercaruncular, que darían lugar al desarrollo de las glándulas uterinas [8]. Los procesos de diferenciación y desarrollo antes mencionados son regulados por las interacciones epitelio-mesénquima [9,10], por la expresión de diversas moléculas señalizadoras y por diferentes factores de transcripción, como los que poseen regiones de homeodominio [1,11].

2. *Diferenciación organogenética posnatal uterina*

Al igual que otros órganos del TRF, el útero no se encuentra completamente desarrollado ni diferenciado al nacimiento en la mayoría de los mamíferos. El establecimiento de la histoarquitectura tejido-específica se completa posnatalmente en roedores, especies de interés zootécnico y en humanos [5]. El proceso de desarrollo posnatal establece el crecimiento y la morfogénesis radial que dan lugar a la histología tisular uterina: el endometrio, el miometrio y el perimetrio. Entre las diferentes especies, los eventos morfogenéticos comunes al desarrollo uterino son: i) organización y estratificación del estroma; ii) diferenciación y crecimiento del endometrio; y iii) el desarrollo de las glándulas uterinas [8]. El momento en el cual ocurren dichos eventos, difiere entre las distintas especies. En los roedores, el útero presenta un epitelio simple con un mesénquima indiferenciado y sin glándulas endometriales al nacimiento, y el proceso de máxima diferenciación del TRF ocurre durante las dos primeras semanas de vida posnatal [11,12]. En forma similar, en las ovejas el útero no se encuentra completamente desarrollado al nacimiento; sin embargo, la vagina, el cérvix y los oviductos presentan apariencia de estar histológicamente desarrollados [13]. En el humano, el útero al nacimiento se asemeja histológicamente al de un adulto, aunque menos desarrollado, sobre todo en relación a las glándulas endometriales, que son escasas y superficiales [1]. Asimismo, en el humano el desarrollo de las glándulas endometriales se inicia en el feto y se completa al alcanzar la pubertad, mientras que en roedores y en la oveja es un proceso que, aunque involucra diferentes etapas, es primordialmente posnatal y finaliza antes de la pubertad [8]. A continuación, se describen con más detalle las características del desarrollo posnatal uterino en roedores y corderas, que son los dos modelos animales que se utilizaron en el desarrollo de la presente tesis.

2.1. *Desarrollo posnatal uterino en roedores*

En los roedores, el TRF consiste en una vagina, un cérvix con dos canales independientes, dos cuernos uterinos, oviductos y ovarios. Como se ha mencionado anteriormente, el desarrollo y diferenciación uterina en los roedores ocurre en las primeras dos semanas de vida. En el ratón y la rata, desde el día posnatal (DPN) 0 al DPN5 se produce la diferenciación del mesénquima en estroma y miometrio, por interacción entre las células mesenquimáticas con las epiteliales [14]. Siendo el tejido mesenquimático el que especifica la identidad epitelial [9,10]

Al momento de nacer, en el ratón, las células mesenquimáticas están indiferenciadas, se encuentran aleatoriamente ordenadas, y presentan inmunomarcación vimentina-positiva [15]. Como mencionamos, entre el DPN0 y el DPN5, el mesénquima comienza a diferenciarse en tres capas: una interna, una media y una externa. La capa media adquiere una orientación circular y se torna α -actina de músculo liso (α -SMA) positiva, dando origen al miometrio circular; mientras que la externa comienza a organizarse

longitudinalmente [15]. Alrededor del DPN10, la capa externa se ordena en fibras celulares α -SMA-positivas, formando el miometrio longitudinal. Entre las capas del miometrio circular y longitudinal, a partir del DPN5 se desarrolla la capa vascular [15].

A partir del DPN5, comienzan las invaginaciones (*budding*) en el epitelio las cuales marcan el inicio del desarrollo glandular. Sin embargo, la génesis de las glándulas no se inicia hasta el DPN7 y DPN9 en el ratón y en la rata, respectivamente; momento el cual el *budding* es más evidente [5,16]. En la rata, desde el DPN9 hasta el DPN15 se produce la *Tubulogenesis*, resultando en el desarrollo de glándulas simples y tubulares [5,8]. Por último, a partir del DPN15, las glándulas comienzan a enrollarse y ramificarse (*coiling* y *branching*) ligeramente, proceso que finaliza en el PDN21; momento en el cual el útero adquiere una histología similar a la de un animal adulto [17].

2.2. Desarrollo posnatal uterino en corderas

En la oveja, así como en otros rumiantes, el TRF posee una vagina, un cérvix con un único canal cervical, y un útero bicornes con un pequeño cuerpo uterino común; además de los oviductos y ovarios. El útero histológicamente desarrollado presenta: un endometrio con regiones protuberantes y aglandulares denominadas carúnculas, regiones intercarunculares con un gran desarrollo glandular, y un miometrio con dos capas de músculo liso circular (o interna) y longitudinal (o externa) [13]. Como se mencionó previamente, la histología uterina en las ovejas no está completamente desarrollada al nacimiento, dado que durante los dos primeros meses de vida se produce el desarrollo de las glándulas, de los pliegues endometriales y, en menor medida, el crecimiento de las carúnculas y del miometrio [18]. El desarrollo de las glándulas desde el epitelio luminal hacia el miometrio involucra una serie de eventos coordinados que comienzan con el *budding* (o formación de invaginaciones) y la tubulogénesis, y se completa con el enrollamiento y la ramificación de las estructuras glandulares [8]. Se ha descrito el patrón de desarrollo temporal del útero ovino. Desde el nacimiento hasta el DPN7, se produce el *budding*, donde pueden observarse invaginaciones superficiales en el epitelio luminal de lo que serían las regiones intercarunculares [13]. Entre el DPN7 y el DPN14, se produce la proliferación y el crecimiento de las invaginaciones dentro del estroma, proceso denominado *Tubulogenesis*. Luego, desde el DPN14 al DPN28, se produce el *Coiling and Branching* (enrollamiento y ramificación) de las glándulas uterinas; y por último (del DPN28 al DPN56) ocurre el *Branching morphogenesis* o la ramificación de las estructuras glandulares (Figura 1A) [1,8]. En el DPN56, es el momento que se considera que la histología del útero ha completado su desarrollo, siendo idéntica a la que se observa en la oveja adulta. Sin embargo, es importante destacar que, similar a lo que ocurre con los roedores, la maduración final del útero no ocurre hasta la pubertad [1,8,19] o incluso durante la gestación [8,20].

Es importante destacar que el tiempo en el que ocurren los procesos del desarrollo uterino difiere entre el humano y las diferentes especies de animales (por ejemplo: roedores, ungulados y primates), siendo estas diferencias muy marcadas en el estadio del desarrollo del útero al nacimiento (Figura 1B). El único proceso de desarrollo y diferenciación posnatal común a todas las especies de mamíferos es el proceso del desarrollo de glándulas endometriales o adenogénesis uterina [5]. En los humanos, al igual que en los animales de interés zootécnico, la adenogénesis involucra un marcado desarrollo de la estructura glandular a través de los procesos de *coiling* y *branching*; mientras que, en los roedores, las estructuras glandulares son más simples. Por lo tanto, debido a las similitudes con el humano, las especies de interés zootécnico proporcionan un modelo más atractivo para el estudio de los mecanismos involucrados en el desarrollo y la funcionalidad uterina.

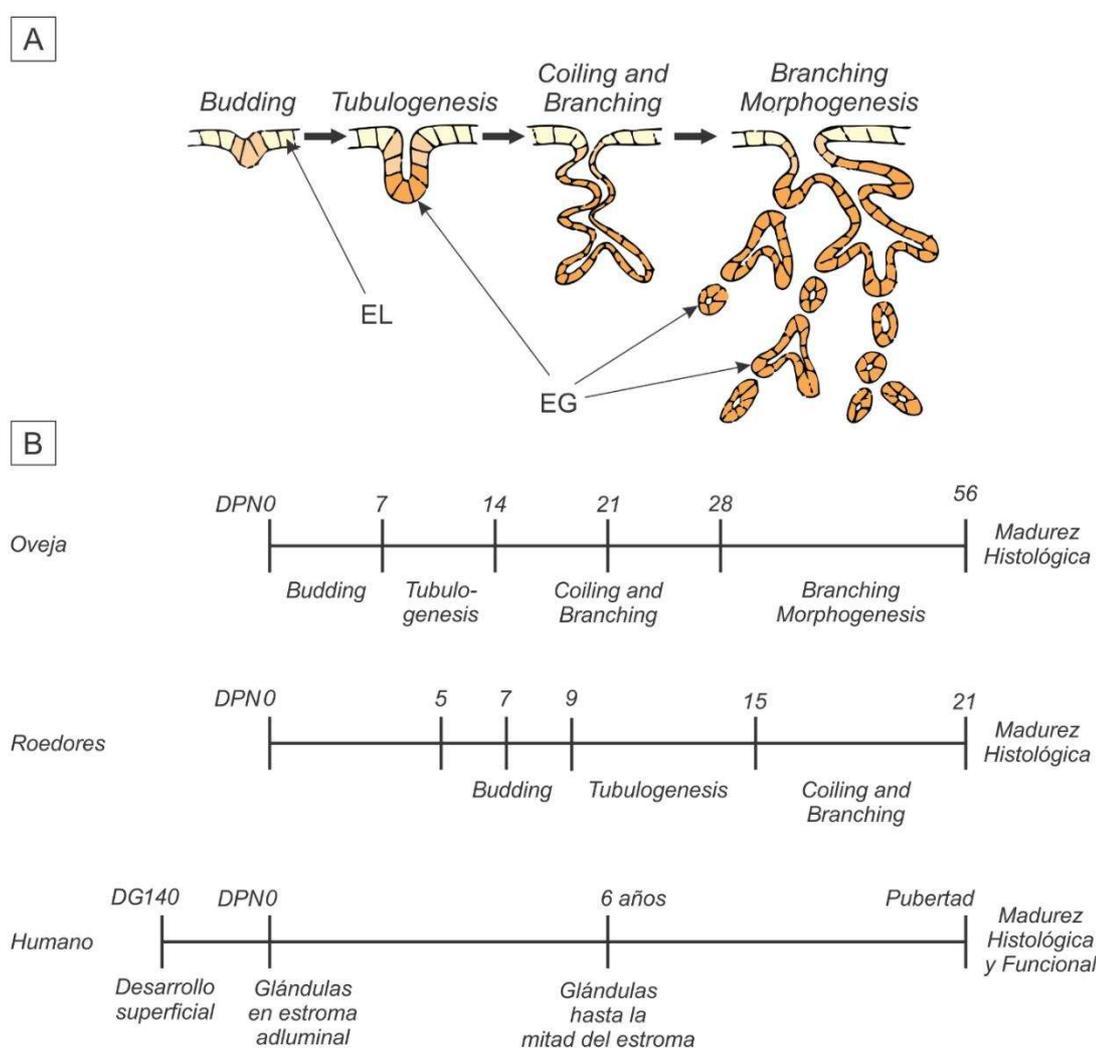


FIGURA 1: A) Representación esquemática de los principales eventos involucrados en el desarrollo morfogenético de las estructuras glandulares en diferentes órganos epitelio-mesenquimáticos. B) Comparación de los principales eventos que ocurren durante el proceso de adenogénesis uterina en la oveja, los roedores y el humano. Modificado de Gray y col. [8].

3. Regulación de la diferenciación organogénica del tracto reproductor femenino

3.1. Genes de la familia *Wnt*

El control morfogenético está determinado por las **interacciones epitelio-mesénquima** del conducto Mülleriano o paramesonéfrico. Inicialmente, señales paracrinas procedentes de la expresión de moléculas específicas por el mesénquima, inducen la diferenciación de los epitelios oviductal, endometrial, cervical y vaginal [12]. Estudios de recombinación tisular han demostrado que, durante la etapa de diferenciación del tracto reproductor de la hembra, el epitelio mülleriano mantiene cierta plasticidad y es capaz de responder a señales inductivas del mesénquima [21].

Los genes *Wnt* (del inglés: *Wingless-related MMTV integration site*) son los homólogos en vertebrados de los genes “*Wingless*” de *Drosophila melanogaster*, implicados en el establecimiento de patrones de polaridad de segmentos corporales durante la embriogénesis de la mosca [22]. En el humano y en los roedores, codifican para una familia de glicoproteínas secretadas que incluye al menos 19 miembros con secuencias altamente conservadas, y que exhiben roles cruciales en la embriogénesis y en la proliferación y diferenciación celular [22,23]. La vía de señalización, mediada por β -catenina, y desencadenada por estas proteínas también es importante en las interacciones epitelio-mesénquima del conducto mülleriano.

En los conductos paramesonéfricos, se expresan tres miembros de la familia *Wnt*, mientras que seis miembros de esta familia se expresan en el útero durante el desarrollo posnatal (Tabla 1). El gen *Wnt5a* se expresa en el mesénquima de los conductos paramesonéfricos en embriones de ratones hembra, y participa en la regulación de las interacciones epitelio-mesénquima [22,24]. La delección del gen *Wnt5a* (*Wnt5a^{-/-}*) produce cambios fenotípicos en el desarrollo del TRF; al nacimiento se observa el desarrollo del oviducto y útero, pero las estructuras posteriores (cérvix y vagina) se encuentran ausentes [25]. Asimismo, los ratones mutantes *Wnt5a^{-/-}*, presentan elevadas tasas de mortalidad debido a fallas en el desarrollo anteroposterior del cuerpo [26]. Mericskay y col. [25] reportaron que los mutantes para el gen *Wnt5a* presentaban cuernos uterinos de menor longitud y con ausencia de glándulas endometriales.

El gen *Wnt7a* se expresa en el epitelio de los conductos de Müller de animales murinos durante los DE12.5 a DE14.5 [27]. Mientras que *Wnt7a* deja de expresarse en machos, su expresión persiste en las hembras tanto en los conductos de Müller como en sus estructuras derivadas posteriores. Roedores *knockout* (KO) del gen *Wnt7a* (*Wnt7a^{-/-}*) poseen un desarrollo inadecuado de los conductos de Müller y las hembras son infértiles. En las hembras, además, la diferenciación de conductos de Müller se ve impedida, observándose un desarrollo incompleto y alteración longitudinal de los oviductos y la parte superior del útero (los oviductos se parecen al útero, y el útero adquiere características histológicas similares a la vagina) [21]. Asimismo, se ha reportado que los úteros de los ratones *Wnt7a^{-/-}* en la etapa

perinatal son hipoplásicos, y presentan un epitelio estratificado, ausencia de glándulas endometriales y miometrio desorganizado [21,28].

Tabla 1: Genes involucrados en el desarrollo pre- y posnatal del tracto reproductor femenino.

Gen	Expresión espaciotemporal		Especie	Referencia
	Conducto Mülleriano	Útero Neonatal		
Wnt2b		ES	Oveja	[29]
Wnt4	MM	ES	Ratón, Oveja	[22,29–31]
Wnt5a	EM, MM	ES, EL	Ratón, Oveja	[22,25,29,32]
Wnt7a	EM	EL	Ratón, Oveja	[29,30,33,34]
Wnt7b		EL, EG	Ratón	[35]
Wnt11		EL, EG	Ratón, Oveja	[29,35]
Wnt16		ES	Ratón	[35]
Fzd2		EL, EG, ES, M	Oveja	[29,36]
Fzd6		EL, EG	Ratón, Oveja	[16,29,35]
Fzd10		EL, EG	Ratón	[35]
Ctnnb1	Todos los compartimentos		Ratón, Oveja	[29,37]
Dkk2		ES, M	Ratón	[30]
SFRP2		ES, ES caruncular	Ratón, Oveja	[29,38]
Hoxa10	Eje antero-	ES	Ratón	[39]
Hoxa11	posterior del MM	ES	Ratón	[39]
Foxa2		EG	Ratón, Oveja	[16,40,41]

Wnt: Wingless-related MMTV integration site family members; Fzd: Frizzled family members; Ctnnb1: β -catenin; Dkk2: Dickkopf 2; SFRP2: Secreted frizzled-related protein 2; Hoxa: Homeobox A family members; Foxa2: Forkhead box A2. EM: epitelio del conducto mülleriano; MM: mesénquima del conducto mülleriano; EL: epitelio luminal; EG: epitelio glandular; ES: estroma subepitelial; M: miometrio.

En la cordera neonatal, se expresan las moléculas Wnt5a, -7a y -11 en el epitelio luminal, y Wnt2b en el estroma uterino [29].

Los mecanismos de acción de los Wnt están mediados por los receptores de membrana *frizzled* (FZD). En los roedores se expresan FZD6 y FZD10 y en la oveja FZD2 y FZD6 [29,35]. Por otro lado, la actividad de los Wnt que regula el desarrollo glandular está limitada a áreas discretas del endometrio tanto en el ratón como en la oveja. Uno de los mecanismos regulatorios de la acción de los Wnt en el ratón es la proteína dickkopf 2 (Dkk2), que antagoniza la vía de señalización canónica [42]. Por otro lado, la inhibición de la adenogénesis en las carúnculas del útero de las corderas está mediada por la proteína secretada relacionada con FZD 2 (SFRP2; del inglés, *secreted FZD-related protein 2*), que inhibe la señalización Wnt en la región caruncular [29].

La proteína β -catenina, que se expresa en todas las células de los conductos paramesonéfricos y el útero (Tabla 1), posee un importante rol en la diferenciación embrionaria y es un mediador intracelular crítico de la vía de señalización canónica de Wnt [37]. Además, β -catenina se encuentra en las uniones adherentes, y está involucrada en la regulación y coordinación de las adhesiones célula-célula [43]. La expresión normal favorece el desarrollo del útero, y durante la etapa posnatal, participa en el proceso de adenogénesis. Mutaciones en la expresión de β -catenina producen un útero hipoplásico, inducen la formación de metaplasia escamosa en el epitelio luminal y la hiperplasia en el epitelio glandular (EG) [37], confirmando la importancia de la vía de señalización Wnt/ β -catenina en el mantenimiento de la diferenciación epitelial del útero.

3.2. Genes de la familia *Hox*

La diferenciación del TRF está regulada, en parte, por una familia de genes denominados *Hox* (del inglés: *Homeobox*). Estos genes poseen una secuencia altamente conservada y compartida de 183-pb que codifica para un dominio de 61 aminoácidos, denominado homeodominio. En el humano y en el ratón, estos genes se encuentran agrupados en cuatro clusters separados: A, B, C y D, los que a su vez están compuestos por 9-13 genes. Los genes *Hox* codifican proteínas que actúan como factores de transcripción produciendo la activación o represión de genes reguladores [11].

La regulación morfogenética del TRF durante el desarrollo embrionario y posnatal es debido a la expresión de los genes: *Hoxa9*, *Hoxa10*, *Hoxa11* y *Hoxa13*. El patrón lineal de expresión de estos genes presenta cambios temporales a lo largo del conducto paramesonéfrico murino, y con la diferenciación del TRF. Durante el periodo prenatal, el conducto paramesonéfrico del embrión en ratones es morfológicamente indiferenciado y homogéneo en apariencia; este estado indiferenciado se corresponde con un patrón uniforme de expresión de los genes *Hoxa* a lo largo del conducto paramesonéfrico entre el DE15 hasta el nacimiento [44]. Luego del nacimiento y hasta el día posnatal 14 (DPN14) donde el TRF murino alcanza su máximo grado de diferenciación, la expresión de los genes *Hoxa* se encuentra espacialmente restringida a lo largo del conducto. Se ha demostrado que, tanto en humanos como en

ratones, el gen *Hoxa9* se expresa preferentemente en los oviductos, *Hoxa10* en el útero, *Hoxa11* en el útero y cérvix y *Hoxa13* en la vagina [45]. En la figura 2, se muestra una representación esquemática de la expresión de los genes *Hoxa* a lo largo del conducto paramesonéfrico y el TRF. En ratones modificados genéticamente se ha observado que la alteración de este patrón de expresión produce cambios anatómicos significativos en la organización espacial del tracto reproductor [44]. Así, la interrupción en la expresión del gen *Hoxa10* provoca que el 25% de la porción anterior del útero se transforme en oviducto, lo que conduce a anomalías reproductivas en la etapa adulta [46]. Además, Benson y col. [47] reportaron que la pérdida de función de *Hoxa10* produce fallas en la implantación embrionaria y reabsorción embrionaria en el periodo posimplantatorio temprano. Por otro lado, Gendron y col. [48] reportaron que ratones *Hoxa11*^{-/-} tienen alteraciones en el desarrollo y en la fertilidad. Los ratones deficientes de *Hoxa11* tienen un menor grosor uterino, asociado con un menor desarrollo estromal y un reducido número de glándulas; estos cambios producen fallas en la producción de moléculas tróficas (histotrofos) de origen glandular y en la decidualización uterina [48]. Asimismo, Branford y col. [49] reportaron que ratones con mutaciones heterocigota para *Hoxa10* no presentan alteraciones en el desarrollo uterino; sin embargo, observaron que los mutantes heterocigota para *Hoxa11* tienen el mismo fenotipo que los mutantes homocigotas. Además, Branford y col. [49] reportaron alteraciones en la unión útero-tubárica y un menor desarrollo del estroma con una disminución en el número de glándulas, cuando evaluaron el útero de ratones doble mutante heterocigota (*Hoxa10*^{+/-} *Hoxa11*^{+/-}).

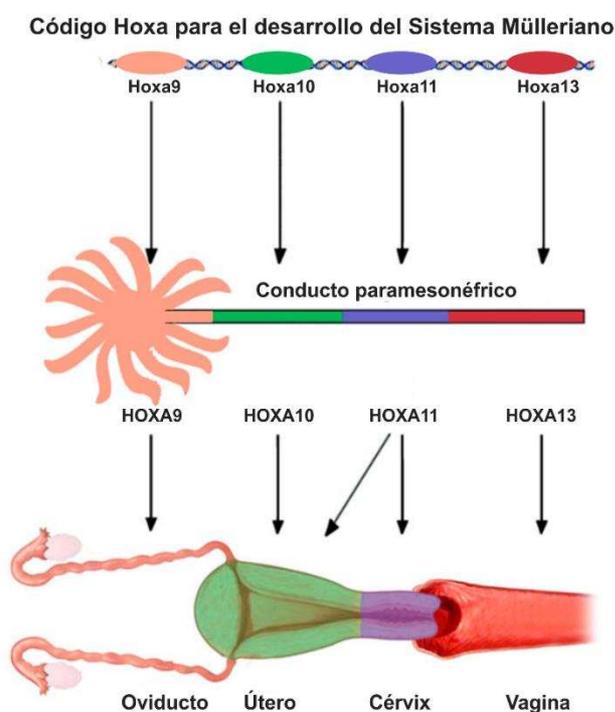


FIGURA 2: Representación esquemática del dominio espacial de los genes *HOX* en el desarrollo del conducto paramesonéfrico humano. Modificado de Zanatta y col. [45].

3.3. Factor de transcripción Foxa2

Los factores de transcripción del tipo *forkhead box A* (Foxa), que comprenden a Foxa1, -2 y -3, se encuentran involucrados en procesos de crecimiento, proliferación, diferenciación y longevidad celular en muchos tejidos y órganos [50]. En el útero de ratones, el único miembro de la familia que se expresa es Foxa2, cuya localización ha sido observada en glándulas nacientes, en desarrollo y diferenciadas. Resultados similares en el útero de la rata fueron reportados por Yamagami y col. [51]. Las mutaciones homocigotas de Foxa2^{-/-} son letales; los fetos mueren en el E10 o E11, ya que presentan malformaciones en el notocordio, y los tubos neural y digestivo [52,53]. Para poder realizar estudios, se han desarrollado dos modelos de ratones con mutaciones condicionales para Foxa2. Uno es el mutante posnatal condicional PR-Cre:Foxa2, el cual resulta en la inhibición del desarrollo glandular uterino e infertilidad [40]. Por otro lado, para estudiar el rol de Foxa2 en la gestación, se realizó el KO condicional Ltf-Cre:Foxa2 [54]. Fenotípicamente, el útero de los animales Ltf-Cre:Foxa2 es morfológicamente normal, con presencia de glándulas, sin embargo no hay funcionalidad glandular y los ratones son infértiles [54]. En los ratones Ltf-Cre:Foxa2, la infertilidad se asocia a la ausencia de la expresión del factor inhibidor de leucemia (LIF; del inglés *leukemia inhibitory factor*), miembro de la superfamilia de la interleuquina 6, el cual es necesario para que se produzca la implantación del embrión [54].

La expresión de Foxa2 ha sido reportada en distintas especies animales, como ovejas, cerdas, vacas e inclusive se ha reportado su expresión en humanos [55–58].

Se han establecido interacciones entre la expresión de Wnt5a y Wnt7a [25], los genes homeóticos Hoxa10 y Hoxa11 y del factor de transcripción Foxa2 (Figura 3). Por un lado, la expresión de Wnt7a es necesaria para la correcta organización del epitelio luminal y del miometrio, y para el patrón de crecimiento radial de las células mesenquimales. La expresión de Wnt7a es necesaria para mantener altos niveles de expresión de Wnt5a, Wnt4a, Hoxa10 y Hoxa11 en el estroma uterino. A su vez, las señales inducidas por la expresión de Wnt5a producirían una represión de Wnt7a en las invaginaciones del epitelio luminal. De acuerdo con los datos experimentales, esta caída en la expresión de Wnt7a sería necesaria para el correcto desarrollo de las glándulas endometriales. Asimismo, la expresión de Foxa2 es modulada por Wnt5a y Wnt7a, ya que se ha reportado que en modelos de ratones KO para estas moléculas, los cuales poseen úteros aglandulares, no hay expresión de Foxa2 [40]. Del mismo modo, Filant y Spencer [59] en un modelo de corderas con administración neonatal de altas dosis de progesterona, reportaron que el proceso de adenogénesis y la expresión de Foxa2 son inhibidas por el tratamiento. Villacorte y col. [60] reportaron que la regulación de la expresión de Foxa2 por los Wnt está mediada a través de β -catenina, evidenciado por estudios de inmunoprecipitación de la cromatina que demuestran la interacción entre β -catenina y la región promotora de Foxa2.

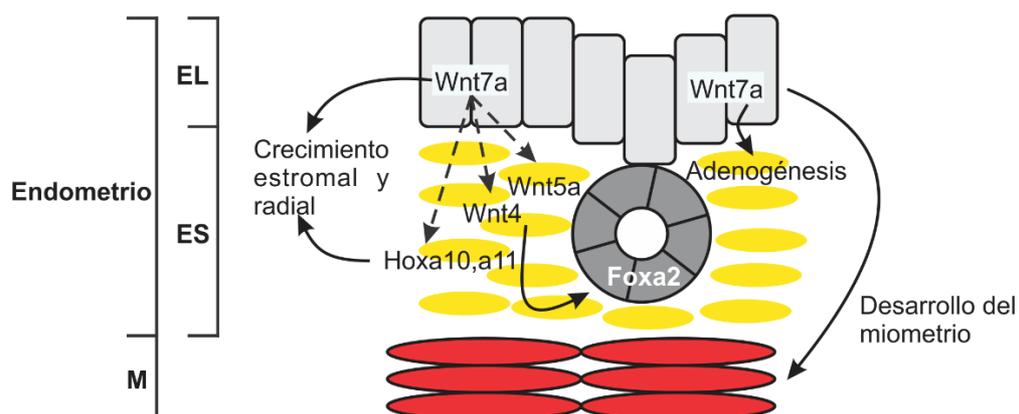


FIGURA 3: Representación esquemática de la interacción entre las moléculas Wnt4, Wnt5a, Wnt7a, Hoxa10, Hoxa11 y Foxa2 en el útero murino. EL: epitelio luminal, Mio: miometrio. Modificado de *Spencer y col.* [1].

3.4. Receptores esteroideos

Los esteroides ováricos estradiol (E_2) y progesterona (P_4), son reguladores claves del crecimiento, diferenciación y funciones fisiológicas de muchos tejidos, incluyendo el tracto reproductor. Estas hormonas ejercen su acción a través de sus receptores específicos, que forman parte de una superfamilia de receptores nucleares que actúan como factores de transcripción con capacidad de unión a ligandos naturales y sintéticos. Estos receptores, al unirse a su ligando específico, interaccionan con secuencias específicas del ADN altamente conservadas (en sus genes blanco) denominadas elementos de respuesta a hormona (del inglés: *Hormone Response Element -HRE-*), y traducen señales provenientes del medio ambiente extracelular, alterando la expresión génica de las células para así llevar a cabo la acción biológica de las hormonas [61].

Los receptores nucleares de hormonas esteroideas comparten similitudes estructurales y dominios funcionales clave (Figura 4). El dominio A/B en la región amino terminal contiene una función de activación (AF-1) que contribuye a la actividad transcripcional del receptor. Adyacente a él, se encuentra el dominio C o dominio de unión al ADN (*DNA Binding Domain -DBD-*), constituido por motivos de dedos de zinc responsables del reconocimiento y unión a los HRE, y en el dominio D los sitios de localización nuclear (*Nuclear Localization Site -NLS-*). Próximo a esta región y cerca del extremo carboxilo terminal, se localiza el dominio E o de unión a ligando (*Ligand Binding Domain -LBD-*) que contiene la función de transactivación 2 (AF-2) dependiente de la presencia del ligando y que puede interactuar con moléculas coactivadoras y correpressoras de la transcripción [62,63].

Al menos dos receptores de estrógenos (REs) se han estudiado en profundidad hasta la actualidad, el receptor de estrógenos alfa ($RE\alpha$) y beta ($RE\beta$), aunque se conocen isoformas del $RE\alpha$ de menor peso molecular (Figura 4). Dos genes diferentes, *ESR1* y *ESR2*, ubicados en distintos cromosomas codifican para $RE\alpha$ y $RE\beta$, respectivamente. Los DBD de ambos receptores comparten un 97% de similitud de secuencia. Por otro lado, los LBD comparten sólo un 60% de sus secuencias; sin embargo, las afinidades al 17β -estradiol para ambos receptores son similares [64]. El receptor de progesterona está codificado por un único gen en diversas especies, y su transcripción a partir de la activación de diferentes promotores origina dos isoformas, RP-A y RP-B (Figura 4) [65,66]. En el humano, la isoforma A posee 164 aminoácidos en el extremo N-terminal menos que la isoforma B. Se han reportados otras isoformas, como la isoforma C, que contiene un DBD truncado; o las isoformas M y S cuyas funciones fisiológicas aún no se conocen en profundidad [67,68]. Asimismo, se han descubierto otros receptores de estrógenos y de progesterona, por ejemplo el GPER1 y el PGRMC1, que se localizan en la membrana celular y que en su conjunto se conocen como mER y mPR, respectivamente [63,69].

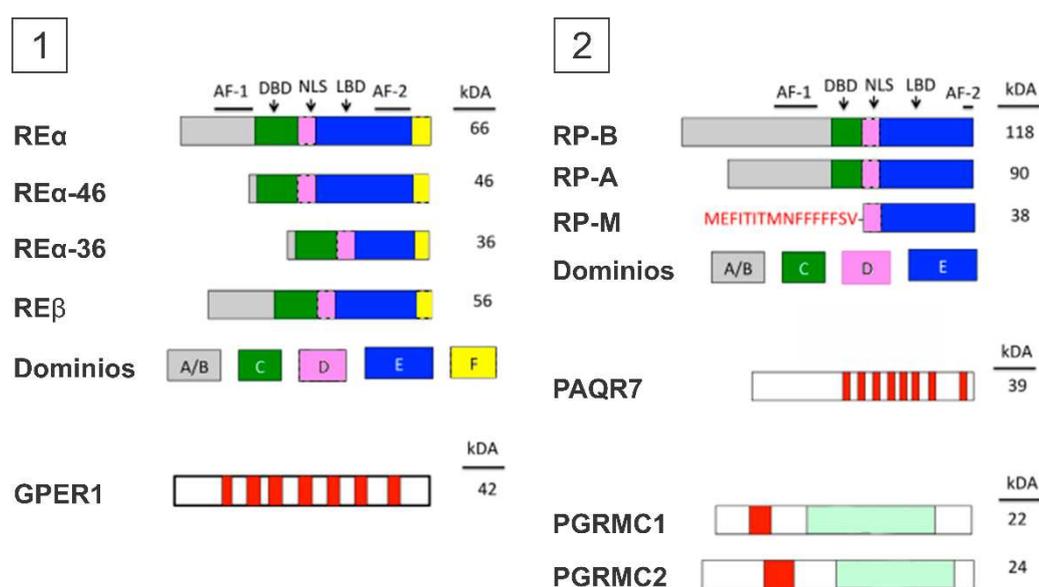


FIGURA 4: Representación esquemática de la familia de receptores de estrógenos (1) y progesterona (2). Se destacan en gris los dominios A/B que contienen el sitio de transactivación AF-1, en verde el DBD, en rosa el dominio D que contiene el sitio de localización nuclear, en azul el dominio E que contiene el LBD y el sitio de transactivación AF-2, en amarillo la región carboxilo terminal. En el caso de los mER y mPR, se muestran los dominios transmembrana en rojo y el dominio de unión hemo en verde claro (PGRMC1 y 2). Modificado de *Peluso* [63].

En las células, los receptores de las hormonas esteroideas ováricas influyen sobre la transcripción génica y producen diversas respuestas celulares a través de dos grandes mecanismos. La vía genómica clásica involucra la interacción directa de los receptores con sus genes blanco. La unión de la hormona al

receptor induce un cambio conformacional que promueve la liberación de las chaperonas, la translocación al núcleo y su dimerización. Así el complejo hormona-receptor recluta coactivadores y se une a los HRE localizados en regiones regulatorias de genes blanco, también conocida como señalización genómica directa (Figura 5). El complejo hormona-receptor también puede reclutar a otros factores de transcripción, como AP1, SP1 o C/EBP- β , y regular la expresión de genes que carecen del HRE, denominada señalización genómica indirecta (Figura 5) [64,67]. La vía no clásica involucra la activación de vías de señalización en la membrana mediadas por protein-quinasas y segundos mensajeros, como las vías AMPc/PKA o -C, PI3K/PKB, o Ras/Raf/MAPK, que conducen a la activación de la transcripción (genómica) o al desarrollo de respuestas rápidas que no requieren transcripción ni síntesis proteica (no genómicas) [70]. En el primer caso, las proteínas quinazas pueden fosforilar y activar a los receptores esteroideos a partir de la unión de factores de crecimiento a sus receptores en la membrana celular (este mecanismo se denomina también “vía genómica independiente de ligando”, debido a que se produce en ausencia de ligando) (Figura 5). Además, las hormonas esteroideas pueden unirse a los receptores de membrana y activar cascadas de quinazas que fosforilen factores de transcripción y modifiquen la transcripción de genes específicos (Figura 5). Luego de la unión de los esteroides sexuales a receptores de membrana, se producen segundo mensajeros tales como calcio intracelular, AMPc y óxido nítrico [70].

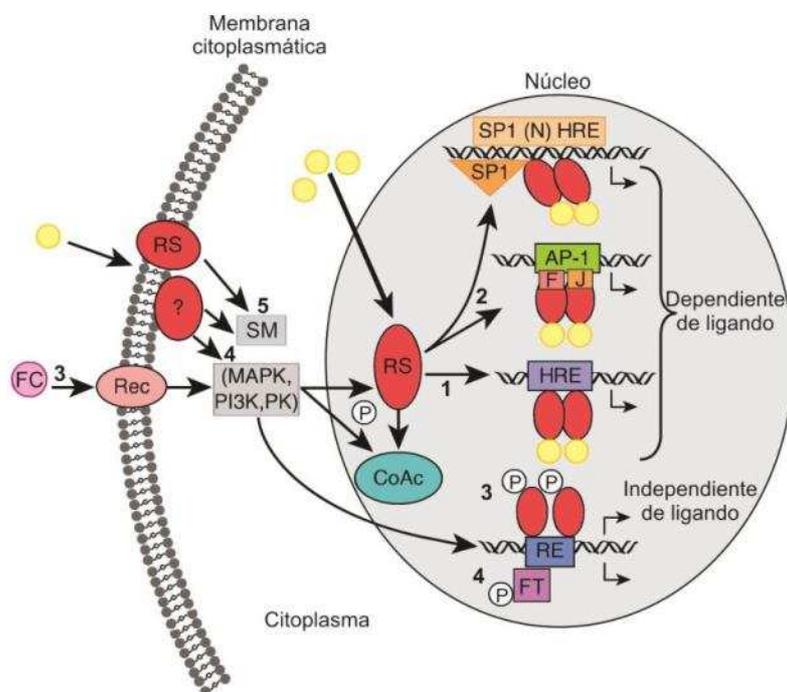


FIGURA 5: Representación esquemática de la vía clásica (1 y 2) y no clásica (3, 4 y 5) de acción de los esteroides sexuales 17 β -estradiol y progesterona, representados en el esquema a través de círculos amarillos. CoAc, coactivadores; F, Fos; FC, factor de crecimiento; FT, factor de transcripción; HRE, elemento de respuesta a hormona; J, Jun; RE, elemento de respuesta; RS, receptor de esteroide; SM, segundo mensajero. Modificado de *Binder y col.* [70].

3.4.1. Receptor de estrógenos

El RE α es la forma predominante y el principal mediador de los efectos de los estrógenos en el útero [71]. Por el contrario, y a pesar de su expresión relativamente baja en útero, el RE β actúa como un modulador negativo de las acciones de los estrógenos. Distintos estudios han revelado que ratones mutantes para este gen exhiben una respuesta exacerbada a un tratamiento exógeno con E2 [72,73].

En roedores, la inmunomarcación para el RE α comienza a observarse en las células mesenquimales del útero fetal en el E15, mientras que la expresión en el epitelio del conducto mülleriano comienza a observarse en la última etapa del período fetal [70,74]. En el DPN1, la inmunomarcación se localiza únicamente en las células mesenquimáticas; luego, hacia el DPN8, el RE α la inmunomarcación aumenta en intensidad en el epitelio luminal y en el estroma subepitelial (ES) [75]. En el DPN21, en el epitelio luminal se mantienen niveles de expresión, mientras que la expresión del RE α en el estroma disminuye ligeramente, respecto al DPN8; además, la inmunomarcación en el epitelio glandular es intensa [75]. Hacia el DPN35, los niveles de expresión aumentan en los epitelios (luminal y glandular) y en el estroma [75]. Por otro lado, se ha descrito que el RE β se expresa en el epitelio uterino durante el período neonatal, y que su expresión disminuye con la edad [72]. Aun considerando estos antecedentes, el desarrollo y la morfogénesis uterina es normal en ratones KO para el RE α o para el RE β [71]. Estudios de recombinación tisular han demostrado que la diferenciación del epitelio uterino es independiente de la expresión del RE α en el estroma [10]. Asimismo, distintos trabajos han revelado que, a diferencia de lo que sucede en el adulto, la proliferación de las células uterinas epiteliales y estromales es independiente de la acción del E2 [76] y de la expresión del RE α en neonatos [77]. Del mismo modo, se ha descrito que el proceso de adenogénesis ocurre normalmente en el útero de ratones deficientes para el RE α [77].

En la oveja, la expresión del receptor en el endometrio se observa a partir del DPN1 y se incrementa hasta el DPN56 [13]. La expresión del RE α se localiza en el epitelio luminal a partir del DPN1, con una intensidad de marcación débil, y se mantiene invariante hasta el DPN42, para luego disminuir ligeramente su expresión hacia el DPN56 [13]. En el DPN7, comienza a expresarse el RE α en el epitelio glandular, alcanzando una inmunomarcación intensa entre el DPN14 y el DPN56. En el estroma subepitelial, la inmunomarcación es débil entre el DPN1 y el DPN14, y aumenta su expresión entre el DPN21 y el DPN56 [13]. El desarrollo posnatal uterino depende de la expresión del RE α , y la inhibición de los efectos del receptor disminuye el desarrollo de las glándulas endometriales [18].

Es importante destacar que, aunque el desarrollo uterino ocurre independientemente de la unión ligando-receptor, tanto en roedores como en corderas, la presencia de los REs en etapas tempranas de la

vida hace que el útero y otros órganos del sistema reproductor femenino sean sensibles a la presencia de hormonas y compuestos con actividad hormonal [1].

3.4.2. *Receptor de progesterona*

A diferencia de lo que ocurre con la expresión del RE α durante el período fetal en roedores, tanto las células uterinas mesenquimales como epiteliales son negativas para el RP durante este período. La expresión del RP comienza a detectarse en el epitelio uterino luego del nacimiento (DPN3-5), mientras que la expresión en el estroma subepitelial ocurre luego del DPN12 [75,78]. Los niveles de expresión del RP en ambos compartimentos uterinos, aumenta con la edad [75,78]. En forma similar a lo que sucede en los ratones mutantes para el RE α , ratones deficientes para el RP exhiben una embriogénesis y un desarrollo uterino posnatal normal [79]. Estudios de recombinación tisular demostraron que la diferenciación del epitelio uterino es independiente de la expresión del RP en el estroma [10].

En la oveja, la expresión del receptor de progesterona comienza en el DPN1, y en los epitelios luminal y glandular se incrementa paulatinamente hasta el DPN56, mientras que la expresión en el estroma subepitelial permanece prácticamente sin variación a lo largo de las 8 semanas posnatales [13]. Asimismo, se ha reportado que la exposición a E2 y a compuestos con actividad estrogénica durante el período neonatal es capaz de modular la expresión del RP en el neonato [78,80].

Como se ha mencionado, el microambiente hormonal durante el período de morfogénesis uterina es crucial ya que una serie compleja de interacciones entre los receptores hormonales y moléculas de señalización específicas programará a las células uterinas para responder apropiadamente a señales hormonales durante la vida adulta. Una activación inadecuada de las vías de señalización que regulan los procesos de diferenciación y desarrollo puede afectar los programas organizacionales, alterar las vías normales de desarrollo e inducir cambios permanentes en la estructura y/o función uterina, con posibles problemas reproductivos a largo plazo [81–83].

4. *Compuestos químicos que contaminan el ambiente y que afectarían la fertilidad*

4.1. *Perturbadores endocrinos y pesticidas*

En las últimas décadas, uno de los principales focos de interés científico a nivel internacional refiere a las consecuencias adversas sobre la salud humana y animal causadas por la exposición a un grupo de compuestos químicos naturales o sintéticos que contaminan el medio ambiente y que se caracterizan por interferir con la actividad de eventos regulados hormonalmente, denominados **perturbadores endócrinos (PE)** o, en inglés: *endocrine disrupting chemicals (EDCs)*. La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, del inglés *Environmental Protection Agency of the United States*) define a los PE como “Agentes exógenos que interfieren con la síntesis, secreción, transporte, unión a

receptores, acción o degradación de las hormonas endógenas, responsables del mantenimiento de la homeostasis, reproducción, desarrollo, y/o conducta” (<https://www.epa.gov/>). Por otro lado, la *Endocrine Society* define a los PE como químicos, o mezclas de químicos, exógenos que pueden interferir con cualquier aspecto de la acción hormonal [84]. Los compuestos pueden o no poseer una estructura química similar a la de las hormonas esteroides naturales; sin embargo, muchos de ellos han demostrado tener actividad estrogénica, por lo que han sido denominados xenoestrógenos [85].

Uno de los compuestos más estudiados debido a su actividad como PE, es el dietilstilbestrol (DES). Este compuesto fue empleado a partir del año 1940, con el fin de evitar complicaciones en el embarazo y abortos espontáneos, y fue prohibido en la década de los '70 debido a los crecientes reportes de anomalías ginecológicas, incluyendo el desarrollo de cáncer en el TRF de las hijas de las mujeres tratadas con DES [81]. Otras patologías no reproductivas han sido asociadas al tratamiento prenatal con DES, tales como ansiedad, depresión o desórdenes alimentarios [86].

También los pesticidas son una importante fuente de contaminación del ambiente, entre ellos, el dicloro-difenil-tricloroetano o DDT, ha sido uno de los primeros en llamar la atención por sus efectos nocivos en aves y humanos. Esto último fue resaltado y presentado a la opinión pública en la publicación del libro *Primavera Silenciosa* (1962) de Rachel Carson. Sin embargo, dentro de los estudios de los pesticidas, muchos de los reportes evalúan la toxicidad de los compuestos generalmente empleando modelos de exposición aguda, siendo que la actividad de PE debe investigarse usando bajas dosis y en experimentos a largo plazo [87]. Existen aproximadamente unos 105 pesticidas que podrían ser clasificados como PE, de los cuales 31% son fungicidas, 21% como herbicidas y 46% como insecticidas [88]; y aunque algunos han sido prohibidos hace muchos años, todavía pueden encontrarse en el ambiente como el DDT, la atrazina o el endosulfán [89–91]. Además, algunos de ellos (DDT, endosulfán, entre otros) han sido catalogados como Contaminantes Orgánicos Persistentes (POPs; del inglés, *Persistent Organic Pollutants*) por su capacidad de bioacumulación y biomagnificación a lo largo de la cadena trófica debido, principalmente, a su baja degradación [92]. Es importante mencionar que el endosulfán, por ejemplo, fue uno de los insecticidas más empleados en Argentina, siendo el segundo insecticida más empleado en el país en el año 2010 [93]. Otro pesticida son los herbicidas a base de glifosato (HBG), empleados actualmente en grandes cantidades a nivel mundial y es el más empleado en Argentina [94]. Aunque los HBG están clasificados como no persistentes, de acuerdo con las prácticas actuales donde las tasas de aplicación son mayores que las de disipación, se estima que los HBG podrían considerarse como “pseudo-persistentes” [95]. En la presente tesis, se reportan los efectos de dos de los agroquímicos más utilizados en Argentina en las últimas décadas, los HBGs y el endosulfán.

4.2. Endosulfán

El endosulfán es un insecticida y acaricida organoclorado de amplio espectro cuyo primer uso se remonta al año 1954 en los Estados Unidos para controlar plagas de insectos y ácaros en cultivos agrícolas [96]. En Argentina, como se mencionó previamente, fue el segundo insecticida más empleado del año 2010 con una cantidad de 5,3 millones de L/Kg de producto [93]. Se ha empleado en una gran variedad de cultivos comestibles: frutas y vegetales, cereales, maíz y oleaginosas, papa, té y café; además de emplearse en cultivos no comestibles, como algodón y tabaco [97]. El endosulfán de grado técnico se compone por dos estereoisómeros, endosulfán- α y endosulfán- β , en concentraciones de aproximadamente 70% y 30%, respectivamente [96]. Se ha establecido que el isómero α es tres veces más tóxico que el isómero beta [97]. Ambos isómeros tienen la particularidad de bioacumularse y biomagnificarse en la cadena trófica y de persistir por varios años en el suelo y el agua [97–99]. Se ha postulado que los alimentos contaminados con residuos de endosulfán son la principal fuente de exposición de los animales y el hombre [97]. A causa de su alta toxicidad y su alto potencial de bioacumulación y contaminación ambiental, desde hace algunos años fue incluido en la lista de POPs en la Convención de Estocolmo del 2011 (www.pops.int). Actualmente, se encuentra prohibido en muchos países; sin embargo, se sigue empleando y comercializando en Brasil, India, China, Corea del Sur e Israel [100]. En nuestro país, este compuesto se encuentra prohibido desde 2013 (SENASA, Resol. 511/11).

El endosulfán ha sido detectado en muestras de suelo y agua [101–103], la biota y vida silvestre [104,105]. Asimismo, existen estudios que han descripto la presencia de endosulfán y sus metabolitos en anfibios [106], aves [107], reptiles [105,108] y en fluidos y tejidos humanos. En el humano, se han detectado niveles de endosulfán en tejido adiposo de glándula mamaria [109], suero [110,111], semen [112], como también en tejido adiposo, sangre de cordón umbilical, leche materna y placenta [113–115]. Debido a su naturaleza lipofílica, los compuestos organoclorados, como el endosulfán, se depositan en el tejido adiposo y pueden ser transferidos al feto a través de la placenta durante la gestación y al recién nacido durante la lactancia [113,115]. En niños y adolescentes (de 10 a 19 años) se detectó un aumento de la LH sérica en habitantes con alta exposición a este agroquímico [96]. Niveles elevados de endosulfán, entre otros pesticidas organoclorados, fueron determinados en sangre materna y de cordón umbilical en mujeres con embarazos pretérmino de la India [116].

4.2.1. Efectos del endosulfán sobre la reproducción y el desarrollo

En estudios *in vitro* se reportó que el endosulfán incrementa la expresión de factores antiproliferativos e induce apoptosis de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano [117,118]. Por otro lado, en estudios *in vivo* demostraron que el endosulfán produce daño al tejido vascular

e incrementa el riesgo de enfermedades cardiovasculares [118,119]. Mediante estudios *in vitro* e *in vivo* también se ha reportado al endosulfán como neurotóxico [120–122].

Efectos adversos permanentes en el desarrollo y la salud reproductiva de machos y hembras han sido descritos por diversos autores [116,123–125]. Estudios *in vitro* con líneas celulares señalan al endosulfán como un agonista de la acción de los estrógenos. Soto y col. [126] demostraron que endosulfán presenta actividad estrogénica en la línea celular de cáncer mamario humano MCF-7 [126]. Asimismo, se ha reportado su actividad antiandrogénica [127,128] y su efecto inhibitorio sobre la actividad de la aromatasa [129].

Estudios *in vivo* también han demostrado efectos nocivos del endosulfán sobre el desarrollo y la salud reproductiva. Sinha y col. [130] evaluaron los efectos del endosulfán en un modelo de ratas macho de la cepa Druckey, que fueron expuestos a endosulfán por vía oral en dosis de 2,5, 5,0 o 10,0 mg/kg de peso corporal (kg-pc), 5 días a la semana, desde el DPN21 al DPN90. En dicho trabajo, se observó que la exposición a endosulfán reduce la producción diaria de esperma, el número de espermatozoides y de espermátidas, y aumenta el porcentaje de espermatozoides anormales de manera dosis-dependiente [130]. Resultados similares fueron observados en animales expuestos a endosulfán *in utero* [131]. También se estudiaron los efectos de la exposición perinatal a endosulfán sobre el desarrollo del tracto reproductor de ratas macho y hembra. Se observó una disminución de los niveles séricos de testosterona y estradiol, como también una reducción del peso de los testículos, próstata, vesículas seminales, ovario, oviducto y útero [132]. Sin embargo, como se mencionó previamente, éste y otros trabajos utilizaron dosis elevadas (del orden de los mg/kg-pc) en sus trabajos [123,125,132,133], no relacionadas con las descritas en el medio ambiente.

Un estudio realizado en peces cebra (*Danio rerio*) adultos, demostró que el tratamiento con β -endosulfán altera la tasa de eclosión, y la morfología testicular y ovárica [134]. Por otro lado, basados en diversos estudios en animales, se estableció que la dosis más alta de endosulfán a la cual no se observan efectos (NOEL) es de 600 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ [135]. La dosis de referencia (RfD) y la ingesta diaria admisible (ADI) fueron establecidas por diferentes organismos reguladores como 100 veces menor que NOEL (6 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$) para considerar variaciones inter- e intra-especies [135,136]. En un modelo de exposición *in utero* a 30 $\mu\text{g}/\text{kg-pc}$ de endosulfán se observaron en las madres alteraciones bioquímicas e histológicas, entre ellas, la degeneración de folículos del ovario, como también alteraciones histológicas en hígado y bazo tanto en madres como en crías [137]. En un trabajo previo de nuestro laboratorio, utilizando un modelo de rata adulta ovariectomizada, se demostró que el endosulfán actúa como un PE que imita la acción de los estrógenos a dosis similares a la RfD y NOEL [138]. Estos resultados generan preocupación sobre los potenciales efectos adversos de este pesticida en el desarrollo y la función del tracto reproductor femenino, en dosis bajas “ambientalmente relevantes”. Asimismo, estudios previos de nuestro grupo han

demostrado que la exposición posnatal temprana a bajas dosis de endosulfán alteró la expresión de proteínas involucradas en el desarrollo y la diferenciación uterina en ratas prepuberales [75,139], e indujo fallas en la implantación alterando el crecimiento y diferenciación endometrial en el período pre implantatorio [140]. Milesi y col. [141] comunicaron que las fallas en la implantación inducidas por la exposición neonatal a endosulfán, estarían asociadas con modificaciones epigenéticas del REα y la alteración de genes *downstream* que regulan la implantación del embrión de rata.

4.3. Herbicidas a base de glifosato

Los HBGs, o formulaciones de herbicidas que contienen glifosato (N-fosfometil glicina) como principio activo, representan aproximadamente el 80% del mercado en nuestro país [142]. Estas formulaciones presentan un amplio espectro de acción (no selectivo) y se utilizan para erradicar las malezas en áreas agrícolas (antes y después de la siembra), para la desecación química precosecha y para eliminar malezas poscosecha [94]. Además, los HBGs son empleados en hogares y en espacios públicos, como así también para el control de la flora acuática [143]. Se estima que la utilización de los HBGs se ha incrementado ~100 veces a nivel mundial entre 1974 y 2014, con un aumento abrupto luego de la aparición de cultivos genéticamente modificados a mediados de los '90 que son tolerantes al herbicida (como soja, maíz y algodón), y la consecuente expansión de las áreas sembradas tanto en nuestro país como en el resto del mundo [94,144]. La aparición de malezas resistentes a los HBGs, debido a su indiscriminado uso, derivó en el aumento de las dosis y el número de aplicaciones del producto [145].

Las concentraciones medioambientales de glifosato y su principal metabolito, el ácido aminometilfosfónico o AMPA, han sido evaluadas en diferentes matrices que rodean las principales áreas de producción de la Argentina. Los datos revelaron la presencia de glifosato y AMPA en el agua y sedimentos de ríos, arroyos y lagunas de áreas rurales y suburbanas en las provincias de Buenos Aires [146–148], Santa Fe [149], Córdoba [150] y Entre Ríos [95,149]. En la provincia de Buenos Aires, las mayores concentraciones de glifosato en agua fueron de 700 µg/L [147], y en sedimentos de ríos de las provincias de Córdoba y Entre Ríos lo mayores niveles de glifosato reportados fueron de 2,15 y 3,29 mg/kg, respectivamente [95,149,150]. Asimismo, se detectaron niveles elevados de glifosato y AMPA de hasta 3,89 y 5,0 mg/kg en muestras de suelo de pueblos rurales y de campos destinados a la agricultura de manera prácticamente ubicua [95,147,151]. Incluso, se detectaron niveles de glifosato y AMPA en el polvo derivado de la erosión de campos de la provincia de La Pampa un año después de la última aplicación del herbicida [152], poniendo en evidencia que una potencial fuente de contaminación aérea podría ser el polvo proveniente de regiones donde se aplica glifosato. Residuos de glifosato y AMPA también fueron detectados en productos para consumo humano y animal, como en fórmulas alimenticias a base de soja para niños, en agua envasada o en alimentos para perros [153–157]. Arregui y col. [158]

describen niveles de glifosato con valores entre 0,1-1,8 y 1,9-4,4 mg/kg en semillas y otras partes de la planta de soja transgénica, respectivamente, en muestras provenientes de campos de las provincias de Santa Fe y Salta (Argentina). Por otro lado, se han reportado muestras con residuos de glifosato cuyos valores medios y máximos fueron de 31,7 y de 72,8 mg/kg, respectivamente, superando el límite máximo permitido para alimentos establecido en 20 mg/kg tanto por SENASA (www.senasa.gob.ar) como por normativas internacionales [159].

Estudios de biomonitoreo han reportado la presencia de glifosato en la orina de individuos que habitan en áreas tanto urbanas como rurales de diferentes partes del mundo [160–164]. Un estudio realizado en mujeres embarazadas en Indiana (Estados Unidos), observó una correlación positiva entre los niveles de glifosato en orina y su residencia en zonas rurales [165]. Otro estudio reportó niveles de glifosato en el suero de mujeres embarazadas y en sangre de cordón umbilical con valores en el rango de 0,2 - 189,1 ng/mL y 0,2 -94,9 ng/mL, respectivamente. Los niveles de glifosato se asociaron a factores de ocupación laboral (agricultoras) o a familiares que practicaban la agricultura, o a la residencia próxima a zonas de cultivos [166]. En conjunto, estas evidencias sugieren que existe un riesgo de exposición ambiental y ocupacional a glifosato tanto a nivel local como mundial, lo que ha despertado el interés y la preocupación por conocer sus efectos sobre la salud humana y de los animales.

4.3.1. Efectos de herbicidas a base de glifosato sobre la reproducción y el desarrollo

Los efectos en el desarrollo y la salud reproductiva del glifosato y sus formulaciones comerciales han despertado gran preocupación. Las formulaciones se comercializan como mezclas que contienen glifosato y diferentes co-formulantes (disolventes, agentes penetrantes, conservantes y tensioactivos) que, en muchos casos, son de identidad y proporción desconocida ya que se considera información comercial confidencial [167]. Los estudios que compararon los efectos de los HBGs, sus co-formulantes y glifosato grado técnico han demostrado que los HBGs son más tóxicos que el ingrediente activo solo (glifosato), lo que sugiere que los co-formulantes también deben considerarse como una fuente de toxicidad [168–170]. Actualmente, existe gran controversia con relación a si los efectos adversos son causados por el glifosato o las formulaciones. Es importante destacar que los ensayos realizados, por las agencias regulatorias, para establecer la seguridad de los HBG se realizan empleando el ingrediente activo (glifosato). Por lo tanto, los resultados de estos ensayos pueden subestimar los efectos adversos de los formulados, que son los empleados para el control de las malezas y son los que contaminan el ambiente [144].

Estudios *in vitro* han demostrado efectos tóxicos a bajas dosis de un HBG en células relacionadas con órganos de la reproducción tales como células embrionarias, de placenta y de Sértoli [171–173]. Entre los diferentes efectos se pueden mencionar la inhibición de la enzima aromatasa y otras alteraciones en el

proceso de esteroidogénesis [169,172,174], incremento de la proliferación celular [175,176], y apoptosis o necrosis [177–179]. Los estudios *in vitro* e *in vivo*, evaluando distintos tejidos hormono-dependientes como testículo, ovario, útero y glándula mamaria, han documentado diversos efectos inducidos por glifosato y sus formulaciones que indicarían una posible actividad como PE [170,174,180–182]. Sin embargo, la EPA comunicó que el glifosato no presenta propiedades de un compuesto con actividad de PE, puesto que no se han detectado evidencias de una posible interacción con las vías de señalización del sistema endócrino [183]. Por lo tanto, a pesar de un creciente número de evidencias sobre los efectos adversos, para los organismos de control el glifosato continúa siendo de potencial tóxico y mecanismo de acción incierto.

Los estudios en modelos animales han demostrado que la exposición a formulaciones que contienen glifosato durante períodos del desarrollo durante la gestación, la lactancia y la etapa prepuberal, induce efectos adversos en el sistema reproductivo de ratas macho [184–186]. Estos efectos se manifestaron en el período puberal y en el organismo adulto, e incluyeron: disminución en el número de espermatozoides y en la producción diaria de esperma, incremento en el porcentaje de espermatozoides anormales, y disminución de los niveles de testosterona en suero [185–187]. En un trabajo realizado en nuestro laboratorio, la exposición posnatal a un HBG provocó un adelantamiento en el desarrollo de la glándula mamaria de ratas macho, que estuvo acompañado por un aumento en las estructuras terminales altamente proliferativas (*terminal end buds*), y un incremento en la proliferación celular y en la expresión del RE α [182]. Un estudio piloto realizado por el Instituto Ramazzini (Bologna, Italia) diseñaron un modelo para evaluar los efectos que produce la exposición de ratas Sprague-Dawley, desde el día gestacional (DG) 6 hasta el PND120, a una dosis de 1,75 mg/kg-pc/día de glifosato puro o formulado (Roundup Bioflow®) [188]. En los animales expuestos al HBG, los investigadores describieron una mayor distancia ano-genital en DPN4, independientemente del sexo, y una demora en la edad a la cual las hembras comenzaban con su ciclo estral [189]. Además, reportaron que luego de 6 semanas de exposición, la exposición a glifosato produce un aumento de la TSH y una disminución de la relación testosterona libre vs. total (fT/tT); mientras que Roundup® incrementó los niveles circulantes del factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y de estradiol libre [189]. Asimismo, Manservisi y col. [189] reportaron una disminución de la relación 5 α -dihidrotestosterona (DHT) vs. testosterona total en ambos sexos; mientras que en machos detectaron una disminución de DHT y de la fT/tT junto con un incremento de TSH, y en hembras observaron un aumento en la tT y en la relación tT/SHBG [189].

Varayoud y col. [181] investigaron la actividad estrogénica de una formulación de un herbicida a base de glifosato utilizando un modelo *in vivo*, describiendo modificaciones en la regulación de genes estrógeno-sensibles, similares a los cambios inducidos por 17 β -estradiol en dosis bajas no uterótropas

[181]. Otros trabajos de nuestro laboratorio han publicado los efectos sobre el desarrollo y la diferenciación uterina de la rata. Guerrero Schimpf y col. [190] realizaron una exposición neonatal (cada 48 h, desde el DPN1 al DPN7) vía subcutánea a 2 mg/kg-pc/día de un HBG alterando el desarrollo uterino en las etapas neonatal (PND8) y prepuberal (PND21). En el DPN8, los autores observaron un aumento de la incidencia de hiperplasia luminal del endometrio, junto con un incremento en la proliferación celular del epitelio luminal y del estroma subepitelial. También observaron que la expresión del RE α aumentó en el estroma uterino, el RP en el EL y el ES, y Hoxa10 en el miometrio en el DPN8. Por otro lado, en el DPN21 disminuyó la expresión del RE α en el EL e incrementó la expresión del RP en el ES. Respecto a Hoxa10, observaron una mayor expresión en el ES, y de Wnt7a en el EG y el ES en el DPN21. En otra publicación, Ingaramo y col. [191], comunicamos una mayor expresión de Wnt5a en el EL en DPN8 y en el ES en DPN21; mientras que la expresión de β -catenina en el EL en DPN8, mayor en el ES y menor en DPN21. Todos estos resultados demuestran efectos a corto plazo de la exposición neonatal a un HBG sobre moléculas que regulan el normal desarrollo del útero en la rata.

Empleando un modelo similar, en ratas hembra expuestas a 2 mg/kg-pc de HBG (desde el DPN1 al 7) se investigó la aptitud reproductiva. Se observó que la exposición al HBG aumentó el porcentaje de pérdidas posimplantatorias en el DG19. Estos efectos se atribuyeron a fallas en la decidualización debido a que se demostró una disminución de la expresión del RE α en el EG de la zona mesometrial y de la expresión del RP en la zona antimesometrial y en los EL y EG de la región mesometrial en el DG9 [192]. También se observó una disminución en la expresión de Hoxa10 en el ES de la región mesometrial, junto con una menor expresión de los genes COUP-TFII y Bmp2 [192]. Posteriormente, reportamos que los animales expuestos al HBG presentaban una disminución en la expresión de Wnt5a y Wnt7a en la zona antimesometrial y en el EL de la mesometrial, respectivamente. Además, la expresión de Dkk1 aumentó, mientras que la de sFRP4 disminuyó en los animales expuestos al HBG [191]. Todos estos efectos adversos de la exposición neonatal a un HBG sobre la decidualización, podrían deberse tanto a cambios en la vía RP/COUP-TFII/Bmp2 como a los observados en la vía Wnt [191,192].

Aunque la exposición neonatal por vía subcutánea ha sido muy valiosa para reportar los efectos de diferentes PE sobre el desarrollo y la salud reproductiva [140,193–195], existen controversias sobre los efectos reportados por dicha vía de exposición, ya que la mayor probabilidad de exposición natural a glifosato y sus formulados ocurriría por vía oral. Teniendo esto último en consideración, Milesi y col. [196,197] diseñaron un modelo de exposición oral a un HBG en ratas gestantes desde el DG9 (*in utero*) hasta el DPN21 (destete), en la F1 observaron que el tratamiento alteró su aptitud reproductiva evidenciando una disminución significativa en el número de sitios de implantación. Las alteraciones reproductivas en el período peri-implantatorio, estarían relacionadas al incremento en la expresión del gen

del RE α y a alteraciones epigenéticas en el promotor de dicho gen [198]. Además, las crías (F2) nacidas de la F1 que había sido expuesta al HBG durante su desarrollo fetal, presentaron un retraso del desarrollo, menor peso y longitud fetal y mayores pesos de las placentas [196,197]. En las F2, también se observó una mayor incidencia de anomalías congénitas [196,197].

Los daños ambientales (causados por la exposición a PE, infecciones, entre otros), así como restricciones nutricionales, ocurridos durante el desarrollo fetal/neonatal se observó que pueden aumentar la susceptibilidad a contraer diversas patologías cuando el individuo es adulto [199]. Basados en estas últimas observaciones se estableció la hipótesis sobre el “developmental origins of health and disease (DOHaD)” (el origen durante el desarrollo de la salud y la enfermedad), que postula que la exposición a determinadas injurias durante períodos críticos del desarrollo (períodos fetal/neonatal), puede tener consecuencias significativas en la salud a corto o largo plazo de un individuo [200–202]. Incluso los efectos que ocurren por estas exposiciones pueden heredarse, habiéndose observado que compuestos tales como DES, bisfenol A (BPA) y pesticidas como metoxicloro (MXC) o vinclozolin [203] producen alteraciones que pasan a generaciones posteriores. Como se mencionó antes, diversos estudios aportan evidencias que la capacidad funcional uterina es definida, en parte, por los eventos del desarrollo asociados a la “programación” de los tejidos uterinos en las etapas pre- y posnatal temprana [2,25,204]. Es por ello que los eventos del desarrollo son críticos a la exposición de los PE. La exposición a bajas dosis de PE durante dichos periodos críticos pueden inducir efectos adversos en la diferenciación y funcionalidad del útero, estos efectos serían mediados por cambios en el epigenoma del individuo [205–207].

Teniendo en cuenta lo antes mencionado, ha aumentado el interés y la preocupación por conocer los efectos de agroquímicos sobre el desarrollo y la capacidad reproductiva en animales y en seres humanos; principalmente, si consideramos el impacto que tienen estos agentes, sobre la cadena productiva y la disminución de la capacidad reproductiva de los animales domésticos observada luego de la exposición a PE [208–211]. Los antecedentes disponibles acerca de las consecuencias de la exposición a los HBGs están en su mayoría limitados a los efectos sobre el desarrollo y funcionalidad del tracto reproductor masculino [170,184–186,212]. En el caso del endosulfán, la mayoría de los antecedentes sobre las consecuencias de la exposición a este insecticida fueron realizados con dosis elevadas, mayores a las que podrían encontrarse en el ambiente [125,213–215]. Asimismo, los estudios de los efectos de los agroquímicos (endosulfán y HBG) referidos al tracto genital de la hembra resultan insuficientes y no aportan datos claros sobre el posible efecto sobre el desarrollo ni la funcionalidad del útero, especialmente, cuando la exposición ocurre en un momento altamente sensible a los estímulos hormonales como es el

período perinatal. Considerando que el útero es uno de los principales órganos blanco de la acción de las hormonas esteroides, nuestra hipótesis propone que *la exposición posnatal temprana a bajas dosis de agroquímicos interfiere con el normal desarrollo y diferenciación uterina, con consecuencias en la implantación embrionaria y la fertilidad.*

OBJETIVOS GENERALES

Para poner a prueba nuestra hipótesis, desarrollamos dos diseños experimentales diferentes para evaluar los efectos de la exposición posnatal temprana a agroquímicos.

- I. Investigar los efectos de la exposición neonatal a endosulfán sobre la adaptación funcional del miometrio de la rata a lo largo de la gestación.
- II. Evaluar los efectos de la exposición neonatal a un HBG sobre el desarrollo uterino de la oveja.

En los siguientes capítulos, se detallan los diseños experimentales y los resultados obtenidos a partir de los modelos experimentales utilizados.

CAPITULO I

EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN NEONATAL A ENDOSULFÁN SOBRE LA ADAPTACIÓN MIOMETRIAL UTERINA EN EL PERIODO PRE-IMPLANTATORIO Y EL PARTO EN RATAS

INTRODUCCIÓN

La presencia de POPs en los ecosistemas genera gran preocupación debido a los efectos perjudiciales para la salud [216–218]. Entre los efectos adversos se han reportado alteraciones en las funciones endócrinas y reproductivas en humanos y animales [219–221]. El endosulfán, insecticida y acaricida organoclorado de amplio espectro, ha sido catalogado como POP en la Convención de Estocolmo del 2011 (www.pops.int), por sus propiedades de bioacumulación, biomagnificación, su potencial de ser transportado largas distancias y sus efectos a la salud [222]. Argentina se sumó al listado que prohíbe su uso a mediados de 2013 y, aunque su empleo está prohibido en más de 80 países, se sigue utilizando en India, China, Brasil, Corea del Sur e Israel [100].

El endosulfán y sus metabolitos pueden ser detectado en la biota y vida silvestre [104,105], en muestras de suelo y agua [101–103,223,224], y aún en ecosistemas remotos [225–227]. Ballesteros y col. [228] han determinado la presencia de endosulfán en aguas superficiales, materia particulada suspendida, sedimentos y peces en muestras provenientes de la Laguna Mar Chiquita (Córdoba, Argentina). Resultados similares fueron reportados por Silva Barni y col. [229], quienes determinaron organoclorados en aguas superficiales, materia particulada suspendida, sedimentos y peces en la Laguna La Peregrina (Buenos Aires, Argentina), con una predominante presencia de endosulfán. Además, se ha detectado endosulfán en tejidos de delfines y peces de Argentina [230–232], y se asoció la exposición a endosulfán con alteraciones en la funcionalidad de la hipófisis, el testículo y el ovario de peces [233–236].

Como ya se mencionó, se ha detectado endosulfán y sus metabolitos en varias especies animales [105–108], como así también en fluidos y tejidos humanos. En el humano, hay endosulfán en diferentes tejidos, como placenta o tejido adiposo de glándula mamaria, y también en fluidos (leche materna, sangre, suero y semen) [109–115]. Debido a la naturaleza lipofílica del endosulfán, es rápidamente absorbido en el tracto gastrointestinal y se acumula en el tejido adiposo [97,237]. El tiempo de vida media del endosulfán y sus metabolitos en sangre es de 1 a 7 días; sin embargo, a pesar de su corta vida media en plasma, presenta efectos prolongados en el tiempo debido a su liberación de los depósitos lipídicos [237,238].

Los efectos perjudiciales del endosulfán sobre la salud incluyen: neurotoxicidad, hepatotoxicidad, cardiotoxicidad y toxicidad reproductiva [239–242]. También se observó que altera el desarrollo y la fertilidad de machos y hembras [123,125,243,244]. En este sentido, estudios de nuestro laboratorio describen los efectos adversos de la exposición neonatal a bajas dosis de endosulfán, sobre el desarrollo y diferenciación del útero en el periodo prepuberal de la rata, en asociación con alteraciones en la expresión de moléculas claves para la morfogénesis del órgano, tales como, receptores esteroideos (RE α

y RP), Hoxa10, Wnt7a, β -catenina y α -actina de músculo liso [75,139]. Asimismo, demostramos que la exposición neonatal de ratas a endosulfán induce subfertilidad, caracterizada por una menor tasa de preñez y fallas en la implantación embrionaria. Estas alteraciones se asociaron con cambios en la expresión de moléculas (RE α , RP, Wnt7a, Hoxa10) que son claves para la preparación del útero para la implantación del embrión [139,140]. Estos efectos están mediados por cambios epigenéticos en el promotor del RE α [141] y por un incremento en la expresión del correpresor SMRT y una disminución del coactivador SRC-3 en los animales expuestos a endosulfán [140].

Las ratas tienen un período de gestación de 22 a 24 días, y para que se establezca y mantenga la gestación se desencadenan diferentes procesos fisiológicos. Uno de ellos es la estimulación cervico-vaginal (durante la copulación) que induce un reflejo neuroendócrino que provoca la descarga hipofisaria de prolactina, que activa a las células lúteas de los ovarios para que produzcan progesterona [245]. Otros eventos relacionados con el éxito de la gestación involucran la implantación embrionaria, la decidualización, la placentación, el normal desarrollo del feto y el parto [246].

Durante el período pre-implantatorio se producen adaptaciones en el útero que permitirán la implantación del embrión en el DG5. La diferenciación endometrial es un proceso coordinado que involucra a las hormonas esteroideas, sus receptores y diversas moléculas, como el factor de transcripción Hoxa10 [82]. Aunque la diferenciación del endometrio es necesaria para que se produzca la implantación del embrión, también se requiere la adaptación del miometrio para el normal desarrollo del embrión [246,247]. La preñez temprana se caracteriza por una elevada proliferación de las células del músculo liso (SMCs) en ambas capas musculares (circular y longitudinal), pero con mayor tasa proliferativa en la capa miometrial longitudinal que en la del miometrio circular [247]. Estudios sugieren que la adaptación del miometrio durante el período pre-implantatorio se encuentra regulado por los receptores esteroideos y genes *downstream* como Hoxa10 y Wnt7a [248–250]. El miometrio posee, además, un rol importante durante el parto, en el cual las SMCs asumen un fenotipo contráctil y se activan para poder expulsar la cría, la placenta y otras membranas [251]. Las contracciones del miometrio durante el parto están coordinadas por hormonas que regulan la expresión de proteínas asociadas a las contracciones (CAPs), como el receptor de oxitocina (OXTR), el receptor de prostaglandina F 2α (PTGFR) y la conexina 43 (Cx-43) [252].

Con base en nuestros estudios previos [140], y lo antes mencionado, nuestra hipótesis propone que *la exposición neonatal a una baja dosis de endosulfán altera la implantación embrionaria afectando el proceso de diferenciación miometrial, y que estas fallas durante la preñez temprana son responsables de alteraciones funcionales durante el parto.*

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- I. Evaluar los efectos de la exposición neonatal a una baja dosis de endosulfán sobre la diferenciación miometrial uterina durante el periodo pre-implantatorio y la activación miometrial durante el parto.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En muestras de rata obtenidas en el periodo pre-implantatorio (DG5):

- Determinar las **características histomorfológicas** del miometrio, como el espesor de la capa circular y longitudinal, la remodelación del colágeno y el área ocupada por vasos sanguíneos.
- Evaluar las tasas de **proliferación celular** en el miometrio circular y longitudinal, empleando la técnica inmunohistoquímica para detectar la expresión de Ki67 como marcador de proliferación celular.
- Evaluar mediante inmunohistoquímica la expresión de **receptores esteroideos**: receptores de estrógenos alfa (RE α) y de progesterona (RP) y de **genes relacionados con la diferenciación del miometrio**: Hoxa10 y Wnt7a.

Durante el DG23, en muestras obtenidas durante el parto:

- Determinar parámetros de parto, como el día y la hora del comienzo del parto.
- Evaluar mediante RT-PCR la expresión de **genes relacionados con la activación miometrial uterina**: receptores de oxitocina (OXTR) y de prostaglandina F2 α (PTGFR), y conexina 43 (Cx-43).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales y diseño experimental

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar pertenecientes al bioterio del Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL), Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral (FBCB - UNL) - Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Los animales fueron mantenidos durante todo el experimento bajo condiciones reguladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) y con fotoperiodo de 14 h de luz (desde las 05.00 h hasta las 19.00 h) y 10 h de oscuridad. Tuvieron libre acceso al agua y al alimento. Los animales fueron alimentados con una dieta estándar (Alimentos Cooperación, Rafaela, Santa Fe). Para minimizar la exposición a PE, los animales fueron alojados en jaulas de acero inoxidable con cama de viruta, y el agua se suministró en botellas de vidrio, con tapones de goma rodeados por un anillo de acero. Todos los animales utilizados fueron manipulados siguiendo las normativas de la Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio editada por la Academia Nacional de Ciencias (EE. UU.). Todos los procedimientos fueron revisados y autorizados por el Comité Académico de Ética y Seguridad en la Investigación de la FBCB - UNL.

Al momento del nacimiento DPN0 los animales fueron sexados de acuerdo con la distancia anogenital. El tamaño de la camada se ajustó a diez crías por madre; en caso de tener un número menor a diez hembras por madre, se completaron con una cantidad apropiada de machos. Las crías fueron asignadas a uno de los siguientes tratamientos neonatales ($n \geq 8$ por grupo):

- a) Control: Aceite de maíz (vehículo).
- b) Endo600: Endosulfán grado técnico 96% de pureza, 600 $\mu\text{g}/\text{kg}\text{-pc}/\text{día}$.

Las crías recibieron inyecciones subcutáneas de vehículo o endosulfán cada 48 h, desde el DPN1 hasta el DPN7. Para cada día de tratamiento, una solución de endosulfán fue preparada de acuerdo con el peso promedio de las crías, y se administraron 600 $\mu\text{g}/\text{kg}\text{-pc}/\text{día}$ en un volumen fijo de 40 μL . La dosis empleada es la equivalente a la dosis NOEL (dosis más alta en la cual no se han observado efectos) [135,136], siendo representativa, además, de los niveles ambientales. Se han encontrado niveles de endosulfán en el orden de los $\mu\text{g}/\text{kg}$ y de los mg/kg en muestras de suelo, plantas y carne [253–256]. No se observaron signos de toxicidad aguda o crónica luego de la inyección con endosulfán, ni alteraciones en el cuidado materno entre los diferentes grupos experimentales.

Luego del destete (DPN21), los animales se mantuvieron con agua y comida *ad libitum* hasta alcanzar la madurez sexual (DPN90). En el DPN90, las ratas hembra fueron alojadas individualmente con

machos de fertilidad comprobada. Se definió como DG1 al momento en que se observaron espermatozoides en el extendido vaginal [257]. Las hembras preñadas fueron asignadas a uno de los siguientes experimentos:

- i) determinación de la diferenciación miometrial en el DG5;
- ii) determinación de la actividad miometrial durante el trabajo de parto (DG23).

En la figura 6 se muestra una representación del esquema experimental empleado.

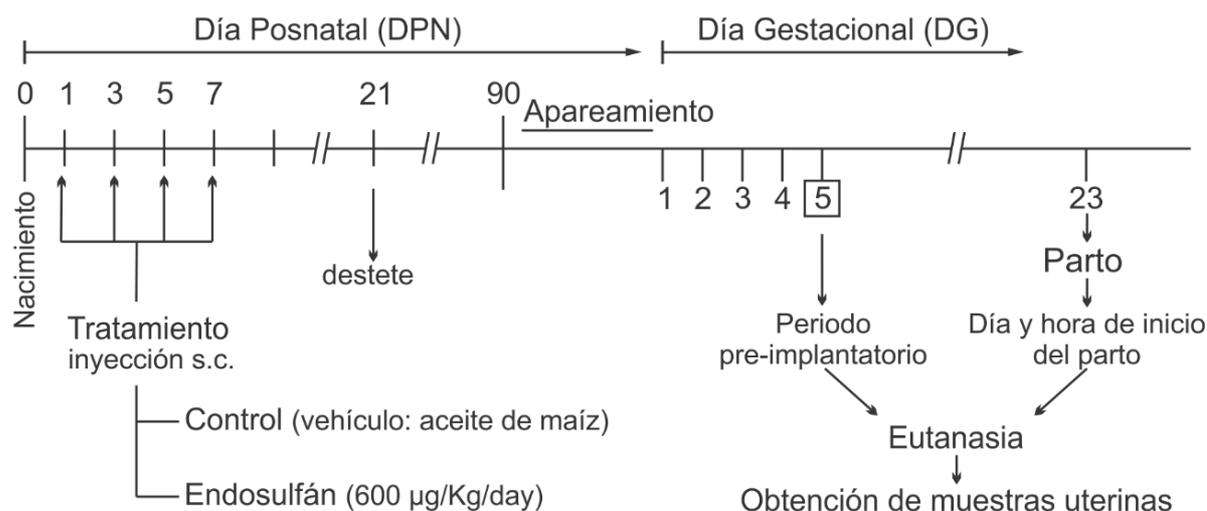


Figura 6: Representación esquemática del protocolo experimental utilizado para investigar los efectos de la exposición neonatal a endosulfán sobre la adaptación del miometrio en la preñez temprana y el parto.

2. *Obtención de muestras y procesado histológico*

Los animales fueron sacrificados y luego se colocaron en la tabla de disección sujetándolos de sus extremidades, con el abdomen hacia arriba. Se procedió a levantar la piel con pinza de punta "diente de ratón" a unos 15 mm del orificio vaginal y con la tijera de punta roma se practicó una incisión en ángulo de 45° hacia los laterales hasta la altura de las últimas costillas, quedando expuestos los músculos abdominales. Se utilizó una pinza de punta roma para sujetar el músculo, y con una tijera de punta fina se practicó una incisión, a 45° y hasta la altura de las últimas costillas, en los músculos abdominales. De esta manera quedó expuesta la cavidad abdominal. Con pinza anatómica de punta roma se separaron las asas intestinales y la grasa mesentérica hacia un lado, visualizando el tracto genital. Con tijera de punta fina se realizó la disección de ambos cuernos uterinos.

Porciones de cuernos uterinos de DG5 de aproximadamente 1,5 cm se fijaron en formol buffer (formol 4% en PBS pH=7.5) durante 24 h para conservar las estructuras histológicas y citológicas del

tejido. Luego se realizaron dos lavados con PBS (pH=7.5) de 10 min cada uno, y finalmente las muestras se conservaron en una solución de alcohol 70° hasta su procesado. Las muestras de útero se procesaron por técnicas histológicas de rutina hasta su inclusión en parafina [258], como se detalla en la tabla 2.

Tabla 2: Protocolo de Procesado Histológico.

Alcohol 96° (I)	1 h
Alcohol 96° (II)	2 h
Alcohol 100° (I)	1 h
Alcohol 100° (II)	1 h
Alcohol 100° (III)	ON
Xilol (I), (II) y (III)	2 h en cada uno
Parafina (I)	ON
Parafina (II)	1 h
Parafina (III)	1 h
Entacar	

Para obtener las muestras de DG23 se procedió de manera similar; se obtuvieron porciones de cuerno uterino por disección del espacio entre fetos de cada cuerno uterino en esterilidad. Los segmentos de órgano fueron rápidamente preservados en N2 líquido y conservados en ultrafreezer a -80 °C, para técnicas de biología molecular.

Las muestras de DG23 se obtuvieron durante el parto, luego de la expulsión de la segunda cría. Asimismo, se registraron el día y la hora a la cual la madre expulsó la primera cría.

3. Características histomorfológicas del útero en el DG5

Para realizar la caracterización histomorfológica del útero, cortes seriados de 5 µm de espesor, separados 25 µm entre sí, y realizados en paralelo al eje mayor del útero fueron teñidos con hematoxilina-eosina (H-E) o con picrosirius-hematoxilina (P-H), con el fin de evaluar los siguientes parámetros: el espesor del miometrio total, y los espesores de los miometrios circular y longitudinal, y el espesor del tejido conectivo intersticial, así como también el área relativa ocupada por vasos sanguíneos.

Para la tinción con H-E se siguió el protocolo detallado en la tabla 3, las secciones se desparafinaron y rehidrataron, y se colorearon con una solución de hematoxilina de Mayer (Biopur, Rosario, Argentina) y con eosina (Anedra, Buenos Aires, Argentina).

Tabla 3: Protocolo de Hematoxilina-Eosina.

Xilol (I), (II) y (III)	5 min cada uno
Alcohol 100°	1 min
Alcohol 96°	1 min
Alcohol 70°	1 min
Agua	1 min
Hematoxilina de Mayer	1 min
Agua	1 min
Agua amoniacal	15 seg
Agua	3 min
Eosina	15 seg
Agua	5 pasajes
Alcohol 70°	Pasaje
Alcohol 96°	Pasaje
Alcohol 100°	30 seg
Xilol deshidratación I	2 min
Xilol deshidratación II	5 min
Montar	

Para la tinción de P-H, secciones uterinas se desparafinaron en xilol, y se hidrataron en soluciones de alcoholes de graduación decreciente, y se colorearon con una solución de picrosirius (Sirius red en una solución saturada de ácido pícrico) durante 1 h y con hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich) durante 6 minutos. Posteriormente, se deshidrataron y montaron con un líquido de montaje permanente Eukitt (Sigma-Aldrich).

La determinación se realizó mediante análisis de imágenes digitalizadas (10 imágenes por muestra capturadas al azar) utilizando el software Image Pro-Plus 5.0.2.9 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD,

EE. UU.). Las imágenes del miometrio fueron capturadas con una cámara de video color Spot Insight V3.5 (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, EE. UU) acoplada al microscopio Olympus BH2 (iluminación: lámpara halógena de 12 voltios, 100 W, equipado con una fuente de luz estable, Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japón) con objetivas Olympus Dplan 20X (apertura numérica = 0,40). Para calibrar el software y luego obtener los valores de los espesores, se realizó la calibración espacial del sistema empleando imágenes de la grilla de la cámara de Neubauer.

Para la determinación del área relativa ocupada por vasos se utilizó la siguiente ecuación

$$\% \text{ Área relativa} = \frac{A_{VS}}{A_T} \times 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde A_{VS} es el área de total de los vasos sanguíneos y, A_T es el área total del miometrio.

4. Estudio de la organización de colágeno en el DG5

Para realizar la evaluación de la organización del colágeno en el miometrio, tres cortes histológicos longitudinales de cada muestra (5 μm de espesor), separados 25 μm entre sí, fueron teñidos con picrosirius durante 1 h, y contracolorados con hematoxilina de Harris durante 6 minutos. Finalmente, las secciones de tejido coloreadas se examinaron por microscopía óptica con luz polarizada utilizando un microscopio Olympus BH2. Se capturaron imágenes con la cámara de video SPOT Insight acoplada al microscopio Olympus BH2 con objetivas Dplan 40X (apertura numérica = 0,65).

En este método, el área de la birrefringencia del colágeno, evaluada por microscopía con luz polarizada, se encuentra relacionada con el grado de remodelación del colágeno debido a que las moléculas de colágeno orientadas presentan brillo birrefringente. Normalmente, las fibras de colágeno están empaquetadas en gruesas fibras regularmente organizadas, y aparecen como estructuras birrefringentes en el campo óptico. Por otro lado, cuando las fibras de colágeno no se encuentran densamente y/o espacialmente ordenadas, presentan una menor birrefringencia. La disminución de la birrefringencia, indica una transformación de un tejido rígido a uno más flexible. Es por ello que, una mayor birrefringencia se relaciona inversamente con una mayor remodelación de colágeno.

4.1. Determinación del área birrefringente relativa

Para comparar si el tratamiento produce modificaciones en la remodelación del colágeno, desarrollamos un método estandarizado para medir el área birrefringente. La evaluación de las áreas se realizó considerando el miometrio circular o longitudinal por separado, y aplicando una fórmula similar a la ecuación 1. Brevemente, se delimitó cada área miométrial y se determinó el área birrefringente (A_B) y el área total (A_T). Con los valores obtenidos se calculó el porcentaje de área birrefringente aplicando la fórmula:

$$\% \text{ Area birrefringente relativa} = \frac{A_B}{A_T} \times 100 \quad (\text{Ecuación 2})$$

5. Proliferación celular y expresión de proteínas involucradas en la adaptación miometrial uterina en el DG5

Se realizaron ensayos de IHQ para determinar la proliferación celular mediante la detección de Ki67, el cual es un marcador de células en proliferación en los estadios G1, G2, S y M [190], y la expresión de proteínas asociadas al proceso de adaptación miometrial: REα, RP, Hoxa10 y Wnt7a.

Las inmunohistoquímicas fueron realizadas siguiendo protocolos previamente descritos [259–262], el protocolo general se encuentra descrito en la Tabla 4. Únicamente para la inmunodetección de Ki67, las muestras fueron contracoloradas con hematoxilina de Mayer. En todos los casos se realizaron controles negativos de especificidad, sustituyendo el anticuerpo primario por un suero no inmune, y controles positivos, incluyendo una sección de tejido que se sabe expresa la proteína de interés. Los anticuerpos y diluciones empleados se detallan en la Tabla 5.

Tabla 4: Protocolo estándar de IHQ

DÍA 1	
<i>Desparafinar</i>	
Bioclear® 1, 2 y 3	3 min c/u
Alcohol 100°, 96° y 70°	3 min c/u
PBS	5 min
<i>Recuperación antigénica</i>	
Microondas estándar en Buffer Citrato 0,01 M pH: 6	15 min al 100% con portas
	20 min apagado
Lavado: PBS	5 min
<i>Bloqueo con peroxidasa endógena</i>	
Metanol + agua oxigenada 30 vol (36 mL metanol + 4 mL H₂O₂)	15 min
Lavado: PBS	15 min
<i>Bloqueo de uniones no específicas</i>	
NHS 1:20 en PBS-leche 1,5%	30 min
<i>Anticuerpo primario (diluido con BC-11)</i>	14-16 h a 4°C
DÍA 2	
Sacar de la heladera y dejar que tome TA	15 min
Lavado: PBS	15 min
<i>Anticuerpo secundario (diluido con PBS-BSA 1%)</i>	30 min
Lavado: PBS	10 min
Streptavidina-peroxidasa (diluido con PBS-BSA 1%)	30 min
Lavado: PBS	10 min
<i>Revelado</i>	
DAB (2.3 mg DAB + 3.3 mL Tris-HCl pH:7,5 + 5 mL H₂O₂ 30 vol)	
Agua destilada	Lavar c/ porta p/ cortar la reacción
Agua destilada	5 min

<i>Contracolorar</i>	
Hematoxilina de Mayer	1 min
Agua destilada	1 min
Agua Amoniacal	15 segundos
Agua destilada	3 min
<i>Deshidratar</i>	
Alcohol 70°, 96°, 100° (1) y 100° (2)	1 min c/u
Bioclear® 1	2 min
Bioclear® 2	5 min
Montar con PMyR	

Tabla 5: Anticuerpos primarios y secundarios usados para IHQ

Anticuerpos	Dilución	Proveedor
<i>Primarios</i>		
Anti-Ki67 (clone MIB-5)	1/50	Dako Corp. (Carpintería, CA, EEUU)
Anti-ER α (clone 6F-11)	1/400	Novocastra (Newcastle upon Tyne, Reino Unido)
Anti-PR (clone A0098)	1/400	Dako Corp. (Carpinteria, CA, EEUU)
Anti-Hoxa10 (sc-17159)	1/50	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, EEUU)
Anti-Wnt7a	1/800	Generado y validado en nuestro laboratorio (Vigazzi y col. [263])
<i>Secundarios</i>		
Anti-mouse (B8774)	1/100	Sigma (St. Louis, MO)
Anti-rabbit (B8895)	1/200	Sigma (St. Louis, MO)
Anti-goat (sc-2042)	1/200	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, EEUU)

RE α , receptor de estrógenos α ; RP, receptor de progesterona; Hoxa10, homeobox protein A10; Wnt7a, wingless-type MMTV integration site family, miembro 7A.

6. Cuantificación de la proliferación celular y de la expresión de proteínas.

La proliferación celular y la expresión de proteínas se evaluaron en el miometrio circular y en el miometrio longitudinal por separado.

La expresión de Ki67 se analizó utilizando un microscopio Olympus BH2 con objetivas Dplan 100X (apertura numérica = 1,25; Olympus). Las tasas de proliferación en los miometrios circular y longitudinal se obtuvieron considerando la relación Vv de las células Ki67-positivas aplicando la fórmula

de Weibel [264] (Ecuación 3); donde V_v es la fracción de volumen estimada del compartimento en estudio, P_i es el número de puntos de la grilla incidentes sobre las células Ki67-positivas, y P es el número de puntos incidentes sobre el total de las células del compartimento estudiado. Tanto las células endoteliales como las células inflamatorias infiltrantes (ej., neutrófilos, macrófagos y eosinófilos), fueron excluidas en todos los análisis. Para obtener los valores numéricos, se empleó un ocular que posee una grilla cuadrículada de 0,8 mm x 0,8 mm [260,265].

$$V_v = \frac{P_i}{P} \times 100 \quad (\text{Ecuación 3})$$

La cuantificación de la expresión de las proteínas (Hoxa10, Wnt7a y receptores esteroideos) se realizó mediante análisis de imágenes, utilizando el programa Image Pro-Plus 5.0.2. Para ello se obtuvieron imágenes del miometrio uterino con una cámara de video color Spot Insight V3.5 acoplada al microscopio Olympus BH2 con una objetiva de Dplan 40X (apertura numérica = 0,65). Previamente, el microscopio fue acondicionado para la iluminación Koehler. Las imágenes fueron convertidas a escala de grises y se delimitó el compartimento a evaluar. Se determina el área total de la sección seleccionada, el área de marcación positiva y el promedio de la intensidad de marcación (Figura 7). A partir de estos parámetros, con los datos devueltos por el software, se calculó la Densidad Óptica Integrada (DOI), definida como una combinación lineal entre el promedio del área relativa de marcación positiva y la intensidad de dicha marcación [260,262]:

$$DOI = [(A_{ip}/A_t) \times 100] \times \bar{I} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde, A_t es el área total del compartimento evaluado, A_{ip} el área de inmunomarcación positiva y \bar{I} el promedio de la intensidad de marcación. Debido a que la DOI es un parámetro adimensional, los resultados fueron expresados como unidades arbitrarias. Es importante destacar que la cuantificación se realizó en áreas conservadas y sin pliegues.

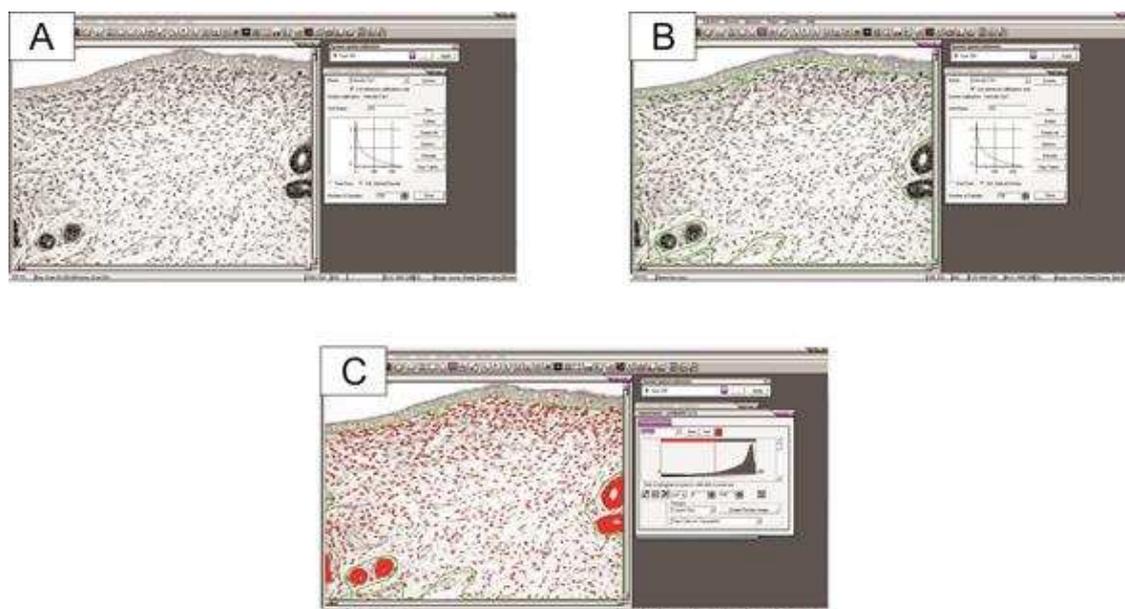


FIGURA 7: Cuantificación de la expresión de proteínas mediante densidad óptica integrada (DOI). Las imágenes muestran la secuencia de pasos para la cuantificación de la expresión de proteínas utilizando el software ImagePro-Plus. A) Imagen convertida a escala de grises. B) Selección manual de la sección de estroma a evaluar. C) Selección del rango de marcación positiva del estroma (visualizada en rojo).

La proliferación celular y la cuantificación de la expresión de proteínas fue realizada en al menos 10 campos visuales por sección, y en dos secciones por animal (con no menos de 25 μm de separación entre secciones).

7. Evaluación de la expresión de genes relacionados con la activación miometrial durante el parto mediante qRT-PCR

7.1. Extracción de ARN total

La extracción de ARN total se realizó utilizando el reactivo comercial “TRIzol Reagent” (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina), que se fundamenta en el método del isotiocianato de guanidina-fenol-cloroformo [266]. Brevemente, en el contenedor del homogeneizador Ultra Turrax® T25 Basic (IKA - Werke GMBH & Co.KG, Staufen, Alemania) se agregaron 1000 μL del reactivo TRIzol por cada 50-100 mg de tejido congelado, y se homogeneizó suavemente. Durante la homogeneización de la muestra el reactivo preserva la integridad del ARN. El agregado de cloroformo y posterior centrifugación separó la solución en una fase acuosa y otra fase orgánica. El ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa, de donde fue recuperado por precipitación con alcohol isopropílico, lavado con etanol al 80% y solubilizado en agua libre de ribonucleasas. La concentración de ARN total en las muestras procesadas se determinó mediante la lectura en espectrofotómetro (NanoDrop Lite, Thermo Scientific, Wilmington, DE, EE. UU.) a una longitud de onda de 260 nm. Se usó como referencia de la pureza del ARN extraído, la relación entre las absorbancias obtenidas a 260 nm (punto de máxima absorción de ácidos nucleicos) y

280 nm (punto de máxima absorción de proteínas). Solamente se utilizaron aquellas muestras con una relación de absorbancia 260/280 mayor a 1,9. Los ARN obtenidos fueron conservados a -80 °C hasta el momento de la realización de las reacciones de RT.

7.2. Transcripción Reversa

A partir de los ARN extraídos se realizaron transcripciones reversas con el fin de obtener los correspondientes ADNc. La RT se llevó a cabo empleando cantidades iguales (1 µg) del ARN total y utilizando la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV, 300 U, Promega, Madison, WI, EE. UU.). Se emplearon oligonucleótidos hexaméricos (200 pmoles, Promega) como cebadores de la enzima. Al tubo de reacción se le adicionaron 20 U de inhibidor de ARNasa (RNAout, Invitrogen) y 100 nmol de una mezcla de dNTPs (deoxinucleótidos trifosfatos) y se alcanzó un volumen final de 30 µl con la solución amortiguadora de la reacción provista por el fabricante de la enzima. La reacción de RT se realizó a 70 °C por 5 min y 30 seg con la mezcla de los ARN y los oligonucleótidos hexaméricos, luego se agregó el resto de los reactivos y se continuó la reacción a 37 °C por 90 min y a 42 °C por 15 min. La reacción se detuvo calentando a 80 °C por 5 min y a 94 °C por 30 segundos, y realizando posteriormente un enfriamiento a 25 °C. Las reacciones de RT se llevaron a cabo en el termociclador T18 (IVEMA, Buenos Aires, Argentina). Una vez obtenido el ADNc, se diluyó con agua libre de ARNasas, llevándolo a un volumen final de 60 µl. Como control negativo de la reacción se utilizó el ARN incubado en condiciones idénticas, pero sin transcriptasa reversa.

7.3. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR)

Luego de la extracción del ARN total y posterior RT, se determinó la expresión del ARNm del OXTR, PTGFR y Cx-43, mediante ensayos optimizados de PCR en tiempo real. Esta metodología se basa en la detección y cuantificación ciclo a ciclo de una molécula fluorescente (Eva Green en la presente tesis) que se intercala a las hebras de ADN doble cadena. La fluorescencia es detectada y leída por un fluorómetro acoplado al termociclador a medida que transcurre la reacción de PCR.

Para amplificar los genes, se diseñaron oligonucleótidos específicos utilizando el software Vector NTI Suite Versión 6.0. Los genes OXTR y PTGFR se estudiaron por su rol en el desarrollo de las contracciones uterinas, mientras que la Cx-43 se estudió por su rol en la transducción y sincronización de las contracciones [252,267]. Como control interno (gen de referencia) se utilizó la determinación de ARNm del gen de la proteína ribosomal L19 (Tabla 6). La temperatura de hibridación para cada amplicón se obtuvo a partir del análisis *in silico* utilizando el software Vector NTI (Tabla 6). La especificidad de los oligonucleótidos fue cotejada por comparación directa de su secuencia contra el genoma completo de

Rattus norvegicus mediante el uso de la herramienta BLAST disponible en la página web del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Tabla 6: Primers y tamaño de los productos de PCR empleados para el análisis de la expresión génica mediante qRT-PCR.

Gen	Primer sequence	Propiedades	N° acceso de GenBank
Rpl19	Forward: AGGTCATCACCATCGGCA	142 bp	NM_001009784.1
	Reverse: AGGTCTTTGCGGATGTCG	Ta 57 °C	
OXTR	Forward: AGATGTGGAGCGTTTGGGAC	166 bp	NM_012871.3
	Reverse: CGAGCAGAGCAGCAGAAGAA	Ta 54 °C	
PTGFR	Forward: TAGAAGTCAGCAGCACAGGC	157 bp	NM_013115.1
	Reverse: CTCACAGGTCACTGGGGAAT	Ta 53 °C	
Cx-43	Forward: AGAGCCTGAACTCTCATTTT	214 bp	NM_012567.2
	Reverse: AGGAGCAGGATTCTGAATAT	Ta 54 °C	

Rpl19, Proteína ribosomal L19; OXTR: receptor de oxitocina; PTGFR: receptor de prostaglandina F2 α ; Cx-43, conexina 43. Ta: Temperatura de *annealing*

Todas las muestras retro-transcriptas a ADNc fueron amplificadas por duplicado. Los niveles de ADNc fueron detectados utilizando el termociclador StepOne (Applied Biosystems Inc.). Para la amplificación, 5 μ l de ADNc se combinaron con 4 μ L de HOT-FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Biocientífica, Rosario, Argentina) y 0,5 μ L (10 pmoles) de cada oligonucleótido en un volumen final de 20 μ l. El protocolo general de ciclado utilizado se muestra en la Tabla 7. La pureza de los productos obtenidos fue confirmada mediante curvas de disociación y electroforesis en geles de agarosa de muestras elegidas al azar en cada corrida. Controles sin ADNc fueron incluidos en todos los ensayos.

El cálculo de los niveles de expresión relativa de cada muestra se realizó utilizando el método del ciclo umbral (Ct) [268]. El valor de Ct para cada muestra se calculó utilizando el software StepOne (Versión 2.3, Applied Biosystems Inc.) con un umbral de ajuste de fluorescencia automática (Rn). La eficiencia (Ef) de la reacción de PCR para cada gen estudiado y para el gen de referencia fue calculada mediante curvas estándar. Estas curvas se construyeron a partir de la amplificación de cada gen en diluciones seriadas de los ADNc. Luego, de la gráfica del logaritmo de las diluciones de los ADNc vs. su correspondiente Ct, se obtuvo la fórmula de la recta por regresión lineal, a partir de la cual se calculó la eficiencia como $Ef = [10^{(-1/\text{pendiente})} - 1] \times 100$. Dependiendo de las condiciones específicas de la PCR, la

eficiencia varió entre 95% y 105%. La expresión relativa de cada gen en los distintos experimentos se determinó utilizando el método de la curva estándar relativa [269]. Para todas las muestras experimentales, la cantidad relativa del gen de interés y del gen de referencia fue determinada a partir de la curva estándar previamente realizada para cada gen. La cantidad obtenida correspondiente al gen de interés fue normalizada con la cantidad relativa del gen de referencia en cada grupo experimental. No se observaron diferencias en la expresión del gen de referencia entre los diferentes grupos experimentales.

Tabla 7: Protocolo de general de ciclado empleado en qRT-PCR.

Hot start (activación de la enzima)	95 °C	15'
Ciclado (40 ciclos)		
Desnaturalización	95 °C	15''
<i>Annealing</i>	Depende del par de primers	15''
Elongación	72 °C	15''
Lectura	81 °C	10''
Curva de <i>melting</i>		
Desnaturalización	95 °C	15''
<i>Annealing</i>	60 °C	1'
Rampa de temperatura	60 °C → 95 °C	Δ 1 °C/min

7.4. Electroforesis en geles de agarosa

Las electroforesis horizontales en geles de agarosa (concentraciones de agarosa 3% p/v) se realizaron utilizando buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1× como solución reguladora de electroforesis y patrones de ADN de peso molecular de entre 100 y 1000 pb (CienMarker, Biodynamics, Buenos Aires, Argentina). El agente revelador utilizado fue GelRed® (Biotium, Fremont, CA, EE. UU.), el cual se agregó al gel en una relación de 1 µL de GelRed® 1000× por cada mL de solución de gel. Las corridas se realizaron en una cuba de electroforesis horizontal Bio-Rad PowerPac® 300 (Bio-Rad, California, CA, EE. UU.) manteniendo el voltaje constante a 70V hasta que todo el frente de corrida ingresara al gel, para luego subir el voltaje hasta 80V. Los geles fueron revelados en un transiluminador Foto/UV® 1 (Fotodyne Inc., Thermo Fischer Scientific, Heartland, WI, EE. UU.).

8. Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media ± SEM (error estándar medio). Los datos se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Los análisis se realizaron usando el software R (<http://www.r-project.org/>). En todos los casos se consideró un $P < 0,05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

La exposición neonatal a endosulfán altera la organización estructural del miometrio durante el periodo pre-implantatorio.

La exposición a endosulfán disminuyó el espesor total de la pared miométrial, al disminuir tanto el espesor del miometrio circular como del longitudinal, y del tejido conectivo entre ambas capas o tejido conectivo intersticial (figura 8). Estas alteraciones se asociaron a un aumento en la remodelación de colágeno en ambas capas miométriales, y a una reducción en el área relativa ocupada por vasos sanguíneos en el tejido conectivo intersticial (figura 9).

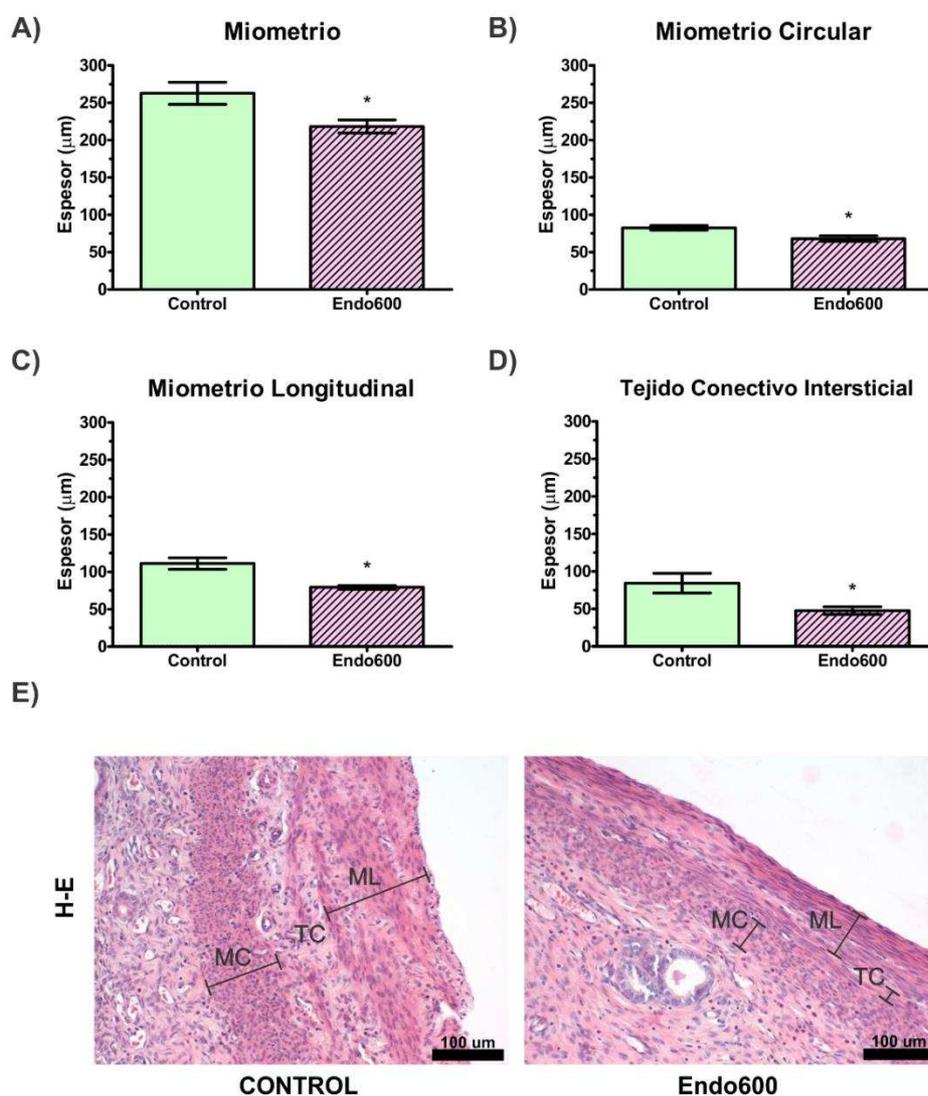


Figura 8: Efecto de la exposición neonatal a endosulfán sobre el espesor del miometrio durante el periodo pre-implantatorio. Espesores del miometrio uterino (A), del miometrio circular (B), del miometrio longitudinal (C) y del tejido conectivo intersticial (D). Las columnas representan la media \pm SEM (Control, n = 8; Endo600, n = 8) *p < 0,05 vs. control. E) Fotomicrografías representativas de secciones uterinas coloreadas con hematoxilina-eosina que muestran los cambios morfológicos

producidos por la exposición a endosulfán. H-E: coloración de hematoxilina-eosina; MC: miometrio circular; ML: miometrio longitudinal; TC: tejido conectivo intersticial. Escala de barra: 100 μ m.

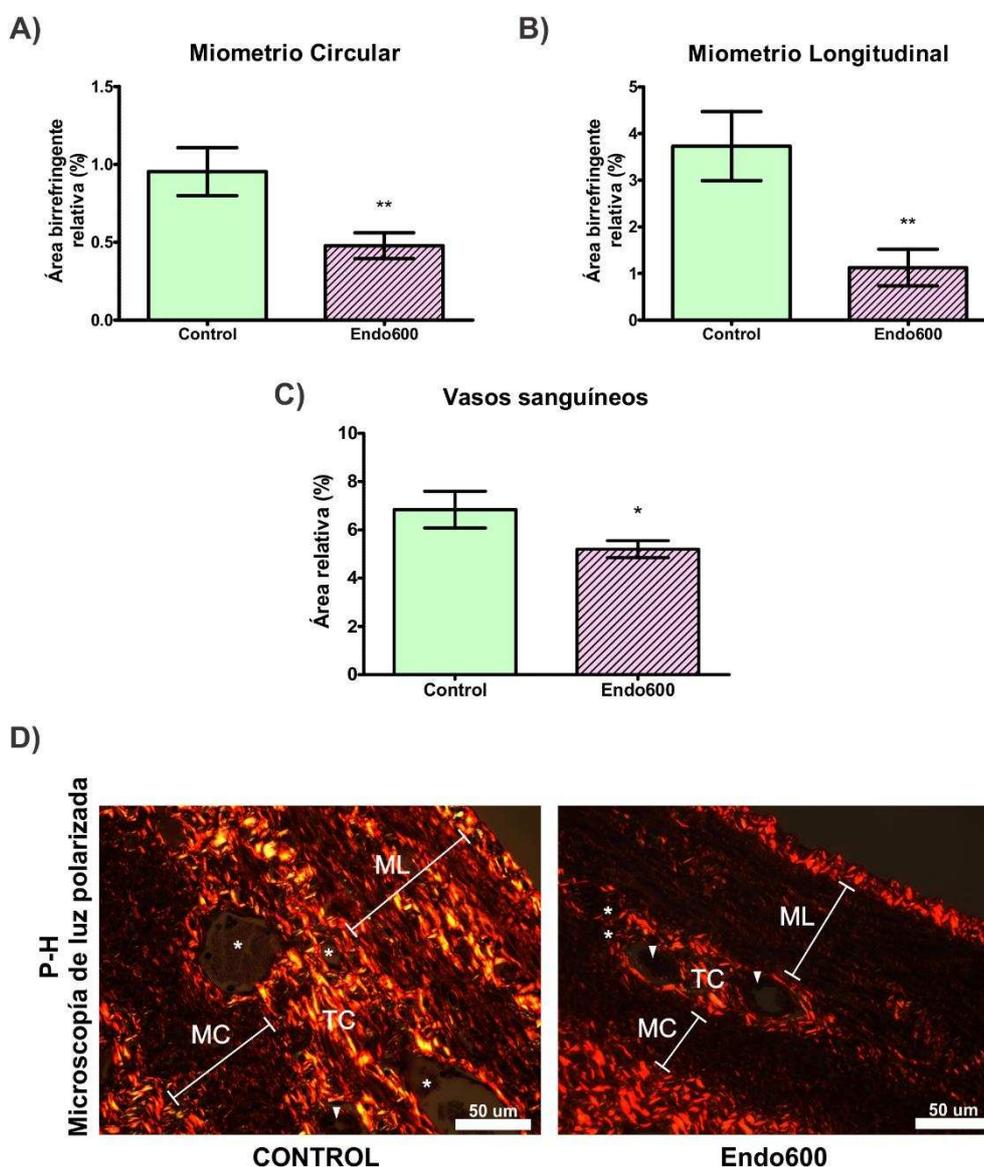


Figura 9: Remodelación de colágeno y área relativa ocupada por vasos sanguíneos en el miometrio de ratas control y expuestas neonatalmente a endosulfán en el periodo pre-implantatorio. Remodelación del colágeno en el miometrio circular (A) y en el miometrio longitudinal (B) expresada como área relativa birrefringente. C) Área relativa ocupada por vasos sanguíneos en el tejido conectivo expresado como Vv. Las columnas representan la media \pm SEM (Control, n = 8; Endo600, n = 8). * $p < 0,05$ vs. control, ** $p < 0,01$ vs. control. D) Fotomicrografías representativas que muestran la organización de las fibras de colágeno en el miometrio uterino. P-H: coloración de picrosirius-hematoxilina; MC: miometrio circular; ML: miometrio longitudinal; TC: tejido conectivo intersticial. Asterisco blanco, vasos sanguíneos; Punta de flecha blanca, arterias uterinas. Escala de barra: 50 μ m.

El endosulfán altera la proliferación de las células miométriales en el DG5

Como se mencionó previamente, la adaptación miométrial durante la preñez temprana involucra la proliferación de SMCs. La proliferación celular de las células del miometrio longitudinal fue mayor que las del miometrio circular, en ambos grupos experimentales. Asimismo, las ratas hembra que habían sido expuestas neonatalmente a endosulfán presentaron una menor proliferación celular en el miometrio circular (C: $0,50 \pm 0,12$; Endo600: $0,16 \pm 0,10$) y longitudinal (C: $1,13 \pm 0,24$; Endo600: $0,63 \pm 0,15$) (figura 10).

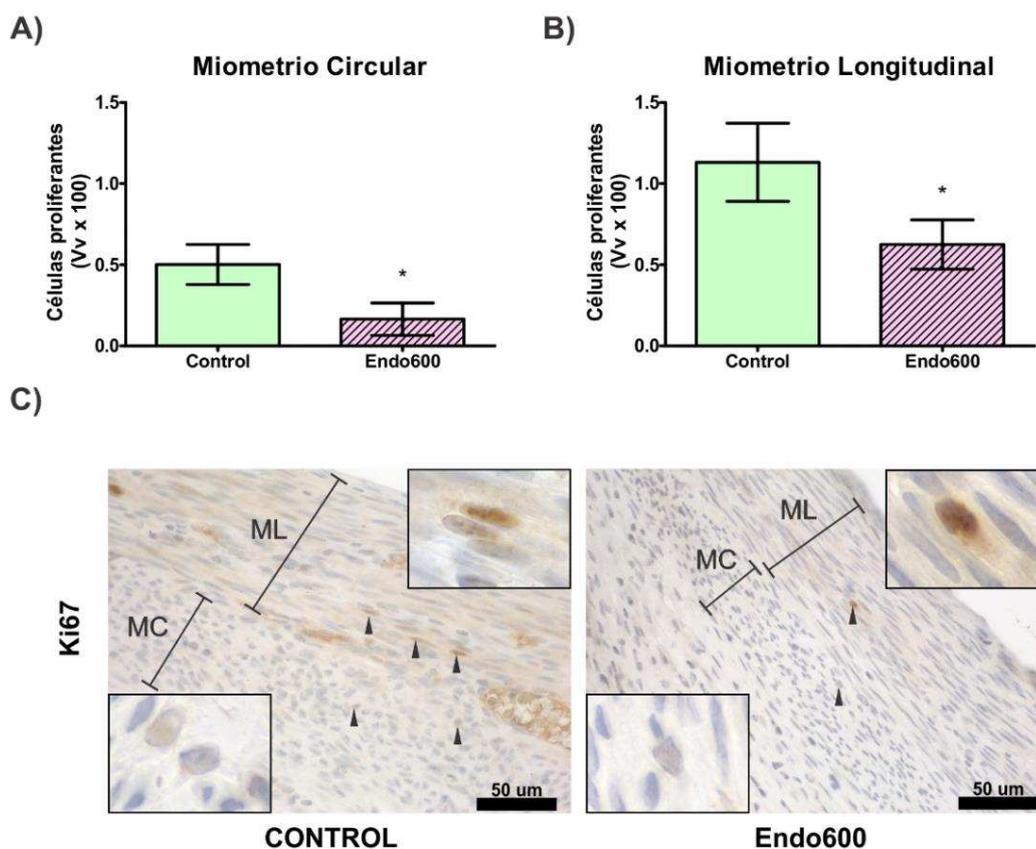


Figura 10: Proliferación celular mediante inmunodetección de Ki67 en el miometrio uterino de animales control y expuestos neonatalmente a endosulfán en el periodo pre-implantatorio. La exposición a endosulfán disminuyó la proliferación celular en el miometrio circular (A) y longitudinal (B). Los resultados se expresan como Vv. Las columnas representan la media \pm SEM (Control, n = 8; Endo600, n = 8). * $p < 0,05$ vs. control. C) Fotomicrografías representativas de la proliferación de las células del miometrio. Los *inset* en las figuras muestran la localización de Ki67 a mayor aumento. MC: miometrio circular; ML: miometrio longitudinal; TC: tejido conectivo intersticial. Punta de flecha negra, células con inmunomarcación positiva para Ki67. Escala de barra: 100 μ m.

La exposición neonatal a endosulfán alteró la expresión de proteínas involucradas en la diferenciación miometrial durante el periodo pre-implantatorio

La proliferación de las SMCs está regulada por los receptores esteroideos y sus genes *downstream* Wnt7a y Hoxa10. No se encontraron diferencias en la expresión del RE α y del RP entre los animales tratados y del grupo control (figura 11). Por otro lado, la exposición a endosulfán redujo los niveles de expresión de Hoxa10 en el miometrio longitudinal, mientras que la expresión de Wnt7a se observó disminuida en ambas capas miometriales (figura 12).

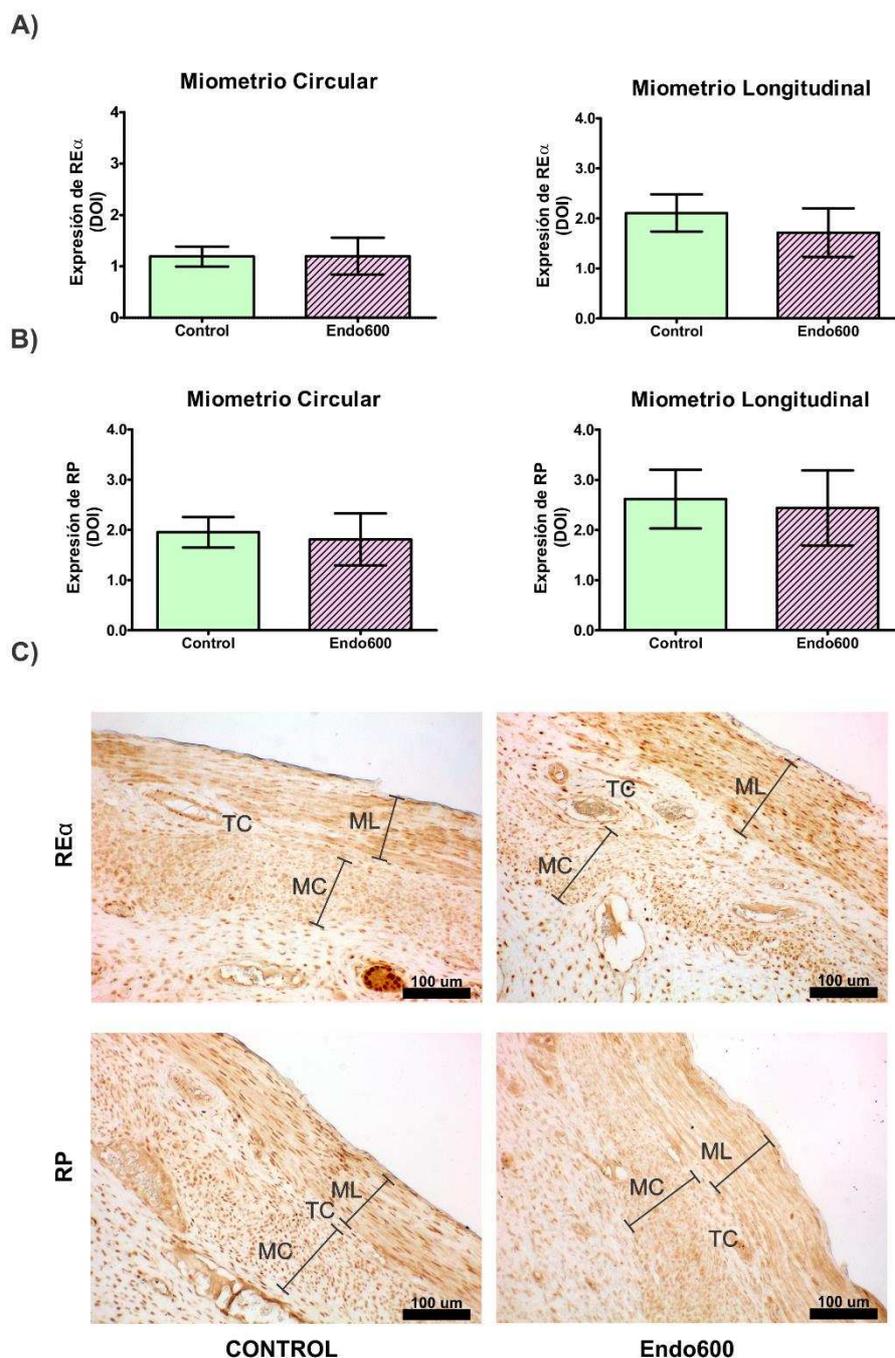


Figura 11: Expresión de los receptores esteroideos en el miometrio uterino de ratas control y expuestas neonatalmente a endosulfán en el periodo pre-implantatorio. No se observaron alteraciones en los

niveles de expresión del RE α (A) o del RP (B) en el miometrio uterino. Los resultados se expresan como DOI. Las columnas representan la media \pm SEM (Control, n = 8; Endo600, n = 8). C) Fotomicrografías representativas de la expresión del RE α y del RP en el miometrio. MC: miometrio circular; ML: miometrio longitudinal; TC: tejido conectivo intersticial. Escala de barra: 100 μ m.

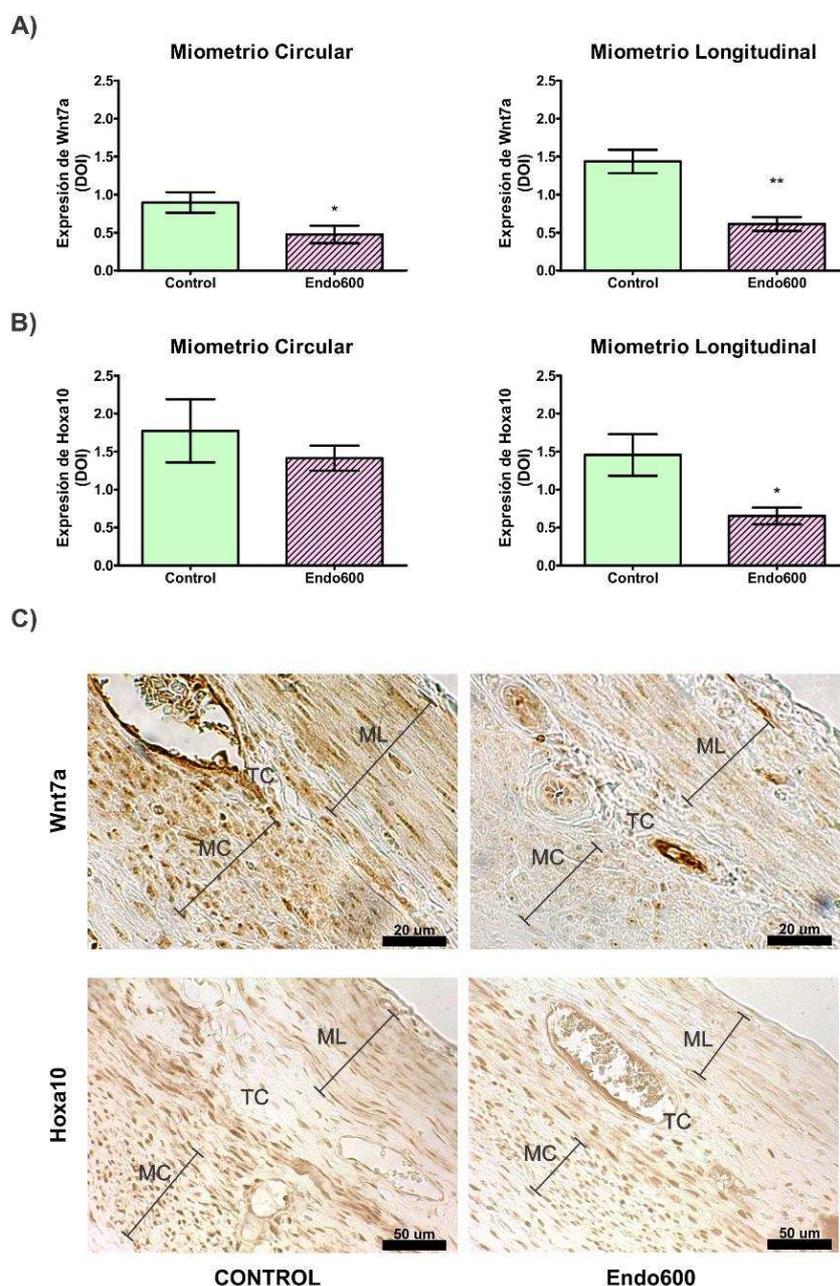


Figura 12: Efecto de la exposición neonatal a endosulfán sobre la expresión miometrial uterina de Wnt7a y Hoxa10 en el periodo pre-implantatorio. A) Resultados de la cuantificación de los niveles de expresión de Wnt7a en las capas del miometrio circular (izquierda) y longitudinal (derecha). B) Niveles de expresión de Hoxa10 en los miometrios circular (izq.) y longitudinal (der.). Los resultados se expresan como DOI. Las columnas representan la media \pm SEM (Control, n = 8; Endo600, n = 8). * $p < 0,05$ vs. control; ** $p < 0,01$ vs. control. C) Fotomicrografías representativas de la expresión de Wnt7a y Hoxa10 en las células del miometrio uterino. MC: miometrio circular; ML: miometrio longitudinal; TC: tejido conectivo intersticial. Punta de flecha negra, células con inmunomarcación positiva para Ki67. Wnt7a, escala de barra: 20 μ m; Hoxa10, escala de barra: 50 μ m.

El endosulfán alteró el inicio del parto y la expresión de genes asociados a las contracciones uterinas durante el parto

Teniendo en cuenta los resultados mencionados, nuestro próximo objetivo fue evaluar si las alteraciones en la adaptación de las SMCs durante el periodo pre-implantatorio, podría afectar la activación miometrial que se requiere para el parto.

Evaluamos el día y la hora a la que comenzaba el parto. A pesar de que todos los animales parieron en el DG23, el tratamiento con endosulfán alteró la hora de inicio del parto. Se observó que la expulsión de la primera cría en las ratas expuestas a endosulfán ocurría significativamente antes (Control: 11:00 ± 00:45 a.m. vs Endo600: 07:00 ± 00:30 a.m.; *p < 0.05). Asimismo, detectamos una mayor expresión en la expresión relativa del ARNm de los genes OXTR, PTGFR y Cx-43 (figura 13).

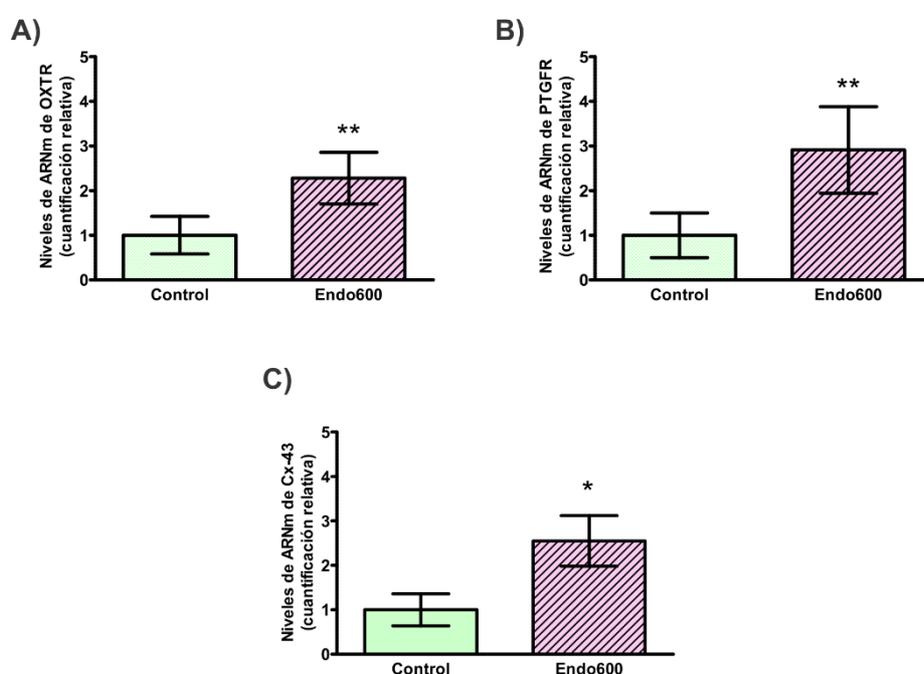


Figura 13: Expresión de genes asociados a las contracciones uterinas en el útero de ratas control y expuestas neonatalmente a endosulfán durante el parto. Niveles de expresión relativa del receptor de oxitocina (A), del receptor de prostaglandinas F2 α (B) y de conexina 43 (C) determinados por qRT-PCR. Las muestras fueron normalizadas frente a la expresión de Rpl19 y a los valores del grupo control, al que se le asignó el valor de 1. Las columnas representan la media \pm SEM (Control, n = 10; Endo600, n = 10). *p<0,05 vs. control; **p<0,01 vs. control.

DISCUSIÓN

En el presente capítulo demostramos los efectos a largo plazo de la exposición neonatal a endosulfán sobre la diferenciación miometrial en el periodo pre-implantatorio, al inducir alteraciones morfológicas y moleculares. La adaptación miometrial es necesaria no solo para el mantenimiento de la gestación y el parto, sino para la implantación embrionaria [270]. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que las alteraciones en la diferenciación miometrial podrían estar relacionadas con las fallas en la implantación del embrión, que hemos reportado previamente [140]. Además, investigamos si las alteraciones en la diferenciación del miometrio uterino podrían afectar la activación miometrial para que se produzca el parto. Observamos que, a pesar de que todos los animales parieron en el DG23, la exposición a endosulfán adelantó el inicio del parto, y esta alteración podría estar asociada con la mayor expresión de los CAPs estudiados (OXTR, PTGFR y Cx-43).

Como se comentó previamente, la exposición a PE durante periodos críticos del desarrollo podría alterar el patrón de desarrollo con consecuencias negativas a largo plazo sobre la función uterina y la salud reproductiva [193,271]. En estudios previos de nuestro laboratorio [75,139,140], demostramos que la exposición neonatal a endosulfán altera la expresión de proteínas involucradas en el desarrollo uterino en el periodo prepuberal e indujo subfertilidad, caracterizada por una disminución en la tasa de preñez y en el número de sitios de implantación. Además, observamos que las fallas en la implantación se relacionaron con alteraciones en las vías de señalización endócrinas que regulan la proliferación endometrial en el periodo pre-implantatorio [140].

La diferenciación miometrial, además de la diferenciación endometrial, es necesaria para que se produzca la implantación embrionaria. En las ratas expuestas a endosulfán, observamos una disminución en el espesor del miometrio como consecuencia de un menor espesor del miometrio circular y longitudinal, así como también del tejido conectivo intersticial entre ambas capas musculares. La disminución del espesor se relaciona con una mayor remodelación de colágeno en los miometrios circular y longitudinal, una reducción del área relativa ocupada por vasos sanguíneos y una menor proliferación en ambas capas musculares. La atrofia uterina y una deficiente vascularización se han asociado a una deficiente implantación, problemas en el mantenimiento de la gestación y/o fallas en el desarrollo y la funcionalidad placentaria, lo que podría dar lugar a una restricción del crecimiento intrauterino o patologías como la preeclampsia [272–275]. Sin embargo, bajo las condiciones de nuestro diseño experimental no podemos afirmar si las alteraciones en el tejido conectivo intersticial y en la densidad vascular alteran el desarrollo embrionario y, por lo tanto, el peso de la cría al nacer. Por otro lado, las alteraciones miometriales observadas en el grupo Endo600 son similares a las reportadas en un modelo de diabetes tipo 1 a largo plazo [270], donde la diabetes redujo la proliferación de las SMCs, las cuales se

relacionaron con una disminución del espesor de las capas musculares. Asimismo, en el modelo de diabetes se observó una disminución del tejido conectivo entre las capas musculares y una atrofia de las capas miometriales, junto con una mayor desorganización de los filamentos contráctiles de las SMCs [270]. Notablemente, estudios epidemiológicos y experimentales han asociado la exposición a endosulfán con patologías metabólicas como diabetes e insulino-resistencia [276,277].

La hiperplasia de las SMCs, que caracteriza la adaptación miometrial durante la preñez temprana, se encuentra inducida por factores de crecimientos regulados por los estrógenos [251]. En nuestro trabajo, la menor proliferación celular está asociada a una disminución en la expresión de Wnt7a y Hoxa10, los cuales son regulados por los estrógenos. Asimismo, Wnt7a y Hoxa10 se encuentran implicados en la regulación de la diferenciación del músculo liso uterino [21,278]. Se demostró que en ratones Wnt7a^{-/-} aumenta la desorganización de las SMCs uterinas y que poseen un miometrio atrofiado en asociación con una pérdida de la expresión de Hoxa10 [21]. La exposición a PE altera la expresión de los genes Wnt7a y Hoxa10, tal como se demostró para la exposición neonatal a DES que inhibe la expresión de dichos genes [32,279]. La exposición *in utero* a BPA o MXC también altera la expresión de Hoxa10 [280,281], mientras que la exposición a bifenilos policlorados (PCBs) y 17β-etinilestradiol disminuye la expresión de Wnt7a [282,283]. En forma similar a lo que observamos para endosulfán, la exposición a los PE antes mencionados produjo alteraciones en la organización miometrial y afectó la eficiencia reproductiva [284–286]. Teniendo en cuenta nuestros resultados, podemos sugerir que la perturbación observada en la vía de señalización Wnt7a/Hoxa10 podrían estar involucradas en las alteraciones de la diferenciación miometrial durante la preñez temprana que, a su vez, podrían estar relacionadas con las fallas en la implantación inducidas por el endosulfán.

Considerando los resultados observados en el miometrio uterino en el periodo pre-implantatorio de ratas que habían sido expuestas neonatalmente a endosulfán, estudiamos si las alteraciones en la adaptación del miometrio podrían afectar la activación del miometrio durante el parto. El parto se desencadena como consecuencia de la generación de contracciones sincronizadas de elevada amplitud y frecuencia. La habilidad del miometrio para que desencadenar las contracciones durante el parto a término puede definirse bioquímicamente por el aumento de la expresión de proteínas asociadas a las contracciones, o CAPs, tales como el OXTR, PTGFR y Cx-43; las que son responsables de la actividad contráctil y de la capacidad de respuesta del miometrio durante el trabajo de parto [252,267]. Las contracciones miometriales son producidas por el incremento de la concentración de Ca⁺² intracelular, que ocurre por la liberación de Ca⁺² del retículo sarcoplasmático y por la activación de canales de Ca⁺² activados por ligando o regulados por diferencia de potencial; estos procesos son regulados por las vías de señalización del OXTR y del PTGFR [287–289]. Por otro lado, la Cx-43, una de las proteínas de unión

de las células miométriales más importante, facilita la propagación de los impulsos eléctricos y sincroniza las contracciones miométriales [290–292]. En nuestro trabajo observamos que, aunque todas las hembras parieron en DG23, los animales tratados con endosulfán comenzaron a parir más temprano, y esto se asoció con una mayor expresión génica de OXTR, PTGFR y Cx-43. En la bibliografía consultada, no encontramos trabajos que estudien los efectos de la exposición a endosulfán sobre la actividad contráctil uterina. Asimismo, existen pocos antecedentes que estudien los efectos de otros PE sobre la actividad contráctil uterina. Estudios *in vitro* demostraron que la exposición de segmentos de miometrio bovino a DDT, o su metabolito diclorodifenildicloroetileno (DDE), incrementa las contracciones miométriales basales y la secreción ovárica de oxitocina y endometrial de prostaglandina F2 α [293–295]. Asimismo, Wrobel y col. [296] demostraron que la exposición *in vitro* de segmentos uterinos a DDT y DDE aumenta la expresión de caveolina-1, otra CAP involucrada en las contracciones [297]. Por el contrario, la exposición de ratas Sprague-Dawley prepuberales durante 3 días a 4-tert-octilfenol o BPA disminuye la actividad contráctil del miometrio aunque se induce la expresión de CAPs [298]. Nuestros resultados, junto con los antecedentes mencionados, sugieren que las CAPs pueden alterarse luego de la exposición a PEs, y así afectar la actividad contráctil uterina. Asimismo, podemos sugerir que los cambios observados en las ratas expuestas a endosulfán durante el periodo pre-implantatorio, podrían estar relacionados con las alteraciones observadas en la activación miométrial durante el parto, evidenciadas por un adelantamiento en el inicio del parto en asociación con una mayor expresión de genes asociados a las contracciones uterinas. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que existan otros efectos del endosulfán, como un adelantamiento del momento en el cual se implanta el embrión, que también podría ser responsable del adelantamiento del parto.

El parto a término exitoso requiere de la coordinación de múltiples vías de señalización que desencadenan las potentes contracciones uterinas. Alteraciones en la expresión de las moléculas involucradas pueden afectar la función fisiológica y conducir a un parto pretérmino o fallas en el trabajo de parto. Por un lado, la Cx-43 está relacionada con la coordinación de las contracciones uterinas que permiten un parto normal. En este sentido, la delección condicional de Cx-43 en SMCs uterinas se asocia con una demora en el inicio del parto [290], mientras que en un modelo murino de parto pretérmino se observó una mayor expresión de Cx-43 [299]. Por otro lado, los incrementos en la expresión de OXTR y de PTGFR estarían asociados con contracciones de mayor amplitud y frecuencia, lo que podría generar una mayor fuerza en las contracciones o que las contracciones sean más largas [300,301]. Una mayor contractilidad uterina durante el parto se asocia con consecuencias perjudiciales para las crías. En relación con esto, se observó que en cerdas con una mayor contractibilidad uterina, las crías al nacer presentaban una disminución en la frecuencia cardíaca, mayor probabilidad de inhalación de meconio, y un aumento de las muertes intraparto [302,303]. En un modelo de ratones KO para la cinasa de receptores acoplados

a proteína G 6 (GRK6), que promueve la desensibilización del OXTR, se ha asociado una mayor actividad contráctil del miometrio con un incremento en la tasa de muertes fetales [304]. En nuestro trabajo, si bien observamos una mayor expresión de CAPs, se requieren más estudios para asociar el incremento en la expresión génica con una mayor actividad contráctil uterina.

La diferenciación y la actividad miometrial poseen un rol central en muchas funciones reproductivas incluyendo el transporte de espermatozoides y de embriones, implantación, gestación y el parto. Asimismo, una diferenciación o actividad miometrial anormal puede inducir fallas reproductivas, como infertilidad, fallas en la implantación o parto pretérmino [305]. Trabajos epidemiológicos han establecido asociaciones entre la exposición a POPs y la incidencia de infertilidad, parto pretérmino y abortos espontáneos. Pathak y col. [116] observaron una correlación significativa entre los niveles de endosulfán, entre otros POPs, en sangre materna y de cordón umbilical y la incidencia de partos pretérmino. Resultados similares fueron publicados por Tyagi y col. [306], quienes evaluaron la asociación entre los niveles de exposición a POPs y el tiempo de gestación, el peso del bebé y el peso de la placenta en partos a término y pretérmino. En dicho estudio, observaron una correlación negativa entre los niveles de los POP α -hexachlorohexano (α -HCH), β -HCH y DDE y el tiempo de gestación; además, describieron que mayores niveles de dieldrin y γ -HCH se asociaban a un menor peso de la placenta. Nosotros desconocemos la existencia de estudios que relacionen elevados niveles de endosulfán con alteraciones en el peso de la placenta. Embrandiri y col. [307] realizaron un estudio epidemiológico y establecieron una relación entre diversas patologías, como retraso madurativo, anomalías congénitas y trastornos reproductivos, en los habitantes de Kasaragod (Kerala, India), y la exposición indirecta durante más de 20 años a endosulfán. Teniendo en cuenta estos antecedentes y nuestros resultados, podemos sugerir que la exposición a endosulfán podría representar un riesgo para el desarrollo de desórdenes reproductivos. Como hemos mencionado previamente, los resultados aquí expuestos, junto con nuestros antecedentes previos [140], establecen una asociación entre las fallas en la implantación inducidas por la exposición a endosulfán y las alteraciones observadas en la diferenciación endometrial y miometrial en el periodo pre-implantatorio.

En conclusión, nuestros resultados demuestran que la exposición neonatal a endosulfán en ratas induce alteraciones morfológicas y moleculares en el miometrio durante el periodo pre-implantatorio. También observamos un adelantamiento del trabajo de parto en asociación con una mayor expresión de CAPs, proteínas que regulan la actividad contráctil y la capacidad de respuesta del miometrio uterino durante el parto. Las alteraciones en la adaptación miometrial durante la gestación temprana y el parto inducidas por el endosulfán podrían repercutir negativamente en la fertilidad de la hembra, el mantenimiento de la gestación y el parto.

CAPITULO II

***EXPOSICIÓN NEONATAL DE CORDERAS A UN HBG:
EFECTOS COMPARATIVOS DE DOS VIAS DE ADMINISTRACIÓN:
ORAL VS SUBCUTÁNEA***

INTRODUCCIÓN

Como se mencionó anteriormente, los HBG son los agroquímicos más empleados. Se estima que en 2014 se utilizaron 800 millones de kg de glifosato a nivel mundial [94], y que cada año se utilizan en Argentina unos 200 millones de litros del herbicida [148]. Es por ello que, debido al frecuente e intensivo uso en la región pampeana, se podría considerar al glifosato como un compuesto pseudo-persistente [95]. Se han descrito residuos de glifosato, y su principal metabolito (AMPA), en diferentes matrices: aguas superficiales, sedimentos y suelo [147–149,308]. Incluso se detectó glifosato y AMPA en partículas de polvo respirable provenientes de la región semiárida central argentina [152]. Por otro lado, también se han determinado niveles de glifosato en carne, granos, frutas y vegetales [158,309], siendo la vía oral una de las potenciales fuentes de exposición. Estos hallazgos han despertado el interés por estudiar los potenciales efectos de estos compuestos sobre la salud.

Como ya se mencionó, se han reportado múltiples efectos en ensayos *in vitro* empleando células de mamífero y, aparentemente, dichos efectos dependen de la composición del HBG y del diseño experimental utilizado (tipo de célula, concentración y tiempo de exposición, entre otros). Además, en un modelo *in vitro* se describen efectos de PE de los HBG mediados por una activación ligando-independiente del RE [176]. Estudios *in vivo* también han observado que el HBG tiene potencial actividad como PE. En publicaciones de nuestro laboratorio, describimos efectos adversos de HBG sobre el desarrollo uterino y mamario, y sobre la fertilidad de la hembra [182,190,191,196].

En Argentina existen aproximadamente 15 millones de ovinos; la mayor cantidad se encuentra en la región patagónica, y luego le siguen la región pampeana y la región del litoral [310]. A pesar de ser nuestro País un gran productor ganadero, no hay estudios que evalúen la reducción en las tasas de fertilidad y su impacto sobre la productividad económica, en asociación con los efectos de la exposición a agroquímicos [311]. Una importante dificultad para demostrar dichas asociaciones podría estar relacionada con la gran diversidad de contaminantes a los cuales los animales de interés zootécnico están expuestos en sus condiciones a campo, y que estos agentes pueden actuar de manera aditiva, sinérgica o antagónicamente [312]. Asimismo, existen diferentes vías de exposición tales como inhalación, ingestión o contacto directo; debiendo considerarse también las tasas de absorción, metabolización y excreción, y el momento de la exposición (prenatal por vía placentaria o posnatal por vía de leche materna, etc.) [313]. 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 y de la adenogénesis uterina [8,314]. La mayoría de los estudios realizados con ovinos y que evalúan los efectos de los PE, se han centrado en evaluar el desarrollo

y la funcionalidad del testículo u ovario [311,315,316], sin prestar mayor atención a los efectos sobre el útero.

En la oveja, el desarrollo uterino finaliza en el DPN56 [1]. Durante este proceso, la proliferación es un factor clave y, junto con el desarrollo y la diferenciación, están coordinadas por la expresión de los receptores esteroideos (RE α y RP) [1,13]. Los factores de crecimiento de la familia del IGF poseen un importante rol, actuando de manera autocrina, paracrina y endocrina en el crecimiento de tejidos y órganos. Regulan la proliferación, diferenciación y apoptosis celular mediante la unión de IGF-1 e IGF-2 a su receptor (IGF-1R). La regulación de la actividad de los IGF está mediada por las proteínas de unión a las IGF (IGFBP-1 a -6), las que pueden inhibir o potenciar el efecto de los mismos [317].

El desarrollo de las glándulas uterinas involucra, entre otros procesos antes mencionados, el proceso de ramificación glandular o *branching morphogenesis*. En muchos órganos, este proceso está regulado por miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF β). En la superfamilia del TGF β se encuentran las activinas e inhibinas, que regulan el crecimiento y la diferenciación del útero y de otros órganos epitelio-mesenquimales ramificados de manera autocrina, paracrina y, probablemente, endocrina [318]. Las activinas ejercen su función al unirse a los receptores tipo IA o -B y tipo IIA o -B [319], y la regulación de los efectos de las activinas está mediada por las inhibinas, o por la unión de alta afinidad de la folistatina a las activinas [320]. Además, la adenogénesis también está regulada por diversos factores de transcripción, como los receptores esteroideos. No obstante, aunque el desarrollo está mediado por los receptores esteroideos, los mecanismos efectores son ligando-independientes [1]. Se han reportado cambios en la expresión de estas moléculas luego de la exposición a PE en etapas tempranas del desarrollo, evidenciando alteraciones en el normal desarrollo uterino con efectos adversos, a largo plazo, sobre la salud reproductiva [139,140,271,321].

Con base en los antecedentes comentados, nuestra hipótesis propone que *la exposición neonatal a un HBG altera el desarrollo uterino, afectando la diferenciación y la funcionalidad uterina, disminuyendo la aptitud reproductiva de la oveja.*

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- I. Estudiar los efectos de la exposición neonatal a un HBG en corderas empleando dos vías de administración diferentes: oral vs. subcutánea.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- **Cuantificar los niveles circulantes de glifosato y sus metabolitos** en tres grupos de corderas: controles tratadas con vehículo, expuestas al HBG por vía oral y expuestas al HBG por vía subcutánea.
- Determinar en los tres grupos experimentales las **características histomorfológicas del útero**: altura del EL, densidad glandular y espesor del ES y del miometrio.
- Evaluar la **proliferación celular** en los distintos compartimientos tisulares del útero, empleando la técnica inmunohistoquímica para identificar la expresión del marcador Ki67 en cada uno de los compartimentos.
- Determinar y cuantificar, mediante RT-PCR en tiempo real (qRT-PCR), la expresión del ARNm de los **receptores esteroideos**: de estrógenos alfa ($RE\alpha$) y beta ($RE\beta$), y de progesterona (RP); y de **genes relacionados con el desarrollo morfogenético del útero**: del sistema folistatina-activina y de la familia *insulin-like growth factors* (IGF1 e IGF2) y del receptor IGF-1R.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales y tratamiento

Todos los procedimientos fueron revisados y autorizados por el Comité Académico de Ética y Seguridad en la Investigación de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral. Los experimentos fueron realizados en una granja cercana a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Lomas de Zamora (Pcia. de Buenos Aires, Argentina) que posee un convenio de cooperación con la FBCB - UNL.

Los animales experimentales utilizados fueron 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 raza frisona durante la temporada reproductiva. Durante los períodos de gestación y de lactancia los animales no recibieron suplementación alimenticia. Para los experimentos se seleccionaron las corderas nacidas durante los meses de agosto y septiembre de 2015 provenientes de partos únicos. No se utilizaron mellizos para evitar la eventual influencia sobre los fetos que podría producir un ambiente hormonal uterino distinto producto de una gestación múltiple [322]. Si bien no se determinó la concentración de fitoestrógenos ni de otros contaminantes (ej.: glifosato) en la pastura, se asume que todos los animales estuvieron expuestos a los mismos niveles dado que la alimentación fue idéntica entre los animales controles y los tratados. Se determinaron los niveles de glifosato y AMPA en el agua de bebida. Tanto las madres como las crías permanecieron bajo condiciones naturales a campo durante todo el experimento. Todos los animales experimentales fueron pesados el día del nacimiento (DPN1) y el DPN45. Al momento de nacer las corderas fueron identificadas con caravanas numeradas de colores, que mantuvieron durante todo el tiempo que duraron los experimentos.

Luego del nacimiento, corderas hembra fueron asignadas aleatoriamente a uno de los siguientes grupos experimentales:

- i) Control: Solución fisiológica (vehículo) administrada por vía subcutánea (Csc; n = 6);
- ii) Control: Solución fisiológica administrada por vía oral (Co; n = 6);
- iii) Tratado: Formulación de un HBG (dosis de 2 mg/kg/día) en solución fisiológica administrada por vía subcutánea (HBGsc; n = 5);
- iv) Tratado: Formulación de un HBG (dosis de 2 mg/kg/día) en solución fisiológica administrada por vía oral (HBGo; n = 5).

La HBG empleada fue Roundup Full® (Argos SRL, Santa Fe, Argentina), una formulación de glifosato soluble en agua que contiene 54 % p/v. La dosis de 2 mg/kg/día se encuentra dentro del orden de magnitud de la dosis crónica de referencia (RfD) recientemente reasignada por la Agencia de

Protección Ambiental de los EE.UU. (EPA; <http://www.epa.gov>) de 1 mg/kg-pc/día [323]. Además, la dosis seleccionada está en el orden de magnitud de las concentraciones encontradas en granos de soja y son valores ambientales detectados en suelos y cursos de agua de Argentina [95,147,158]. El tratamiento con el vehículo o el HBG fue posnatal, desde el DPN1 al DPN14, y se realizó mediante inyecciones subcutáneas en la nuca del animal o por vía oral usando una pistola autosificadora (Líder Matic 5 cc, Villa Nueva SA, Córdoba, Argentina). La elección de la vía oral se realizó considerando que es una de las principales fuentes de exposición al HBG. La elección de la vía subcutánea se realizó con base en los antecedentes de trabajos de nuestro laboratorio donde demostramos los efectos adversos de la exposición neonatal a otros PE sobre el desarrollo uterino en roedores [75,190–192], y del ovario en ovinos [259,324]. Empleando esta vía de administración, podemos asegurarnos los niveles de exposición administrados, especialmente en los roedores tratados durante los primeros días posnatales.

2. Obtención de suero

Se obtuvo muestras de sangre periférica por punción yugular de las corderas de DPN15 (al finalizar el tratamiento) y DPN45 (al momento del sacrificio). La sangre fue recolectada en tubos de vidrio y mantenida refrigerada a 5°C hasta su llegada al laboratorio (menos de 1 hora) donde se procesaron. Luego se colocaron en estufa a 37°C durante 30 minutos para la retracción del coágulo. Por último, se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos y se separó el suero, el cual se preservó a -80°C hasta su uso.

3. Obtención de muestras uterinas.

Todo el material utilizado durante la cirugía fue previamente esterilizado. Cada animal fue sacrificado mediante sobredosis de pentobarbital sódico (Euthanyle®, Brouwer SA, Buenos Aires, Argentina) y 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 yodopovidona colocando luego un campo quirúrgico.

Luego se practicó una incisión con bisturí de aproximadamente 8 cm en la línea media de la piel de la zona abdominal, inmediatamente por delante de las glándulas mamarias. Por divulsión del tejido subcutáneo se separó la piel del tejido muscular subyacente. Para ingresar a la cavidad abdominal se debe 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 localizado el útero, se lo expuso evitando cualquier tipo de presión innecesaria. Se seccionó respetando las ligaduras, extrayéndose así el cervix, cada uno de los cuernos uterinos y los ovarios.

Por último, el cuerpo y los cuernos uterinos y los ovarios se disecaron bajo lupa para separarlos entre sí y de posibles restos de tejidos adyacentes (cérvix, meso-ovario, oviducto, tejido adiposo) y se pesaron en balanza analítica. Los valores obtenidos (expresados en g) se ajustaron al peso corporal de cada cordera (expresados en kg).

Porciones de la región media de un cuerno uterino (de aproximadamente 1 cm) se fijaron en formol buffer (formol 4% en PBS pH=7.5) durante 24 h para conservar las estructuras histológicas y citológicas del tejido. Además, porciones de la región media del otro cuerno uterino, se congelaron en N₂ líquido y luego fueron almacenadas a -80 °C hasta su uso.

Las porciones fijadas con formol buffer fueron procesadas hasta su inclusión en parafina como se detalla en la tabla 2. Las muestras congeladas se destinaron para ensayos de biología molecular (ver sección 7). Las muestras obtenidas de cada animal fueron asignadas aleatoriamente para procesamiento histológico o biología molecular.

4. Determinación de los niveles de glifosato

4.1. En muestras de agua

Las concentraciones de glifosato y su metabolito AMPA en el agua de bebida fueron determinadas mediante cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas (UHPLC-MS/MS). Las determinaciones se llevaron a cabo en el Programa de Investigación y Análisis de Residuos y Contaminantes químicos (PRINARC, Facultad de Ingeniería Química, UNL). Los límites de cuantificación (LOQ) fueron de 0,6 y 0,2 µg/L de glifosato y AMPA, respectivamente, como fue descrito por Demonte y col. [325].

4.2. En suero de corderas

Se midieron las concentraciones de glifosato y AMPA en el suero de corderas de DPN15 (al día siguiente de finalizar la exposición) y en el DPN45 (día del sacrificio) empleando un UHPLC-MS/MS (PRINAR, FIQ, UNL). Se procesaron 500 µL de suero de corderas (blanco, blanco con adición de reactivos patrón, o muestras de suero de grupos experimentales), y se realizaron los ensayos de validación como fue descrito por Milesi y col. [196]. Brevemente, se agrega acetonitrilo al suero de las corderas para precipitar las proteínas, se homogeniza, se pasan por ultrasonido y se centrifuga. Se toma el sobrenadante y se repite el proceso. Luego, se agrega al sobrenadante buffer borato (pH = 9) y se incuba 2 h con el reactivo derivatizante cloruro de 9-fluorenilmetiloxicarbonil (FMOC-Cl). Finalizada la reacción de derivatización, se agrega diclorometano, se homogeniza, centrifuga y se toma el sobrenadante, el cual se analiza por cromatografía. Para evaluar la selectividad del método, se evaluaron los extractos a partir

del blanco y de muestras con agregado de patrón. Los límites de detección (LOD) y LOQ fueron determinados a partir de la inyección de diferentes extractos obtenidos a partir de muestras de suero blanco ($n = 6$), y midiendo la magnitud del fondo de la respuesta. El LOD se determinó experimentalmente como 3 veces la relación señal-ruido, mientras que el LOQ es la menor concentración que puede medirse con un coeficiente de variación y un error relativo menor al 20%. El LOD y el LOQ para glifosato y AMPA fue de 1 y 2 $\mu\text{g/L}$, respectivamente.

5. Características histomorfológicas del útero

Para realizar la caracterización histomorfológica del útero, cortes seriados de 5 μm de espesor realizados de manera transversal al eje mayor del útero fueron teñidos con picrosirius-hematoxilina, con el fin de evaluar los siguientes parámetros: altura del epitelio luminal, densidad glandular y espesor del estroma subepitelial y del miometrio.

Se tomaron 3 secciones uterinas (separadas 50 μm entre sí) por animal y se aplicó un protocolo similar al descrito en la tabla 4 del capítulo 1. Brevemente, se desparafinaron en xilol, se hidrataron en soluciones de alcoholes de graduación decreciente, y se colorearon con una solución de picrosirius (Sirius red en una solución saturada de ácido pícrico) durante 1 h y con hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich) durante 6 minutos. Posteriormente, se deshidrataron y montaron con un líquido de montaje permanente Eukitt (Sigma-Aldrich). Finalmente, imágenes de las secciones de tejido coloreadas fueron capturadas con la cámara de video color Spot Insight V3.5 acoplada al microscopio Olympus BH2 con objetivas Olympus Dplan 20X (apertura numérica = 0,40) y 40X (apertura numérica = 0,65).

La determinación de la altura del epitelio luminal, y el espesor del estroma subepitelial y del miometrio se realizó mediante el análisis de las imágenes digitalizadas (al menos 6 imágenes por muestra fueron capturadas al azar) utilizando el software FIJI [326], previa calibración espacial del sistema. La calibración se realizó empleando imágenes de la grilla de la cámara de Neubauer.

Por otro lado, para determinar la densidad glandular, las secciones de tejido coloreadas se examinaron por microscopía óptica utilizando el microscopio Olympus BH2 con objetivas Dplan 40X (apertura numérica = 0,65; Olympus), aplicando una metodología similar a la descrita para evaluar proliferación celular en el miometrio uterino (Capítulo 1). El valor obtenido fue estimado considerando la relación V_v de las glándulas presentes en el estroma intercaruncular, aplicando la ecuación 3 del capítulo 1.

Donde V_v es la proporción estimada del objeto, P_i es el número de puntos incidentes sobre las glándulas, y P es el número de puntos totales sobre el estroma, incluyendo las glándulas. Para una mejor

estimación, el miometrio, el epitelio luminal y el lumen fueron excluidos. Para obtener los valores numéricos, se empleó un ocular que posee una grilla cuadrada de 0,8 mm x 0,8 mm [260,265].

6. Evaluación de la proliferación celular en el útero

Se evaluó la proliferación celular mediante la inmunodetección de Ki67. El protocolo estándar de IHQ utilizado se describe en la tabla 4 del capítulo 1, y la dilución del anticuerpo es la descrita en la tabla 12. Las muestras fueron contracoloradas con hematoxilina de Mayer (Biopur, Rosario, Argentina), deshidratadas y montadas con líquido de montaje Eukitt (Sigma-Aldrich).

La expresión de Ki67 fue cuantitativamente analizada en las secciones de tejido, utilizando un microscopio Olympus BH2 con objetivos Dplan 100X (apertura numérica = 1,25; Olympus). Las tasas de proliferación en los epitelios luminal y glandular se determinaron como el porcentaje de células Ki67-positivas empleando la Ecuación 5 donde C_T es el número total de núcleos (2000 células/sección) del compartimento y C_{NP} es el número de células con núcleo Ki67-positivas.

$$\% \text{ marcación positiva} = \frac{C_{NP}}{C_T} \times 100 \text{ (Ecuación 5)}$$

En el estroma subepitelial y el miometrio, los índices de proliferación se obtuvieron considerando la V_v de las células Ki67-positivas, aplicando la Ecuación 3, descrita previamente en la sección 6 del capítulo 1; donde V_v es la proporción estimada de células positivas del compartimento en estudio, P_i es el número de puntos de la grilla incidentes sobre las células Ki67-positivas, y P es el número de puntos incidentes sobre el total de las células del compartimento estudiado. Tanto las células endoteliales como las células inflamatorias infiltrantes (ej., neutrófilos, macrófagos y eosinófilos), fueron excluidas en todos los análisis. La proliferación celular fue realizada en al menos 10 campos visuales por sección, y en dos secciones por cordera (con no menos de 50 μm de separación entre secciones).

7. Evaluación de la expresión génica mediante qRT-PCR

7.1. Extracción de ARN total y transcripción reversa

La extracción de ARN total se realizó utilizando el reactivo comercial “TRIzol Reagent” (Invitrogen), como se mencionó previamente. La concentración de ARN total en las muestras procesadas se determinó mediante la lectura en espectrofotómetro (NanoDrop Lite) a una longitud de onda de 260 nm. Se usó como referencia de la pureza del ARN extraído, la relación entre las absorbancias obtenidas a 260 nm (punto de máxima absorción de ácidos nucleicos) y 280 nm (punto de máxima absorción de proteínas). Solamente se utilizaron aquellas muestras con una relación de absorbancia 260/280 mayor a

1,9. Los ARN obtenidos fueron conservados a -80 °C hasta el momento de la realización de las reacciones de RT.

A partir de los ARN extraídos se realizaron transcripciones reversas con el fin de obtener los correspondientes ADNc, empleando el protocolo ya descrito. Como control negativo de la reacción se utilizó el ARN incubado en condiciones idénticas, pero sin transcriptasa reversa.

7.2. PCR en tiempo real

Luego de la extracción del ARN total y posterior RT, empleando los protocolos descritos en el capítulo 1, se determinó la expresión del ARNm de receptores de estrógenos α y β (ER α y ER β , respectivamente), receptor de progesterona (PR), *insulin-like growth factors* 1 y 2 (IGF-1 y IGF-2), e *insulin-like growth factor receptor* (IGF-1R), y las moléculas folistatina (FST) y el receptor tipo 2 de activina A (ACVR2A) mediante ensayos optimizados de PCR en tiempo real.

Para amplificar los genes, se diseñaron oligonucleótidos específicos utilizando el software Vector NTI Suite Versión 6.0. Los receptores esteroideos (ER α , ER β y PR), los factores de crecimiento (IGF-1, IGF-2 e IGF-1R) y las moléculas FST y ACVR2A se estudiaron por su rol en el desarrollo y la diferenciación uterina [318,327,328]. Como control interno (gen de referencia) se utilizó la determinación de ARNm del gen de la proteína β -Actina (Tabla 8). La temperatura de hibridación para cada amplicón se obtuvo a partir del análisis *in silico* utilizando el software Vector NTI (Tabla 8). La especificidad de los oligonucleótidos fue cotejada por comparación directa de su secuencia contra el genoma completo de *Ovis aries* mediante el uso de la herramienta BLAST disponible en la página web del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Todas las muestras retro-transcriptas a ADNc fueron amplificadas por duplicado. Los niveles de ADNc fueron detectados utilizando el termociclador StepOne (Applied Biosystems Inc.). Para la amplificación, 5 μ l de ADNc se combinaron con 4 μ L de HOT-FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne) y 0,5 μ L (10 pmoles) de cada oligonucleótido en un volumen final de 20 μ l. El protocolo general de ciclado utilizado se muestra en la Tabla 6. La pureza de los productos obtenidos fue confirmada mediante curvas de disociación y electroforesis en geles de agarosa (ver sección 7.4 del capítulo 1) de muestras elegidas al azar en cada corrida. Controles sin ADNc fueron incluidos en todos los ensayos.

Tabla 8: Primers y tamaño de los productos de PCR empleados para el análisis de la expresión génica mediante qRT-PCR.

Gen	Primer sequence	Propiedades	N° acceso de GenBank
ACTB	Forward: AGGTCATCACCATCGGCA Reverse: AGGTCCTTTCGCGGATGTGC	142 bp Ta 57 °C	NM_001009784.1
ESR1	Forward: ACCCTTTCAGTGAGGCTT Reverse: CCAGATCCACAAATCCTG	108 bp Ta 54 °C	AY033393.1
ESR2	Forward: AGAGTCCTTGGTGTGAAACC Reverse: AACTCGGACTAGAAACAGGG	114 bp Ta 54 °C	NM_001009737.1
RP	Forward: GCATCAGGCTGTCATTATGGTGT Reverse: GCAATCGTTTCTTCCAGCACA	108 bp Ta 54 °C	Z66555.1
IGF-1	Forward: GCTGAGTTGGTGGATGCT Reverse: TCCACGATTCCTGTCTGG	113 bp Ta 57 °C	NM_001009774.3
IGF-2	Forward: ACCCTCCAGTTTGTCTGT Reverse: CAACACTCTTCCACGATG	95 bp Ta 54 °C	NM_001009311.1
IGF-1R	Forward: GCCGCTGTGTGAGAAGACG Reverse: CATGGGTCTCCGTACACGC	119 bp Ta 59 °C	XM_012098367.2
FST	Forward: TGCCGAATGAACAAGAAG Reverse: ATTCGTTGCGGTAGGTTT	112 bp Ta 54 °C	KF833357.1
ACVR2A	Forward: AGTAACACCTAAGCCTCCC Reverse: ACAGGAGGGTAAGCCATC	126 bp Ta 51 °C	NM_001009293.1

ACTB, β -actina; ESR1, receptor de estrógenos α ; ESR2, receptor de estrógenos β ; RP, receptor de progesterona; IGF-1, insulin-like growth factor 1; IGF-2, insulin-like growth factor 2; IGF-1R, insulin-like growth factor receptor; FST: folistatina; ACVR2A: receptor de activina A tipo 2A.

Ta: Temperatura de *annealing*

El cálculo de los niveles de expresión relativa de cada muestra se realizó utilizando el método del ciclo umbral (Ct) [268] El valor de Ct para cada muestra se calculó utilizando el software StepOne Versión 2.3 con un umbral de ajuste de fluorescencia automática (Rn), y se procedió como se menciona en la sección 7 (capítulo 1).

8. Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media \pm SEM (error estándar medio). Los datos se analizaron con las pruebas de Shapiro-Wilk y de Levene para analizar la distribución normal y la homogeneidad de varianzas, respectivamente. Como las variables no se encontraron normalmente distribuidas, se realizó un análisis de Kruskal-Wallis con una prueba post-hoc de Dunn. Los análisis se realizaron usando el software R (<http://www.r-project.org/>). En todos los casos se consideró un $P < 0,05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

No se observaron diferencias en los distintos parámetros evaluados entre los animales controles expuestos al vehículo (solución fisiológica) por vía oral o por vía subcutánea, por lo que los resultados de ambos grupos se presentan como un único grupo control.

Niveles de glifosato y AMPA

Determinamos los niveles de glifosato y AMPA en el agua de bebida para evaluar posibles contaminaciones que podrían interferir con nuestro experimento. No se detectaron niveles de glifosato ni de AMPA en el agua de bebida.

Evaluamos los niveles de glifosato y AMPA en suero ovino obtenido al finalizar la exposición (DPN15) y al momento de la eutanasia (DPN45). No se detectaron niveles circulantes de glifosato o AMPA en muestras de suero obtenidas en los DPN15 o DPN45 en las ovejas de los grupos control. Respecto a los animales tratados con el HBG por vía oral o subcutánea presentaron niveles séricos de glifosato que fueron significativamente mayores que los controles, no se observaron diferencias entre las dos vías de exposición en el DPN15 (Tabla 9). Los niveles de glifosato en el DPN45 estuvieron por debajo del LOD en ambos grupos expuestos al HBG y en los controles. 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 LOD, tanto en el DPN15 como el DPN45 (Tabla 9).

Tabla 9: Niveles séricos de glifosato y AMPA en los grupos experimentales

Variable	Control (n: 12)	HBGsc (n: 5)	HBGo (n: 5)
<i>Glifosato en suero en DPN15 (µg/L)</i>	N/D	123.9 ± 101.1†	255.3 ± 182.2†
<i>AMPA en suero en DPN15 (µg/L)</i>	N/D	N/D	N/D
<i>Glifosato en suero en DPN45 (µg/L)</i>	N/D	N/D	N/D
<i>AMPA en suero en DPN45 (µg/L)</i>	N/D	N/D	N/D

Valores expresados como la media ± SEM. † p<0,05 vs. control. HBGsc: exposición subcutánea; HBGo: exposición oral; DPN: día posnatal. N/D: no detectable

La exposición neonatal no modifica el peso uterino ni el peso corporal del animal

Considerando que la exposición posnatal temprana al HBG, principalmente la vía oral, puede causar alteraciones en la conducta alimenticia o alteraciones metabólicas, evaluamos el peso de los

animales al nacer y en el momento del sacrificio. Además, considerando el potencial rol del HBG como PE, determinamos el peso uterino y la relación peso uterino-peso corporal. La exposición al HBG por vía oral o subcutánea no modificó el peso de las corderas ni el peso del útero en el DPN45 (Tabla 10).

Tabla 10: Variables del animal y anatómicas de los grupos experimentales

Variable	Control (n: 12)	HBGsc (n: 5)	HBGo (n: 5)
<i>Peso al nacer (kg)</i>	4,4 ± 0,2	4,5 ± 0,2	4,3 ± 0,5
<i>Peso en DPN45 (kg)</i>	13,4 ± 1,3	13,9 ± 3,3	11,8 ± 2,1
<i>Peso del útero en DPN45 (g)</i>	2,3 ± 0,1	2,5 ± 0,2	2,6 ± 0,2
<i>Peso relativo del útero en DPN45</i>	0,18 ± 0,02	0,19 ± 0,01	0,22 ± 0,01

Valores expresados como la media ± SEM. HBGsc: exposición subcutánea; HBGo: exposición oral; DPN: día posnatal.

La exposición al HBG no modificó la histomorfología uterina en corderas prepuberales.

Con el fin de evaluar si la exposición por vía oral o subcutánea al HBG modifica la histomorfología uterina en el DPN45, evaluamos la altura del epitelio luminal, la densidad glandular y el espesor del estroma subepitelial y del miometrio. La exposición al HBG, tanto por vía oral como subcutánea, no produjo alteraciones histomorfológicas en ninguno de los parámetros analizados (Tabla 11).

Tabla 11: Efecto de la exposición al HBG por vía oral o vía subcutánea sobre la histomorfología uterina.

	Control (n: 12)	HBGsc (n: 5)	HBGo (n: 5)
Altura del epitelio luminal (µm)	15,46 ± 1,14	13,46 ± 0,53	14,35 ± 0,80
Densidad glandular (Vv×100)	29,84 ± 1,02	30,06 ± 1,47	30,49 ± 2,38
Espesor del estroma subepitelial (µm)	578,8 ± 55,5	576,7 ± 60,3	634,5 ± 51,8
Espesor del miometrio (µm)	500,8 ± 59,8	451,0 ± 46,4	482,6 ± 53,2

Los valores se expresaron como la media ± SEM. HBG: herbicida a base de glifosato (2 mg de glifosato/ Kg / día). HBGsc: exposición subcutánea; HBGo: exposición oral.

La exposición al HBG disminuyó la proliferación celular

La proliferación celular es un evento clave del desarrollo y la diferenciación del útero en los primeros días posnatales de la cordera. La exposición posnatal al HBG produjo una disminución de la tasa de proliferación celular en el epitelio (luminal y glandular), el estroma subepitelial y el miometrio (Figura 14). En los animales expuestos al HBG, la reducción de la proliferación en los epitelios luminal y glandular fue de un 55%. Por otro lado, la proliferación en el estroma subepitelial disminuyó un 40%, mientras que en las células miométricas se redujo un 65%. Es importante destacar que este efecto fue semejante en ambas vías de exposición, permitiendo sugerir que la alteración de la proliferación celular es independiente de la vía de administración del HBG.

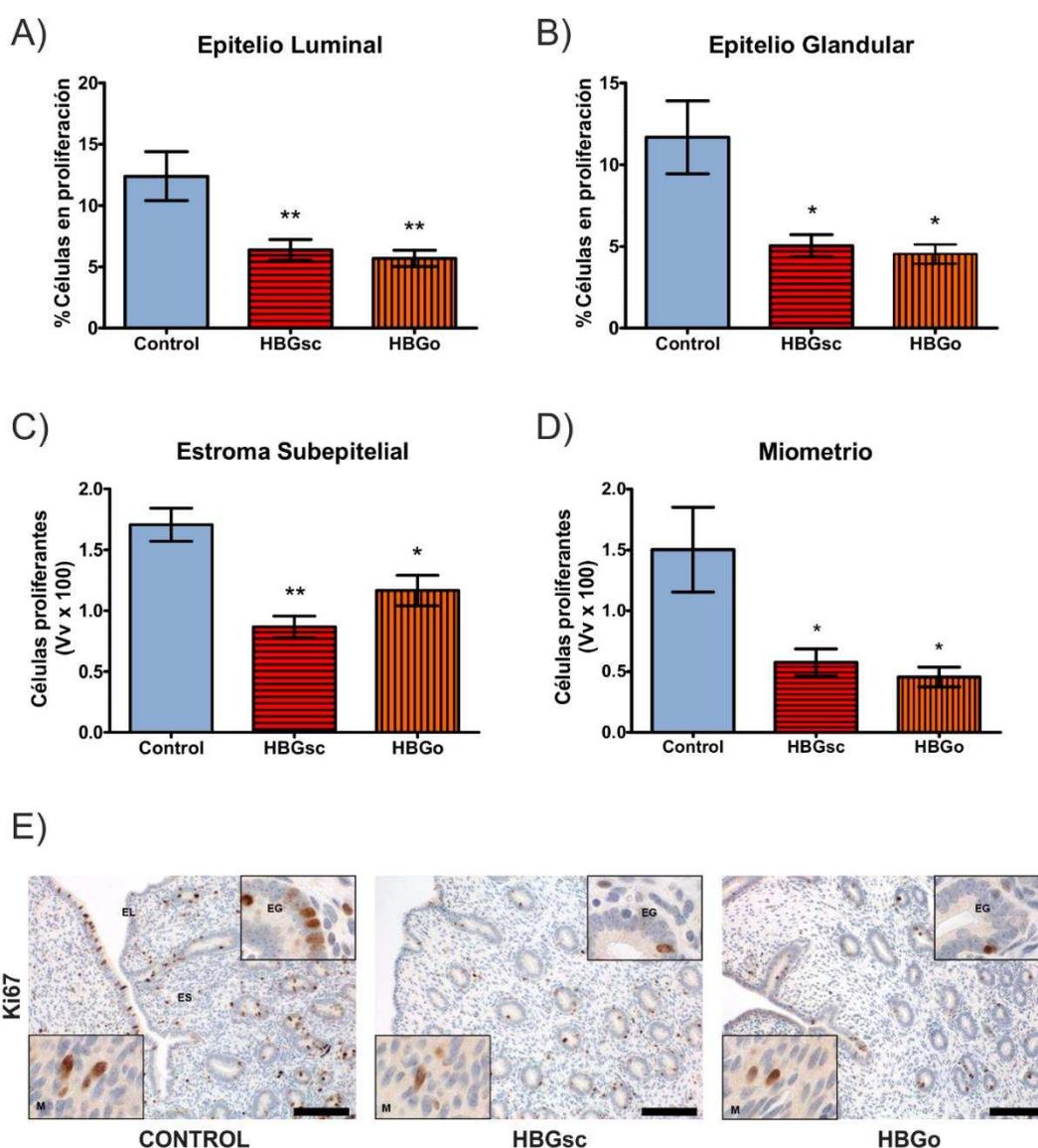


Figura 14: Efecto de la exposición neonatal al HBG sobre la proliferación celular en el útero de corderas prepúberes. Tasas de proliferación celular en los epitelios luminal (A) y glandular (B), en el estroma subepitelial (C) y el miometrio (D). E) Fotomicrografías representativas de la proliferación celular en el útero de corderas control y expuestas al HBG por vía subcutánea

(HBGsc) o por vía oral (HBGo). Las columnas representan la media \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. control, ** $p < 0,01$ vs. control. Los *inset* muestran la proliferación en el epitelio glandular (EG) y en el miometrio (M). Escala de barra: 100 μ m.

El tratamiento con HBG no modificó la expresión de genes involucrados en el desarrollo uterino

La proliferación celular es modulada por diferentes vías. Una de las vías de señalización que regula la proliferación celular es la familia de los IGF, dentro de los cuales podemos mencionar a los IGF-1, -2, a su receptor (IGF-1R) y a las moléculas de unión a los IGF (IGFBPs). Considerando la alteración en la proliferación celular detectada en los animales expuestos al HBG, evaluamos la expresión de moléculas de la familia IGF. Asimismo, como ya se mencionó, los receptores esteroideos ($ER\alpha$, $ER\beta$ y PR) están relacionados con el desarrollo uterino; por lo tanto, investigamos los efectos del tratamiento sobre los niveles de expresión a nivel mRNA. Además, teniendo en cuenta que el sistema folistatina-activina también regula el desarrollo glandular uterino en las ovejas, determinamos la expresión de folistatina y del receptor de activina A tipo 2A. El estudio de dichos genes se realizó mediante qRT-PCR.

La expresión de los receptores esteroideos, de las moléculas de la vía del IGF, de la folistatina y del receptor de activina no fue alterada por la exposición al HBG. Este efecto fue semejante para ambas vías de administración (Figura 15).

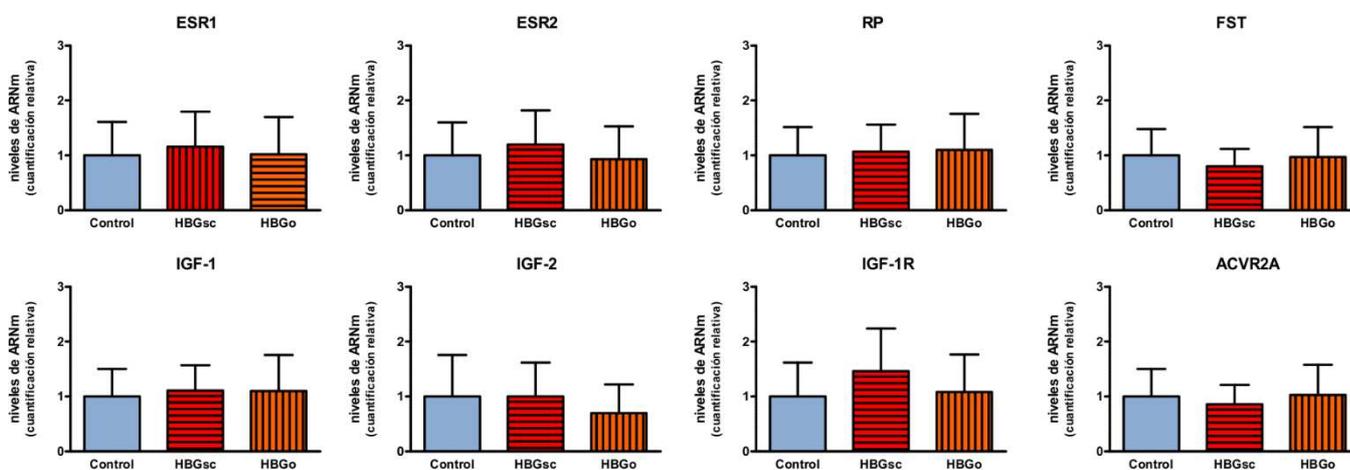


Figura 15: Evaluación de la expresión de genes involucrados en el desarrollo uterino en corderas expuestas al HBG por vía oral o subcutánea. Expresión relativa del ARNm de los receptores esteroideos (ESR1, ESR2 y PR), de los factores de crecimiento IGF-1, IGF-2 y su receptor IGF-1R, y de folistatina (FST) y el receptor de activina A tipo 2A (ACVR2A) evaluada mediante qRT-PCR. El gen β -actina se usó como *housekeeping*. Las muestras fueron normalizadas frente a la expresión de β -actina y a los valores del grupo control, al que se le asignó el valor de referencia de 1. Cada columna representa la media \pm SEM.

DISCUSIÓN

En el presente estudio, se investigaron los efectos de la exposición neonatal a un HBG empleando dos vías de administración diferentes: oral *vs.* subcutánea. Además, se determinaron los niveles de glifosato y AMPA en muestras de suero, al finalizar el tratamiento (DPN15) y en el DPN45. También se evaluaron los niveles de glifosato y AMPA en el agua de bebida de las corderas.

Las corderas de los grupos control no tuvieron niveles detectables de glifosato o AMPA ni en el DPN15 ni en DPN45, indicando que no existe contaminación ambiental ni en el agua de bebida de los animales con el herbicida. Los niveles séricos de glifosato en las corderas de DPN15 expuestas al HBG tanto por vía oral como por la vía subcutánea fueron similares. La biodisponibilidad de la exposición oral a glifosato en diferentes especies es entre un 15% a un 36% [329–331], mientras que la biodisponibilidad oral de glifosato en ratas es del 23% siendo en rumiantes la biodisponibilidad del 30% [330]. Los diferentes valores podrían atribuirse a las características de los sistemas digestivos, que podrían influir en diferencias en la absorción y la velocidad de distribución entre las especies; ya que los rumiantes tienen el estómago compartimentado, mientras que los roedores son monogástricos. Con base en estos antecedentes, en nuestro trabajo, esperábamos tener una menor concentración sérica de glifosato en los animales expuestos oralmente que en los expuestos por vía subcutánea; sin embargo, no fue este el caso y esto indicaría que no se pueden hacer extrapolaciones cuando hay diferencias en el diseño experimental o en la edad de los animales. Von Soosten y col. [332] evaluaron los niveles de glifosato y AMPA en leche, orina, materia fecal y contenido duodenal en vacas lecheras luego de la alimentación con forraje conteniendo glifosato y AMPA. En los experimentos realizados, los autores describen que los animales consumieron entre 0,08 y 6,67 mg/día de glifosato. La principal vía de eliminación del glifosato fue la materia fecal (61%), en orina se elimina un 8%, mientras que no se detectó glifosato en leche [332]. La retención de glifosato promedió el 31% y observaron que hay una conversión en el rumen del glifosato a AMPA [332]. En nuestro trabajo, a diferencia de von Soosten y col. [332], no evaluamos el contenido de glifosato en orina, materia fecal o en duodeno. Por otro lado, en nuestro caso no hubiera sido posible medir el contenido de glifosato ruminal, ya que en corderas de DPN15 aún no se encuentra completamente desarrollado [333]. La presencia de AMPA en el suero de ratas expuestas oralmente a glifosato, sugiere la conversión de glifosato en AMPA por acción microbiana intestinal [329]. La ausencia de AMPA en nuestras corderas expuestas por vía oral al HBG, podría deberse a un metabolismo limitado a los microorganismos intestinales ya que, como mencionamos previamente, el rumen exhibe un desarrollo funcional limitado corderas de DPN15 [333]. La metabolización ruminal del glifosato en AMPA ocurrió en vacas adultas con desarrollo pleno de los pre-estómagos [332]. En el DPN45 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 explicaría la corta vida media del glifosato y su baja bioacumulación debido a su naturaleza hidrofílica [329,331,334]. Es importante mencionar que luego de 30 días de finalizada la exposición al HBG, es poco probable que existan niveles circulantes de glifosato o AMPA, ya que vacas y cerdos expuestos a una mezcla glifosato-AMPA (relación 9:1) por vía oral a dosis desde 40 a 400 mg/kg no presentaron niveles de agroquímicos luego de 28 días de finalizada la exposición [331]. 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 [157,335]; incluso son mayores a los descritos en orina de mujeres de zonas urbanas y rurales de Indiana, EE. UU. [165]. Kongtip y col. [166], reportaron elevados niveles 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.

La exposición neonatal a hormonas esteroideas o compuestos con actividad endócrina pueden alterar el normal desarrollo del útero [190,192,336,337]. La exposición de corderas dos veces por semana, desde el DPN28 al DPN49 a una baja dosis de DES, alteró la histología uterina y se observaron diferentes anomalías, incluyendo edema y alteraciones en la proliferación celular [338]. En un modelo de ratas expuestas neonatalmente a una baja dosis de un HBG, se indujo un aumento en la incidencia de hiperplasia luminal uterina, en asociación con una mayor proliferación celular en el EL y el estroma en el DPN8 (al finalizar el tratamiento) [190]. En nuestro experimento no observamos diferencias en ninguno de los parámetros histomorfológicos evaluados, lo cual sugiere que estos efectos pueden ser especie-dependientes y/o presentarse en diferentes períodos del desarrollo del animal. Por otro lado, en nuestro experimento, la exposición al HBG redujo la proliferación celular con relación a las corderas del grupo control. Por lo tanto, la menor proliferación celular observada en las corderas expuestas al HBG podría ser otro ejemplo de diferencia entre especies y/o períodos seleccionados para realizar el estudio.

Se evaluó la expresión de genes relacionados con la proliferación celular, para investigar los posibles mecanismos que podrían estar involucrados en la disminución de la proliferación celular uterina en respuesta a la exposición con HBG. No encontramos cambios en la expresión de ninguno de los genes evaluados entre los diferentes grupos experimentales. Teniendo en cuenta que la expresión génica es considerablemente variable a lo largo del tiempo, no podemos descartar la posibilidad de que cambios en la expresión génica ocurran en períodos diferentes a los seleccionados para el estudio: el DPN45.

Para concluir, en el presente capítulo demostramos que la exposición neonatal de corderas a un HBG produce una disminución de la proliferación celular en útero, y que este efecto es independiente de

las dos vías de exposición utilizadas: oral vs. subcutánea. Dado que en nuestro experimento decidimos evaluar el efecto de un HBG, tratando de simular las condiciones “ambientales” no podemos atribuir los efectos observados al glifosato, a los co-formulantes, o a la mezcla de ambos. Además, las formulaciones comerciales de los HBG (siempre que se sepa su formulación) difieren entre marcas y países; por lo que no podemos hacer extensivos los efectos aquí reportados a otras formulaciones.

CAPITULO III

***EFECTOS DE LA EXPOSICIÓN NEONATAL DE CORDERAS A UN HBG
SOBRE EL DESARROLLO UTERINO***

INTRODUCCIÓN

Como se mencionó anteriormente, el empleo de los HBG se incrementa cada año [94] y, bajo las prácticas actuales se podría considerar al glifosato y a sus formulaciones comerciales como pseudo-persistentes [95]. Actualmente, los residuos de glifosato y de AMPA son ubicuos, y se han descrito en diferentes matrices: aguas superficiales, sedimentos, polvo respirable y suelo [147–149,152,308]. Incluso se detectó glifosato en alimentos como carne, granos, frutas y vegetales [158,309], siendo la vía oral una de las potenciales fuentes de exposición. Estos hallazgos han despertado el interés por estudiar los potenciales efectos de estos compuestos sobre la salud. La potencial actividad de los HBG como PE se demostró tanto *in vitro* como *in vivo* [170,174–176,184,339]. En publicaciones de nuestro laboratorio, describimos los efectos adversos de los HBG sobre el desarrollo uterino y mamario, y sobre la fertilidad de la hembra [182,190,191,196].

Para nuestro País, los ovinos representan un gran porcentaje de la industria ganadera [310]; sin embargo, no hay estudios que evalúen los efectos de la exposición a agroquímicos sobre la reducción en las tasas de fertilidad ni el impacto sobre la productividad económica [311]. Las condiciones a las cuales los animales de interés zootécnico están expuestos dificulta la realización de estos ensayos a campo [312]. Asimismo, se deben considerarse las múltiples vías de exposición posibles; como también las tasas de absorción, metabolización y excreción, y el momento de la exposición [313]. Además, volvemos a destacar 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 y de la adenogénesis uterina [8,314].

Como ya fue comentado, el desarrollo uterino en la oveja finaliza en el DPN56 [1]. Durante este proceso, la proliferación junto con el desarrollo y la diferenciación, están coordinadas por la expresión de los receptores esteroideos (RE α y RP), y también por otras moléculas como factores de transcripción (Hoxa10 y Foxa2), y los genes Wnt, entre otros [1,13,39,41]. Los factores de crecimiento de la familia del IGF poseen un importante rol en el crecimiento de tejidos y órganos regulando la proliferación, diferenciación y apoptosis celular. La regulación de la actividad de los IGF está mediada por las proteínas de unión a las IGF (IGFBP-1 a -6), las que pueden inhibir o potenciar el efecto de los mismos [317]. En el útero, las IGFBP-3 e IGFBP-4 son las que participan en el desarrollo y la diferenciación del útero ovino durante el periodo posnatal [328]. Una proteína importante en la regulación de la proliferación celular es p27, perteneciente a la familia de inhibidores de ciclinas dependientes de cinasas CIP/KIP [340], que participa en el ciclo celular y controla la proliferación, diferenciación y muerte celular [341].

La adenogénesis uterina, como mencionamos anteriormente, está también regulada por los receptores esteroideos. En el útero de la oveja prepuberal, la inmunomarcación del RE α se expresa débilmente en el EL y el ES, mientras que la expresión es elevada en el EG [13]. Por otro lado, en el mismo periodo del desarrollo, la activación ligando-independiente del RE α induce la expresión del RP, y la inmunomarcación del RP es elevada en los EL y EG, y baja en el ES [13,18]. Los receptores de prolactina (PRLR) en el útero ovino posee dos isoformas, larga y corta, las cuales se expresan en el EG [342]. Los Wnt ejercen su actividad a través de diferentes vías de señalización, una de las vías se denomina canónica o vía Wnt/ β -catenina [343], donde la β -catenina posee un rol importante en la transducción de señales. Los factores de transcripción Hoxa10 y Foxa2 se expresan en el útero de animales en desarrollo y adultos. Las células del estroma expresan Hoxa10, mientras que Foxa2 se expresa en el EG. Se han reportado cambios en la expresión de estas moléculas luego de la exposición a PE en etapas tempranas del desarrollo, evidenciando alteraciones en el normal desarrollo uterino y, a largo plazo, un impacto negativo en la salud reproductiva [139,140,271,321].

Con base en los antecedentes comentados, nuestra hipótesis propone que *la exposición neonatal a un HBG altera la proliferación celular uterina, afectando la expresión de moléculas que regulan la diferenciación y la funcionalidad uterina, disminuyendo la aptitud reproductiva de la oveja.*

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- I. Investigar los efectos de la exposición neonatal a una dosis baja de un HBG sobre el desarrollo uterino en corderas prepuberales. Específicamente, se profundizarán los estudios orientados a describir los mecanismos de acción del HBG en el útero.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar las **características histomorfológicas**: altura del epitelio luminal, espesor del estroma subepitelial y del miometrio, y la densidad glandular en el endometrio de la cordera.
- Evaluar las tasas de **proliferación** en los distintos compartimientos tisulares del útero, empleando la inmunodetección de Ki67.
- Determinar, mediante RT-PCR, la expresión de **genes relacionados con el desarrollo morfogénico del útero**: el gen del receptor de prolactina y genes de la familia *insulin-like growth factor* (IGF1 e IGF2), su receptor IGF-1R y la proteína de unión IGFBP-3.
- Evaluar mediante inmunohistoquímica la expresión de **receptores esteroideos**: receptores de estrógenos alfa (RE α) y de progesterona (RP); de **genes relacionados con el desarrollo morfogénico del útero**: genes de la familia de Hox (Hoxa10) y Wnt (Wnt7a y Wnt5a); y de otros **factores que participan en el proceso de adenogénesis** como β -catenina y Foxa2.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales y tratamiento

Todos los procedimientos fueron revisados y autorizados por el Comité Académico de Ética y Seguridad en la Investigación de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral. Los experimentos fueron realizados en una granja cercana a la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Lomas de Zamora (Pcia. de Buenos Aires, Argentina) que posee un convenio de cooperación con la FBCB - UNL.

Los animales experimentales utilizados fueron hembras de la raza ovina frisona (de 2 a 4 años) alimentadas en pastura natural con baja proporción de trébol. Dichas hembras recibieron servicio natural con machos de la misma raza durante la temporada reproductiva. Durante los períodos de gestación y de lactancia los animales no recibieron suplementación alimenticia. Para los experimentos se seleccionaron las corderas nacidas durante los meses de agosto y septiembre de 2016 provenientes de partos únicos. No se utilizaron mellizos para evitar la eventual influencia, sobre los fetos, que podría producir un ambiente hormonal uterino distinto producto de una gestación múltiple [322]. Si bien no se determinó la concentración de fitoestrógenos ni de otros contaminantes (ej.: glifosato) en la pastura, se asume que todos los animales estuvieron expuestos a los mismos niveles de fitoestrógenos, dado que la alimentación fue idéntica entre los animales controles y los tratados. Se determinaron los niveles de glifosato y AMPA en el agua de bebida. Tanto las madres como las crías permanecieron bajo condiciones naturales durante todo el experimento. Todos los animales experimentales fueron pesados el día del nacimiento (DPN1) 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.

Luego del nacimiento, corderas hembra fueron asignadas aleatoriamente a uno de los siguientes grupos experimentales:

- i) Solución salina (vehículo) administrada por vía subcutánea (Control; n = 10);
- ii) Formulación de un HBG (dosis de 2 mg/kg/día) en solución salina administrada por vía subcutánea (HBG; n = 12).

La formulación de glifosato empleada fue Roundup Full® (Argos SRL, Santa Fe, Argentina), una formulación de glifosato soluble en agua que contiene 54 % p/v. La dosis de 2 mg/kg/día se encuentra dentro del orden de magnitud de la dosis crónica de referencia (RfD). El tratamiento con el vehículo o el HBG fue posnatal, desde el DPN1 al DPN14, y se realizó mediante inyecciones subcutáneas en la nuca del animal. La elección de la vía subcutánea se realizó con base en los trabajos previos de nuestro laboratorio que demuestran efectos de la exposición neonatal a otros PE [75,190–192,195,259,324] y los

presentados en el Capítulo II de esta tesis. Además, la vía de exposición subcutánea nos permite asegurar los niveles de administrados a las corderas experimentales y resulta más simple que la vía oral.

2. Obtención de muestras uterinas.

Todo el material utilizado durante la cirugía fue previamente esterilizado. Cada animal fue anestesiado con ketamina (20 mg/kg, intramuscular) y xylazina (0,1–0,2 mg/kg, intramuscular) y 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 yodopovidona colocando luego un campo quirúrgico.

Luego se practicó una incisión con bisturí de aproximadamente 8 cm en la línea media de la piel de la zona abdominal, inmediatamente por delante de las glándulas mamarias. Por divulsión del tejido subcutáneo se separó la piel del tejido muscular subyacente. Para ingresar a la cavidad abdominal se debe 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 cada cuerno uterino, se los expuso evitando cualquier tipo de presión innecesaria. Se realizaron ligaduras con hilo de sutura a nivel de la unión del útero con el cérvix y a nivel de la unión uterotubárica evitar hemorragias. Se seccionó respetando las ligaduras, extrayéndose así cada uno de los cuernos uterinos. Se introdujo el resto del material expuesto en la cavidad abdominal y se procedió a suturar el peritoneo junto con el tejido muscular, con sutura de puntos simples. Por último, se suturó la piel con puntos discontinuos. La hembra se mantuvo en jaula individual hasta la recuperación de la anestesia, se administraron antibióticos de amplio espectro por vía intramuscular y un producto de uso local repelente de moscas (curabicheras) en la herida para evitar complicaciones por miasis.

Porciones de la región media de cada cuerno uterino (de aproximadamente 1 cm) se fijaron en formol buffer (formol 4% en PBS pH=7.5) durante 24 h para conservar las estructuras histológicas y citológicas del tejido, y luego fueron incluidos en parafina siguiendo el protocolo descrito en la sección 2 del capítulo 1.

Porciones de la región media a continuación de la anterior de cada cuerno uterino (de aproximadamente de 1 cm) fueron destinadas a ensayos de biología molecular (ver sección 7), para ello se congelaron inmediatamente en N₂ líquido, y conservadas a -80 °C hasta su utilización.

3. Generación de un anticuerpo anti-Foxa2

Para investigar la participación del Foxa2 (un factor de transcripción de la familia *forkhead box*) en la morfogénesis del útero ovino, generamos un anticuerpo policlonal anti-Foxa2 monoespecífico, que fue purificado mediante cromatografía de afinidad, adaptando protocolos publicados por nuestro laboratorio [193,263,344]. El antígeno fue expresado en *Escherichia coli* JM109 (Stratagene Corp, La Jolla, CA, EE. UU.) como proteínas quiméricas unidas a la proteína glutatión-S-transferasa empleando el vector pGEX4T-3 (Stratagene Corp.). El antígeno incluyó la región carboxilo-terminal de la secuencia proteica de la rata (N° de acceso NP_036875.1). Dicha región, tiene un 96% de homología respecto a la misma región de la proteína Foxa2 de oveja (N° de acceso XP_027832223.1).

Los anticuerpos fueron purificados mediante cromatografía de afinidad con el antígeno unido covalentemente (Hi-Trap NHS activated HP columna; GE Healthcare, Buenos Aires, Argentina). Para los ensayos de control de la especificidad, el anticuerpo anti-Foxa2 fue pre-adsorbido incubán 1 µg de anticuerpo con 10 a 20 µg del péptido antigénico durante 24 h a 4°C. El anticuerpo y el complejo antígeno-anticuerpo fueron ensayados en Western blot e inmunohistoquímica en hígado de oveja, debido a que este órgano expresa el Foxa2.

3.1. Western blot

Se realizó la extracción de proteínas totales a partir del útero e hígado de corderas controles no tratadas, siguiendo la metodología previamente descrita [345]. La concentración de las proteínas totales se determinó usando un ensayo colorimétrico (BCA Protein Assay Kit; Pierce Chemical Co., Rockford, IL, EE. UU.). Se sembró igual cantidad de masa (70 µg de proteína) de cada muestra, y se resolvió mediante SDS-PAGE (concentración de acrilamida/bis-acrilamida 12%). Luego se transfirió a membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad Argentina, Buenos Aires, Argentina) y se incubó con el anticuerpo (dilución 1:200). La reacción fue visualizada usando diaminobencidina (DAB, Sigma-Aldrich). Los pesos moleculares se determinaron por comparación a marcadores de peso molecular comerciales (Broad Range Protein Markers, Promega, Madison, WI, EE. UU.).

4. Características histomorfológicas del útero

Para realizar la caracterización histomorfológica del útero de las corderas, cortes seriados de 5 µm de espesor realizados de manera transversal al eje mayor del útero fueron teñidos con picrosirius-hematoxilina, con el fin de evaluar los siguientes parámetros: altura del epitelio luminal, densidad glandular y espesor del estroma subepitelial y del miometrio.

Se tomaron 3 secciones uterinas (separadas 50 μm entre sí) por animal y se empleó el protocolo descrito previamente. Finalmente, imágenes de las secciones de tejido coloreadas fueron capturadas con una cámara de video color Spot Insight V3.5 acoplada al microscopio Olympus BH2 con objetivas Olympus Dplan 20X (apertura numérica = 0,40) y 40X (apertura numérica = 0,65).

La determinación de la altura del epitelio luminal, y el espesor del estroma subepitelial y del miometrio se realizó mediante el análisis de las imágenes digitalizadas (10 imágenes por muestra capturadas al azar) utilizando el software FIJI [326], como se ha descrito anteriormente. Por otro lado, para determinar la densidad glandular, las secciones de tejido coloreadas se examinaron por microscopía óptica utilizando un microscopio Olympus BH2 con objetivas Dplan 40X (apertura numérica = 0,65; Olympus). El valor obtenido fue estimado considerando la fracción de volumen (Vv) aplicando la ecuación 3 (sección 6 del capítulo 1).

5. Evaluación de la expresión proteica por inmunohistoquímica

Ensayos de inmunohistoquímica fueron realizados para medir la proliferación celular, y la expresión de moléculas involucradas en el desarrollo endometrial uterino en las ovejas. La proliferación celular se determinó mediante IHQ de Ki67, como marcador de células en proliferación. Para ello utilizamos un anticuerpo generado y validado en nuestro laboratorio [259]. Asimismo, se evaluó la expresión del inhibidor de ciclinas dependientes de cinasas p27^{kip} como molécula reguladora de la proliferación celular [346].

También se evaluó la expresión de los receptores esteroideos (RE α y RP), de factores de transcripción (Hoxa10 y Foxa2), y de proteínas de la vía canónica de los Wnt (Wnt5a, Wnt7a y β -catenina).

Las inmunohistoquímicas fueron realizadas adaptando protocolos previamente descritos [259,261], el protocolo general se encuentra descrito en la Tabla 4 (Capítulo 1). Luego de la inmunodetección de Ki67 y p27 las muestras fueron contracoloradas con hematoxilina de Mayer (Biopur, Rosario, Argentina), deshidratadas y montadas con líquido de montaje Eukitt (Sigma-Aldrich). En todos los casos se realizaron controles negativos de especificidad, sustituyendo el anticuerpo primario por un suero no inmune, y controles positivos, incluyendo una sección de tejido que se sabe expresa la proteína de interés. Los anticuerpos y diluciones empleadas se detallan en la Tabla 12.

Tabla 12: Anticuerpos primarios y secundarios usados para IHQ

Anticuerpos	Dilución	Proveedor
<i>Primarios</i>		
Anti-Ki67	1/100	Generado y validado en nuestro laboratorio (Rivera y col. [259])
Anti-p27 (sc-528)	1/100	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, EE. UU.)
Anti-ER α (clone 6F-11)	1/50	Novocastra (Newcastle upon Tyne, Reino Unido)
Anti-PR (clone A0098)	1/200	Dako Corp. (Carpinteria, CA, EE. UU.)
Anti-Hoxa10 (sc-17159)	1/50	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, EE. UU.)
Anti-Foxa2	1/1000	Generado y validado en el marco de la tesis doctoral
Anti-Wnt5a	1/50	Generado y validado en nuestro laboratorio (Vigazzi y col. [263])
Anti-Wnt7a	1/50	Generado y validado en nuestro laboratorio (Vigazzi y col. [263])
Anti- β -catenina (sc-7963)	1/50	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, EE. UU.)
<i>Secundarios</i>		
Anti-mouse (B8774)	1/100	Sigma (St. Louis, MO)
Anti-rabbit (B8895)	1/100	Sigma (St. Louis, MO)
Anti-goat (sc-2042)	1/200	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, EEUU)

P27, inhibidor de ciclinas dependientes de cinasas 1; RE α , receptor de estrógenos α ; RP, receptor de progesterona; Hoxa10, homeobox protein A10; Foxa2, forkhead box protein A2; Wnt5a, wntless-type MMTV integration site family, miembro 5A; Wnt7a, wntless-type MMTV integration site family, miembro 7A.

5.1. Evaluación de la expresión de moléculas involucradas en la proliferación celular

La expresión de Ki67 y p27 fue cuantitativamente analizada en las secciones de tejido, utilizando un microscopio Olympus BH2 con objetivas Dplan 100X (apertura numérica = 1,25; Olympus). Las tasas de proliferación en los epitelios luminal y glandular se determinaron como el porcentaje de células Ki67-positivas Ecuación 5 (ver sección 6 del experimento 1). En el estroma subepitelial y el miometrio, los índices de proliferación se obtuvieron considerando V_v de las células Ki67-positivas, aplicando la Ecuación 3 (Capítulo 1); donde V_v es la proporción estimada de células positivas del compartimento en estudio, P_i es el número de puntos de la grilla incidentes sobre las células Ki67-positivas, y P es el número de puntos incidentes sobre el total de las células del compartimento estudiado. Tanto las células endoteliales como las células inflamatorias infiltrantes (ej., neutrófilos, macrófagos y eosinófilos), fueron excluidas en todos los análisis. Se procedió de manera similar para evaluar la expresión de p27, en los epitelios se calculó el porcentaje de células p27-positivas aplicando la ecuación 5; en el estroma y el

miometrio se aplicó la ecuación 3 y se expresó como V_v . La determinación de la expresión de ambas moléculas fue realizada en al menos 10 campos visuales por sección, y en dos secciones por cordera (con no menos de 50 μm de separación entre secciones).

5.2. Cuantificación de la expresión de proteínas involucradas en el desarrollo uterino

La expresión de las proteínas de los receptores esteroideos, factores de transcripción y de moléculas de la vía Wnt/ β -catenina, fue evaluada en los diferentes compartimentos uterinos: epitelios luminal y glandular, y estroma. Las cuantificaciones se realizaron mediante análisis de imágenes, utilizando el programa FIJI [326]. Para ello se obtuvieron imágenes del endometrio uterino con una cámara de video color Spot Insight V3.5 acoplada al microscopio Olympus BH2 con una objetiva de Dplan 40X (apertura numérica: 0,65). Como ya se mencionó, las imágenes fueron convertidas a escala de grises, y se determinaron: el área total de la sección seleccionada, el área de marcación positiva y el promedio de la intensidad de marcación. A partir de estos parámetros, se calculó la Densidad Óptica Integrada (DOI) aplicando la Ecuación 4 (capítulo 1).

6. Inmunofluorescencia doble

Para evaluar la colocalización de las proteínas Ki67 y p27 en el útero de las corderas control y expuestas al HBG, se realizó una inmunofluorescencia doble. Las secciones uterinas fueron deparafinizadas, rehidratadas, y sujetas a recuperación antigénica en microondas. La autofluorescencia propia del tejido se bloqueó con borohidruro de sodio por 40 minutos y, para minimizar la interacción de las uniones inespecíficas, los cortes se incubaron con suero normal por 1 h. La incubación con el anticuerpo primario (Tabla 12) se realizó a 4°C durante toda la noche. Luego se incubó con el anticuerpo secundario durante 1 h, seguido de tres lavados con PBS de 15 min cada uno. Se utilizaron los siguientes anticuerpos secundarios: anti-conejo de burro conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor 568 (A-10042, naranja-rojo, dilución 1:1000; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.), y anti-conejo de cabra conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor 488 (A-11034, verde, dilución 1:100; Invitrogen Molecular Probes, Eugene, OR, EE. UU.). Finalmente, todas las secciones se montaron con líquido de montaje para fluorescencia Prolong Gold (Invitrogen), con 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidrocloruro (DAPI; Fluka, Sigma) y se almacenaron en oscuridad a temperatura ambiente. Los controles negativos se realizaron con secciones uterinas incubadas con la solución buffer del anticuerpo primario (3% BSA, 0,1% Tween 20 en PBS) como control de marcación inespecífica. Todas las secciones inmunomarcadas se examinaron con un microscopio (Olympus BX-51) equipado con filtros (Olympus) apropiados para la detección de epifluorescencia. Las imágenes fueron tomadas con una cámara digital de alta resolución (QImaging Go-3; QImaging, Surrey, British Columbia, Canadá) acoplada al microscopio.

7. Evaluación de la expresión génica mediante qRT-PCR

7.1. Extracción de ARN total y transcripción reversa

La extracción de ARN total se realizó utilizando el reactivo comercial “TRIzol Reagent” (Invitrogen), como se mencionó previamente. La concentración de ARN total en las muestras procesadas se determinó mediante la lectura en espectrofotómetro (NanoDrop Lite) a una longitud de onda de 260 nm. Se usó como referencia de la pureza del ARN extraído, la relación entre las absorbancias obtenidas a 260 nm (punto de máxima absorción de ácidos nucleicos) y 280 nm (punto de máxima absorción de proteínas). Solamente se utilizaron aquellas muestras con una relación de absorbancia 260/280 mayor a 1,9. Los ARN obtenidos fueron conservados a -80 °C hasta el momento de la realización de las reacciones de RT.

A partir de los ARN extraídos se realizaron transcripciones reversas con el fin de obtener los correspondientes ADNc, empleando el protocolo ya descrito (ver sección 7 del capítulo 1). Como control negativo de la reacción se utilizó el ARN incubado en condiciones idénticas, pero sin transcriptasa reversa.

7.2. PCR en tiempo real

Mediante qRT-PCR se determinó la expresión del receptor de prolactina *short* (PRLR-s) y genes de la familia IGF: *insulin-like growth factors* 1 y 2 (IGF-1 y IGF-2), *insulin-like growth factor receptor* (IGF-1R) e *insulin-like growth factor binding protein 3* (IGFBP-3), mediante ensayos optimizados de PCR en tiempo real como se describió previamente.

Para amplificar los genes, se diseñaron oligonucleótidos específicos utilizando el software Vector NTI Suite Versión 6.0 (Infomax Inc., North Bethesda, MD, EE. UU.). El receptor de prolactina y los genes de la familia IGF se estudiaron por su rol en el desarrollo y la diferenciación uterina [13,328], y como moduladores de la proliferación celular [317,347]. Como control interno (gen de referencia) se utilizó la determinación de ARNm del gen de la proteína β -Actina (Tabla 13). La temperatura de hibridación para cada amplicón se obtuvo a partir del análisis *in silico* utilizando el software Vector NTI (Tabla 13). La especificidad de los oligonucleótidos fue cotejada por comparación directa de su secuencia contra el genoma completo de *Ovis aries* mediante el uso de la herramienta BLAST disponible en la página web del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Todas las muestras retro-transcriptas a ADNc fueron amplificadas por duplicado. Los niveles de ADNc fueron detectados utilizando el termociclador StepOne. Para la amplificación, 5 μ l de ADNc se combinaron con 4 μ L de HOT-FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne) y 0,5 μ L (10 pmoles) de cada oligonucleótido en un volumen final de 20 μ l. El protocolo general de ciclado utilizado se muestra

en la Tabla 6. La pureza de los productos obtenidos fue confirmada mediante curvas de disociación y electroforesis en geles de agarosa (ver sección 7.4 del capítulo 1) de muestras elegidas al azar en cada corrida. Controles sin ADNc fueron incluidos en todos los ensayos.

El cálculo de los niveles de expresión relativa de cada muestra se realizó utilizando el método del ciclo umbral (Ct) [268]. El valor de Ct para cada muestra se calculó utilizando el software StepOne Versión 2.3 con un umbral de ajuste de fluorescencia automática (Rn), y se procedió como se menciona en la sección 7 (capítulo 1).

Tabla 13: Primers y tamaño de los productos de PCR empleados para el análisis de la expresión génica mediante qRT-PCR.

Gen	Primer sequence	Propiedades	N° acceso de GenBank
ACTB	Forward: AGGTCATCACCATCGGCA Reverse: AGGTCTTTGCGGATGTCTG	142 bp Ta 57 °C	NM_001009784.1
PRLR-s	Forward: CAGTGGCTTTGAAGGGCT Reverse: AGGCGAGAAGGCTGTGAT	112 bp Ta 54 °C	AF041977.1
PRLR-l	Forward: CAGTGGCTTTGAAGGGCT Reverse: AGGCGAGAAGGCTGTGAT	112 bp Ta 53 °C	AF041257.1
IGF-1	Forward: GCTGAGTTGGTGGATGCT Reverse: TCCACGATTCCTGTCTGG	113 bp Ta 57 °C	NM_001009774.3
IGF-2	Forward: ACCCTCCAGTTTGTCTGT Reverse: CAACACTCTTCCACGATG	95 bp Ta 54 °C	NM_001009311.1
IGF-1R	Forward: GCCGCTGTGTGAGAAGACG Reverse: CATGGGTCTCCGTACACGC	119 bp Ta 59 °C	XM_012098367.2
IGFBP-3	Forward: ACTTCTCCTCCGAGTCCAAGC Reverse: CTTGAGGTCGTTCAAGTGTGTCC	80 bp Ta 54 °C	NM_001159276

ACTB, β -actin; PRLR-s: receptor de prolactina isoforma *short*; PRLR-l: receptor de prolactina isoforma *long*; IGF-1, insulin-like growth factor 1; IGF-2, insulin-like growth factor 2; IGF-1R, insulin-like growth factor receptor; IGFBP-3, *insulin-like growth factor binding protein 3*.

Ta: Temperatura de *annealing*

8. Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media \pm SEM (error estándar medio). Los datos se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. Los análisis se realizaron usando el software R (<http://www.r-project.org/>). En todos los casos se consideró un $P < 0,05$ como estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Caracterización y validación del anticuerpo anti-Foxa2

Se realizó la caracterización y validación del antisuero por western blot e IHQ. Una banda específica de 48 kDa se observó tanto en homogenatos de útero e hígado de ovinos incubados con el anticuerpo anti-Foxa2 (Figura 16A). Por IHQ también se identificó la inmunoreactividad del anticuerpo anti-Foxa2 en cortes histológicos de útero e hígado de corderas. Se observó una intensa inmunomarcación nuclear y una débil marcación citoplasmática en el hígado y en el EG del útero de ovejas control, sin observarse inmunomarcación en el EL, ES o el miometrio (Figura 16B). Cuando los anticuerpos fueron preadsorbidos con el péptido usado como inmunógeno, no se detectó marcación específica, demostrando la especificidad del anticuerpo tanto por western blot como por IHQ.

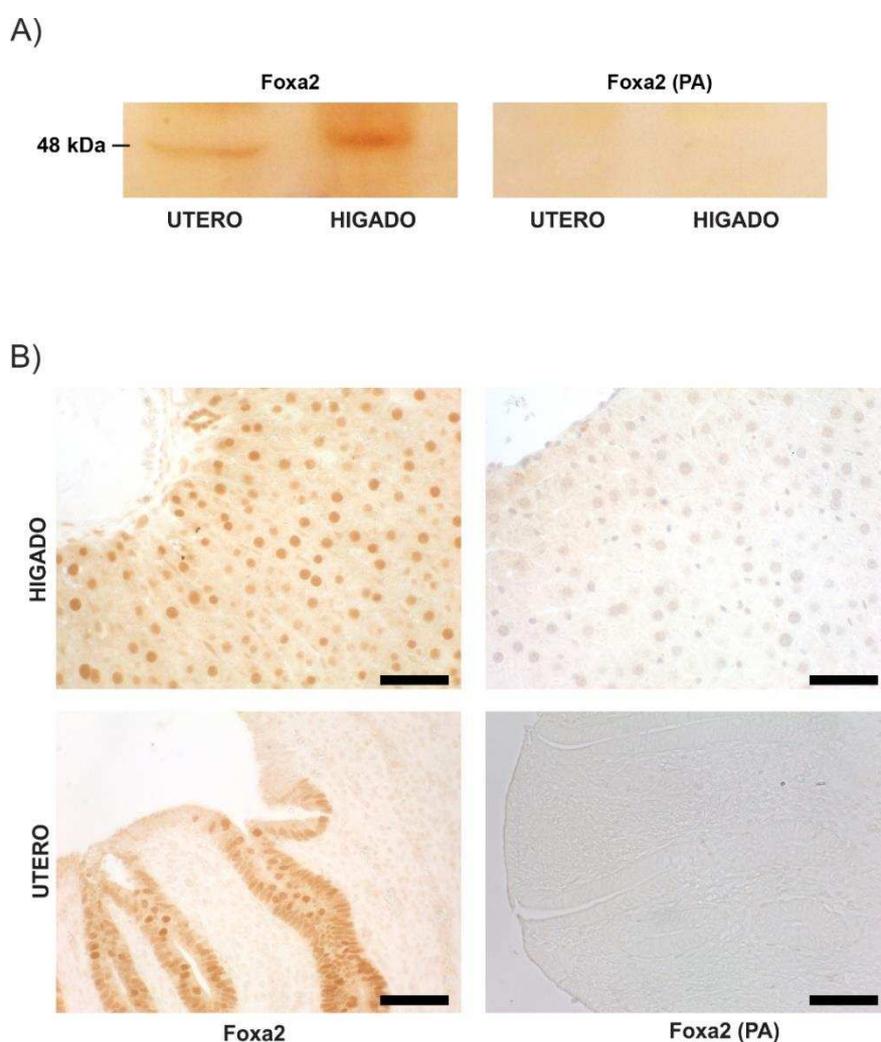


Figura 16: A) Western blot donde se observa una banda específica de 48 kDa, representativa de Foxa2, en el hígado y el útero de corderas. No se observa inmunomarcación cuando el anticuerpo fue preadsorbido B) Fotomicrografías representativas de la inmunomarcación de Foxa2 en el hígado y útero de corderas. Una intensa marcación nuclear y una débil marcación citoplasmática se observa en los hepatocitos y en el EG. No se observa inmunomarcación cuando se empleó el anticuerpo preadsorbido con el péptido específico. Escala de barra: 50 μ m.

La exposición al HBG disminuye la proliferación celular en el útero de corderas prepuberales

Estudiamos parámetros histomorfológicos para evaluar si el tratamiento con el HBG produce alteraciones en el desarrollo uterino, determinamos la histomorfolología uterina en el DPN45, evaluando la altura del epitelio luminal, el espesor del estroma subepitelial y del miometrio y la densidad glandular. Como se puede observar en la tabla 14, la exposición al HBG no produce alteraciones histomorfológicas en ninguno de los parámetros analizados. Esto último coincide con lo demostrado en el experimento anterior.

Tabla 14: Efecto de la exposición al HBG por vía subcutánea sobre la histomorfolología uterina.

	Control (n: 10)	HBGsc (n: 12)
Altura del epitelio luminal (µm)	14,87 ± 0,79	13,82 ± 0,47
Densidad glandular (Vv×100)	29,19 ± 1,44	29,65 ± 1,18
Espesor del estroma subepitelial (µm)	541,14 ± 54,86	524,79 ± 32,60
Espesor del miometrio (µm)	471,89 ± 43,30	443,81 ± 30,72

Los valores se expresaron como la media ± SEM. HBG: herbicida a base de glifosato (2 mg de glifosato/ Kg / día). HBGsc: exposición subcutánea.

Considerando que la proliferación celular es un evento clave que caracteriza el desarrollo y la diferenciación del útero. Investigamos la expresión de Ki67 como marcador de proliferación celular. La exposición posnatal al HBG indujo una disminución de la tasa de proliferación celular en el epitelio (luminal y glandular) y el estroma subepitelial (Figura 17). Cabe destacar el efecto significativo del tratamiento con HBG sobre la proliferación celular, observándose una reducción de aproximadamente del 50% y 60% en los epitelios (luminal y glandular) y en el estroma subepitelial y el miometrio, respectivamente.

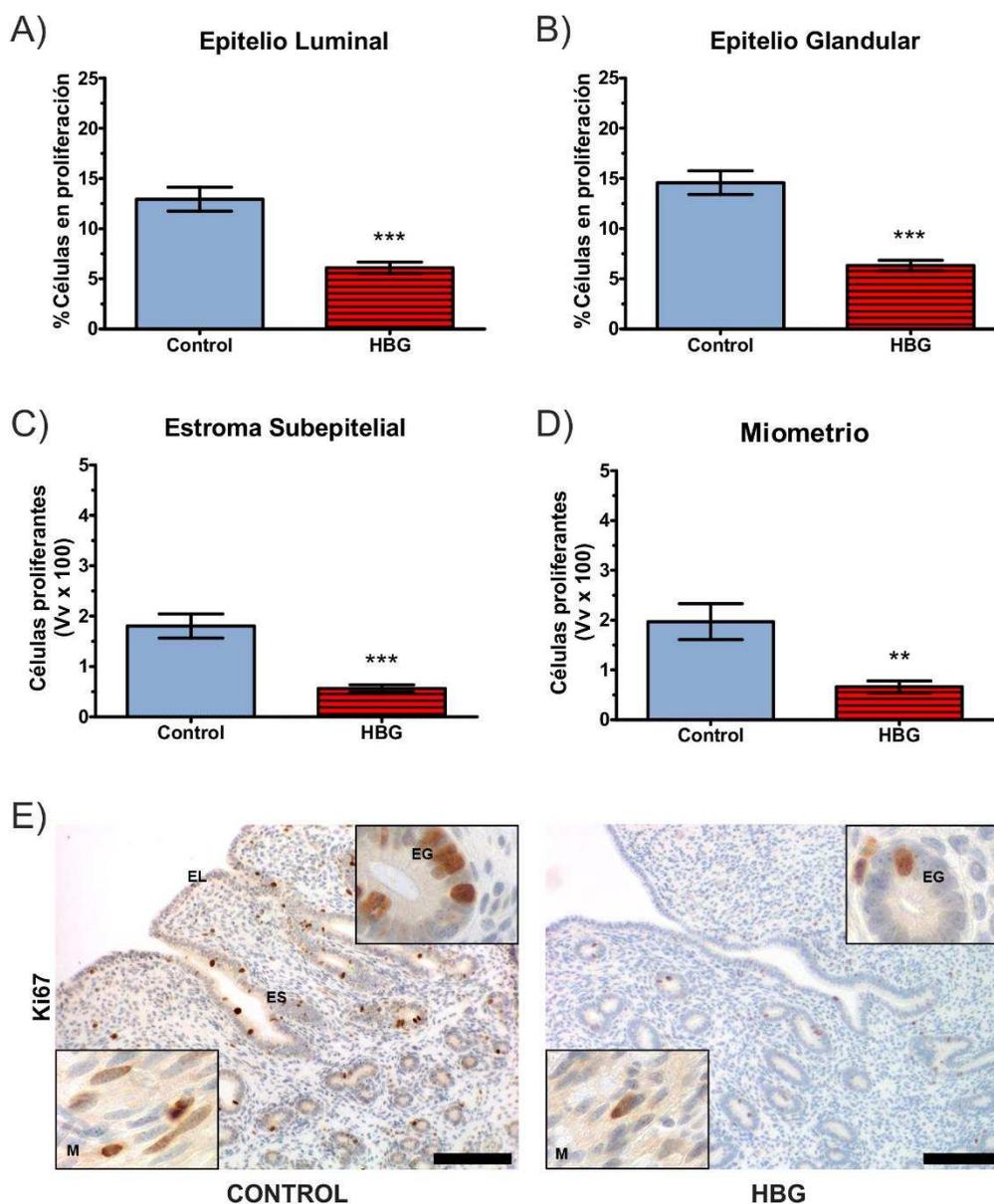


Figura 17: Efecto de la exposición neonatal al HBG sobre la proliferación celular en el útero de corderas prepúberes. La exposición al HBG disminuyó la proliferación celular en los epitelios luminal (A) y glandular (B), en el estroma subepitelial (C) y en el miometrio (D). E) Fotomicrografías representativas de en el útero de corderas control y expuestas al HBG por ambas vías de administración. Las columnas representan la media \pm SEM. **p<0,01 vs. control y ***p<0,001 vs. control. Los *inset* muestran la proliferación celular en el epitelio glandular (EG) y en el miometrio (M). Escala de barra: 100 μ m.

La exposición al HBG induce moléculas que modulan la proliferación celular

Como ya se mencionó, la proliferación celular es modulada por diferentes vías, una de ellas es la del IGF. Las hormonas, como la prolactina, también regulan la proliferación celular del útero mediante la señalización mediada por unión a sus receptores (PRLR isoformas larga o corta). Debido a que la

proliferación celular del útero de los animales expuestos a HBG resultó notablemente afectada, investigamos si el mecanismo de acción del herbicida estaba relacionado con alteraciones en la vía de señalización del sistema IGF o en el PRLR. Para ello medimos la expresión de dichas moléculas a nivel de mRNA mediante qRT-PCR.

Cuando hicimos las PCR para realizar las curvas de calibrado y ver los niveles de expresión del PRLR-1, observamos la presencia de fluctuaciones en la curva de melting y comprobamos la presencia de productos de diferentes tamaños en geles de agarosa. Respecto al receptor de prolactina en su isoforma corta (PRLR-s), se realizaron las curvas de calibrado y la cuantificación respectiva. No se encontraron diferencias en la expresión de ambas isoformas del PRLR entre los grupos experimentales (resultados no presentados).

En cuanto a la vía de señalización IGF, evaluamos los genes IGF-1 y -2, IGF-1R e IGFBP-3. Las corderas expuestas al HBG presentaron una mayor expresión del gen IGFBP-3 y no se observaron cambios en la expresión de los otros genes estudiados. La figura 18 resume los resultados de la expresión relativa de los genes para los grupos experimentales.

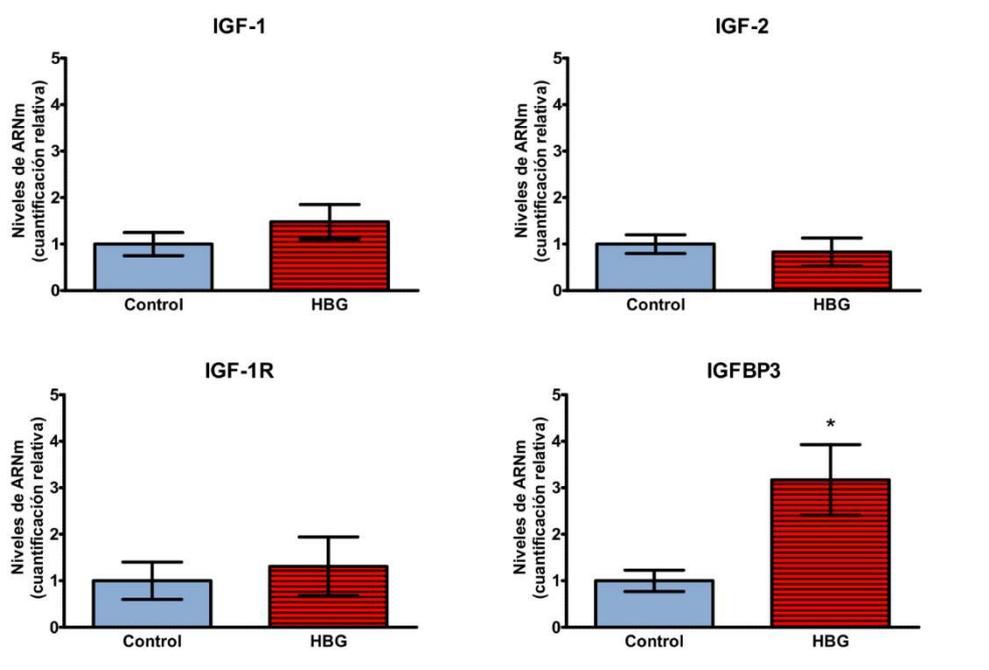


Figura 18: Expresión de genes de la vía de señalización IGF en el útero de corderas expuestas al HBG en DPN45. Expresión relativa del ARNm de IGF-1, IGF-2, IGF-1R e IGFBP-3 evaluada mediante qRT-PCR. La exposición neonatal al HBG aumenta la expresión de IGFBP-3, pero no modifica la expresión de las otras moléculas de la vía de señalización de IGF estudiadas. El gen β -actina se usó como *housekeeping*. Al grupo control se le asignó un valor de referencia de 1. Cada columna representa la media \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. control.

El ciclo de proliferación celular es un proceso complejo que involucra diferentes moléculas y varios puntos de control con el fin de asegurar la correcta duplicación de las células. Una de las moléculas que regulan el ciclo celular es la proteína p27, la cual inhibe la proliferación celular frenando la célula al final de la fase G0 evitando que ingrese en la G1 regulando la actividad de diferentes moléculas. Teniendo en cuenta esto, decidimos investigar la expresión de la p27 en los diferentes compartimentos uterinos de la cordera por IHQ. La exposición neonatal al HBG aumentó la expresión de p27 en los compartimentos estudiados: epitelios luminal y glandular, estroma subepitelial y miometrio (Figura 19).

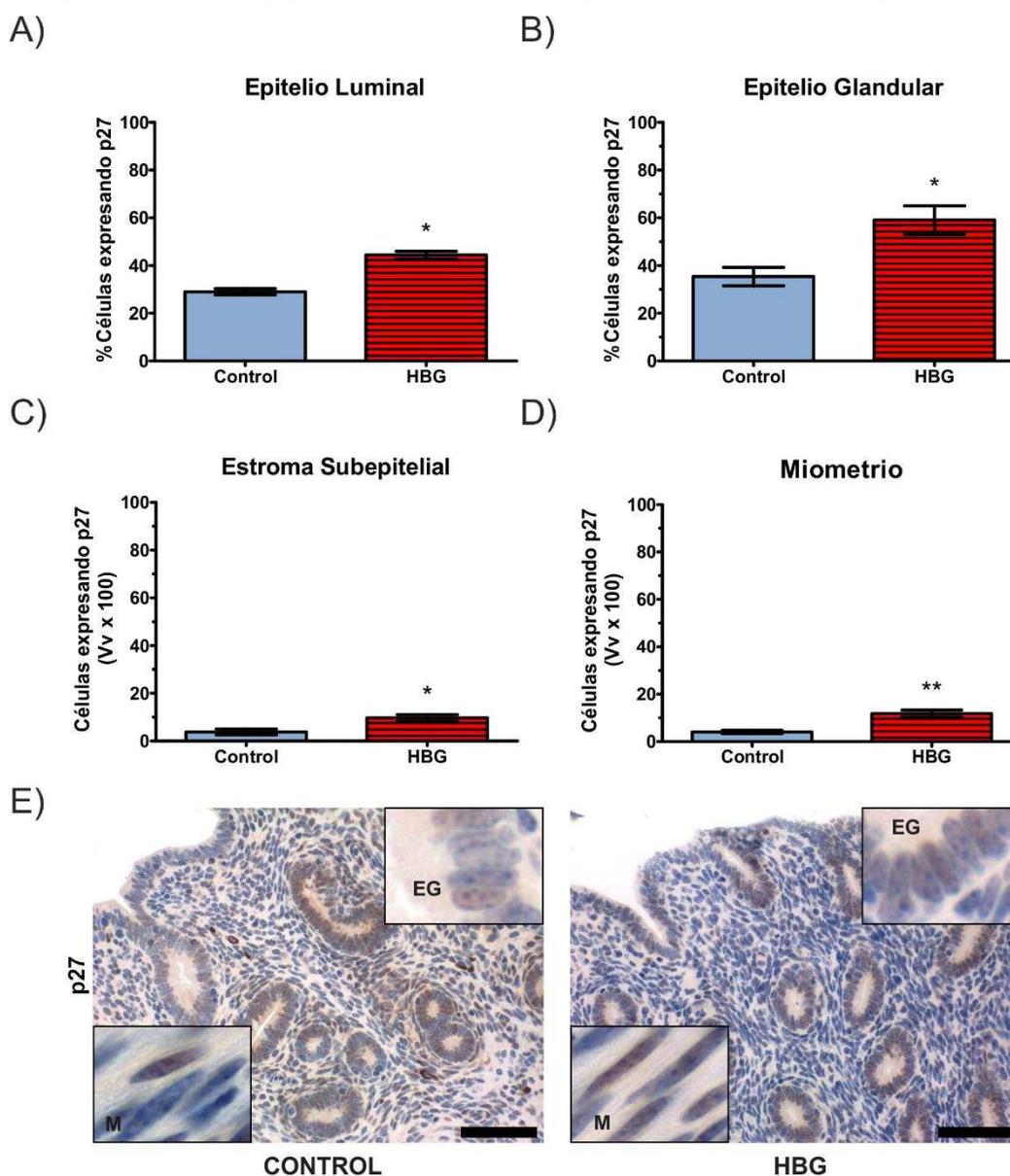


Figura 19: Expresión de p27 en el útero de corderas control y expuestas al HBG en DPN45. Porcentajes de células p27 positivas en los epitelios luminal (A) y glandular (B), en el estroma subepitelial (C) y el miometrio (D). E) Fotomicrografías representativas de la expresión de p27 en el útero de corderas control y expuestas al HBG por ambas vías de administración. Las columnas representan la media \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. control, ** $p < 0,01$ vs. control. Los *inset* muestran la expresión de p27 en el epitelio glandular (EG) y en el miometrio (M). Escala de barra: 50 μ m.

Estudiamos la coexpresión de Ki67 y p27 mediante inmunofluorescencia doble en úteros de corderas con el objetivo de conocer la localización tisular de ambas moléculas. La expresión de ambas Ki67 y p27 es predominantemente nuclear, con una débil marcación de p27 en el citoplasma. Se observó que solo pocas células uterinas colocalizaban ambos marcadores y que no había diferencias en la localización de las corderas del grupo control *versus* las expuestas al HBG (Figura 20).

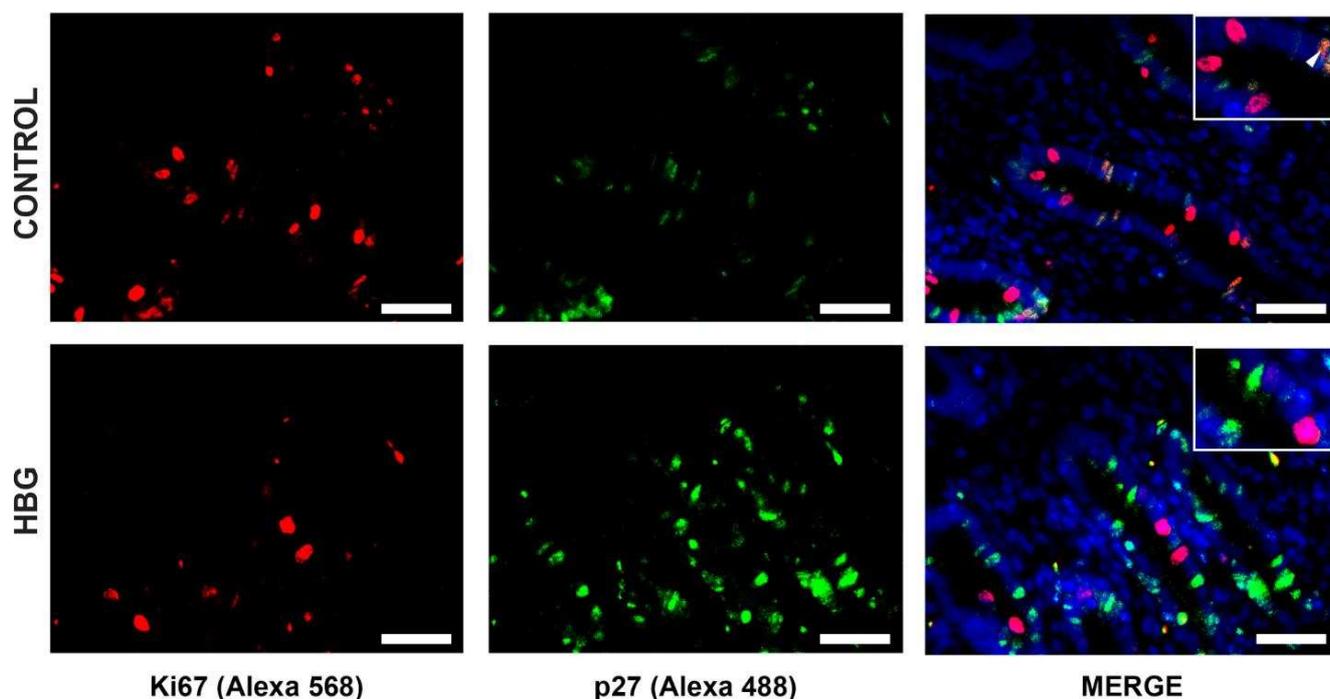


Figura 20: Fotomicrografías representativas de la marcación inmunofluorescente de las proteínas Ki67 y p27 en el útero de animales control y expuestos al HBG. Los *insets* en la figura muestran la inmunodetección de Ki67 (en naranja-rojo) y de p27 (en verde) a mayor magnificación. La punta de flecha blanca muestra la colocalización de Ki67/p27 (en amarillo-naranja). Escala de barra: 100 μ m.

El tratamiento con un HBG altera la expresión de marcadores moleculares del desarrollo uterino

Entre los marcadores moleculares relacionados con el desarrollo uterino podemos mencionar los receptores esteroideos ($RE\alpha$ y RP), la vía canónica de Wnt (Wnt5a, Wnt7a y β -catenina), Hoxa10 y Foxa2.

Observamos que la localización celular de ambos receptores esteroideos en el útero de la oveja es nuclear, sin embargo, la distribución de los mismos en los distintos compartimentos tisulares del útero difiere entre sí en el DPN45. El $RE\alpha$ posee una elevada expresión en el epitelio glandular y moderada en el epitelio luminal y el estroma subepitelial. En relación con el patrón de distribución del RP, la expresión es elevada en el epitelio luminal y glandular, y baja en las células estromales.

En las corderas expuestas al HBG, el patrón de expresión de los receptores esteroideos fue alterada. El tratamiento produjo una disminución en la expresión del $RE\alpha$ en los epitelios luminal y glandular y en

el estroma subepitelial. Asimismo, los animales tratados tuvieron una menor expresión del RE α en el epitelio luminal y un aumento de su expresión en el epitelio glandular y en el estroma subepitelial respecto al grupo control (Figura 21).

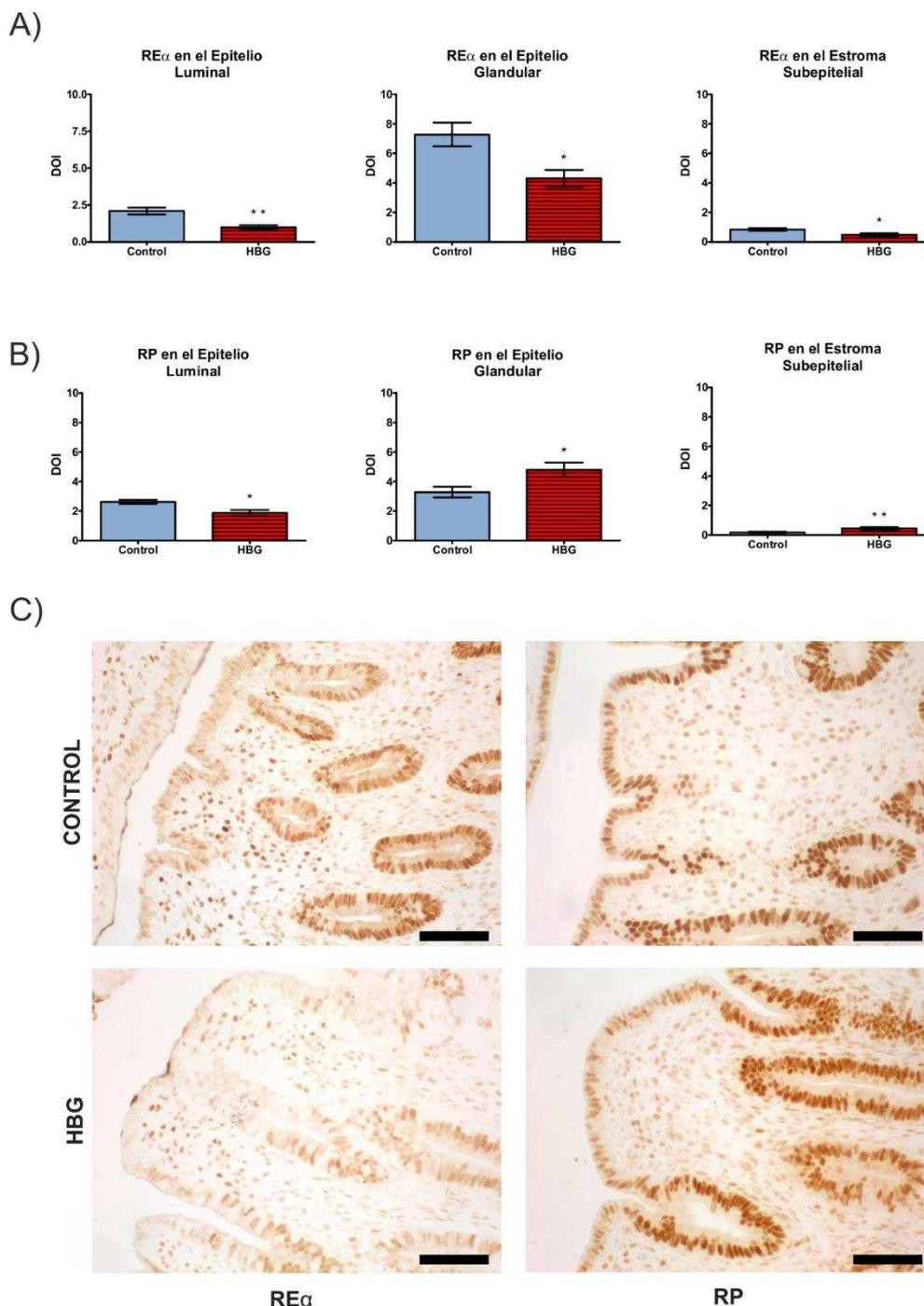


Figura 21: Expresión de los receptores esteroideos en el útero de corderas control y tratadas con el HBG en DPN45. A) La exposición al HBG produjo una menor expresión del RE α en los epitelios luminal y glandular y en el estroma subepitelial. B) Los animales del grupo HBG presentaron una disminución en la expresión del PR en el epitelio luminal y un aumento de la expresión en el epitelio glandular y el estroma subepitelial. C) Fotomicrograffas representativas de la expresión de los receptores esteroideos en el útero de corderas control y expuestas al HBG. Las columnas representan la media \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. control, ** $p < 0,01$ vs. control. Escala de barra: 50 μ m.

El proceso adenogénico uterino también está regulado por la acción de proteínas que modulan la interacción entre el epitelio y el estroma. Entre estas proteínas podemos mencionar a los genes Wnt (Wnt5a y Wnt7a) y la molécula efectora de la vía canónica de los Wnt, β -catenina. El desarrollo del estroma uterino está regulado por el Hoxa10, y el desarrollo glandular está modulado por la expresión del factor de transcripción Foxa2. Según la bibliografía consultada no hemos encontrado trabajos que estudien la expresión de las proteínas Hoxa10, Wnt7a y Wnt5a en el útero de corderas prepuberales. En el útero de las corderas control observamos que Wnt7a y de Wnt5a se localiza en los núcleos del estroma subepitelial, y en el núcleo y citoplasma de los epitelios luminal y glandular. La expresión de β -catenina en el útero de corderas prepuberales se localizó en los epitelios luminal y glandular, mientras que en el ES y el miometrio su expresión fue muy baja. La localización celular de β -catenina en el útero fue en citoplasma y membrana. En cuanto a los factores de transcripción, Hoxa10 se ubicó en el núcleo de las células estromales y fue negativo en los epitelios luminal o glandular; y el Foxa2 se expresó en células del epitelio glandular, siendo su localización celular predominantemente nuclear, aunque también observamos una débil expresión en el citoplasma. La exposición posnatal al HBG disminuyó la expresión de Wnt5a en el EG, y de Wnt7a en el ES. Por otro lado, se observó que el tratamiento con HBG disminuyó la expresión de β -catenina en los epitelios luminal y glandular (Figura 22). Además, el tratamiento con HBG presentó una menor expresión de Hoxa10 en el ES, y de Foxa2 en el EG (Figura 23).

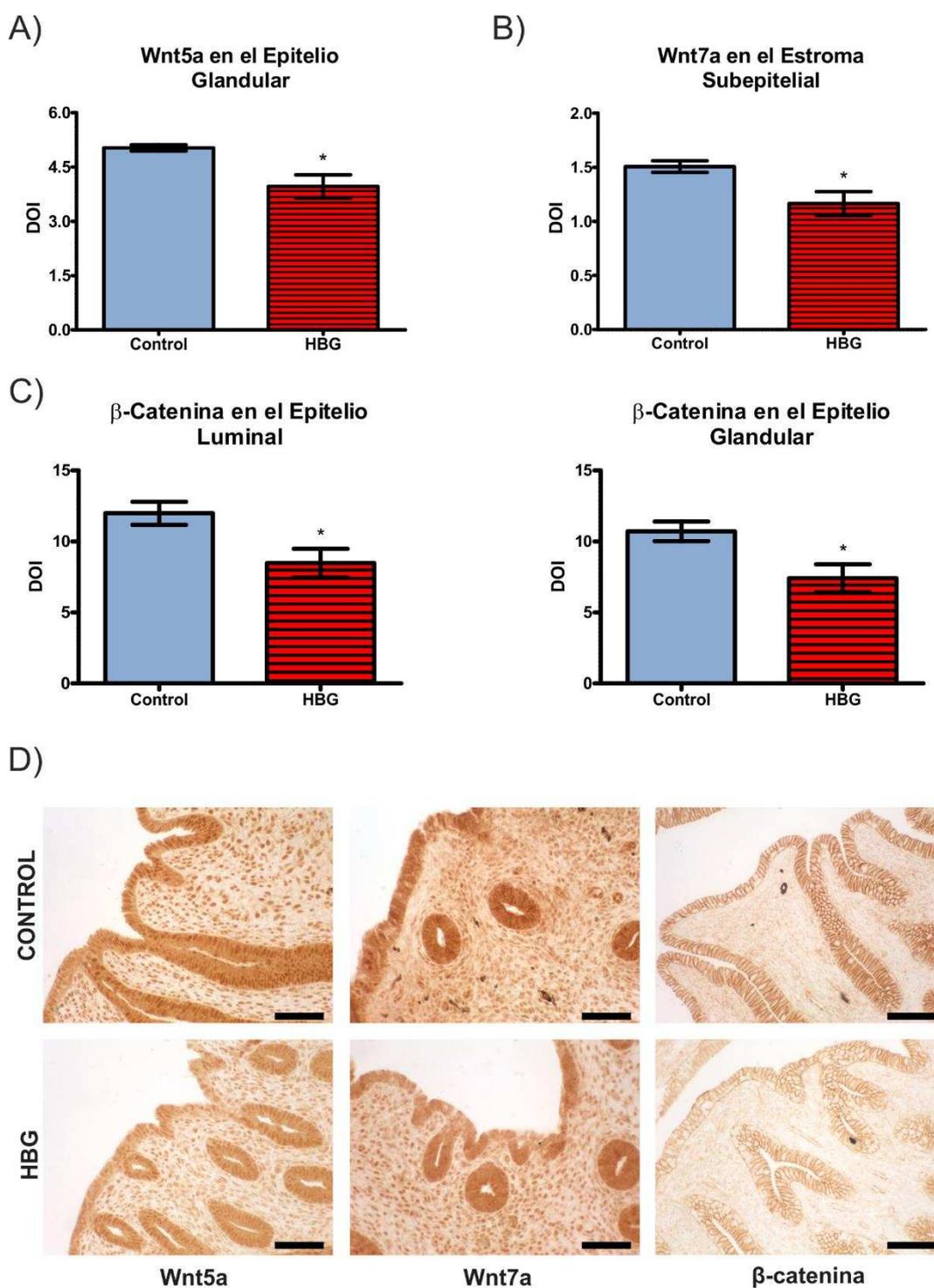


Figura 22: Expresión de las moléculas Hoxa10, Wnt5a, Wnt7a y β-catenina en el útero de corderas control y expuestas al HBG. A) En las corderas expuestas al HBG se observó una disminución en la expresión de Hoxa10 en el estroma subepitelial (ES). B) Los animales del grupo HBG presentaron una menor expresión de Wnt7a en el estroma subepitelial. C) La exposición al HBG produjo una disminución en la expresión de Wnt5a en el epitelio glandular (EG). D) La expresión de β-catenina en los epitelios luminal (EL) y glandular fue menor en los animales tratados respecto al grupo control. E) Fotomicrografías representativas de los cambios observados en la expresión de las moléculas estudiadas. Las columnas representan la media ± SEM. * $p < 0,05$ vs. control. Escala de barra: 50 μ m.

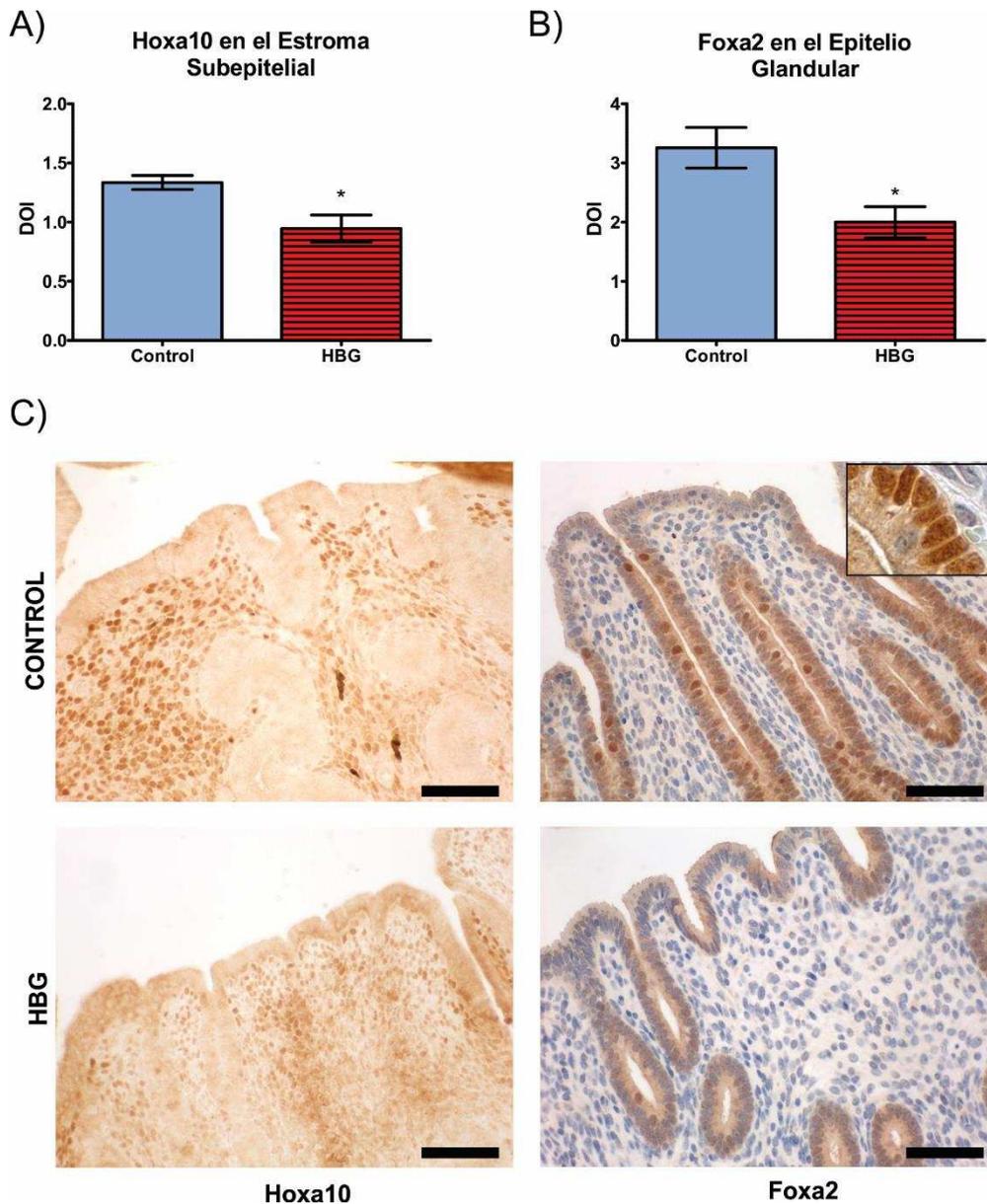


Figura 23: Expresión de Hoxa10 y Foxa2 en el útero de corderas control y expuestas al HBG en DPN45. A) Cuantificación de la expresión de Hoxa10 en el estroma subepitelial. B) Cuantificación de la expresión de Foxa2 en el núcleo de las células del epitelio glandular. Los resultados fueron expresados como densidad óptica integrada (DOI). Las columnas representan la media \pm SEM. * $p < 0,05$ vs. control. C) Fotomicrografías representativas de la expresión de Hoxa10 y Foxa2 en el útero de corderas control y expuestas al HBG. Escala de barra: 50 μ m.

DISCUSIÓN

En esta parte del trabajo de tesis utilizamos la vía subcutánea para evaluar los efectos de la exposición neonatal a un HBG en el útero de las corderas prepuberales. No observamos cambios en la histomorfología uterina y la exposición neonatal al HBG produjo una menor proliferación celular en todos los compartimentos uterinos evaluados (al igual que los resultados presentados en el capítulo anterior). La alteración en la proliferación celular está asociada con un aumento en la expresión de genes y proteínas relacionados con su regulación. Además, en las corderas expuestas al HBG se observó una desregulación de la expresión de receptores esteroideos y de otras moléculas relacionadas con el desarrollo uterino.

Dependiendo del PE, así como del momento, frecuencia o dosis de la exposición, los animales que tratados pueden presentar alteraciones en la morfología uterina [348,349]. En trabajos previos de nuestro laboratorio, hemos descrito alteraciones histomorfológicas en el útero de ratas expuestas neonatalmente a un HBG [190,350]. Similar a los resultados obtenidos en el Experimento I de la presente tesis, no observamos alteraciones en la histomorfología uterina de las corderas tratadas con HBG. Si demostramos una disminución de proliferación celular en los epitelios (luminal y glandular), el estroma y el miometrio uterinos. Con el objetivo de dilucidar los mecanismos involucrados con la menor proliferación celular, estudiamos los receptores de prolactina y moléculas de la vía de señalización IGF. En el EG del útero ovino durante el desarrollo, se expresan los receptores de prolactina (PRLR-l y PRLR-s), que son codificados a partir de un único gen [342]. La presencia de más de una banda en el producto de PCR del PRLR-l cuando se realizaron los geles de úteros de corderas control y tratadas, se debe a la posibilidad de fragmentos remanentes de exones del PRLR-s durante el *splicing* alternativo que ocurre para dar lugar al PRLR-l [13]. La ausencia de cambios en la expresión del PRLR-s podría estar relacionado a que los parámetros histomorfológicos no se modificaron en los úteros de las corderas con HBG. En el útero ovino durante el desarrollo de glándulas uterinas, las moléculas más importantes que participan de la vía IGF serían: IGF-1, IGF-2, IGF-1R, IGFBP-3 e IGFBP-4 [328]. Entre ellas, la proteína IGFBP-3 regula la biodisponibilidad de los IGFs en circulación, inhibe la migración y la proliferación celular e induce apoptosis [347]. En nuestro trabajo, no observamos diferencias en la expresión de los genes IGF-1, -2 ni de su receptor; si ocurrieron cambios en el útero de las corderas tratadas en los niveles de IGFBP-3, que son mayores a los del grupo control. La exposición *in vitro* a PE de la línea celular de cáncer de mama (MCF-7) y de células multipotentes derivadas de tejido adiposo incrementó los niveles de IGFBP-3 [351,352]. Por otro lado, la exposición *in vivo* de ratas macho adultas a bajas dosis de un PE (el 3-monocloropropanediol) aumentó la expresión de IGFBP-3 [353]. Por el contrario, el tratamiento de corderas con estradiol valerato (E₂V) desde el DPN0 al DPN13 disminuyó la expresión de la IGFBP-3

uterina [336]. Los antecedentes comentados y nuestros resultados permiten sugerir que la expresión de IGFBP-3 podría ser sensible a la exposición a PE de posible acción estrogénica.

Como ya se mencionó, la p27 que regula la proliferación celular. Se ha demostrado que la expresión de IGFBP-3 se correlaciona positivamente con la expresión de p27, mecanismo mediado por la proteína Smad3 [354,355]. En este trabajo, observamos una mayor expresión de p27 en todos los compartimentos uterinos de las corderas tratadas con HBG y esto se correlaciona con una menor proliferación celular. En un estudio previo, usando un modelo animal similar, demostramos que la exposición neonatal de corderas a bajas dosis de DES o bisfenol A (BPA), desde el DPN1 al DPN14, aumentó la expresión de p27 en células de la granulosa y en ovocitos y que esto se asoció con una mayor proliferación de células de la granulosa y de la teca [259]. Interesantemente, Yoshida y col. [356,357] comunicaron que la exposición neonatal de ratones CD-1 a DES disminuye la proliferación de células epiteliales uterinas en asociación con una mayor expresión de p21 (una proteína relacionada a p27). Adicionalmente, hemos descrito que la exposición neonatal de ratas a un HBG disminuyó la expresión de p27 junto con un aumento de la proliferación celular en los sitios de implantación en DG9 [192]. Los estudios con líneas celulares humanas expuestas a BPA mostraron una mayor expresión de p27 relacionado con un estado proliferativo quiescente [358,359]. Teniendo en consideración nuestros resultados, podemos sugerir que la disminución de la proliferación celular en el útero de las corderas tratadas con HBG estaría asociada a un incremento en la expresión de p27 que estaría mediada por la mayor expresión de IGFBP-3. De acuerdo con los resultados obtenidos en la inmunofluorescencia doble de Ki67/p27 en los que la colocalización de ambas proteínas es baja, la disminución en la proliferación celular y la sobreexpresión de p27 ocurrirían en células o tiempos diferentes.

La presencia del RE α disminuyó en todos los compartimentos uterinos (epitelios luminal y glandular, y estroma) de las corderas expuestas al HBG. Estos resultados coinciden con publicaciones previas de nuestro laboratorio, en las que observamos una menor expresión del RE α en el útero de ratas expuestas neonatalmente a un HBG [190,192]. Resultados similares se describen luego de la exposición de corderas a una elevada dosis de E₂V, desde el DPN14 al DPN56, disminuyendo la expresión del RE α en el EL y el ES, además de afectar el desarrollo glandular [18]. Efectos similares sobre el RE α se obtuvieron al tratar corderas con estradiol benzoato (E₂B) [360]. Morrison y col. [338] describen una alteración en el patrón de expresión del RE α luego del tratamiento de corderas prepuberales ovariectomizadas con DES o BPA. Del mismo modo, ratas de la cepa Donryu tratadas con el PE p-tert-octilfenol durante las primeras dos semanas de vida presentaron una disminución en la expresión del RE α en el EL uterino en el DPN28 [361].

En cuanto al RP, el tratamiento de las corderas con HBG disminuyó su expresión en el EL y hubo una mayor expresión en el EG y el ES. La exposición neonatal de ratas a un HBG también altera la expresión uterina del RP en el EL y ES en el periodo prepuberal y en los sitios de implantación en el DG9 [190,192]. Utilizando un modelo de rata ovariectomizada, reportamos un aumento de la expresión de PR en el epitelio glandular luego de la administración del HBG [181]. Es importante destacar que los receptores de esteroides regulan la proliferación celular a través de p27; mientras que el RE α disminuye la expresión de p27, el RP la induce [362–364]. Por lo tanto, la menor proliferación celular junto con la mayor expresión de p27 en el EG y el ES podría estar relacionada con la mayor expresión del RP en el útero de las corderas tratadas. Nuestros resultados sugieren que la desregulación de la expresión de los receptores esteroideos se relaciona con la baja proliferación celular, como consecuencia del tratamiento neonatal al HBG.

El desarrollo uterino está regulado, al menos en parte, por la expresión de genes de la familia Wnt. Identificamos expresión de las proteínas Wnt5a y Wnt7a en el EL, EG y el ES del útero de las corderas del grupo control. Luego del tratamiento con el HBG, se indujo una disminución de la expresión de Wnt5a en el EG, y de Wnt7a en el ES. En consonancia con estos resultados, previamente habíamos publicado que la exposición neonatal de ratas a HBG modificó la expresión de Wnt5a y Wnt7a [190,192,365]. El tratamiento de ratones con DES altera los niveles y el patrón de expresión de Wnt5a y Wnt7a [32,33]. En corderas prepuberales, Hayashi y Spencer [29] observaron mediante estudios de hibridación *in situ*, que los niveles de ARNm Wnt5a disminuyeron en el EL y el EG luego del tratamiento con E₂B; mientras que los ARNm de Wnt7a disminuyeron en el EL luego del tratamiento con E₂B o E₂V. Respecto a β -catenina, en la presente tesis observamos una menor expresión en el EL y el EG en los animales expuestos neonatalmente al HBG. La exposición neonatal de ratas a un HBG disminuye la expresión de β -catenina en el EG y la aumenta en el ES en el DG9 [192]. Además de su rol en la vía de señalización canónica de Wnt, la β -catenina participa en las uniones célula-célula; por lo tanto, una alteración en la expresión de dicha molécula causaría problemas en el desarrollo, la fertilidad y otras patologías del útero (por ejemplo: hiperplasia, adenocarcinomas y cáncer) [37]. En estudios previos, demostramos que la exposición neonatal de ratas a HBG altera la vía Wnt/ β -catenina durante el periodo prepuberal y que, además, está desregulada en periodos posteriores de la vida [192,365]. Nuestros resultados apoyan la idea que la vía de señalización Wnt/ β -catenina es sensible a la perturbación endócrina, y que dichas alteraciones podrían tener efectos adversos a largo plazo.

Como ya se comentó, el desarrollo uterino está coordinado por la interacción entre diferentes proteínas, entre ellas los factores de transcripción, que interactúan entre sí para coordinar la morfogénesis uterina. En la presente tesis, la exposición neonatal al HBG disminuyó la expresión de Hoxa10 en el ES

del útero de las corderas. Diferentes estudios observaron alteraciones en la expresión de Hoxa10 luego de la exposición a un perturbador endócrino [75,193,279,282]. La exposición neonatal de ratones a DES reprime la expresión uterina de Hoxa10 [366], y los mecanismos moleculares que median esta represión involucrarían un elemento de respuesta a estrógenos presente en la región promotora de Hoxa10 [367]. Por lo tanto, con base en nuestros resultados, podemos sugerir que la menor expresión uterina de Hoxa10 se relaciona con la menor expresión del RE α debido al tratamiento con HBG: Además y como ya se mencionó, la expresión de Hoxa10 depende de la expresión de Wnt7a [25]; por lo tanto, la menor expresión de Hoxa10 también podría estar relacionada con la menor expresión de Wnt7a observada en las células estromales uterinas de las corderas expuestas al HBG.

Un factor de transcripción involucrado en el desarrollo glandular uterino es Foxa2. El rol de Foxa2 en el desarrollo uterino fue estudiado usando mutantes condicionales. Jeong y col. [40] usando mutantes condicionales para Foxa2 poseen un útero sin glándulas, siendo estas hembras infértiles. Resultados similares fueron descritos por Kelleher y col. [54], quienes desarrollaron un modelo de ratones adultos con una mutación condicional para Foxa2, donde observaban la presencia de glándulas uterinas pero los animales eran infértiles. Estos estudios demuestran el rol fundamental que tiene el Foxa2 tanto en el desarrollo uterino como para la fertilidad de la hembra. Estos antecedentes demuestran que la expresión de Foxa2 en el ratón y en la oveja se observa únicamente en el epitelio glandular del útero [41,368]. En nuestras corderas nosotros también demostramos la expresión de Foxa2 en el EG y que la exposición neonatal al HBG disminuyó la expresión de Foxa2 en el útero. La exposición durante la gestación de ratones a 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) reduce el número de glándulas y hay menores niveles de ARNm de Foxa2 [321]. La vía Wnt/ β -catenina está involucrada en el normal desarrollo glandular uterino y mantiene la expresión de Foxa2, la delección de Wnt7a en ratones genera un fenotipo uterino aglandular alterando la expresión de Foxa2 [34]. Resultados similares se observaron en mutantes del gen β -catenina [37]. Además, se ha demostrado que la β -catenina se une a la región promotora de Foxa2 [60]. Por todo lo expuesto, la menor expresión de Foxa2 en las glándulas uterinas de las corderas tratadas con HBG estaría relacionada con la menor expresión de los Wnt y de β -catenina. La disminución en la expresión de Foxa2 podría alterar la funcionalidad uterina y afectar la implantación embrionaria y la fertilidad.

Para concluir, en esta parte del trabajo de tesis demostramos que la exposición neonatal a una baja dosis de HBG produce una disminución de la proliferación celular e induce menor expresión de moléculas involucradas en el desarrollo uterino (como los receptores esteroideos, Wnt5a, Wnt7a, β -catenina, Hoxa10 o Foxa2) en el útero de corderas. Aunque, como hemos mencionado, las alteraciones en la expresión de dichas moléculas durante las etapas críticas del desarrollo que fueron estudiadas en este trabajo podrían

afectar negativamente la salud reproductiva de la hembra, utilizando nuestro modelo animal no podemos afirmar ni descartar que la funcionalidad uterina y la fertilidad estén efectivamente alteradas en hembras adultas.

CONCLUSIONES DE LOS CAPITULOS II Y III

En el presente capítulo investigamos los efectos del HBG empleando dos vías de administración: la vía oral vs. la subcutánea; observamos que el tratamiento disminuye la proliferación celular del útero de las corderas independientemente de la vía de administración. Evaluamos los niveles de glifosato y AMPA en el agua de bebida y en el suero de corderas de DPN15 y DPN45. El agua de bebida se encontró libre de glifosato y AMPA, descartando posible la contaminación con dichos compuestos. Detectamos glifosato, pero no AMPA, en el suero de los animales tratados con el HBG por vía oral o subcutánea de DPN15. En los sueros de las corderas tratadas con el HBG de DPN45 los niveles de glifosato y AMPA fueron indetectables. Tampoco detectamos glifosato o AMPA en el suero de las corderas de los grupos control de DPN15 o DPN45. Posteriormente continuamos utilizando la vía subcutánea para estudiar la expresión de genes y proteínas involucradas en el desarrollo uterino y que podrían explicar, al menos en parte, los cambios observados en la proliferación celular. La menor proliferación celular del útero estaría relacionada con una mayor expresión del IGFBP-3 la que, a su vez, estaría asociada con el incremento en la expresión del inhibidor de ciclinas dependientes de cinasas p27. También demostramos alteraciones en la expresión de los receptores esteroideos (RE α y RP) en el útero de las corderas tratadas con HBG que, a su vez, estarían relacionadas con los niveles de expresión de proteínas de la vía Wnt/ β -catenina, y de otros genes *downstream* como Hoxa10 y Foxa2. El rol de las proteínas mencionadas sería coordinar el normal desarrollo uterino, y muchas de ellas están directamente relacionadas con la proliferación celular.

Los resultados de esta tesis permiten dilucidar las vías de señalización relacionadas con las alteraciones en el desarrollo en el útero de corderas expuestas a HBG. Varios estudios han demostrado que los efectos de la exposición a un PE durante periodos críticos del desarrollo podrían ser responsables de alteraciones en hembras adultas [202]; a pesar de ello, no podemos afirmar que las alteraciones durante el desarrollo comunicadas en la presente tesis podrían tener un impacto en la fertilidad y en la salud reproductiva de los animales domésticos. Más estudios son necesarios para evaluar si la funcionalidad uterina y la fertilidad de las hembras estaría comprometida luego de la exposición neonatal a una baja dosis de un HBG.

CONSIDERACIONES FINALES

“Je cherche à comprendre”

Jacques Monod

En la presente tesis, se presentan los resultados de la exposición neonatal a dos agroquímicos empleando dos modelos animales diferentes. Por un lado, reportamos los efectos de la exposición neonatal a un HBG sobre el desarrollo del útero de corderas prepuberales. Por otro lado, reportamos los efectos de la exposición neonatal a endosulfán sobre la diferenciación miometrial en el periodo pre-implantatorio y durante el trabajo de parto. La elección de los agroquímicos se fundamenta en que ambos han sido los más empleados en el país en los últimos años. Mientras que los HBG son los agroquímicos que más se emplean en la actualidad, aunque el endosulfán está prohibido en Argentina, se sigue detectando en el ambiente.

Con el aumento de la población mundial, desde hace décadas, hay una creciente demanda de alimentos. De hecho, se estima que deberíamos aumentar el rendimiento actual de los cultivos entre un 20-70% para satisfacer la potencial demanda poblacional para el 2050 [369]. El mejoramiento de los cultivos, sumado al control de plagas y malezas, han permitido alcanzar mayores rindes en las cosechas. En este sentido, actualmente hay una gran variedad de compuestos químicos, como los herbicidas que permiten controlar las malezas, y los pesticidas controlan ácaros e insectos en diversos cultivos. Muchos de estos compuestos han tenido que utilizarse en dosis mayores, o en asociación con otros productos, debido a la aparición de malezas y plagas resistentes [370]. Aunque las tecnologías y agroquímicos actuales ofrecen grandes beneficios en la producción de alimentos, también se asocian con posibles riesgos para la salud, el ambiente, el abastecimiento de alimentos seguros y el desarrollo sustentable [369]. El impacto en la salud y el ambiente, comprobado científicamente, ha resultado en la prohibición de la fabricación, comercialización y empleo de muchos de ellos debido a su elevada toxicidad y/o demostrada actividad como PE, como es el caso del endosulfán. Sin embargo, los efectos perjudiciales sobre la salud y el ambiente para otros agroquímicos siguen siendo tema de controversia, como ocurre con los HBG debido, entre otras cosas, a la gran variedad de formulaciones comerciales.

El endosulfán, a pesar de su prohibición en gran parte del mundo, se continúa utilizando en un pequeño número de países y, aunque en Argentina se encuentra prohibida su comercialización y su uso, todavía puede detectarse en muestras de suelo y de agua [371]. Esto se debe, principalmente, a su baja degradabilidad y elevado potencial de bioacumulación [97]. En dosis elevadas, el endosulfán causa toxicidad neurológica, vascular, cardíaca, hepática, renal y reproductiva [372–376]. A bajas dosis puede actuar como PE, tal como se demostró en estudios *in vitro* e *in vivo* que posee actividad estrogénica y antiandrogénica [126–128,138]. Además, empleando modelos animales se describieron los efectos de la exposición a endosulfán sobre el desarrollo y la funcionalidad del tracto reproductor masculino [123,124,243,244] y femenino [75,139–141].

Previamente, demostramos que la exposición de ratas a endosulfán en la primer semana de vida alteró la expresión, durante el periodo prepuberal, de los receptores esteroideos (RE α y RP), α -SMA, Hoxa10, Wnt7a y β -catenina, que están relacionadas con el desarrollo y la diferenciación del útero [75,139]. También reportamos que la exposición neonatal de ratas a endosulfán indujo fallas en la implantación al desregular la expresión de moléculas que modulan el crecimiento y la diferenciación endometrial en el periodo pre-implantatorio [139,140]. Los resultados de la presente tesis aportan evidencia sobre los efectos adversos de la exposición neonatal a una dosis ambientalmente relevante de endosulfán sobre la diferenciación funcional del miometrio uterino en el período pre-implantatorio. El tratamiento con endosulfán alteró la histología miometrial, redujo la vascularización, y disminuyó la proliferación celular y la expresión de Wnt7a y Hoxa10. Estos cambios podrían, a su vez, contribuir con la menor tasa de implantación hallada en el DG5. Además, observamos un retraso en el inicio del parto en asociación con alteraciones en la expresión de genes asociados con las contracciones en el DG23.

En el caso del glifosato, el uso de los HBG ha crecido a mayor velocidad a medida que aparecieron nuevos cultivos resistentes al glifosato y, para el 2014, más del 90% de los cultivos de soja en EE. UU., Brasil y Argentina presentaban resistencia al glifosato [94]. Los HBG son los agroquímicos más empleados en la actualidad, con un consumo estimado en más de 800 millones de kg por año a nivel mundial [94]. Además, es el agroquímico más empleado en Argentina, con un consumo estimado en más de 200 millones de litro por año [148]. Aunque es rápidamente degradado a AMPA en el suelo, los volúmenes y la frecuencia de aplicación hacen que ambos compuestos persistan y se acumulen tanto en suelo como en alimentos [94,95].

Como ya se mencionó, el glifosato y los HBG presentan diferentes efectos tanto *in vitro* como *in vivo* lo cual podría atribuirse no sólo al AMPA, sino también a los diferentes coadyuvantes, compuestos considerados inertes y que están presentes en las formulaciones comerciales [184,377–379]. Los coadyuvantes, cuya especificación no siempre son requeridas por los organismos de control, varían entre los formulados comerciales de las distintas marcas o dentro de la misma marca entre los diferentes países donde se comercializa [167,380,381]. Hay una importante controversia acerca de los efectos adversos, o no, de las formulaciones comerciales de glifosato y de sus coadyuvantes. Los coadyuvantes cumplen una función importante aumentando la eficiencia del producto activo (el glifosato) para que se pueda incorporar a la planta. Hay un gran interés por parte de los fabricantes en buscar nuevos coadyuvantes que posean mayor eficacia y un menor efecto adverso sobre el ambiente y la salud humana y animal [167]. En nuestro trabajo estudiamos los efectos de la exposición al formulado comercial Roundup Full II, por lo tanto, no podemos obtener conclusiones que puedan hacer extensivas a otras formulaciones comerciales.

Los estudios *in vitro* con cultivos celulares primarios o con distintas líneas celulares describen que la exposición a los HBG altera las tasas de proliferación celular, induce apoptosis, citotoxicidad y estrés oxidativo, e interfiere con la esteroidogénesis al inhibir la transcripción y la actividad enzimática de la aromatasa [174,175,177–179]. Resultados similares han sido descriptos empleando modelos animales. La exposición a glifosato y a los HBG produce daño renal y hepático [382–384], altera el eje hipotalámico-hipofisario-tiroideo [385], e interfiere con el normal desarrollo de la glándula mamaria y del tracto reproductor de ratas macho [182,186,386,387]. Asimismo, la exposición de roedores a glifosato o a un HBG altera la aptitud reproductiva en machos, el desarrollo y la funcionalidad testicular al inhibir la aromatasa, inducir apoptosis y aumentar el estrés oxidativo; todo lo que resulta en una menor cantidad y calidad espermática [170,173,180,184,187,388].

Como ya mencionamos, hay antecedentes que demuestran efectos adversos de la exposición a HBG en el TRF de roedores. La exposición *in utero* de ratas a HBG altera el desarrollo uterino y su diferenciación funcional, evidenciado por un menor número de sitios de implantación en la F1 [189,196,197] e induce alteraciones el desarrollo de la F2 [196,197]. Los efectos observamos en la F1 se asocian a cambios en el epigenéticos en el promotor del RE α [198]. Por otro lado, la exposición neonatal de ratas a HBG también altera el desarrollo uterino en el período prepuberal, y la diferenciación funcional uterina, observando un aumento significativo en el número de sitios de reabsorción [190–192]. En esta tesis se investigaron los efectos de la exposición neonatal en un modelo animal ovino utilizando una baja dosis de HBG y los animales fueron expuestos en el período posnatal temprano (período de alta sensibilidad a efectos de PE). Cabe destacar que, de acuerdo con la bibliografía, éste es el primer estudio que evalúa los efectos de un HBG sobre el desarrollo uterino en una especie de interés zootécnico. La exposición neonatal alteró, en el período prepuberal, la expresión de moléculas que controlan el normal desarrollo uterino y que podrían afectar su funcionalidad. Estos resultados sugieren que las alteraciones observadas podrían interferir en la fertilidad de las hembras adultas.

Se sabe que los agroquímicos son un serio problema para la salud pública y para el medio ambiente, debido a su ubicuidad, a las prácticas de uso, a sus propiedades físicas y químicas que facilitan su distribución y acumulación. El análisis de poblaciones humanas como de animales con potencial exposición a agroquímicos han informado datos preocupantes. La presencia de agroquímicos en el torrente sanguíneo materno, durante la gestación, se asocia con alteraciones en el mantenimiento de la gestación y el parto, como también con trastornos en el desarrollo fetal [114,116,165,166,216,389]. Esta preocupación por el impacto de los agroquímicos se extiende al sector productivo ganadero y, especialmente, en nuestro País por su tradición de exportador de carnes. En el año 2018, en Argentina el stock ganadero incluía unos 54 millones de bovinos, 15 millones de ovinos y 3 millones de caprinos [390],

evidenciando el gran valor comercial de este sector para nuestro país. Sin embargo, no hay estudios que investiguen los problemas de fertilidad en especies de interés zootécnico en relación con la exposición a agroquímicos que contaminan el ambiente. Los resultados de la presente tesis han intentado hacer una pequeña contribución a este problema central de nuestra Región y del País, demostrando en un modelo *in vivo* usando una especie de interés zootécnico como la exposición a bajas dosis de un agroquímico altera el desarrollo del útero y cómo esto podría disminuir el potencial reproductivo de hembras de especies ganaderas o de la fauna que se encuentren en condiciones a campo.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] TE Spencer, KA Dunlap, J Filant (2012) Comparative developmental biology of the uterus: insights into mechanisms and developmental disruption. *Mol Cell Endocrinol* 354 (1-2):34-53.
- [2] A Kobayashi, RR Behringer (2003) Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nature Reviews Genetics* 4 (12):969.
- [3] T DeFalco, B Capel (2009) Gonad morphogenesis in vertebrates: divergent means to a convergent end. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25:457-482.
- [4] CM Haqq, PK Donahoe (1998) Regulation of sexual dimorphism in mammals. *Physiol Rev* 78 (1):1-33.
- [5] TE Spencer, KD Carpenter, K Hayashi, J Hu (2005) Uterine Glands, En: *Branching Morphogenesis*, Springer, Boston, MA, p. 186-201.
- [6] T Kurita (2010) Developmental origin of vaginal epithelium. *Differentiation* 80 (2-3):99-105.
- [7] T Kurita (2011) Normal and abnormal epithelial differentiation in the female reproductive tract. *Differentiation* 82 (3):117-126.
- [8] CA Gray, FF Bartol, BJ Tarleton, AA Wiley, GA Johnson, FW Bazer, TE Spencer (2001) Developmental biology of uterine glands. *Biol Reprod* 65 (5):1311-1323.
- [9] GR Cunha, PS Cooke, T Kurita (2004) Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. *Archives of Histology and Cytology* 67 (5):417-434.
- [10] T Kurita, PS Cooke, GR Cunha (2001) Epithelial–Stromal Tissue Interaction in Paramesonephric (Müllerian) Epithelial Differentiation. *Developmental Biology* 240 (1):194-211.
- [11] GS Daftary, HS Taylor (2006) Endocrine Regulation of HOX Genes. *Endocr Rev* 27 (4):331-355.
- [12] T Kurita, GR Cunha (2001) Roles of p63 in differentiation of Müllerian duct epithelial cells. *Ann N Y Acad Sci* 948:9-12.
- [13] KM Taylor, CA Gray, MM Joyce, MD Stewart, FW Bazer, TE Spencer (2000) Neonatal Ovine Uterine Development Involves Alterations in Expression of Receptors for Estrogen, Progesterone, and Prolactin. *Biol Reprod* 63 (4):1192-1204.
- [14] GR Cunha, P Young, JR Brody (1989) Role of Uterine Epithelium in the Development of Myometrial Smooth Muscle Cells. *Biol Reprod* 40 (4):861-871.
- [15] JR Brody, GR Cunha (1989) Histologic, morphometric, and immunocytochemical analysis of myometrial development in rats and mice: II. Effects of DES on development. *American Journal of Anatomy* 186 (1):21-42.
- [16] AM Kelleher, FJ DeMayo, TE Spencer (2019) Uterine Glands: Developmental Biology and Functional Roles in Pregnancy. *Endocr Rev* 40 (5):1424-1445.
- [17] Z Vue, G Gonzalez, CA Stewart, S Mehra, RR Behringer (2018) Volumetric imaging of the developing prepubertal mouse uterine epithelium using light sheet microscopy. *Molecular Reproduction and Development* 85 (5):397-405.
- [18] KD Carpenter, CA Gray, TM Bryan, TH Welsh, TE Spencer (2003) Estrogen and antiestrogen effects on neonatal ovine uterine development. *Biol Reprod* 69 (2):708-717.
- [19] JP Kennedy, CA Worthington, ER Cole (1974) The post-natal development of the ovary and uterus of the Merino lamb. *J Reprod Fertil* 36 (2):275-282.
- [20] MD Stewart, GA Johnson, CA Gray, RC Burghardt, LA Schuler, MM Joyce, FW Bazer, TE Spencer (2000) Prolactin Receptor and Uterine Milk Protein Expression in the Ovine Endometrium During the Estrous Cycle and Pregnancy. *Biol Reprod* 62 (6):1779-1789.
- [21] C Miller, DA Sassoon (1998) Wnt-7a maintains appropriate uterine patterning during the development of the mouse female reproductive tract. *Development* 125 (16):3201-3211.
- [22] C Miller, A Pavlova, DA Sassoon (1998) Differential expression patterns of Wnt genes in the murine female reproductive tract during development and the estrous cycle. *Mechanisms of Development* 76 (1):91-99.
- [23] S Tulac, NR Nayak, LC Kao, M Van Waes, J Huang, S Lobo, A Germeyer, BA Lessey, RN Taylor, E Suchanek, LC Giudice (2003) Identification, characterization, and regulation of the canonical Wnt signaling pathway in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 88 (8):3860-3866.

- [24] A Pavlova, E Boutin, G Cunha, D Sassoon (1994) Msx1 (Hox-7.1) in the adult mouse uterus: cellular interactions underlying regulation of expression. *Development* 120 (2):335-345.
- [25] M Mericskay, J Kitajewski, D Sassoon (2004) Wnt5a is required for proper epithelial-mesenchymal interactions in the uterus. *Development* 131 (9):2061-2072.
- [26] TP Yamaguchi, A Bradley, AP McMahon, S Jones (1999) A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development* 126 (6):1211-1223.
- [27] BA Parr, AP McMahon (1998) Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires Wnt-7a. *Nature* 395 (6703):707-710.
- [28] KL Parker, BP Schimmer (2006) Embryology and genetics of the mammalian gonads and ducts. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* 3.
- [29] K Hayashi, TE Spencer (2006) WNT pathways in the neonatal ovine uterus: potential specification of endometrial gland morphogenesis by SFRP2. *Biol Reprod* 74 (4):721-733.
- [30] J Goad, Y-A Ko, M Kumar, SM Syed, PS Tanwar (2017) Differential Wnt signaling activity limits epithelial gland development to the anti-mesometrial side of the mouse uterus. *Developmental Biology* 423 (2):138-151.
- [31] HL Franco, D Dai, KY Lee, CA Rubel, D Roop, D Boerboom, J-W Jeong, JP Lydon, IC Bagchi, MK Bagchi, FJ DeMayo (2011) WNT4 is a key regulator of normal postnatal uterine development and progesterone signaling during embryo implantation and decidualization in the mouse. *FASEB J* 25 (4):1176-1187.
- [32] C Miller, K Degenhardt, DA Sassoon (1998) Fetal exposure to DES results in de-regulation of Wnt7a during uterine morphogenesis. *Nat Genet* 20 (3):228-230.
- [33] L Carta, D Sassoon (2004) Wnt7a Is a Suppressor of Cell Death in the Female Reproductive Tract and Is Required for Postnatal and Estrogen-Mediated Growth. *Biol Reprod* 71 (2):444-454.
- [34] KA Dunlap, J Filant, K Hayashi, EB Rucker, G Song, JM Deng, RR Behringer, FJ DeMayo, J Lydon, J-W Jeong, TE Spencer (2011) Postnatal deletion of Wnt7a inhibits uterine gland morphogenesis and compromises adult fertility in mice. *Biol Reprod* 85 (2):386-396.
- [35] K Hayashi, S Yoshioka, SN Reardon, EB Rucker, TE Spencer, FJ DeMayo, JP Lydon, JA MacLean (2011) WNTs in the neonatal mouse uterus: potential regulation of endometrial gland development. *Biol Reprod* 84 (2):308-319.
- [36] X Hou, Y Tan, M Li, SK Dey, SK Das (2004) Canonical Wnt Signaling Is Critical to Estrogen-Mediated Uterine Growth. *Mol Endocrinol* 18 (12):3035-3049.
- [37] J-W Jeong, HS Lee, HL Franco, RR Broaddus, MM Taketo, SY Tsai, JP Lydon, FJ DeMayo (2009) beta-catenin mediates glandular formation and dysregulation of beta-catenin induces hyperplasia formation in the murine uterus. *Oncogene* 28 (1):31-40.
- [38] J Goad, Y-A Ko, SM Syed, YJ Crossingham, PS Tanwar (2017) Data on the mRNA expression by in situ hybridization of Wnt signaling pathway members in the mouse uterus. *Data in Brief* 12:208-212.
- [39] H Du, HS Taylor (2016) The Role of Hox Genes in Female Reproductive Tract Development, Adult Function, and Fertility. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6 (1).
- [40] J-W Jeong, I Kwak, KY Lee, TH Kim, MJ Large, CL Stewart, KH Kaestner, JP Lydon, FJ DeMayo (2010) Foxa2 Is Essential for Mouse Endometrial Gland Development and Fertility. *Biol Reprod* 83 (3):396-403.
- [41] TE Spencer, AM Kelleher, FF Bartol (2019) Development and Function of Uterine Glands in Domestic Animals. *Annual Review of Animal Biosciences* 7 (1):125-147.
- [42] R Nusse (2001) Developmental biology. Making head or tail of Dickkopf. *Nature* 411 (6835):255-256.
- [43] M Peifer, PD McCrea, KJ Green, E Wieschaus, BM Gumbiner (1992) The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin and the Drosophila segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. *J Cell Biol* 118 (3):681-691.
- [44] HS Taylor, GB Vanden Heuvel, P Igarashi (1997) A conserved Hox axis in the mouse and human female reproductive system: late establishment and persistent adult expression of the Hoxa cluster genes. *Biol Reprod* 57 (6):1338-1345.
- [45] A Zanatta, AM Rocha, FM Carvalho, RMA Pereira, HS Taylor, ELA Motta, EC Baracat, PC Serafini (2010) The role of the Hoxa10/HOXA10 gene in the etiology of endometriosis and its related infertility: a review. *J Assist Reprod Genet* 27 (12):701-710.

- [46] K Block, A Kardana, P Igarashi, HS Taylor (2000) In utero diethylstilbestrol (DES) exposure alters Hox gene expression in the developing müllerian system. *FASEB J* 14 (9):1101-1108.
- [47] GV Benson, H Lim, BC Paria, I Satokata, SK Dey, RL Maas (1996) Mechanisms of reduced fertility in Hoxa-10 mutant mice: uterine homeosis and loss of maternal Hoxa-10 expression. *Development* 122 (9):2687-2696.
- [48] RL Gendron, H Paradis, HM Hsieh-Li, DW Lee, S Steven Potter, E Markoff (1997) Abnormal Uterine Stromal and Glandular Function Associated with Maternal Reproductive Defects in Hoxa-11 Null Mice. *Biol Reprod* 56 (5):1097-1105.
- [49] WW Branford, GV Benson, L Ma, RL Maas, SS Potter (2000) Characterization of Hoxa-10/Hoxa-11 Transheterozygotes Reveals Functional Redundancy and Regulatory Interactions. *Developmental Biology* 224 (2):373-387.
- [50] JR Friedman, KH Kaestner (2006) The Foxa family of transcription factors in development and metabolism. *Cell Mol Life Sci* 63 (19-20):2317-2328.
- [51] K Yamagami, N Yamauchi, K Kubota, S Nishimura, VS Chowdhury, K Yamanaka, M Takahashi, S Tabata, M Hattori (2014) Expression and Regulation of Foxa2 in the Rat Uterus during Early Pregnancy. *Journal of Reproduction and Development* advpub.
- [52] SL Ang, J Rossant (1994) HNF-3 beta is essential for node and notochord formation in mouse development. *Cell* 78 (4):561-574.
- [53] DC Weinstein, A Ruiz i Altaba, WS Chen, P Hoodless, VR Prezioso, TM Jessell, JE Darnell (1994) The winged-helix transcription factor HNF-3 beta is required for notochord development in the mouse embryo. *Cell* 78 (4):575-588.
- [54] AM Kelleher, W Peng, JK Pru, CA Pru, FJ DeMayo, TE Spencer (2017) Forkhead box a2 (FOXA2) is essential for uterine function and fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114 (6):E1018-E1026.
- [55] P Wang, S-P Wu, KE Brooks, AM Kelleher, JJ Milano-Foster, FJ DeMayo, TE Spencer (2018) Generation of Mouse for Conditional Expression of Forkhead Box A2. *Endocrinology* 159 (4):1897-1909.
- [56] AM Kelleher, SK Behura, GW Burns, SL Young, FJ DeMayo, TE Spencer (2019) Integrative analysis of the forkhead box A2 (FOXA2) cistrome for the human endometrium. *FASEB J* 33 (7):8543-8554.
- [57] S Córdoba, I Balcells, A Castelló, C Ovilo, JL Noguera, O Timoneda, A Sánchez (2015) Endometrial gene expression profile of pregnant sows with extreme phenotypes for reproductive efficiency. *Scientific Reports* 5 (1):1-15.
- [58] T Shimizu, S Krebs, S Bauersachs, H Blum, E Wolf, A Miyamoto (2010) Actions and interactions of progesterone and estrogen on transcriptome profiles of the bovine endometrium. *Physiological Genomics* 42A (4):290-300.
- [59] J Filant, TE Spencer (2013) Endometrial Glands Are Essential for Blastocyst Implantation and Decidualization in the Mouse Uterus. *Biol Reprod* 88 (4).
- [60] M Villacorte, K Suzuki, A Hirasawa, Y Ohkawa, M Suyama, T Maruyama, D Aoki, Y Ogino, S Miyagawa, T Terabayashi, Y Tomooka, N Nakagata, et al. (2013) β -Catenin signaling regulates Foxa2 expression during endometrial hyperplasia formation. *Oncogene* 32 (29):3477-3482.
- [61] M Beato, A Sánchez-Pacheco (1996) Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocr Rev* 17 (6):587-609.
- [62] S Ellmann, H Sticht, F Thiel, MW Beckmann, R Strick, PL Strissel (2009) Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. *Cell Mol Life Sci* 66 (15):2405-2426.
- [63] JJ Peluso (2018) Nonclassical Steroid Receptors and Their Role in Regulating Female Reproduction, En: *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)*, (Ed: MK Skinner), Oxford: Academic Press, p. 158-164.
- [64] SC Hewitt, KS Korach, KS Korach (2008) Estrogen-regulated genes in the endometrium; 2008. <https://www.taylorfrancis.com/>. Accedido 17 de julio de 2019.
- [65] X Li, BW O'Malley (2003) Unfolding the action of progesterone receptors. *J Biol Chem* 278 (41):39261-39264.
- [66] L-Y Zhang, H Mi, J-K Yan, X-X Yan, L Yang (2017) Pregnancy-associated changes in expression of progesterone receptor and progesterone-induced blocking factor genes in bone marrow of ewes. *Animal Reproduction Science* 186:77-84.

- [67] K Lee, J Wang, and F DeMayo (2008) Progesterone-regulated genes in the endometrium; 2008. <https://www.taylorfrancis.com/>. Accedido 17 de julio de 2019.
- [68] R Li, FJ DeMayo (2018) Steroid Receptors Classical, En: *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)*, (Ed: MK Skinner), Oxford: Academic Press, p. 142-157.
- [69] N Schwartz, A Verma, CB Bivens, Z Schwartz, BD Boyan (2016) Rapid steroid hormone actions via membrane receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1863 (9):2289-2298.
- [70] AK Binder, W Winuthayanon, SC Hewitt, JF Couse, KS Korach (2015) Steroid receptors in the uterus and ovary. *Knobil and Neill's physiology of reproduction, 4th edn Elsevier, San Francisco*:1099-1193.
- [71] JF Couse, KS Korach (1999) Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 20 (3):358-417.
- [72] T Nakajima, Y Tanimoto, M Tanaka, P Chambon, H Watanabe, T Iguchi, T Sato (2015) Neonatal Estrogen Receptor β Is Important in the Permanent Inhibition of Epithelial Cell Proliferation in the Mouse Uterus. *Endocrinology* 156 (9):3317-3328.
- [73] O Wada-Hiraike, H Hiraike, H Okinaga, O Imamov, RPA Barros, A Morani, Y Omoto, M Warner, J-A Gustafsson (2006) Role of estrogen receptor beta in uterine stroma and epithelium: Insights from estrogen receptor beta-/- mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (48):18350-18355.
- [74] TL Greco, TM Duello, J Gorski (1993) Estrogen Receptors, Estradiol, and Diethylstilbestrol in Early Development: The Mouse as a Model for the Study of Estrogen Receptors and Estrogen Sensitivity in Embryonic Development of Male and Female Reproductive Tracts. *Endocr Rev* 14 (1):59-71.
- [75] MM Milesi, J Varayoud, VL Bosquiazzo, M Muñoz-de-Toro, EH Luque (2012) Neonatal exposure to low doses of endosulfan disrupts the expression of proteins regulating uterine development and differentiation. *Reproductive Toxicology* 33 (1):85-93.
- [76] Y Ogasawara, S Okamoto, Y Kitamura, K Matsumoto (1983) Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice, assayed by incorporation of [125I]iododeoxyuridine. *Endocrinology* 113 (2):582-587.
- [77] MK Nanjappa, TI Medrano, AG March, PS Cooke (2015) Neonatal uterine and vaginal cell proliferation and adenogenesis are independent of estrogen receptor 1 (ESR1) in the mouse. *Biol Reprod* 92 (3):78.
- [78] Y Ohta, Y Fukazawa, T Sato, A Suzuki, N Nishimura, T Iguchi (1996) Effect of estrogen on ontogenic expression of progesterone and estrogen receptors in rat uterus. *Zool Sci* 13 (1):143-149.
- [79] JP Lydon, FJ DeMayo, CR Funk, SK Mani, AR Hughes, CA Montgomery, G Shyamala, OM Conneely, BW O'Malley (1995) Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* 9 (18):2266-2278.
- [80] JR Roy, S Chakraborty, TR Chakraborty (2009) Estrogen-like endocrine disrupting chemicals affecting puberty in humans--a review. *Med Sci Monit* 15 (6):RA137-145.
- [81] J Kitajewski, D Sassoon (2000) The emergence of molecular gynecology: homeobox and Wnt genes in the female reproductive tract. *BioEssays* 22 (10):902-910.
- [82] J Varayoud, JG Ramos, M Muñoz-de-Toro, EH Luque (2014) Long-lasting effects of neonatal bisphenol A exposure on the implantation process. *Vitam Horm* 94:253-275.
- [83] CE Reed, SE Fenton (2013) Exposure to diethylstilbestrol during sensitive life stages: a legacy of heritable health effects. *Birth Defects Res C Embryo Today* 99 (2):134-146.
- [84] RT Zoeller, TR Brown, LL Doan, AC Gore, NE Skakkebaek, AM Soto, TJ Woodruff, FS Vom Saal (2012) Endocrine-Disrupting Chemicals and Public Health Protection: A Statement of Principles from The Endocrine Society. *Endocrinology* 153 (9):4097-4110.
- [85] F Anwer, S Chaurasia, AA Khan (2016) Hormonally active agents in the environment: a state-of-the-art review. *Rev Environ Health* 31 (4):415-433.
- [86] H Verdoux, E Devouche, M Tournaire, A Levadou (2017) Impact of prenatal exposure to diethylstilbestrol (DES) on psychological outcome: a national survey of DES daughters and unexposed controls. *Arch Womens Ment Health* 20 (3):389-395.
- [87] Y Combarrous (2017) Endocrine Disruptor Compounds (EDCs) and agriculture: The case of pesticides. *Comptes Rendus Biologies* 340 (9):406-409.
- [88] W Mnif, AIH Hassine, A Bouaziz, A Bartegi, O Thomas, B Roig (2011) Effect of Endocrine Disruptor Pesticides: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 8 (6):2265-2303.

- [89] S-Y Lu, P Lin, W-R Tsai, C-Y Weng (2018) The Pragmatic Strategy to Detect Endocrine-Disrupting Activity of Xenobiotics in Food. *Medicinal Chemistry*.
- [90] A Yahaya, OO Okoh, AI Okoh, AO Adeniji (2017) Occurrences of Organochlorine Pesticides along the Course of the Buffalo River in the Eastern Cape of South Africa and Its Health Implications. *Int J Environ Res Public Health* 14 (11).
- [91] J Patočka, Q Wu, TCC França, TC Ramalho, R Pita, K Kuča, J Patočka, Q Wu, TCC França, TC Ramalho, R Pita, K Kuča (2016) Clinical aspects of the poisoning by the pesticide endosulfan. *Química Nova* 39 (8):987-994.
- [92] D Megson, EJ Reiner, KJ Jobst, FL Dorman, M Robson, J-F Focant (2016) A review of the determination of persistent organic pollutants for environmental forensics investigations. *Analytica Chimica Acta* 941:10-25.
- [93] CASAFE (2010) Informe-Mercado-Fitosanitario-2010.pdf; 2010. <https://www.casafe.org/pdf/2015/ESTADISTICAS/Informe-Mercado-Fitosanitario-2010.pdf>. Accedido 16 de octubre de 2019.
- [94] CM Benbrook (2016) Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe* 28:3.
- [95] 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.
- [96] H Saiyed, A Dewan, V Bhatnagar, U Shenoy, R Shenoy, H Rajmohan, K Patel, R Kashyap, P Kulkarni, B Rajan, B Lakkad (2003) Effect of endosulfan on male reproductive development. *Environ Health Perspect* 111 (16):1958-1962.
- [97] SM Naqvi, C Vaishnavi (1993) Bioaccumulative potential and toxicity of endosulfan insecticide to non-target animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 105 (3):347-361.
- [98] O Ozmen (2011) Pathology of Endosulfan.
- [99] J Weber, CJ Halsall, D Muir, C Teixeira, J Small, K Solomon, M Hermanson, H Hung, T Bidleman (2010) Endosulfan, a global pesticide: A review of its fate in the environment and occurrence in the Arctic. *Science of The Total Environment* 408 (15):2966-2984.
- [100] K Ghosh, B Chatterjee, AG Jayaprasad, SR Kanade (2018) The persistent organochlorine pesticide endosulfan modulates multiple epigenetic regulators with oncogenic potential in MCF-7 cells. *Science of The Total Environment* 624:1612-1622.
- [101] HE Bakouri, A Ouassini, JM Aguado, JU García (2007) Endosulfan Sulfate Mobility in Soil Columns and Pesticide Pollution of Groundwater in Northwest Morocco. *Water Environment Research* 79 (13):2578-2584.
- [102] KSB Miglioranza, M Gonzalez, PM Ondarza, VM Shimabukuro, FI Isla, G Fillmann, JE Aizpún, VJ Moreno (2013) Assessment of Argentinean Patagonia pollution: PBDEs, OCPs and PCBs in different matrices from the Río Negro basin. *Science of The Total Environment* 452:275-285.
- [103] M Gonzalez, KSB Miglioranza, VM Shimabukuro, OMQ Londoño, DE Martinez, JE Aizpún, VJ Moreno (2012) Surface and groundwater pollution by organochlorine compounds in a typical soybean system from the south Pampa, Argentina. *Environ Earth Sci* 65 (2):481-491.
- [104] L Lupi, F Bedmar, DA Wunderlin, KSB Miglioranza (2016) Organochlorine pesticides in agricultural soils and associated biota. *Environ Earth Sci* 75 (6):519.
- [105] C Stoker, MR Repetti, SR García, MA Zayas, GH Galoppo, HR Beldoménico, EH Luque, M Muñoz-de-Toro (2011) Organochlorine compound residues in the eggs of broad-snouted caimans (*Caiman latirostris*) and correlation with measures of reproductive performance. *Chemosphere* 84 (3):311-317.
- [106] MB Jofré, RI Antón, E Caviedes-Vidal (2008) Organochlorine contamination in anuran amphibians of an artificial lake in the semiarid midwest of Argentina. *Arch Environ Contam Toxicol* 55 (3):471-480.
- [107] FD Cid, RI Antón, E Caviedes-Vidal (2007) Organochlorine pesticide contamination in three bird species of the Embalse La Florida water reservoir in the semiarid midwest of Argentina. *Sci Total Environ* 385 (1-3):86-96.

- [108] TH Wu, JE Cañas, TR Rainwater, SG Platt, ST McMurry, TA Anderson (2006) Organochlorine contaminants in complete clutches of Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletii*) eggs from Belize. *Environ Pollut* 144 (1):151-157.
- [109] M Muñoz-de-Toro, HR Beldoménico, SR García, C Stoker, JJ De Jesús, PM Beldoménico, JG Ramos, EH Luque (2006) Organochlorine levels in adipose tissue of women from a littoral region of Argentina. *Environmental Research* 102 (1):107-112.
- [110] B González-Alzaga, M Lacasaña, AF Hernández, JP Arrebola, I López-Flores, F Artacho-Cordón, JP Bonde, N Olea, C Aguilar-Garduño (2018) Serum concentrations of organochlorine compounds and predictors of exposure in children living in agricultural communities from South-Eastern Spain. *Environ Pollut* 237:685-694.
- [111] EV Younglai, WG Foster, EG Hughes, K Trim, JF Jarrell (2002) Levels of Environmental Contaminants in Human Follicular Fluid, Serum, and Seminal Plasma of Couples Undergoing In Vitro Fertilization. *Arch Environ Contam Toxicol* 43 (1):121-126.
- [112] R Kumar, N Pant, SP Srivastava (2000) Chlorinated pesticides and heavy metals in human semen. *Int J Androl* 23 (3):145-149.
- [113] I Cerrillo, A Granada, M-J López-Espinosa, B Olmos, M Jiménez, A Caño, N Olea, M Fátima Olea-Serrano (2005) Endosulfan and its metabolites in fertile women, placenta, cord blood, and human milk. *Environmental Research* 98 (2):233-239.
- [114] MF Fernandez, B Olmos, A Granada, MJ López-Espinosa, J-M Molina-Molina, JM Fernandez, M Cruz, F Olea-Serrano, N Olea (2007) Human exposure to endocrine-disrupting chemicals and prenatal risk factors for cryptorchidism and hypospadias: a nested case-control study. *Environ Health Perspect* 115 Suppl 1:8-14.
- [115] H Shen, KM Main, A-M Andersson, IN Damgaard, HE Virtanen, NE Skakkebaek, J Toppari, K-W Schramm (2008) Concentrations of persistent organochlorine compounds in human milk and placenta are higher in Denmark than in Finland. *Hum Reprod* 23 (1):201-210.
- [116] R Pathak, SG Suke, T Ahmed, RS Ahmed, AK Tripathi, K Guleria, CS Sharma, SD Makhijani, BD Banerjee (2010) Organochlorine pesticide residue levels and oxidative stress in preterm delivery cases. *Hum Exp Toxicol* 29 (5):351-358.
- [117] J Wei, L Zhang, L Ren, J Zhang, Y Yu, J Wang, J Duan, C Peng, Z Sun, X Zhou (2017) Endosulfan inhibits proliferation through the Notch signaling pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Environmental Pollution* 221:26-36.
- [118] J Wei, L Zhang, L Ren, J Zhang, J Liu, J Duan, Y Yu, Y Li, C Peng, X Zhou, Z Sun (2017) Endosulfan induces cell dysfunction through cycle arrest resulting from DNA damage and DNA damage response signaling pathways. *Science of The Total Environment* 589:97-106.
- [119] L Zhang, J Wei, F Guo, J Duan, Y Li, Z Shi, Y Yang, X Zhou, Z Sun (2015) Endosulfan activates the extrinsic coagulation pathway by inducing endothelial cell injury in rats. *Environ Sci Pollut Res Int* 22 (20):15722-15730.
- [120] T Cabaleiro, A Caride, A Romero, A Lafuente (2008) Effects of in utero and lactational exposure to endosulfan in prefrontal cortex of male rats. *Toxicol Lett* 176 (1):58-67.
- [121] A Lafuente, N Pereiro (2013) Neurotoxic effects induced by endosulfan exposure during pregnancy and lactation in female and male rat striatum. *Toxicology* 311 (1-2):35-40.
- [122] V Briz, J-M Molina-Molina, S Sánchez-Redondo, MF Fernández, JO Grimalt, N Olea, E Rodríguez-Farré, C Suñol (2011) Differential estrogenic effects of the persistent organochlorine pesticides dieldrin, endosulfan, and lindane in primary neuronal cultures. *Toxicol Sci* 120 (2):413-427.
- [123] R Sebastian, SC Raghavan (2015) Exposure to Endosulfan can result in male infertility due to testicular atrophy and reduced sperm count. *Cell Death Discov* 1:15020.
- [124] JE Perobelli, MF Martinez, CA da Silva Franchi, CDB Fernandez, JLV de Camargo, WDG Kempinas (2010) Decreased sperm motility in rats orally exposed to single or mixed pesticides. *J Toxicol Environ Health Part A* 73 (13-14):991-1002.
- [125] ND Singh, AK Sharma, P Dwivedi, RD Patil, M Kumar (2007) Citrinin and endosulfan induced maternal toxicity in pregnant Wistar rats: pathomorphological study. *J Appl Toxicol* 27 (6):589-601.

- [126] AM Soto, KL Chung, C Sonnenschein (1994) The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. *Environ Health Perspect* 102 (4):380-383.
- [127] H Kojima, E Katsura, S Takeuchi, K Niiyama, K Kobayashi (2004) Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. *Environmental Health Perspectives* 112 (5):524-531.
- [128] M Ma, C Chen, G Yang, Y Wang, T Wang, Y Li, Y Qian (2019) Combined anti-androgenic effects of mixtures of agricultural pesticides using in vitro and in silico methods. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 186:109652.
- [129] RH Andersen, AM Vinggaard, TH Rasmussen, IM Gjermansen, EC Bonefeld-Jørgensen (2002) Effects of Currently Used Pesticides in Assays for Estrogenicity, Androgenicity, and Aromatase Activity in Vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology* 179 (1):1-12.
- [130] N Sinha, R Narayan, DK Saxena (1997) Effect of endosulfan on the testis of growing rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 58 (1):79-86.
- [131] N Sinha, N Adhikari, D K Saxena (2001) Effect of endosulfan during fetal gonadal differentiation on spermatogenesis in rats. *Environ Toxicol Pharmacol* 10 (1-2):29-32.
- [132] MM Ahmad, M Ahmad (1993) Effects of endosulfan and chlorpyrifos on the reproductive organs and sex hormones of neonatal rats. *Pakistan Journal of Zoology* 25 (1):11-14.
- [133] PR Dalsenter, E Dallegrave, JR Mello, A Langeloh, RT Oliveira, AS Faqi (1999) Reproductive effects of endosulfan on male offspring of rats exposed during pregnancy and lactation. *Hum Exp Toxicol* 18 (9):583-589.
- [134] Z Han, S Jiao, D Kong, Z Shan, X Zhang (2011) Effects of β -endosulfan on the growth and reproduction of zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol Chem* 30 (11):2525-2531.
- [135] I Marshall, S Rutherford (2003) Health-based investigation level for endosulfan in soil, En: *Proceedings of the Fifth National Workshop on the Assessment of Site Contamination*, National Environment Protection Council Service Corporation, Adelaide: A. Langley, M. Gilbey, B. Kennedy (Eds.), p. 217-223.
- [136] ATSDR (2000) Toxicological profile for endosulfan.
- [137] S Mansour, D Mohamed, L Gamet-Payrastre (2014) Effects of indirect exposure of mice pups to endosulfan via their dams during gestation and lactation periods and the ameliorative effect of vitamin E. *Hum Exp Toxicol* 33 (9):911-927.
- [138] J Varayoud, L Monje, T Bernhardt, M Muñoz-de-Toro, EH Luque, JG Ramos (2008) Endosulfan modulates estrogen-dependent genes like a non-uterotrophic dose of 17 β -estradiol. *Reprod Toxicol* 26 (2):138-145.
- [139] PI Ingaramo, MM Milesi, MG Schimpf, JG Ramos, L Vigezzi, M Muñoz-de-Toro, EH Luque, J Varayoud (2016) Endosulfan affects uterine development and functional differentiation by disrupting Wnt7a and β -catenin expression in rats. *Mol Cell Endocrinol* 425:37-47.
- [140] MM Milesi, R Alarcón, 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. *Molecular and Cellular Endocrinology* 401:248-259.
- [141] MM Milesi, J Varayoud, JG Ramos, EH Luque (2017) Uterine ER α epigenetic modifications are induced by the endocrine disruptor endosulfan in female rats with impaired fertility. *Molecular and Cellular Endocrinology* 454:1-11.
- [142] M Castro Berman, DJG Marino, MV Quiroga, H Zagarese (2018) Occurrence and levels of glyphosate and AMPA in shallow lakes from the Pampean and Patagonian regions of Argentina. *Chemosphere* 200:513-522.
- [143] A Székács, B Darvas (2018) Re-registration Challenges of Glyphosate in the European Union. *Front Environ Sci* 6.
- [144] LN Vandenberg, B Blumberg, MN Antoniou, CM Benbrook, L Carroll, T Colborn, LG Everett, M Hansen, PJ Landrigan, BP Lanphear, R Mesnage, FS vom Saal, et al. (2017) Is it time to reassess current safety standards for glyphosate-based herbicides? *J Epidemiol Community Health* 71 (6):613-618.
- [145] I Heap, SO Duke (2018) Overview of glyphosate-resistant weeds worldwide. *Pest Manag Sci* 74 (5):1040-1049.

- [146] TM Mac Loughlin, L Peluso, DJG Marino (2017) Pesticide impact study in the peri-urban horticultural area of Gran La Plata, Argentina. *Sci Total Environ* 598:572-580.
- [147] 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 (1):61-66.
- [148] VC Aparicio, E De Gerónimo, 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 (9):1866-1873.
- [149] AE Ronco, DJG Marino, M Abelando, P Almada, CD Apartin (2016) Water quality of the main tributaries of the Paraná Basin: glyphosate and AMPA in surface water and bottom sediments. *Environ Monit Assess* 188 (8):458.
- [150] RI Bonansea, I Filippi, DA Wunderlin, DJG Marino, MV Amé (2017) The Fate of Glyphosate and AMPA in a Freshwater Endorheic Basin: An Ecotoxicological Risk Assessment. *Toxics* 6 (1).
- [151] M Avila-Vazquez, E Maturano, A Etchegoyen, FS Difilippo, B Maclean (2017) Association between Cancer and Environmental Exposure to Glyphosate. *International Journal of Clinical Medicine* 8 (2):73-85.
- [152] MJ Mendez, SB Aimar, VC Aparicio, NB Ramirez Haberkon, DE Buschiazzo, E De Gerónimo, JL Costa (2017) Glyphosate and Aminomethylphosphonic acid (AMPA) contents in the respirable dust emitted by an agricultural soil of the central semiarid region of Argentina. *Aeolian Research* 29:23-29.
- [153] SH Bai, SM Ogbourne (2016) Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. *Environ Sci Pollut Res Int* 23 (19):18988-19001.
- [154] O Zoller, P Rhyn, H Rupp, JA Zarn, C Geiser (2018) Glyphosate residues in Swiss market foods: monitoring and risk evaluation. *Food Additives & Contaminants: Part B* 11 (2):83-91.
- [155] NR Rodrigues, APF de Souza (2018) Occurrence of glyphosate and AMPA residues in soy-based infant formula sold in Brazil. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 35 (4):723-730.
- [156] J Rendon-von Osten, R Dzul-Caamal (2017) Glyphosate Residues in Groundwater, Drinking Water and Urine of Subsistence Farmers from Intensive Agriculture Localities: A Survey in Hopelchén, Campeche, Mexico. *Int J Environ Res Public Health* 14 (6).
- [157] J Zhao, S Pacenka, J Wu, BK Richards, T Steenhuis, K Simpson, AG Hay (2018) Detection of glyphosate residues in companion animal feeds. *Environmental Pollution* 243:1113-1118.
- [158] MC Arregui, A Lenardón, D Sanchez, MI Maitre, R Scotta, S Enrique (2004) Monitoring glyphosate residues in transgenic glyphosate-resistant soybean. *Pest Manag Sci* 60 (2):163-166.
- [159] C Then (2013) High levels of residues from spraying with glyphosate found in soybeans in Argentina. *TestBiotech background report* 22.
- [160] L Niemann, C Sieke, R Pfeil, R Solecki (2015) A critical review of glyphosate findings in human urine samples and comparison with the exposure of operators and consumers. *J Verbr Lebensm* 10 (1):3-12.
- [161] PJ Mills, I Kania-Korwel, J Fagan, LK McEvoy, GA Laughlin, E Barrett-Connor (2017) Excretion of the Herbicide Glyphosate in Older Adults Between 1993 and 2016. *JAMA* 318 (16):1610-1611.
- [162] A Conrad, C Schröter-Kermani, H-W Hoppe, M Rütger, S Pieper, M Kolossa-Gehring (2017) Glyphosate in German adults - Time trend (2001 to 2015) of human exposure to a widely used herbicide. *Int J Hyg Environ Health* 220 (1):8-16.
- [163] A Wongta, N Sawarng, P Tongchai, K Sutan, T Kerdnoi, T Prapamontol, S Hongsisong (2018) The Pesticide Exposure of People Living in Agricultural Community, Northern Thailand. *J Toxicol* 2018:4168034.
- [164] C Gillezeau, M van Gerwen, RM Shaffer, I Rana, L Zhang, L Sheppard, E Taioli (2019) The evidence of human exposure to glyphosate: a review. *Environ Health* 18 (1):2.
- [165] 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. *Environmental Health* 17 (1):23.
- [166] 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 (3):282-289.

- [167] R Mesnage, C Benbrook, MN Antoniou (2019) Insight into the confusion over surfactant co-formulants in glyphosate-based herbicides. *Food and Chemical Toxicology* 128:137-145.
- [168] R Mesnage, MN Antoniou (2017) Ignoring Adjuvant Toxicity Falsifies the Safety Profile of Commercial Pesticides. *Front Public Health* 5:361.
- [169] N Defarge, E Takács, VL Lozano, R Mesnage, J Spiroux de Vendômois, G-E Seralini, A Székács (2016) Co-Formulants in Glyphosate-Based Herbicides Disrupt Aromatase Activity in Human Cells below Toxic Levels. *Int J Environ Res Public Health* 13 (3).
- [170] TH Pham, L Derian, C Kervarrec, P-Y Kernanec, B Jégou, F Smagulova, A Gely-Pernot (2019) Perinatal exposure to glyphosate and a glyphosate-based herbicide affect spermatogenesis in mice. *Toxicol Sci*.
- [171] 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 (1):126-133.
- [172] S Richard, S Moslemi, H Sipahutar, N Benachour, G-E Seralini (2005) Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. *Environ Health Perspect* 113 (6):716-720.
- [173] VL de Liz Oliveira Cavalli, D Cattani, CE Heinz Rieg, P Pierozan, L Zanatta, E Benedetti Parisotto, D Wilhelm Filho, FR Mena Barreto Silva, R Pessoa-Pureur, A Zamoner (2013) Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. *Free Radic Biol Med* 65:335-346.
- [174] MC Perego, F Caloni, C Cortinovia, LF Schutz, M Albonico, D Tsuzukibashi, LJ Spicer (2017) Influence of a Roundup formulation on glyphosate effects on steroidogenesis and proliferation of bovine granulosa cells in vitro. *Chemosphere* 188:274-279.
- [175] S Thongprakaisang, A Thiantanawat, N Rangkadilok, T Suriyo, J Satayavivad (2013) Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. *Food and Chemical Toxicology* 59 (Supplement C):129-136.
- [176] 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.
- [177] N Benachour, G-E Seralini (2009) Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chem Res Toxicol* 22 (1):97-105.
- [178] G Chaufan, I Coalova, MDC Ríos de Molina (2014) Glyphosate commercial formulation causes cytotoxicity, oxidative effects, and apoptosis on human cells: differences with its active ingredient. *Int J Toxicol* 33 (1):29-38.
- [179] É Clair, R Mesnage, C Travert, G-É Seralini (2012) A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells in vitro, and testosterone decrease at lower levels. *Toxicology in Vitro* 26 (2):269-279.
- [180] E Cassault-Meyer, S Gress, G-É Seralini, I Galeraud-Denis (2014) An acute exposure to glyphosate-based herbicide alters aromatase levels in testis and sperm nuclear quality. *Environ Toxicol Pharmacol* 38 (1):131-140.
- [181] J Varayoud, M Durando, JG Ramos, MM Milesi, PI Ingaramo, M Muñoz-de-Toro, EH Luque (2017) Effects of a glyphosate-based herbicide on the uterus of adult ovariectomized rats. *Environmental Toxicology* 32 (4):1191-1201.
- [182] 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.
- [183] U EPA (2015) EDSP: Weight of Evidence Analysis of Potential Interaction with the Estrogen, Androgen or Thyroid Pathways. Chemical: Glyphosate. Office of Pesticide Programs US EPA. Washington DC, USA, p. .
- [184] D Kubsad, EE Nilsson, SE King, I Sadler-Riggelman, D Beck, MK Skinner (2019) Assessment of Glyphosate Induced Epigenetic Transgenerational Inheritance of Pathologies and Sperm Epimutations: Generational Toxicology. *Sci Rep* 9 (1):6372.
- [185] E Dallegrave, FD Mantese, RT Oliveira, AJM Andrade, PR Dalsenter, A Langeloh (2007) Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. *Arch Toxicol* 81 (9):665-673.

- [186] 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 (4):309-317.
- [187] W Cai, Y Ji, X Song, H Guo, L Han, F Zhang, X Liu, H Zhang, B Zhu, M Xu (2017) Effects of glyphosate exposure on sperm concentration in rodents: A systematic review and meta-analysis. *Environ Toxicol Pharmacol* 55:148-155.
- [188] S Panzacchi, D Mandrioli, F Manservigi, L Bua, L Falcioni, M Spinaci, G Galeati, G Dinelli, R Miglio, A Mantovani, S Lorenzetti, J Hu, et al. (2018) The Ramazzini Institute 13-week study on glyphosate-based herbicides at human-equivalent dose in Sprague Dawley rats: study design and first in-life endpoints evaluation. *Environ Health* 17 (1):52.
- [189] F Manservigi, C Lesseur, S Panzacchi, D Mandrioli, L Falcioni, L Bua, M Manservigi, M Spinaci, G Galeati, A Mantovani, S Lorenzetti, R Miglio, et al. (2019) The Ramazzini Institute 13-week pilot study glyphosate-based herbicides administered at human-equivalent dose to Sprague Dawley rats: effects on development and endocrine system. *Environ Health* 18 (1):15.
- [190] 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* 376:2-14.
- [191] 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.
- [192] PI Ingaramo, J Varayoud, MM Milesi, MG Schimpf, M Muñoz-de-Toro, EH Luque (2016) Effects of neonatal exposure to a glyphosate-based herbicide on female rat reproduction. *Reproduction* 152 (5):403-415.
- [193] J Varayoud, JG Ramos, VL Bosquiazzo, M Muñoz-de-Toro, EH Luque (2008) Developmental Exposure to Bisphenol A Impairs the Uterine Response to Ovarian Steroids in the Adult. *Endocrinology* 149 (11):5848-5860.
- [194] VL Bosquiazzo, J Varayoud, M Muñoz-de-Toro, EH Luque, JG Ramos (2010) Effects of neonatal exposure to bisphenol A on steroid regulation of vascular endothelial growth factor expression and endothelial cell proliferation in the adult rat uterus. *Biol Reprod* 82 (1):86-95.
- [195] GH Galoppo, G Canesini, YE Tavalieri, C Stoker, L Kass, EH Luque, M Muñoz-de-Toro (2017) Bisphenol A disrupts the temporal pattern of histofunctional changes in the female reproductive tract of *Caiman latirostris*. *Gen Comp Endocrinol* 254:75-85.
- [196] 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 (8):2629-2643.
- [197] MM Milesi, V Lorenz, PM Beldomenico, S Vaira, J Varayoud, EH Luque (2019) Response to comments on: Perinatal exposure to a glyphosate-based herbicide impairs female reproductive outcomes and induces second-generation adverse effects in Wistar rats. *Arch Toxicol* 93 (12):3635-3638.
- [198] V Lorenz, MM Milesi, MG Schimpf, EH Luque, J Varayoud (2019) Epigenetic disruption of estrogen receptor alpha is induced by a glyphosate-based herbicide in the preimplantation uterus of rats. *Molecular and Cellular Endocrinology* 480:133-141.
- [199] EE Nilsson, MK Skinner (2015) Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of disease susceptibility. *Translational Research* 165 (1):12-17.
- [200] DJP Barker (2007) The origins of the developmental origins theory. *Journal of Internal Medicine* 261 (5):412-417.
- [201] M Mandy, M Nyirenda (2018) Developmental Origins of Health and Disease: the relevance to developing nations. *Int Health* 10 (2):66-70.
- [202] EH Luque, M Muñoz-de-Toro, JG Ramos (2018) Estrogenic Agonist, En: *Encyclopedia of Reproduction (Second Edition)*, (Ed: MK Skinner), Oxford: Academic Press, p. 753-759.
- [203] CW Schmidt (2013) Uncertain Inheritance: Transgenerational Effects of Environmental Exposures. *Environmental Health Perspectives* 121 (10):A298-A303.
- [204] FF Bartol, AA Wiley, JG Floyd, TL Ott, FW Bazer, CA Gray, TE Spencer (1999) Uterine differentiation as a foundation for subsequent fertility. *J Reprod Fertil Suppl* 54:287-302.

- [205] RL Jirtle, MK Skinner (2007) Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet* 8 (4):253-262.
- [206] JA McLachlan (2016) Environmental signaling: from environmental estrogens to endocrine-disrupting chemicals and beyond. *Andrology* 4 (4):684-694.
- [207] JA McLachlan (2001) Environmental Signaling: What Embryos and Evolution Teach Us About Endocrine Disrupting Chemicals. *Endocr Rev* 22 (3):319-341.
- [208] NR Adams (1995) Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. *J Anim Sci* 73 (5):1509-1515.
- [209] AO Darwash, GE Lamming, JA Woolliams (1999) The potential for identifying heritable endocrine parameters associated with fertility in post-partum dairy cows. *Anim Sci* 68 (2):333-347.
- [210] ML Boerjan, S Freijnagel, SM Rhind, G a. L Meijer (2002) The potential reproductive effects of exposure of domestic ruminants to endocrine disrupting compounds. *Anim Sci* 74 (1):3-12.
- [211] U Magnusson, S Persson (2015) Endocrine Disruptors in Domestic Animal Reproduction: A Clinical Issue? *Reprod Domest Anim* 50 (Suppl 3):15-19.
- [212] G Anifandis, G Amiridis, K Dafopoulos, A Daponte, E Dovolou, E Gavriil, V Gorgogietas, E Kachpani, Z Mamuris, CI Messini, K Vassiou, A-MG Psarra (2017) The In Vitro Impact of the Herbicide Roundup on Human Sperm Motility and Sperm Mitochondria. *Toxics* 6 (1).
- [213] PK Gupta, SV Chandra, DK Saxena (1978) Teratogenic and embryotoxic effects of endosulfan in rats. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 42 (2):150-152.
- [214] MB Hiremath, BB Kaliwal (2002) The anti-implantation action of endosulfan in albino mice: possible mechanisms. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 13 (4):329-340.
- [215] ND Singh, AK Sharma, P Dwivedi, RD Patil, M Kumar (2007) Citrinin and endosulfan induced teratogenic effects in Wistar rats. *J Appl Toxicol* 27 (2):143-151.
- [216] S Kalra, P Dewan, P Batra, T Sharma, V Tyagi, BD Banerjee (2016) Organochlorine pesticide exposure in mothers and neural tube defects in offsprings. *Reproductive Toxicology* 66 (Supplement C):56-60.
- [217] C Warembourg, A Debost-Legrand, N Bonvallot, C Massart, R Garlandezec, C Monfort, E Gaudreau, C Chevrier, S Cordier (2016) Exposure of pregnant women to persistent organic pollutants and cord sex hormone levels. *Human Reproduction* 31 (1):190-198.
- [218] C Monteagudo, M Mariscal-Arcas, L Heras-Gonzalez, D Ibañez-Peinado, A Rivas, F Olea-Serrano (2016) Effects of maternal diet and environmental exposure to organochlorine pesticides on newborn weight in Southern Spain. *Chemosphere* 156:135-142.
- [219] E Diamanti-Kandarakis, J-P Bourguignon, LC Giudice, R Hauser, GS Prins, AM Soto, RT Zoeller, AC Gore (2009) Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr Rev* 30 (4):293-342.
- [220] J Gomes, G Roche (2016) The Role of Estrogens and Estrogenic Metabolites and Male Reproductive Health Disorders, En: *Implications and Consequences of Anthropogenic Pollution in Polar Environments*, Springer, Berlin, Heidelberg, p. 117-156.
- [221] A Rutkowska, D Rachoń, A Milewicz, M Ruchała, M Bolanowski, D Jędrzejuk, T Bednarczuk, M Górska, A Hubalewska-Dydejczyk, BK- Kudła, A Lewiński, W Zgliczyński (2015) Polish Society of Endocrinology Position statement on endocrine disrupting chemicals (EDCs). *Endokrynologia Polska* 66 (3):276-285.
- [222] L Becker, M Scheringer, U Schenker, K Hungerbühler (2011) Assessment of the environmental persistence and long-range transport of endosulfan. *Environmental Pollution* 159 (6):1737-1743.
- [223] SI Grondona, M Gonzalez, DE Martínez, HE Massone, KSB Miglioranza (2019) Assessment of Organochlorine Pesticides in Phreatic Aquifer of Pampean Region, Argentina. *Bull Environ Contam Toxicol* 102 (4):544-549.
- [224] MF Silva-Barni, F Smedes, G Fillmann, KSB Miglioranza (2019) Passive sampling of pesticides and polychlorinated biphenyls along the Quequén Grande River watershed, Argentina. *Environ Toxicol Chem* 38 (2):340-349.
- [225] MD Loewen, S Sharma, G Tomy, F Wang, P Bullock, F Wania (2005) Persistent organic pollutants and mercury in the Himalaya. *Aquatic Ecosystem Health & Management* 8 (3):223-233.
- [226] P Fernández, G Carrera, JO Grimalt (2005) Persistent organic pollutants in remote freshwater ecosystems. *Aquat Sci* 67 (3):263-273.

- [227] Y Su, H Hung, P Blanchard, GW Patton, R Kallenborn, A Konoplev, P Fellin, H Li, C Geen, G Stern, B Rosenberg, LA Barrie (2008) A circumpolar perspective of atmospheric organochlorine pesticides (OCPs): Results from six Arctic monitoring stations in 2000–2003. *Atmospheric Environment* 42 (19):4682-4698.
- [228] ML Ballesteros, KSB Miglioranza, M Gonzalez, G Fillmann, DA Wunderlin, MA Bistoni (2014) Multimatrix measurement of persistent organic pollutants in Mar Chiquita, a continental saline shallow lake. *Sci Total Environ* 490:73-80.
- [229] MF Silva Barni, PM Ondarza, M Gonzalez, R Da Cuña, F Meijide, F Grosman, P Sanzano, FL Lo Nostro, KSB Miglioranza (2016) Persistent organic pollutants (POPs) in fish with different feeding habits inhabiting a shallow lake ecosystem. *Science of The Total Environment* 550:900-909.
- [230] PM Ondarza, M Gonzalez, G Fillmann, KSB Miglioranza (2014) PBDEs, PCBs and organochlorine pesticides distribution in edible fish from Negro River basin, Argentinean Patagonia. *Chemosphere* 94:135-142.
- [231] MFS Barni, M Gonzalez, KSB Miglioranza (2014) Assessment of persistent organic pollutants accumulation and lipid peroxidation in two reproductive stages of wild silverside (*Odontesthes bonariensis*). *Ecotoxicol Environ Saf* 99:45-53.
- [232] MB Romero, P Polizzi, L Chiodi, S Medici, M Blando, M Gerpe (2018) Preliminary Assessment of Legacy and Current-Use Pesticides in Franciscana Dolphins from Argentina. *Bull Environ Contam Toxicol* 101 (1):14-19.
- [233] RH Da Cuña, M Pandolfi, G Genovese, Y Piazza, M Ansaldo, FL Lo Nostro (2013) Endocrine disruptive potential of endosulfan on the reproductive axis of *Cichlasoma dimerus* (Perciformes, Cichlidae). *Aquat Toxicol* 126:299-305.
- [234] RH Da Cuña, G Rey Vázquez, L Dorelle, EM Rodríguez, R Guimarães Moreira, FL Lo Nostro (2016) Mechanism of action of endosulfan as disruptor of gonadal steroidogenesis in the cichlid fish *Cichlasoma dimerus*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 187:74-80.
- [235] Y Piazza, M Pandolfi, R Da Cuña, G Genovese, F Lo Nostro (2015) Endosulfan affects GnRH cells in sexually differentiated juveniles of the perciform *Cichlasoma dimerus*. *Ecotoxicol Environ Saf* 116:150-159.
- [236] YG Piazza, M Pandolfi, FL Lo Nostro (2011) Effect of the organochlorine pesticide endosulfan on GnRH and gonadotrope cell populations in fish larvae. *Arch Environ Contam Toxicol* 61 (2):300-310.
- [237] MPL Chan, S Morisawa, A Nakayama, Y Kawamoto, M Sugimoto, M Yoneda (2005) Toxicokinetics of 14C-endosulfan in male Sprague-Dawley rats following oral administration of single or repeated doses. *Environ Toxicol* 20 (5):533-541.
- [238] RG Menezes, TF Qadir, A Moin, H Fatima, SA Hussain, M Madadin, SB Pasha, FA Al Rubaish, S Senthilkumaran (2017) Endosulfan poisoning: An overview. *Journal of Forensic and Legal Medicine* 51:27-33.
- [239] MA Takshid, AR Tavasuli, Y Heidary, M Keshavarz, H Kargar (2012) Protective effect of vitamins e and C on endosulfan-induced reproductive toxicity in male rats. *Iran J Med Sci* 37 (3):173-180.
- [240] S Kalender, Y Kalender, A Ogutcu, M Uzunhisarcikli, D Durak, F Açikgoz (2004) Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: the protective effect of vitamin E. *Toxicology* 202 (3):227-235.
- [241] Y Lu, K Morimoto, T Takeshita, T Takeuchi, T Saito (2000) Genotoxic Effects of α -Endosulfan and β -Endosulfan on Human HepG2 Cells. *Environmental Health Perspectives* 108 (6):559-561.
- [242] VM Pereira, JW Bortolotto, LW Kist, MB de Azevedo, RS Fritsch, R da L Oliveira, TCB Pereira, CD Bonan, MR Vianna, MR Bogo (2012) Endosulfan exposure inhibits brain AChE activity and impairs swimming performance in adult zebrafish (*Danio rerio*). *NeuroToxicology* 33 (3):469-475.
- [243] N Choudhary, SC Joshi (2003) Reproductive Toxicity of Endosulfan in Male Albino Rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 70 (2):0285-0289.
- [244] N Wang, Y Xu, X-Q Zhou, Y-H Wu, S-L Li, X Qiao, Y-B Li, Z-W Sun (2016) Protective effects of testosterone propionate on reproductive toxicity caused by Endosulfan in male mice. *Environ Toxicol* 31 (2):142-153.
- [245] JJ Lohmiller, SP Swing (2006) Chapter 6 - Reproduction and Breeding, En: *The Laboratory Rat (Second Edition)*, (Eds: MA Suckow), SH Weisbroth), CL Franklin), Burlington: Academic Press, p. 147-164.
- [246] J Cha, X Sun, SK Dey (2012) Mechanisms of implantation: strategies for successful pregnancy. *Nat Med* 18 (12):1754-1767.

- [247] O Shynlova, A Oldenhof, A Dorogin, Q Xu, J Mu, N Nashman, SJ Lye (2006) Myometrial apoptosis: activation of the caspase cascade in the pregnant rat myometrium at midgestation. *Biol Reprod* 74 (5):839-849.
- [248] A Franczak, B Wojciechowicz, J Kolakowska, K Zglejc, G Kotwica (2014) Transcriptomic analysis of the myometrium during peri-implantation period and luteolysis—the study on the pig model. *Funct Integr Genomics* 14 (4):673-682.
- [249] S Jaffer, O Shynlova, S Lye (2009) Mammalian Target of Rapamycin Is Activated in Association with Myometrial Proliferation during Pregnancy. *Endocrinology* 150 (10):4672-4680.
- [250] OA Mohamed, M Jonnaert, C Labelle-Dumais, K Kuroda, HJ Clarke, D Dufort (2005) Uterine Wnt/ β -catenin signaling is required for implantation. *PNAS* 102 (24):8579-8584.
- [251] O Shynlova, P Tsui, S Jaffer, SJ Lye (2009) Integration of endocrine and mechanical signals in the regulation of myometrial functions during pregnancy and labour. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 144 Suppl 1:S2-10.
- [252] S Mesiano, TN Welsh (2007) Steroid hormone control of myometrial contractility and parturition. *Semin Cell Dev Biol* 18 (3):321-331.
- [253] Y Fang, Z Nie, Q Die, Y Tian, F Liu, J He, Q Huang (2016) Spatial distribution, transport dynamics, and health risks of endosulfan at a contaminated site. *Environ Pollut* 216:538-547.
- [254] V Singh, N Singh (2014) Uptake and accumulation of endosulfan isomers and its metabolite endosulfan sulfate in naturally growing plants of contaminated area. *Ecotoxicol Environ Saf* 104:189-193.
- [255] P Kumar, SP Singh, D Madhukar, AM Kotresh (2009) Determination of endosulfan residues in buffalo meat using high performance liquid chromatography. *Buffalo Bulletin* 28 (4):188-197.
- [256] A Singh, SK Nag, S Singh (2015) Persistent organochlorine pesticide residue in tissues and blood of goat. *Journal of Applied Animal Research* 43 (3):366-371.
- [257] GS Montes, EH Luque (1988) Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Acta Anat (Basel)* 133 (3):192-199.
- [258] LCU Junqueira, L Junqueira (1983) Técnicas básicas de citología e histología. São Paulo: Santos.
- [259] 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 (3):304-312.
- [260] 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 (3):735-742.
- [261] 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 (4):333-339.
- [262] JG Ramos, J Varayoud, C Sonnenschein, AM Soto, M Muñoz De Toro, EH Luque (2001) Prenatal exposure to low doses of bisphenol A alters the periductal stroma and glandular cell function in the rat ventral prostate. *Biol Reprod* 65 (4):1271-1277.
- [263] L Vigezzi, JG Ramos, L Kass, MV Tschopp, M Muñoz-de-Toro, EH Luque, VL Bosquiazzo (2016) A deregulated expression of estrogen-target genes is associated with an altered response to estradiol in aged rats perinatally exposed to bisphenol A. *Mol Cell Endocrinol* 426:33-42.
- [264] ER Weibel (1969) Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol* 26:235-302.
- [265] HJ Gundersen, TF Bendtsen, L Korbo, N Marcussen, A Møller, K Nielsen, JR Nyengaard, B Pakkenberg, FB Sørensen, A Vesterby (1988) Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96 (5):379-394.
- [266] P Chomczynski, N Sacchi (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162 (1):156-159.
- [267] O Shynlova, P Tsui, A Dorogin, BL Langille, SJ Lye (2007) Insulin-like growth factors and their binding proteins define specific phases of myometrial differentiation during pregnancy in the rat. *Biol Reprod* 76 (4):571-578.
- [268] R Higuchi, C Fockler, G Dollinger, R Watson (1993) Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Nature Biotechnology* 11 (9):1026.

- [269] Š Čikoš, A Bukovská, J Koppel (2007) Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Molecular Biology* 8:113.
- [270] RR Favaro, RM Salgado, PR Raspantini, ZB Fortes, TMT Zorn (2010) Effects of long-term diabetes on the structure and cell proliferation of the myometrium in the early pregnancy of mice. *Int J Exp Pathol* 91 (5):426-435.
- [271] J Varayoud, JG Ramos, VL Bosquiazzo, M Lower, M Muñoz-de-Toro, EH Luque (2011) Neonatal exposure to bisphenol A alters rat uterine implantation-associated gene expression and reduces the number of implantation sites. *Endocrinology* 152 (3):1101-1111.
- [272] LC Rockwell, S Pillai, CE Olson, RD Koos (2002) Inhibition of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor action blocks estrogen-induced uterine edema and implantation in rodents. *Biol Reprod* 67 (6):1804-1810.
- [273] T Tomimatsu, K Mimura, M Endo, K Kumasawa, T Kimura (2017) Pathophysiology of preeclampsia: an angiogenic imbalance and long-lasting systemic vascular dysfunction. *Hypertens Res* 40 (4):305-310.
- [274] CJ Shawber, L Lin, M Gnarra, MV Sauer, VE Papaioannou, JK Kitajewski, NC Douglas (2015) Vascular Notch proteins and Notch signaling in the peri-implantation mouse uterus. *Vasc Cell* 7.
- [275] A Zenclussen, N Meyer, A Schumacher, J Pollheimer (2017) Simultaneous ablation of natural killer cells and mast cells leads to poor uterine vascularization that compromises fetal-well being. *The Journal of Immunology* 198 (1 Supplement):149.14-149.14.
- [276] C Canlet, M Tremblay-Franco, R Gautier, J Molina, B Métais, F Blas-Y Estrada, L Gamet-Payrastre (2013) Specific metabolic fingerprint of a dietary exposure to a very low dose of endosulfan. *J Toxicol* 2013:545802.
- [277] C Juntarawijit, Y Juntarawijit (2018) Association between diabetes and pesticides: a case-control study among Thai farmers. *Environ Health Prev Med* 23 (1):3.
- [278] O El-Mounayri, JW Triplett, CW Yates, BP Herring (2005) Regulation of smooth muscle-specific gene expression by homeodomain proteins, Hoxa10 and Hoxb8. *J Biol Chem* 280 (27):25854-25863.
- [279] L Ma, GV Benson, H Lim, SK Dey, RL Maas (1998) Abdominal B(AbdB)HoxaGenes: Regulation in Adult Uterus by Estrogen and Progesterone and Repression in Müllerian Duct by the Synthetic Estrogen Diethylstilbestrol (DES). *Developmental Biology* 197 (2):141-154.
- [280] X Fei, H Chung, HS Taylor (2005) Methoxychlor Disrupts Uterine Hoxa10 Gene Expression. *Endocrinology* 146 (8):3445-3451.
- [281] CC Smith, HS Taylor (2007) Xenoestrogen exposure imprints expression of genes (Hoxa10) required for normal uterine development. *FASEB J* 21 (1):239-246.
- [282] R Ma, DA Sassoon (2006) PCBs Exert an Estrogenic Effect through Repression of the Wnt7a Signaling Pathway in the Female Reproductive Tract. *Environmental Health Perspectives* 114 (6):898-904.
- [283] S Katayama, K Ashizawa, T Fukuhara, M Hiroyasu, Y Tsuzuki, H Tatamoto, T Nakada, K Nagai (2006) Differential Expression Patterns of Wnt and β -Catenin/TCF Target Genes in the Uterus of Immature Female Rats Exposed to 17 α -Ethinyl Estradiol. *Toxicol Sci* 91 (2):419-430.
- [284] U Tiemann (2008) In vivo and in vitro effects of the organochlorine pesticides DDT, TCPM, methoxychlor, and lindane on the female reproductive tract of mammals: A review. *Reproductive Toxicology* 25 (3):316-326.
- [285] BC Ryan, AK Hotchkiss, KM Crofton, LE Gray (2010) In Utero and Lactational Exposure to Bisphenol A, In Contrast to Ethinyl Estradiol, Does Not Alter Sexually Dimorphic Behavior, Puberty, Fertility, and Anatomy of Female LE Rats. *Toxicol Sci* 114 (1):133-148.
- [286] DB Sager, DM Girard (1994) Long-Term Effects on Reproductive Parameters in Female Rats after Translactational Exposure to PCBs. *Environmental Research* 66 (1):52-76.
- [287] N Salomonis, N Cotte, AC Zambon, KS Pollard, K Vranizan, SW Doniger, G Dolganov, BR Conklin (2005) Identifying genetic networks underlying myometrial transition to labor. *Genome Biol* 6 (2):R12.
- [288] K Noble, J Zhang, S Wray (2006) Lipid rafts, the sarcoplasmic reticulum and uterine calcium signalling: an integrated approach. *J Physiol (Lond)* 570 (Pt 1):29-35.
- [289] BM Sanborn, C-Y Ku, S Shlykov, L Babich (2005) Molecular signaling through G-protein-coupled receptors and the control of intracellular calcium in myometrium. *J Soc Gynecol Investig* 12 (7):479-487.

- [290] B Döring, O Shynlova, P Tsui, D Eckardt, U Janssen-Bienhold, F Hofmann, S Feil, R Feil, SJ Lye, K Willecke (2006) Ablation of connexin43 in uterine smooth muscle cells of the mouse causes delayed parturition. *J Cell Sci* 119 (Pt 9):1715-1722.
- [291] K Willecke, J Eiberger, J Degen, D Eckardt, A Romualdi, M Güldenagel, U Deutsch, G Söhl (2002) Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biol Chem* 383 (5):725-737.
- [292] E Winterhager, R Stutenkemper, O Traub, E Beyer, K Willecke (1991) Expression of different connexin genes in rat uterus during decidualization and at term. *Eur J Cell Biol* 55 (1):133-142.
- [293] J Mlynarczuk, MH Wrobel, J Kotwica (2010) Effect of environmental pollutants on oxytocin synthesis and secretion from corpus luteum and on contractions of uterus from pregnant cows. *Toxicol Appl Pharmacol* 247 (3):243-249.
- [294] MH Wrobel, P Bedziechowski, J Mlynarczuk, J Kotwica (2014) Impairment of uterine smooth muscle contractions and prostaglandin secretion from cattle myometrium and corpus luteum in vitro is influenced by DDT, DDE and HCH. *Environ Res* 132:54-61.
- [295] M Wrobel, J Mlynarczuk, J Kotwica (2009) The adverse effect of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and its metabolite (DDE) on the secretion of prostaglandins and oxytocin in bovine cultured ovarian and endometrial cells. *Reproductive Toxicology* 27 (1):72-78.
- [296] MH Wrobel (2018) Do chlorinated insecticides (aldrin and DDT) or products of their transformations (dieldrin and DDE) impair signal transfer from regulators (oxytocin and relaxin) of bovine myometrium motility in vitro? *Environmental Research* 167:234-239.
- [297] M Elmes, A Szyszka, C Pauliat, B Clifford, Z Daniel, Z Cheng, C Wathes, S McMullen (2015) Maternal age effects on myometrial expression of contractile proteins, uterine gene expression, and contractile activity during labor in the rat. *Physiological Reports* 3 (4):e12305.
- [298] B-S An, H-J Ahn, H-S Kang, E-M Jung, H Yang, E-J Hong, E-B Jeung (2013) Effects of estrogen and estrogenic compounds, 4-tert-octylphenol, and bisphenol A on the uterine contraction and contraction-associated proteins in rats. *Molecular and Cellular Endocrinology* 375 (1):27-34.
- [299] JL Cook, DB Zaragoza, DH Sung, DM Olson (2000) Expression of Myometrial Activation and Stimulation Genes in a Mouse Model of Preterm Labor: Myometrial Activation, Stimulation, and Preterm Labor. *Endocrinology* 141 (5):1718-1728.
- [300] JM Lee, JR Mayall, A Chevalier, D Van Helden, JC Horvat, PM Hansbro, P Jobling (2018) Chlamydia muridarum infection differentially changes smooth muscle contractility and responses to prostaglandins in uterus and cervix. *BioRxiv*:448340.
- [301] AM Blanks, A Shmygol, S Thornton (2007) Regulation of oxytocin receptors and oxytocin receptor signaling. *Semin Reprod Med* 25 (1):52-59.
- [302] D Mota-Rojas, AA Nava-Ocampo, ME Trujillo, Y Velázquez-Armenta, R Ramírez-Necoechea, J Martínez-Burnes, y M Alonso-Spilsbury (2005) Dose minimization study of oxytocin in early labor in sows: Uterine activity and fetal outcome. *Reproductive Toxicology* 20 (2):255-259.
- [303] D Mota-Rojas, J Martínez-Burnes, MaE Trujillo, A López, AM Rosales, R Ramírez, H Orozco, A Merino, M Alonso-Spilsbury (2005) Uterine and fetal asphyxia monitoring in parturient sows treated with oxytocin. *Animal Reproduction Science* 86 (1):131-141.
- [304] CA Grotegut, L Mao, SL Pierce, GK Swamy, RP Heine, AP Murtha (2016) Enhanced Uterine Contractility and Stillbirth in Mice Lacking G Protein-Coupled Receptor Kinase 6 (GRK6): Implications for Oxytocin Receptor Desensitization. *Mol Endocrinol* 30 (4):455-468.
- [305] HN Aguilar, BF Mitchell (2010) Physiological pathways and molecular mechanisms regulating uterine contractility. *Hum Reprod Update* 16 (6):725-744.
- [306] V Tyagi, N Garg, MD Mustafa, BD Banerjee, K Guleria (2015) Organochlorine pesticide levels in maternal blood and placental tissue with reference to preterm birth: a recent trend in North Indian population. *Environ Monit Assess* 187 (7):471.
- [307] A Embrandiri, RP Singh, HM Ibrahim, AB Khan (2012) An epidemiological study on the health effects of endosulfan spraying on cashew plantations in Kasaragod District, Kerala, India. *Asian journal of epidemiology* 5 (1):22-31.

- [308] L Lupi, KSB Miglioranza, VC Aparicio, D Marino, F Bedmar, DA Wunderlin (2015) Occurrence of glyphosate and AMPA in an agricultural watershed from the southeastern region of Argentina. *Sci Total Environ* 536:687-694.
- [309] WR Reeves, MK McGuire, M Stokes, JL Vicini (2019) Assessing the Safety of Pesticides in Food: How Current Regulations Protect Human Health. *Adv Nutr* 10 (1):80-88.
- [310] (S. f.) Cuáles son las principales razas y dónde se producen los ovinos en la Argentina. <https://www.infocampo.com.ar/cuales-son-las-principales-razas-y-donde-se-producen-los-ovinos-en-la-argentina/>. Accedido 3 de enero de 2020.
- [311] KD Sinclair, KMD Rutherford, JM Wallace, JM Brameld, R Stöger, R Alberio, D Sweetman, DS Gardner, VEA Perry, CL Adam, CJ Ashworth, JE Robinson, et al. (2016) Epigenetics and developmental programming of welfare and production traits in farm animals. *Reprod Fertil Dev* 28 (10):1443-1478.
- [312] N Rajapakse, E Silva, A Kortenkamp (2002) Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action. *Environ Health Perspect* 110 (9):917-921.
- [313] 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 (3):317-329.
- [314] 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 (4).
- [315] SM Rhind (2002) Endocrine disrupting compounds and farm animals: their properties, actions and routes of exposure. *Domestic Animal Endocrinology* 23 (1):179-187.
- [316] SM Rhind, MT Rae, AN Brooks (2003) Environmental influences on the fetus and neonate—timing, mechanisms of action and effects on subsequent adult function. *Domest Anim Endocrinol* 25 (1):3-11.
- [317] A Kasprzak, W Kwasniewski, A Adamek, A Gozdicka-Jozefiak (2017) Insulin-like growth factor (IGF) axis in cancerogenesis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 772:78-104.
- [318] K Hayashi, KD Carpenter, CA Gray, TE Spencer (2003) The activin-follistatin system in the neonatal ovine uterus. *Biol Reprod* 69 (3):843-850.
- [319] JF Ethier, JK Findlay (2001) Roles of activin and its signal transduction mechanisms in reproductive tissues. *Reproduction* 121 (5):667-675.
- [320] JP de Winter, P ten Dijke, CJM de Vries, TAE van Achterberg, H Sugino, P de Waele, D Huylebroeck, K Verschueren, AJM van den Eijnden-van Raaij (1996) Follistatins neutralize activin bioactivity by inhibition of activin binding to its type II receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology* 116 (1):105-114.
- [321] KA Burns, LM Zorrilla, KJ Hamilton, CE Reed, LS Birnbaum, KS Korach (2013) A single gestational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin disrupts the adult uterine response to estradiol in mice. *Toxicol Sci* 136 (2):514-526.
- [322] FS Vom Saal, FH Bronson (1978) In Utero Proximity of Female Mouse Fetuses to Males: Effect on Reproductive Performance during Later Life. *Biol Reprod* 19 (4):842-853.
- [323] JL Vicini, WR Reeves, JT Swarthout, KA Karberg (2019) Glyphosate in livestock: feed residues and animal health. *J Anim Sci* 97 (11):4509-4518.
- [324] OE Rivera, J Varayoud, HA Rodríguez, CG Santamaría, VL Bosquiazzo, M Osti, NM Belmonte, M Muñoz-de-Toro, EH Luque (2015) Neonatal exposure to xenoestrogens impairs the ovarian response to gonadotropin treatment in lambs. *Reproduction* 149 (6):645-655.
- [325] LD Demonte, N Michlig, M Gaggiotti, CG Adam, HR Beldoménico, MR Repetti (2018) Determination of glyphosate, AMPA and glufosinate in dairy farm water from Argentina using a simplified UHPLC-MS/MS method. *Sci Total Environ* 645:34-43.
- [326] J Schindelin, I Arganda-Carreras, E Frise, V Kaynig, M Longair, T Pietzsch, S Preibisch, C Rueden, S Saalfeld, B Schmid, J-Y Tinevez, DJ White, et al. (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9 (7):676-682.
- [327] A Meikle, C Tasende, C Sosa, EG Garófalo (2004) The role of sex steroid receptors in sheep female reproductive physiology. *Reprod Fertil Dev* 16 (4):385-394.

- [328] K Hayashi, KD Carpenter, TH Welsh, RC Burghardt, LJ Spicer, TE Spencer (2005) The IGF system in the neonatal ovine uterus. *Reproduction* 129 (3):337-347.
- [329] A Anadón, MR Martínez-Larrañaga, MA Martínez, VJ Castellano, M Martínez, MT Martín, MJ Nozal, JL Bernal (2009) Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. *Toxicol Lett* 190 (1):91-95.
- [330] 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 (5):1-7.
- [331] AL Van Eenennaam, AE Young (2017) Detection of dietary DNA, protein, and glyphosate in meat, milk, and eggs. *J Anim Sci* 95 (7):3247-3269.
- [332] 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. *Journal of Dairy Science* 99 (7):5318-5324.
- [333] RL Baldwin, EE Connor (2017) Rumen Function and Development. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 33 (3):427-439.
- [334] 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 (3):758-764.
- [335] KR Solomon (2016) Glyphosate in the general population and in applicators: a critical review of studies on exposures. *Critical Reviews in Toxicology* 46 (sup1):21-27.
- [336] K Hayashi, TE Spencer (2005) Estrogen disruption of neonatal ovine uterine development: effects on gene expression assessed by suppression subtraction hybridization. *Biol Reprod* 73 (4):752-760.
- [337] MB Padua, S Tekin, TE Spencer, PJ Hansen (2005) Actions of progesterone on uterine immunosuppression and endometrial gland development in the uterine gland knockout (UGKO) ewe. *Mol Reprod Dev* 71 (3):347-357.
- [338] AG Morrison, JJ Callanan, NP Evans, TC Aldridge, T Sweeney (2003) Effects of endocrine disrupting compounds on the pathology and oestrogen receptor alpha and beta distribution in the uterus and cervix of ewe lambs. *Domest Anim Endocrinol* 25 (4):329-343.
- [339] M Kwiatkowska, E Reszka, K Woźniak, E Jabłońska, J Michałowicz, B Bukowska (2017) DNA damage and methylation induced by glyphosate in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Food and Chemical Toxicology* 105 (Supplement C):93-98.
- [340] A Besson, SF Dowdy, JM Roberts (2008) CDK Inhibitors: Cell Cycle Regulators and Beyond. *Developmental Cell* 14 (2):159-169.
- [341] M Abbastabar, M Kheyrollah, K Azizian, N Bagherlou, SS Tehrani, M Maniati, A Karimian (2018) Multiple functions of p27 in cell cycle, apoptosis, epigenetic modification and transcriptional regulation for the control of cell growth: A double-edged sword protein. *DNA Repair* 69:63-72.
- [342] KD Carpenter, CA Gray, S Noel, A Gertler, FW Bazer, TE Spencer (2003) Prolactin regulation of neonatal ovine uterine gland morphogenesis. *Endocrinology* 144 (1):110-120.
- [343] PH van der Horst, Y Wang, M van der Zee, CW Burger, LJ Blok (2012) Interaction between sex hormones and WNT/ β -catenin signal transduction in endometrial physiology and disease. *Molecular and Cellular Endocrinology* 358 (2):176-184.
- [344] G Canesini, C Stoker, GH Galoppo, ML Durando, MV Tschopp, EH Luque, MM Muñoz-de-Toro, JG Ramos (2018) Temperature- vs. estrogen-induced sex determination in Caiman latirostris embryos: Both females, but with different expression patterns of key molecules involved in ovarian development. *Gen Comp Endocrinol* 259:176-188.
- [345] L Kass, GA Altamirano, VL Bosquiazzo, EH Luque, M Muñoz-de-Toro (2012) Perinatal exposure to xenoestrogens impairs mammary gland differentiation and modifies milk composition in Wistar rats. *Reprod Toxicol* 33 (3):390-400.
- [346] MD Larrea, SA Wander, J Slingerland (2009) p27 as Jekyll and Hyde: Regulation of cell cycle and cell motility. *Cell Cycle* 8 (21):3455-3461.
- [347] P Amutha, T Rajkumar (2017) Role of Insulin-like Growth Factor, Insulin-like Growth Factor Receptors, and Insulin-like Growth Factor-binding Proteins in Ovarian Cancer. *Indian J Med Paediatr Oncol* 38 (2):198-206.

- [348] S-M Ho, A Cheong, MA Adgent, J Veevers, AA Suen, NNC Tam, Y-K Leung, WN Jefferson, CJ Williams (2017) Environmental Factors, Epigenetics, and Developmental Origin of Reproductive Disorders. *Reprod Toxicol* 68:85-104.
- [349] L Vigezzi, VL Bosquiazzo, L Kass, JG Ramos, M Muñoz-de-Toro, EH Luque (2015) Developmental exposure to bisphenol A alters the differentiation and functional response of the adult rat uterus to estrogen treatment. *Reprod Toxicol* 52:83-92.
- [350] PI Ingaramo, M Guerrero Schimpf, MM Milesi, EH Luque, J Varayoud (2019) Acute uterine effects and long-term reproductive alterations in postnatally exposed female rats to a mixture of commercial formulations of endosulfan and glyphosate. *Food and Chemical Toxicology* 134:110832.
- [351] MJ Kim, V Pelloux, E Guyot, J Tordjman, L-C Bui, A Chevallier, C Forest, C Benelli, K Clément, R Barouki (2012) Inflammatory pathway genes belong to major targets of persistent organic pollutants in adipose cells. *Environ Health Perspect* 120 (4):508-514.
- [352] BC Spink, JA Bennett, BT Pentecost, N Lostritto, NA Englert, GK Benn, AK Goodenough, RJ Turesky, DC Spink (2009) Long-term estrogen exposure promotes carcinogen bioactivation, induces persistent changes in gene expression, and enhances the tumorigenicity of MCF-7 human breast cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 240 (3):355-366.
- [353] T Buhrke, K Schultrich, A Braeuning, A Lampen (2017) Comparative analysis of transcriptomic responses to repeated-dose exposure to 2-MCPD and 3-MCPD in rat kidney, liver and testis. *Food and Chemical Toxicology* 106:36-46.
- [354] L-L Luo, L Zhao, Y-X Wang, X-P Tian, M Xi, J-X Shen, L-R He, Q-Q Li, S-L Liu, P Zhang, D Xie, M-Z Liu (2015) Insulin-like growth factor binding protein-3 is a new predictor of radiosensitivity on esophageal squamous cell carcinoma. *Scientific Reports* 5:17336.
- [355] L Peng, J Wang, PJ Malloy, D Feldman (2008) The role of insulin-like growth factor binding protein-3 in the growth inhibitory actions of androgens in LNCaP human prostate cancer cells. *International Journal of Cancer* 122 (3):558-566.
- [356] A Yoshida, RR Newbold, D Dixon (2000) Abnormal Cell Differentiation and p21 Expression of Endometrial Epithelial Cells Following Developmental Exposure to Diethylstilbestrol (DES). *Toxicol Pathol* 28 (2):237-245.
- [357] A Yoshida, RR Newbold, D Dixon (1999) Effects of Neonatal Diethylstilbestrol (DES) Exposure on Morphology and Growth Patterns of Endometrial Epithelial Cells in CD-1 Mice. *Toxicol Pathol* 27 (3):325-333.
- [358] A Bilancio, P Bontempo, MD Donato, M Conte, P Giovannelli, L Altucci, A Migliaccio, G Castoria (2017) Bisphenol A induces cell cycle arrest in primary and prostate cancer cells through EGFR/ERK/p53 signaling pathway activation. *Oncotarget* 8 (70):115620-115631.
- [359] H-S Lee, E-J Park, J-H Oh, G Moon, M-S Hwang, S-Y Kim, M-K Shin, Y-H Koh, J-H Suh, H-S Kang, J-H Jeon, G-S Rhee, et al. (2014) Bisphenol A exerts estrogenic effects by modulating CDK1/2 and p38 MAP kinase activity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 78 (8):1371-1375.
- [360] K Hayashi, KD Carpenter, TE Spencer (2004) Neonatal Estrogen Exposure Disrupts Uterine Development in the Postnatal Sheep. *Endocrinology* 145 (7):3247-3257.
- [361] M Yoshida, A Takenaka, S Katsuda, Y Kurokawa, A Maekawa (2002) Neonatal exposure to p-tert-octylphenol causes abnormal expression of estrogen receptor alpha and subsequent alteration of cell proliferating activity in the developing Donryu rat uterus. *Toxicol Pathol* 30 (3):357-364.
- [362] S Cariou, JCH Donovan, WM Flanagan, A Milic, N Bhattacharya, JM Slingerland (2000) Down-regulation of p21WAF1/CIP1 or p27Kip1 abrogates antiestrogen-mediated cell cycle arrest in human breast cancer cells. *PNAS* 97 (16):9042-9046.
- [363] F Gizard, R Robillard, P Gervois, A Faucompré, F Révillion, J-P Peyrat, WD Hum, B Staels (2005) Progesterone inhibits human breast cancer cell growth through transcriptional upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 gene. *FEBS Letters* 579 (25):5535-5541.
- [364] T Shiozawa, A Horiuchi, K Kato, M Obinata, I Konishi, S Fujii, T Nikaido (2001) Up-Regulation of p27Kip1 by Progestins Is Involved in the Growth Suppression of the Normal and Malignant Human Endometrial Glandular Cells. *Endocrinology* 142 (10):4182-4188.

- [365] M Guerrero Schimpf, MM Milesi, EH Luque, J Varayoud (2018) Glyphosate-based herbicide enhances the uterine sensitivity to estradiol in rats. *J Endocrinol* 239 (2):197-213.
- [366] JF Couse, D Dixon, M Yates, AB Moore, L Ma, R Maas, KS Korach (2001) Estrogen Receptor- α Knockout Mice Exhibit Resistance to the Developmental Effects of Neonatal Diethylstilbestrol Exposure on the Female Reproductive Tract. *Developmental Biology* 238 (2):224-238.
- [367] GE Akbas, J Song, HS Taylor (2004) A HOXA10 estrogen response element (ERE) is differentially regulated by 17 beta-estradiol and diethylstilbestrol (DES). *J Mol Biol* 340 (5):1013-1023.
- [368] V Besnard, SE Wert, WM Hull, JA Whitsett (2004) Immunohistochemical localization of Foxa1 and Foxa2 in mouse embryos and adult tissues. *Gene Expr Patterns* 5 (2):193-208.
- [369] NR Scott, H Chen, H Cui (2018) Nanotechnology Applications and Implications of Agrochemicals toward Sustainable Agriculture and Food Systems. *J Agric Food Chem* 66 (26):6451-6456.
- [370] JH Westwood, R Charudattan, SO Duke, SA Fennimore, P Marrone, DC Slaughter, C Swanton, R Zollinger (2018) Weed Management in 2050: Perspectives on the Future of Weed Science. *Weed Sci* 66 (3):275-285.
- [371] L Lupi, F Bedmar, DA Wunderlin, KSB Miglioranza (2019) Levels of organochlorine pesticides in soils, mesofauna and streamwater from an agricultural watershed in Argentina. *Environ Earth Sci* 78 (18):569.
- [372] N Choudhary, M Sharma, P Verma, SC Joshi (2003) Hepato and nephrotoxicity in rat exposed to endosulfan. *J Environ Biol* 24 (3):305-308.
- [373] R Ghosh, M Siddarth, N Singh, V Tyagi, PK Kare, BD Banerjee, OP Kalra, AK Tripathi (2017) Organochlorine pesticide level in patients with chronic kidney disease of unknown etiology and its association with renal function. *Environ Health Prev Med* 22 (1):49.
- [374] J-L Wei, L-S Zhang, J-J Wang, F-Z Guo, Y-B Li, X-Q Zhou, Z-W Sun (2015) Endosulfan inducing blood hypercoagulability and endothelial cells apoptosis via the death receptor pathway in Wistar rats. *Toxicol Res* 4 (5):1282-1288.
- [375] S Avci, A Basaran, S Genç, S Ozkan, ED Arslan (2019) Endosulfan induced cardiac arrest treated with intravenous lipid emulsion. *Acta Biomed* 89 (4):573-575.
- [376] MH Silva, D Gammon (2009) An assessment of the developmental, reproductive, and neurotoxicity of endosulfan. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology* 86 (1):1-28.
- [377] E Woźniak, P Sicińska, J Michałowicz, K Woźniak, E Reszka, B Huras, J Zakrzewski, B Bukowska (2018) The mechanism of DNA damage induced by Roundup 360 PLUS, glyphosate and AMPA in human peripheral blood mononuclear cells - genotoxic risk assesment. *Food and Chemical Toxicology* 120:510-522.
- [378] F Mañas, L Peralta, J Raviolo, H García Ovando, A Weyers, L Ugnia, M Gonzalez Cid, I Larripa, N Gorla (2009) Genotoxicity of AMPA, the environmental metabolite of glyphosate, assessed by the Comet assay and cytogenetic tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72 (3):834-837.
- [379] CN Martini, M Gabrielli, MM Codesido, MC del Vila (2016) Glyphosate-based herbicides with different adjuvants are more potent inhibitors of 3T3-L1 fibroblast proliferation and differentiation to adipocytes than glyphosate alone. *Comp Clin Pathol* 25 (3):607-613.
- [380] R Mesnage, N Defarge, J Spiroux de Vendômois, GE Séralini (2015) Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food and Chemical Toxicology* 84:133-153.
- [381] B Weinhold (2010) Mystery in a bottle: will the EPA require public disclosure of inert pesticide ingredients? *Environ Health Perspect* 118 (4):A168-171.
- [382] NS El-Shenawy (2009) Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28 (3):379-385.
- [383] K Larsen, R Najle, A Lifschitz, G Virkel (2012) Effects of sub-lethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: Glutathione transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys and small intestine. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 34 (3):811-818.
- [384] GA Dedeke, FO Owagboriaye, KO Ademolu, OO Olujimi, AA Aladesida (2018) Comparative Assessment on Mechanism Underlying Renal Toxicity of Commercial Formulation of Roundup Herbicide and Glyphosate Alone in Male Albino Rat: *International Journal of Toxicology*.
- [385] JS de Souza, MML Kizys, RR da Conceição, G Glebocki, RM Romano, TM Ortiga-Carvalho, G Giannocco, IDCG da Silva, MR Dias da Silva, MA Romano, MI Chiamolera (2017) Perinatal exposure to glyphosate-

- based herbicide alters the thyrotrophic axis and causes thyroid hormone homeostasis imbalance in male rats. *Toxicology* 377 (Supplement C):25-37.
- [386] AL Gomez, GA Altamirano, J Leturia, VL Bosquiazzo, M Muñoz-de-Toro, L Kass (2019) Male mammary gland development and methylation status of estrogen receptor alpha in Wistar rats are modified by the developmental exposure to a glyphosate-based herbicide. *Molecular and Cellular Endocrinology* 481:14-25.
- [387] P Dai, P Hu, J Tang, Y Li, C Li (2016) Effect of glyphosate on reproductive organs in male rat. *Acta Histochemica* 118 (5):519-526.
- [388] FO Owagboriaye, GA Dedeke, KO Ademolu, OO Olujimi, JS Ashidi, AA Adeyinka (2017) Reproductive toxicity of Roundup herbicide exposure in male albino rat. *Exp Toxicol Pathol* 69 (7):461-468.
- [389] E Sharma, M Mustafa, R Pathak, K Guleria, RS Ahmed, NB Vaid, BD Banerjee (2012) A case control study of gene environmental interaction in fetal growth restriction with special reference to organochlorine pesticides. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 161 (2):163-169.
- [390] (2018) Cadena animal - estadísticas; 2018. <https://www.argentina.gob.ar/senasa/mercados-y-estadisticas/estadisticas/animal-estadisticas>. Accedido 28 de enero de 2020.