



## EXPOSICIÓN TEMPRANA A GLIFOSATO Y SUS EFECTOS A LARGO PLAZO SOBRE LA GESTACIÓN

**Bidner, Ximena; Alegre, Ana**

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

Directora: Ingaramo, Paola Inés  
Codirector: Alarcón, Ramiro

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Glifosato, gestación, decidua

### INTRODUCCIÓN

El glifosato es el ingrediente activo de algunos de los herbicidas más ampliamente utilizados en el mundo. Los herbicidas a base de glifosato (HBG) adquirieron gran transcendencia en los últimos años por su eficacia y relativa seguridad para humanos y animales, sin embargo, algunos estudios sugieren que podrían tener efectos adversos sobre el sistema reproductivo, actuando como un potente perturbador endócrino (PE) (Benachour, et al. 2007, Richard, et al. 2005, Ingaramo et al. 2020).

Las consecuencias de la exposición posnatal temprana a PE podrían evidenciarse posteriormente como alteraciones en las funciones fisiológicas del órgano cuando este tejido es sometido a estímulos hormonales específicos durante la etapa adulta. En este sentido, fallas en los procesos de proliferación, diferenciación o angiogénesis endometrial durante la gestación pueden conducir a pérdidas recurrentes de preñez e infertilidad (Choi, et al. 2003, Mayhew, et al. 2004, Taylor, et al. 1997).

En nuestro grupo de trabajo, mediante un ensayo uterotrópico realizado en ratas, demostramos que el HBG presenta efectos xenoestrogénicos (Varayoud et al., 2017). Por otro lado, demostramos que la exposición postnatal temprana de ratas con bajas dosis de HBG (dosis: 2 mg/kg de peso corporal) induce cambios morfológicos en el útero de hembras prepuberales (Guerrero Schimpf, et al. 2017). Mientras que, en la etapa adulta, al día gestacional 9 (DG9), observamos alteraciones en la expresión receptores esteroideos, de la

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

Instrumento: PICT

Año convocatoria: 2018

Organismo financiador: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica

Directora: Ingaramo, Paola Inés





vía de señalización Wnt y fallas en la angiogénesis en la decidua de los sitios de implantación (Ingaramo, et al. 2016, Ingaramo, et al. 2017, Ingaramo, et al. 2022). Al DG19 se observó aumento en el número de sitios de implantación reabsorbidos (Ingaramo, et al. 2016, Ingaramo, et al. 2019). Nuestra hipótesis de trabajo postula que la exposición a HBG en períodos hormono-sensibles del desarrollo, afecta negativamente la funcionalidad de la decidua y la placenta. Por lo tanto, nos interesa evaluar si la desregulación de los receptores de hormonas esteroideas en el útero y las fallas en la angiogénesis en ratas expuestas neonatalmente a un HBG, podría afectar el progreso de la gestación y el desarrollo del feto.

## OBJETIVOS

### **Objetivo General:**

Evaluar en ratas de la cepa Wistar, los efectos de la exposición durante el desarrollo posnatal temprano a un HBG, a largo plazo sobre la gestación.

### **Objetivos Particulares:**

En ratas que fueron expuestas en los primeros días posnatal a solución fisiológica o a dos dosis diferentes de HBG (0,2 o 2 mg/kg/día glifosato) y sacrificadas al DG15:

- a) Evaluar parámetros gestacionales: Cantidad de sitios de implantación uterinos, peso de las placentas y longitud de los fetos.
- b) Evaluar la expresión del Receptor de Estrógenos alfa por inmunohistoquímica en la decidua basal.

## METODOLOGÍA

Los procedimientos con animales se realizaron previo al inicio de la actividad de formación extracurricular siguiendo las normativas vigentes (Guide for the Care and Use of the Laboratory Animal and of Agriculture Animals in Agricultural Research, USA) aprobadas por la Universidad Nacional del Litoral. Se utilizaron ratas (cepa Wistar) de nuestro bioterio mantenidas bajo condiciones controladas de temperatura ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y fotoperíodo de 14 hs de luz (06:00/20:00). Crías de ratas hembra de la cepa Wistar se trataron por vía subcutánea los días 1, 3, 5 y 7 posnatales (DPN) con solución fisiológica (C, n=8) o solución comercial de herbicida: HBG0,2 (n=5, dosis: 0,2 mg/kg/día) o HBG2 (n=5, dosis: 2 mg/kg/día). Por grupo se utilizaron crías de 3 madres diferentes con el objetivo de aumentar la diversidad genética. En el DPN90, las hembras de ambos grupos se colocaron individualmente con machos de fertilidad comprobada. Se definió como día 1 de preñez el día en que se observaron espermatozoides en el extendido vaginal. Las hembras que efectivamente quedaron preñadas fueron sacrificadas al DG15 en cámara de dióxido de carbono y guillotinas. Al momento del sacrificio, se contaron los sitios de implantación y los sitios de reabsorción. Del útero se extrajeron los fetos y las placentas de los sitios de implantación que fueron medidas y pesadas. Los sitios de implantación fueron pesados, fijados en formaldehído 4% (6 hs) e incluidos en parafina para estudios histomorfológicos e inmunohistoquímicos. Para realizar la caracterización histomorfológica del tejido, cortes seriados de 5  $\mu\text{m}$  de espesor fueron teñidos con hematoxilina. La determinación de la expresión del RE $\alpha$  en la decidua basal de los sitios



de implantación se realizó mediante inmunohistoquímica (IHQ). La cuantificación se realizó utilizando un sistema computarizado de análisis de imágenes, Image Pro Plus 3.0.1. Las imágenes digitales fueron capturadas utilizando cámara de video color (Spot Insight V3.5, Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) acoplada a un microscopio Olympus BH2 (Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japón).

## RESULTADOS/CONCLUSIONES

Los animales expuestos a la dosis más baja del HBG (0,2 mg/kg bw/día) presentaron alteraciones en los parámetros gestacionales, un menor número de sitios de implantación, junto con una reducción de la longitud de los fetos, respecto al grupo control. No se observaron efectos en los animales del grupo HBG2 (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros gestacionales

	Control	HBG0,2	HBG2
Longitud de fetos (cm)	1,89±0,03	1,74±0,02*	1,84±0,02
Peso de placentas (g)	0,11±0,01	0,10±0,01	0,11±0,01
Sitios de implantación (n)	12,20±0,20	11,50±0,22*	11,89±0,26

\* $p < 0,05$  vs Control

En el grupo HBG0,2 la expresión del ER $\alpha$  en la decidua basal de los sitios de implantación disminuyó significativamente respecto del grupo control ( $p < 0,05$ ), sin embargo, no se observaron cambios en la expresión de esta proteína en el HBG2 (Figura 1).

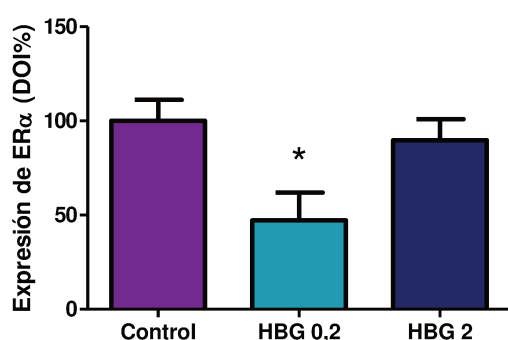


Figura 1. Expresión del receptor de estrógenos alfa en la decidua de los sitios de implantación, en grupo control, HBG0,2 y HBG2. \* $p < 0,05$  vs Control

Los cambios observados en los parámetros gestacionales junto con la menor expresión de ER $\alpha$  en la decidua basal demuestran que la exposición neonatal a un HBG interfiere, a largo plazo, con el desarrollo de las crías y la placenta al DG15.



## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

**Benachour, N., Sipahutar, H., Moslemi, S., Gasnier, C., Travert, C., and Seralini, G.E., 2007.** Time- and dosedependent effects of roundup on human embryonic and placental cells. *Arch Environ Contam Toxicol* 53 126-133.

**Choi, H.K., Choi, B.C., Lee, S.H., Kim, J.W., Cha, K.Y., and Baek, K.H., 2003.** Expression of angiogenesis- and apoptosis-related genes in chorionic villi derived from recurrent pregnancy loss patients. *Mol Reprod Dev* 66 24-31.

**Guerrero Schimpf, M., Milesi, M.M., Ingaramo, P.I., Luque E.H., Varayoud, and J., 2017.** Neonatal exposure to a glyphosate based herbicide alters the development of the rat uterus. *Toxicology* 376: 2-14.

**Ingaramo, P.I., Alarcon, R., Muñoz-de-Toro, M., and Luque, E.H., 2020.** Are glyphosate and glyphosate-based herbicides endocrine disruptors that alter female fertility? *Mol Cell Endocrinol* 518 110934.

**Ingaramo, P.I., Alarcon, R., Cagliaris, M.L., Varayoud, J., Munoz-de-Toro, M., and Luque, E.H., 2022.** Altered uterine angiogenesis in rats treated with a glyphosate-based herbicide. *Environ Pollut* 296 118729.

**Ingaramo, P.I., Guerrero Schimpf, M., Milesi, M.M., Luque, E.H., and Varayoud, J., 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 Chem Toxicol* 134 110832.

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

**Ingaramo, P.I., Varayoud, J., Milesi, M.M., Guerrero Schimpf, M., Muñoz-de-Toro, M., and Luque, E.H., 2016.** Effects of neonatal exposure to a glyphosate-based herbicide on female rat reproduction. *Reproduction* 152 403-415.

**Mayhew, T.M., Charnock-Jones, D.S., and Kaufmann, P., 2004.** Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. III. Changes in complicated pregnancies. *Placenta* 25 127-139.

**Richard, S., Moslemi, S., Sipahutar, H., Benachour, N., and Seralini, G.E., 2005.** Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. *Environ Health Perspect* 113 716-720.

**Taylor, H.S., Vanden Heuvel, G.B. and Igarashi, P., 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 1338-1345.

