

## EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN A GLIFOSATO SOBRE LA SÍNTESIS DE LOS COMPONENTES DE LA LECHE UTILIZANDO UN MODELO *IN VITRO*

Roth, Iara

*Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (UNL-CONICET).*

Director/a: Dra. Altamirano, Gabriela A.

Codirector/a: Dra. Oddi, Sofía L.

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: lactancia, glifosato, perturbador endócrino

### INTRODUCCIÓN

El herbicida a base de glifosato (GBH), ampliamente utilizado en la Argentina, ha sido detectado en diversos entornos y compuestos biológicos como la leche materna (Munoz, et al., 2021). Datos experimentales indican que la exposición a GBH afecta el desarrollo mamario en ratas, aunque los mecanismos exactos aún no están claros (Kass, et al., 2020). En este sentido, la glándula mamaria, crucial durante la lactancia, depende de un equilibrio hormonal para producir leche con nutrientes esenciales (Kass, et al., 2012, Altamirano, et al., 2015) y podría ser susceptible a perturbadores endocrinos ambientales.

Teniendo en cuenta los antecedentes sobre las modificaciones en la glándula mamaria inducida por los estrógenos ambientales y la importancia a nivel nutricional de la cantidad y calidad de la leche, no sólo para las crías lactantes sino también para la industria lechera, en el presente trabajo se analizará la influencia de la exposición directa a GBH y a glifosato (GLY) sobre la funcionalidad de la glándula mamaria utilizando un modelo *in vitro*.

### OBJETIVOS

- Analizar si la exposición directa a GBH y, a su principio activo, GLY afecta la síntesis de los componentes de la leche durante la diferenciación mamaria utilizando un modelo *in vitro*.

**Título del proyecto:** Toxicología ambiental: Exposición a glifosato y su acción sobre la funcionalidad de la glándula mamaria y prostática utilizando modelos de cultivo *in vitro*

**Instrumento:** SF PEIC I+D 2022

**Año de la convocatoria:** 2022

**Organismo financiador:** Secretaría de Ciencia, Tecnología e Innovación del Gobierno de Sta Fe.

**Directora:** Dra. Gabriela A. Altamirano

## METODOLOGÍA

### Diseño experimental

Para analizar los efectos directos de GBH y GLY durante la diferenciación funcional de la glándula mamaria *in vitro* se utilizó la línea celular HC11, la cual es una línea de células epiteliales mamaria de ratón (BALB/c) extraídas a mediados de la preñez. Las células HC11 se cultivaron en medio de crecimiento [RPMI 1640 sin rojo fenol (Gibco, Argentina) suplementado con factor de crecimiento epidérmico, insulina y suero fetal bovino tratado con carbón vegetal] hasta su confluencia. Luego de 72 h post-confluencia, el medio de cultivo fue reemplazado por otro que contenía hormonas lactogénicas (prolactina, insulina y dexametasona), y las células fueron expuestas a: a) Vehículo (RPMI 1640 sin rojo fenol), b) 0.001 - 1  $\mu$ M GBH y c) 0.001 - 1  $\mu$ M GLY durante 72 h. Las concentraciones fueron seleccionadas teniendo en cuenta los valores detectados de GLY en muestras biológicas. Asimismo, el protocolo de tratamiento está diseñado para que las células estén bajo la influencia del agroquímico durante la diferenciación funcional mamaria. Se realizaron tres experimentos independientes por duplicado.

### Evaluación de la viabilidad celular utilizando las concentraciones de GBH y GLY seleccionadas

Para descartar posibles efectos citotóxicos por parte del agroquímico sobre la línea celular utilizada, se realizó un análisis de la viabilidad celular utilizando el kit comercial WST-1 (Roche Diagnostics, EEUU) siguiendo las indicaciones del fabricante. El ensayo se realizó por triplicado, con los siguientes grupos: blanco (medio sin células), vehículo y los tratamientos correspondientes de GBH y GLY. Brevemente, luego del tratamiento con GBH y GLY, se agregó el reactivo WST-1, y se midieron las absorbancias a 450 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje relativo al vehículo.

### Análisis de los genes involucrados en la síntesis de los componentes de la leche y su regulación hormonal mediante qPCR

Se realizó la extracción de ARN con el reactivo Trizol (Invitrogen, Argentina) para su posterior retrotranscripción con la enzima MMLV (Promega, Argentina). Se evaluó la expresión génica mediante PCR en tiempo real (qPCR), utilizando oligonucleótidos diseñados específicamente para la proteína de la leche beta-caseína (CSN2), la proteína de la membrana del glóbulo graso adipofilina (ADPH), el factor transcripcional Stat5a y el receptor del estrógeno alfa (ESR1). Los resultados se expresaron como el valor normalizado del gen de interés relativos al gen de referencia empleado el método de la curva estándar.

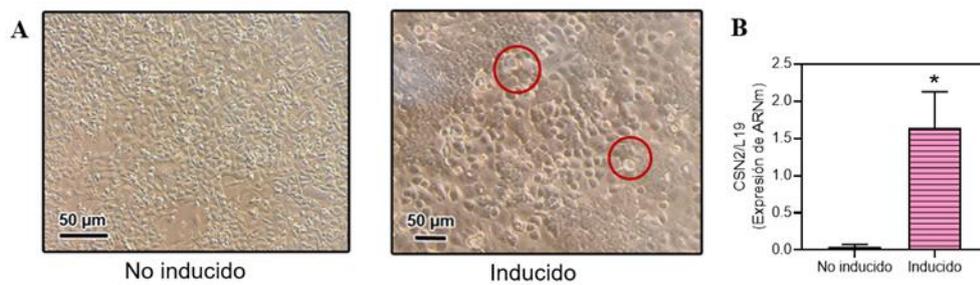
### Análisis estadísticos

Los resultados experimentales fueron analizados con test paramétricos (ANOVA) y no paramétricos (Mann-Whitney *test* y Kruskal-Wallis *test*) seleccionados específicamente para cada experimento, un  $p < 0.05$  fue considerado significativo en todos los casos.

## RESULTADOS

### Optimización y validación de la diferenciación funcional mamaria *in vitro*

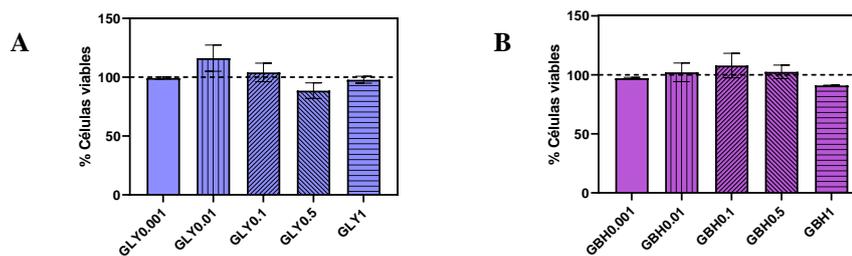
Analizando la morfología de las células, se observó que las células inducidas con hormonas lactogénicas presentaron un mayor tamaño celular y la presencia de pseudo-mamo esferas en comparación con las células no inducidas (Figura 1). Asimismo, los niveles de expresión de CNS2, marcador de la diferenciación funcional, presentaron una mayor expresión en comparación a las células no inducidas (Figura 1;  $p < 0.05$ ). La expresión génica de ESR1, no presentó diferencias entre los grupos estudiados.



**Figura 1. Morfología celular y expresión génica de las células HC11 post-diferenciación funcional.** A. Imágenes representativas de cultivos de células HC11 sin inducción y con inducción con hormonas lactogénicas tomadas con una magnificación 100x. El círculo rojo indica una pseudo-mamoesfera. B. Niveles relativos de ARNm de CSN2. La expresión de los genes se normalizó con el gen de referencia L19. El análisis estadístico se realizó la prueba de Mann-Whitney, donde un  $P < 0.05$  (\*) denota diferencia significativa entre los tratamientos. Las barras representan los valores medios  $\pm$  SEM de triplicados repetidos en tres experimentos independientes.

### Evaluación de la viabilidad celular de las HC11 tratadas con GBH y GLY post-diferenciación con hormonas lactogénicas

La viabilidad celular de las células HC11 no presentó diferencias significativas entre el vehículo y los diferentes tratamientos con GBH y GLY (Figura 2).

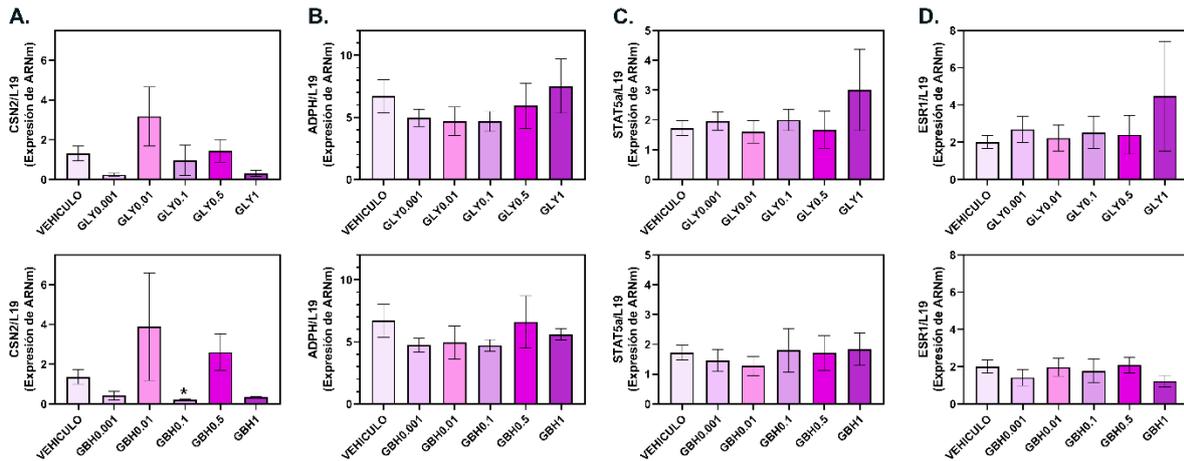


**Figura 2. Viabilidad celular de las células HC11 tratadas con GBH y GLY.** La viabilidad celular fue medida en las células HC11 mediante la prueba WST-1 después de 72 h de cultivo en presencia de hormonas lactogénicas y diferentes concentraciones de GLY y GBH. Los datos se expresaron como porcentaje relativos a los valores del vehículo. Las barras representan los valores medios  $\pm$  SEM de triplicados repetidos en tres experimentos independientes. (\*:  $p < 0.05$ . Prueba de ANOVA seguida de post hoc Dunn).

### Análisis de la expresión de los genes involucrados en la síntesis de los componentes de la leche y su regulación hormonal

Con respecto a los niveles del ARNm de CSN2, aunque se observó una tendencia a aumentar en las concentraciones de 0.01  $\mu$ M y 0.5  $\mu$ M, respecto al vehículo, y a disminuir en las restantes concentraciones de GBH y GLY, solo se encontró una diferencia estadísticamente significativa con el tratamiento de GBH al 0.1  $\mu$ M (Figura 3;  $p < 0.05$ ). Los niveles de ARNm de ADPH no presentaron diferencia significativa entre los diferentes tratamientos con GLY y GBH (Figura 3).

Además, se midieron los niveles de ARNm del gen Stat5a para evaluar los efectos sobre la vía de señalización del receptor de prolactina y del gen ESR1 para estudiar si GLY y GBH podrían actuar a través de la vía clásica estrogénica. Al evaluar los niveles de ARNm de Stat5a y ESR1 no se observó diferencias entre los diferentes tratamientos con GLY y GBH (Figura 3).



**Figura 3. Efecto de GLY y GBH sobre la expresión de genes relacionados síntesis de componentes de la leche.** Niveles de ARNm en los distintos tratamientos con GLY y GBH de CSN2 (A), ADPH (B), Stat5a (C) y ESR1 (D). Los niveles de ARNm fueron medidos mediante qPCR luego de 72 h de cultivo en presencia de hormonas lactogénicas y diferentes concentraciones de GLY y GBH. La expresión de los genes se normalizó con el gen de referencia L19. Para el análisis estadístico se realizó la prueba de Kruskal-Wallis para los tratamientos con GLY y GBH, seguida por la prueba post hoc de Dunn para comparar cada concentración con el vehículo, donde un  $p < 0.05$  (\*) denota diferencia significativa los tratamientos.

## CONCLUSIONES

Los resultados sugieren que la exposición a concentraciones bajas de GBH podría incidir en el proceso de síntesis de la proteína de la leche CSN2, indicando que la diferenciación funcional mamaria podría estar alterada. Este impacto observado podría tener consecuencias significativas en el crecimiento y la salud de la descendencia.

## BIBLIOGRAFÍA

- Altamirano, G.A., et al., *Environ Res*, 2020. 191: p. 110185.
- Altamirano, G.A., et al., *Mol Cell Endocrinol*, 2015. 411: p. 258-67.
- Kass, L., et al., *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2020. 508: p. 110789.
- Kass, L., et al., *Reproductive Toxicology*, 2012. 33(3): p. 390-400.
- Munoz, J.P., et al., *Chemosphere*, 2021. 270: p. 128619.