

## Plan de Gestión de Datos

### INFORMACION SOBRE EL PROYECTO

#### 1. – Título del Proyecto

##### - Título del Proyecto (en castellano)

Efectos multigeneracionales del glifosato en la histofuncionalidad gonadal de ratas macho adultas

##### - Título del Proyecto (en inglés)

Multigenerational effects of glyphosate on gonadal histofunctionality in adult male rats

#### -Descripción del Proyecto (en castellano) Resumen

Se define a un perturbador endocrino (PE) como “una sustancia o mezcla de sustancias exógenas que altera (n) alguna función del sistema endocrino y, en consecuencia, causa (n) efectos adversos sobre la salud de un organismo intacto, su prole o subpoblaciones”. Entre los PE más estudiados se mencionan los plaguicidas, de uso domiciliario y agrícola, y entre estos últimos a los herbicidas a base de glifosato (HBG); por ser los de mayor uso y aplicación. Su principio activo, el glifosato, tiene baja persistencia en el ambiente, pero su impacto ambiental depende del grado y la frecuencia de aplicación. La exposición al herbicida puede ocurrir por la manipulación laboral directa, o por residir en la cercanía a las zonas de aplicación o por la ingesta de agua o alimentos contaminados. Hay numerosa evidencia obtenida de estudios epidemiológicos y en animales de experimentación que sostiene que los PEs, están involucrados en la disminución de la fertilidad masculina. El estudio de los efectos de los HBG o el glifosato puro (GLI) sobre la histofuncionalidad testicular de roedores ha sido abordado utilizando distintos esquemas experimentales. Sin embargo, no hay un acuerdo general acerca de si es más nociva la exposición a GLI o a un HBG. Esta incertidumbre enfatiza la necesidad de contar con diseños experimentales que permitan distinguir entre los efectos causados por el principio activo (glifosato) de aquellos atribuibles a surfactantes y adyuvantes. Sumado a la necesidad de contar con experimentos que permitan estudiar distintas generaciones. En los últimos años optimizamos un modelo de exposición perinatal (durante la gestación y lactancia) que nos permite estudiar el impacto de los PE sobre la descendencia F1 (1° generación) y F2 (2° generación). Basándonos en los antecedentes y de acuerdo con nuestra experiencia hipotetizamos que: *“la exposición a GLI o a un HBG induce efectos multigeneracionales afectando las características histológicas y la funcionalidad testicular de ratas adultas, que podrían comprometer la fertilidad de las mismas”*. Plantemos como objetivo general *“analizar el impacto de una dosis (considerada ambientalmente rele-*



vante) de GLI o HBG sobre la histología y la funcionalidad testicular, con énfasis en los efectos multigeneracionales” utilizando dos enfoques experimentales (in vivo e in vitro). **A) Estudio in vivo:** en los machos F2, descendencia de hembras F1 expuestas *in utero* y durante la lactancia a GLI o HBG planteamos: **1)** evaluar la fertilidad mediante un protocolo de cría continua; **2)** determinar los niveles séricos de testosterona y E2; **3)** evaluar la histología testicular, analizando la proporción de las distintas poblaciones celulares; **4)** cuantificar la proliferación de las células intratubulares y la expresión de receptores de hormonas esteroideas en las mismas; diferenciando entre células germinales y células de Sertoli; **5)** evaluar la integridad de la barrera hemato-testicular mediante el estudio de proteínas características de las células de Sertoli; **6)** cuantificar la expresión de genes claves implicados en la integridad de la barrera hemato-testicular; **7)** analizar la viabilidad celular y los procesos de necrosis y apoptosis tisular mediante citometría de flujo. **B) Estudio in vitro:** utilizando un modelo de exposición *in vitro* sobre la descendencia F1, planteamos como **objetivo específico 8)** establecer los efectos de GLI o HBG sobre el desarrollo temprano de células germinales en cultivos de testículos enteros.

#### **-Descripción del Proyecto (en inglés) Resumen**

An endocrine disruptor (ED) is defined as "an exogenous substance or mixture of substances that alter(s) some function of the endocrine system and consequently causes adverse health effects in an intact organism, its progeny or subpopulations". Among the most studied EDs are household and agricultural pesticides, and among the latter, glyphosate-based herbicides (GBHs), as they are the most widely used and applied. Their active ingredient, glyphosate, is poorly persistent in the environment, but their environmental impact depends on the extent and frequency of application. Exposure to the herbicide can occur through direct occupational handling, by living near application areas, or by ingesting contaminated food or water. There is sufficient epidemiological and experimental evidence to suggest that EDs are involved in reducing male fertility. The effects of GBHs or pure glyphosate (GLI) on rodent testicular histofunction have been studied using different experimental designs. However, there is no general agreement as to whether exposure to GLI or GBH is more harmful. This uncertainty highlights the need for experimental designs that distinguish between effects caused by the active ingredient (glyphosate) and those caused by surfactants and adjuvants. In addition, there is a need for experiments to study different generations. In recent years, we have optimized a perinatal exposure model (during gestation and lactation) that allows us to study the effects of EDs on F1 (1st generation) and F2 (2nd generation) offspring. Based on the background and our experience, we hypothesized that "exposure to GLI or a GBH induces multigenerational effects affecting histological characteristics and testicular functionality in adult rats, which could affect their fertility". Our general objective is to "analyze the impact of a dose (considered environmentally relevant) of GLI or HBG on testicular histology and functionality, with emphasis on multigenerational effects" using two experimental approaches (*in vivo* and *in vitro*). **A) In vivo study:** in F2 males, offspring of F1 females exposed in utero and during lactation to GLI or HBG, we propose to: **1)** assess fertility using a continuous breeding protocol; **2)** determine serum testosterone and E2 levels; **3)** assess testicular histology, analyzing the proportion of different cell populations; **4)** quantify intratubular cell proliferation and steroid hormone receptor expression in the cells; differentiate between germ cells and Sertoli cells; **5)** assess the integrity of the blood-testicular barrier by studying proteins characteristic of Sertoli cells; **6)** quantify the expression of key genes involved in the integrity of the blood-testicular barrier; **7)** analyze cell viability and the processes of tissue necrosis and apoptosis by flow cytometry. **B) In vitro study:** using an *in vitro*

exposure model on F1 offspring, our specific aim is to **8**) determine the effects of GLI or HBG on early germ cell development in whole testis cultures.

**-Palabras Clave descriptivas del Proyecto (en castellano)**

- 1- Reproducción masculina
- 2- Glifosato y Herbicidas a base de glifosato
- 3- Ratas

**- Palabras Clave descriptivas del Proyecto (en ingles)**

- 1- Male reproduction
- 2- Glyphosate and glyphosate-based herbicides
- 3- Rats

**2 – Datos del Director/ar del Proyecto**

**- Nombre y Apellido**

Milena de Lourdes Durando

**- Unidad Académica**

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral (UNL).

**- Teléfono oficial de contacto**

+ 54 9 342-4575206 int 197

**-Teléfono movil de contacto**

+ 54 9 342-4235193

**-E-mail del Director/a del Proyecto**

[mdurando@fcb.unl.edu.ar](mailto:mdurando@fcb.unl.edu.ar)

**DATOS RESULTANTES DE LA EJECUCIÓN DEL PROYECTO**

**-Describa la toma de muestras / datos a realizar**

En el estudio se trabajará con ratas de la cepa Wistar, criadas en el bioterio del Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL; UNL-CONICET), radicado en la FBCB. Los animales serán mantenidos bajo condiciones controladas de temperatura ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y fotoperíodo de 14 h de luz (06:00/20:00) y 10 h de oscuridad.

Para el manejo de los animales de experimentación se seguirán las normas establecidas en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, publicada por la Academia Nacional de Ciencias, USA.

Las ratas preñadas serán tratadas según el protocolo experimental descrito en el proyecto. Las crías machos F2 serán sacrificadas, en las edades establecidas, por decapitación para la obtención de las muestras. Los procedimientos experimentales se



llevarán a cabo en el Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL, UNL/CONICET) y transcurrirán con mínimo dolor y sufrimiento por parte de los animales.

Se evaluará la fertilidad de los machos F2 utilizando hembras de nuestro bioterio, no expuestas a ningún tratamiento. Al momento del sacrificio de los machos F2, se obtendrá sangre troncal y se diseccionarán las gónadas. Porciones de cada testículo se congelarán inmediatamente en N2 líquido y se mantendrán a -80°C para estudios de biología molecular. Otras porciones serán fijadas en fijador de Davidson y paraformaldehído (por 24 h) y se procesarán hasta su inclusión en parafina.

Adicionalmente, hembras adultas de la cepa Wistar de nuestro bioterio serán apareadas con machos de fertilidad comprobada (no expuestos a ningún tratamiento). En el día del parto se obtendrán los testículos de las crías (F1). Los testículos serán cultivados, procesados y analizados según se describe en el proyecto.

Para llevar adelante los objetivos planteados en el proyecto se aplicarán diversas metodologías para análisis histológico, de inmunohistoquímica, de expresión de genes, de citometría de flujo y de cultivo de órganos enteros. Dichas técnicas han sido optimizadas en nuestro Instituto (tal como lo demuestran nuestras publicaciones), contamos con la experticia y el equipamiento necesario.

Finalmente, los datos serán recopilados y almacenados en planillas de Excel, utilizando las bases de datos de nuestro Instituto.

<b>– Datos: ¿Existe alguna razón por la cual los datos declarados no deban ser puestos a disposición de la comunidad / ser de acceso público? (marque X)</b>	
	<b>NO</b>
	<b>SI. Elija una de las opciones:</b>
	se encuentra en evaluación de protección por medio de patentes no se inició el proceso de evaluación de patentabilidad, pero podría ser protegible
<b>X</b>	existe un contrato con un tercero que impide la divulgación <b>Otro. Justifique: los datos del proyecto no podrán darse a conocer hasta que no hayan sido publicados (artículos o tesis), para respetar las políticas de privacidad que exigen las revistas y para resguardar la originalidad de nuestro trabajo.</b>



– **Período de Confidencialidad:** Es el periodo durante el cual los datos no deberían ser publicados, contado a partir del momento de la toma de los mismos. El periodo máximo para la no publicación es de 5 (CINCO) años posteriores a su obtención. Luego de este periodo, los datos estarán disponibles para la comunidad / serán de acceso público.

Si Ud. considera que este tiempo es insuficiente, y necesita prorrogar el período de confidencialidad, indique sus motivos y la cantidad de años adicionales que considera necesarios. Marque su opción con “X”.

	<b>1 (UN) año</b>
	<b>2 (DOS) años</b>
	<b>3 (TRES) años</b>
	<b>4 (CUATRO) año</b>
X	<b>5 (CINCO) años</b>
	<b>Otro.</b>
	<b>Motivos:</b>