

ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES GESTACIONALES INDUCIDAS POR EXPOSICIÓN POSTNATAL DE RATAS HEMBRA A DOSIS BAJAS DE GLIFOSATO

Fernández Schamzenpach, Valentín

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.

Director: Alarcón, Ramiro

Codirectora: Ingaramo, Paola

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Glifosato, Herbicida, Útero

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 trascendencia 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).

Las consecuencias de la exposición postnatal 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 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 día gestacional 19 (DG19) se observó aumento en el número de sitios de implantación reabsorbidos (Ingaramo, et al. 2016, Ingaramo, et al. 2019). Nuestros trabajos previos evidencian los efectos de la exposición postnatal temprana a una dosis ambientalmente relevante, sin embargo, los efectos a dosis más bajas aún son desconocidos.

Título del proyecto: Efectos de la exposición a un herbicida a base de glifosato sobre la gestación en ratas Wistar.

Instrumento: PICT

Año convocatoria: 2018

Organismo financiador: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica

Directora: Ingaramo, Paola

Es importante mencionar que la evidencia científica ha permitido que los organismos regulatorios, en particular la Organización Mundial de la Salud (OMS), establezcan nuevos límites de exposición, fijando la Ingesta Diaria Admisible (ADI) en 1 mg/kg peso corporal/día, y la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) ha situado el ADI en 0,5 mg/kg pc/ día (Williams, et al. 2016). Nuestra hipótesis de trabajo postula que la exposición a HBG a dosis 10 veces menor que la evaluada previamente, 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 de ratas expuestas neonatalmente a un HBG, puede 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 postnatal temprano a una muy baja dosis de un HBG sobre la gestación.

Objetivos Específicos:

Evaluar, en ratas hembra adultas preñadas que fueron tratadas en los primeros días postnatales con inyecciones subcutáneas de solución fisiológica o HBG (dosis: 0,2 mg/kg/día):

- a) Al día gestacional 19: parámetros gestacionales (cantidad de sitios de implantación uterinos, peso de las placentas y longitud de los fetos).
- b) Al día gestacional 9: la expresión del Receptor de Estrógenos α (RE α) y del Receptor de Progesterona (RP) 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 posnatales (DPN) 1, 3, 5 y 7 con solución fisiológica (grupo control; n=13) o solución comercial de herbicida a base de glifosato en una dosis de 0,2 mg/kg/día (HBG0,2; n=10). En los grupos se utilizaron crías de diferentes madres 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 en cámara de dióxido de carbono y guillotinas en DG9 o DG19 para la evaluación de la expresión proteica y de los parámetros gestacionales, respectivamente. Al momento del sacrificio de los animales en DG19 (Control n=5; HBG0,2 n=5), 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 medidos y pesados. Los sitios de implantación, obtenidos de los animales en DG9 (Control n=8; HBG0,2 n=5), fueron fijados en formaldehído 10% (6 hs) e incluidos en parafina para estudios histomorfológicos e inmunohistoquímicos. Para realizar la caracterización histomorfológica del tejido, cortes seriados de 5 μm de espesor fueron teñidos con hematoxilina. La determinación de la expresión del RE α y RP 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 presentaron una disminución en la longitud de los fetos y un mayor número de pérdidas postimplantación respecto al grupo control (* $p < 0,05$).

Tabla 1. Parámetros gestacionales

	Control	HBG0,2
Longitud de fetos (mm)	31,4±0,5	29,6±0,3*
Peso de los fetos (mg)	2709,0±76,1	2594±64,5
Peso de las placentas (mg)	354,4±17,2	343,2±11,9
Sitios de implantación (n)	11±1	11±1
Pérdidas postimplantación (n)	0±0	8±2*

* $p < 0,05$ vs Control

La expresión de RE α en la decidua basal de los sitios de implantación disminuyó en la zona antimesometrial respecto al grupo control, sin embargo, no se observaron cambios en las demás zonas (Figura 1).

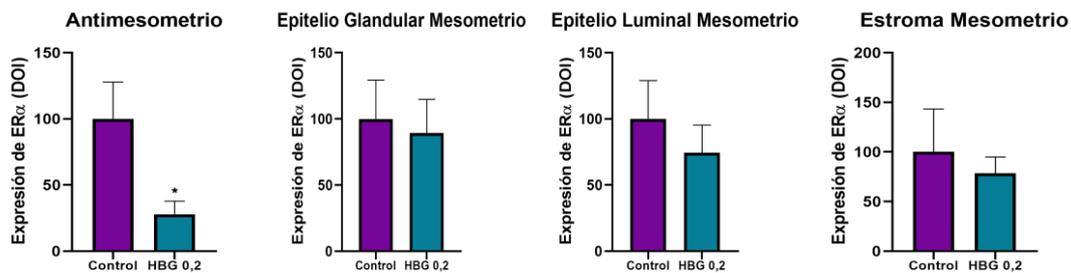


Figura 1. Expresión del receptor de estrógeno alfa (RE α) en la decidua de los sitios de implantación, grupo control y HBG 0,2.

* $p < 0,05$ vs control.

La expresión del RP en la decidua basal de los sitios de implantación disminuyó significativamente respecto al grupo control en todas las zonas evaluadas (Figura 2).

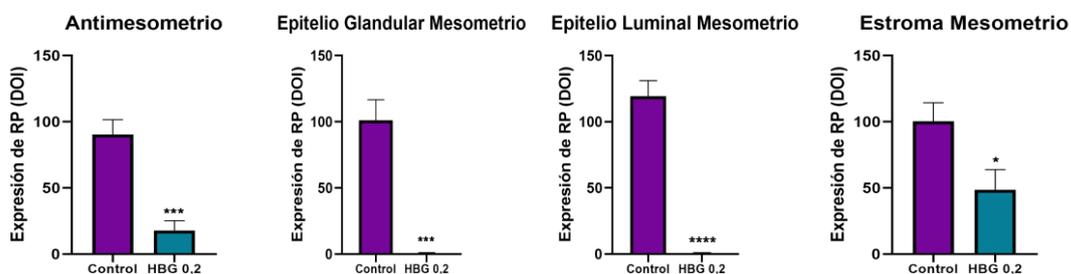


Figura 2. Expresión del receptor de progesterona (RP) en la decidua de los sitios de implantación, grupo control y HBG 0,2.

* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$ vs control.

Los cambios observados en los parámetros gestacionales, menor longitud fetal y mayor número de pérdidas embrionarias, junto con la menor expresión de RP y RE α en la decidua basal demuestran que la exposición neonatal a una muy baja dosis de un HBG interfiere con el normal desarrollo de la gestación y de las crías en el DG9. Estos

resultados evidencian los efectos a largo plazo, de la exposición a un HBG durante períodos sensibles del desarrollo, incluso en dosis menores que las consideradas como seguras.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Benachour, N., Sipahutar, H., Moslemi, S., Gasnier, C., Travert, C. & 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. & 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, 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., Cagliaris, M.L., Varayoud, J., Munoz-de-Toro, M. & 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. & 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., 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. & 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. & 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. & 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. & 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.

Varayoud, J., Durando, M., Ramos, J.G., Milesi, M.M., Ingaramo, P.I., Munoz-de-Toro, M. & Luque, E.H., 2017. Effects of a glyphosate-based herbicide on the uterus of adult ovariectomized rats. Environmental toxicology 32 1191-1201.

Williams, G. M., Aardema, M., Acquavella, J., Berry, S. C., Brusick, D., Burns, M. M., de Camargo, J. L. V., Garabrant, D., Greim, H. A., Kier, L. D., Kirkland, D. J., Marsh, G., Solomon, K. R., Sorahan, T., Roberts, A. & Weed, D. L. 2016. A review of the carcinogenic potential of glyphosate by four independent expert panels and comparison to the IARC assessment. Critical Reviews in Toxicology, 46(sup1), 3-20.