

## EFFECTOS A LARGO PLAZO POR EXPOSICIÓN NEONATAL A UN HERBICIDA A BASE DE GLIFOSATO

**Bidner, Ximena**

*Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL-CONICET), Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad  
Nacional del Litoral*

*Directora: Ingaramo, Paola Inés*

*Codirectora: Zenclussen, María Laura*

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Gestación, Glifosato, Inflamación.

### INTRODUCCIÓN

El glifosato es un herbicida de amplio espectro extensamente utilizado en la agricultura, comúnmente comercializado y empleado como formulados con adyuvantes y otras sustancias consideradas inertes. En Argentina, el uso de herbicidas a base de glifosato (HBG) se incrementó drásticamente debido a la utilización de cultivos resistentes al glifosato (Castro Berman y col., 2018). Los HBG han adquirido una gran transcendencia en los últimos años por su eficacia y relativa seguridad para humanos y animales. Sin embargo, algunos estudios realizados en ratas Wistar sugieren que podría tener efectos adversos sobre el sistema reproductivo, actuando como un potente perturbador endócrino (PE) (Benachour y col., 2007; Richard y col., 2005; Ingaramo y col., 2020).

Las consecuencias de la exposición postnatal temprana a PE podrían evidenciarse posteriormente como alteraciones en las funciones fisiológicas del útero 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 y col., 2003; Mayhew y col., 2004; Taylor y col., 1997).

En estudios previos de nuestro grupo de trabajo, mediante ensayos uterotrópicos realizados en ratas, demostramos que el HBG presenta efectos xenoestrogénicos (Varayoud y col., 2017). Por otro lado, demostramos que la exposición postnatal temprana de ratas a bajas dosis de HBG (2 mg/kg peso corporal/día) induce cambios morfológicos en el útero de hembras prepuberales (Guerrero Schimpf y col., 2017). Mientras que, en la etapa adulta, el día gestacional (DG) 9,

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 de la convocatoria: 2018.

Organismo financiador: Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.

Directora: Ingaramo, Paola Inés.



observamos alteraciones en la expresión de receptores esteroideos, fallas en la angiogénesis en la decidua de los sitios de implantación y un aumento en el número de sitios de implantación reabsorbidos al DG19 (Ingaramo y col., 2016; Ingaramo y col., 2017; Ingaramo y col., 2019; Ingaramo y col., 2022).

Nuestra hipótesis de trabajo postula que la exposición neonatal a la misma dosis y a dosis aún más bajas de 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 en la expresión de moléculas relacionadas a procesos inflamatorios podría conducir a fallas en la gestación.

## OBJETIVOS

### Objetivo general:

Evaluar los efectos de una exposición neonatal a un HBG, a largo plazo, sobre la gestación en ratas de la cepa Wistar.

### Objetivos particulares:

Evaluar en los organismos control y tratados con HBG:

- Parámetros gestacionales.
- Expresión de moléculas relacionadas a la inflamación.

## METODOLOGÍA

Los procedimientos con animales se realizaron siguiendo las normativas vigentes aprobadas por la Universidad Nacional del Litoral, la guía de cuidado y uso de animales de laboratorio (National Research Council, 2011). 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 postnatales (DPN) con solución fisiológica (C,  $n=8$ ) o solución comercial de herbicida: HBG0,2 ( $n=8$ , dosis: 0,2 mg/kg peso corporal/día) o HBG2 ( $n=8$ , dosis: 2 mg/kg peso corporal/día). Cada grupo está compuesto por 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. Un lote de las hembras que efectivamente quedaron preñadas fueron sacrificadas al DG19 en cámara de dióxido de carbono y guillotinas. Al momento del sacrificio, se contaron los sitios de implantación y los sitios de reabsorción, y también se pesaron las placentas. Los sitios de implantación sin placentas se congelaron inmediatamente en  $\text{N}_2$  líquido y se mantuvieron en freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta la extracción del ARN total. Por RT-qPCR se cuantificaron moléculas relacionadas a procesos inflamatorios: el factor de necrosis tumoral alfa ( $\text{TNF}\alpha$ ), la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), el factor nuclear kappa B ( $\text{NF}\kappa\text{B}$ ) y la interleuquina 10 (IL10). Para ello, se extrae el ARN total de los sitios de implantación previamente conservados, y se someten a retro transcripción (RT). La PCR en tiempo real se realizó utilizando la técnica de fluorescencia del ADN doble cadena con el colorante EvaGreen®. La amplificación de los genes blanco se realizó con primers específicos diseñados de acuerdo con las secuencias publicadas en GenBank. Se determinaron y

compararon las eficiencias de las reacciones de los genes target y normalizadores. Con estos datos posteriormente se cuantificó la expresión génica por el método de la curva estándar relativa.

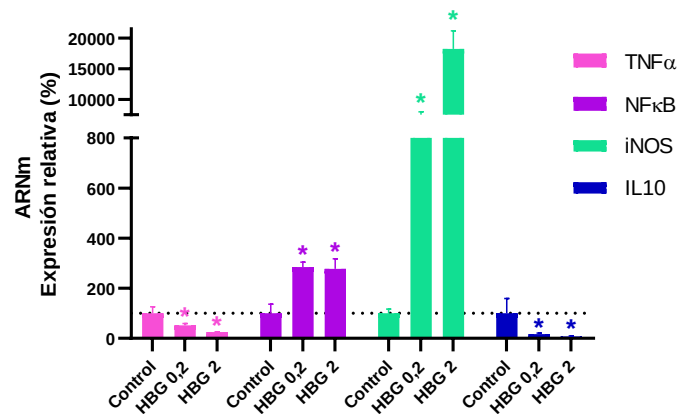
## CONCLUSIONES

En la Tabla 1 se observa que la tasa de pérdidas post-implantación de las ratas de los grupos tratados, HBG0,2 y HBG2, fue significativamente mayor respecto al grupo control.

**Tabla 1.** Parámetros gestacionales DG19.  
Resultados: Media±SEM. \*p<0,05 vs Control.

|                                        | Control | HBG0,2 | HBG2    |
|----------------------------------------|---------|--------|---------|
| Peso de placentas (mg)                 | 354±17  | 343±12 | 342±424 |
| Sitios de implantación (n)             | 11±1    | 11±1   | 11±1    |
| Tasa de pérdidas post-implantación (n) | 0±0     | 8±2*   | 4±3*    |

En cuanto a las moléculas inflamatorias, observamos que la expresión del ARNm de IL10 y TNFα disminuyó significativamente tanto en HBG0,2 como en HBG2 respecto al control. Mientras que, la expresión del ARNm de iNOS y NFκB fue significativamente mayor en HBG0,2 y HBG2 respecto al control (Figura 1).



**Figura 1.** Expresión relativa de ARNm (%) en el DG19 de TNFα, NFκB, iNOS, IL10.  
Resultado: Media±SEM. \*p<0,05 vs. Control.

Los resultados presentados demuestran el rol del HBG como perturbador endócrino, dado que la exposición en una etapa temprana del desarrollo interfiere, a largo plazo, sobre la gestación. Si bien se observa una disminución de TNFα, el incremento en la expresión de iNOS y de NFκB, junto con la disminución de IL10 sugiere un ambiente altamente inflamatorio. El conjunto de estas alteraciones en estadios avanzados de la gestación pueden explicar parte de las pérdidas post-implantatorias observadas con esta dosis 10 veces menor a la evaluada en trabajos previos.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

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

**Castro Berman, M., Marino, D. J. G., Quiroga, M. V., y Zagarese, H.,** 2018. Occurrence and levels of glyphosate and AMPA in shallow lakes from the Pampean and Patagonian regions of Argentina. *Chemosphere*, 200, 513–522.

**Choi, H.K., Choi, B.C., Lee, S.H., Kim, J.W., Cha, K.Y., 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., Muñoz-de-Toro, M., y 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., Muñoz-de-Toro, M., y 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., y 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., Muñoz-de-Toro, M., y 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., y 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., y Kaufmann, P.,** 2004. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. III. Changes in complicated pregnancies. *Placenta* 25 127-139.

**National Research Council (US) Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals,** 2011. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. 8<sup>th</sup> edition.

**Richard, S., Moslemi, S., Sipahutar, H., Benachour, N., y 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. y 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.