

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

**“Exposición a glifosato y salud reproductiva:
evaluación de efectos sobre la fertilidad y el
desarrollo tumoral en rata”**

Bioq. Marlise Luciana Guerrero Schimpf

Director de Tesis: Dra. Jorgelina Varayoud

Co-director de Tesis: Dra. María Mercedes Milesi

**Instituto de Salud y Ambiente del Litoral, Facultad de Bioquímica y Ciencias
Biológicas, Universidad Nacional del Litoral**



I S A L

2018

*“...yo creo que es mejor vivir un sueño
que simplemente soñarlo.*

*El sueño es el comienzo de algo más grande,
algo que nos impulsa a tomar decisiones atrevidas.
Y es verdad que una persona que persigue un sueño
toma muchos riesgos.
Pero la persona que no sueña
corre riesgos aún mayores”.*

Paulo Coelho

*A mis padres, **Ofelia e Isidro**, por su amor incondicional, por aconsejarme y brindarme su apoyo siempre.*

*A mi hermano, **Federico**, por estar presente en todo momento.*

*A mi amor, mi mejor amigo, mi compañero, **Rodrigo**, por elegirme para crecer juntos.*

Estoy muy orgullosa y feliz de tenerlos a mi lado.

AGRADECIMIENTOS

A la **Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral**, por ofrecerme la posibilidad de realizar tanto la carrera de grado como la de posgrado, y hacer posible la realización de este trabajo.

Al **CONICET**, por haberme otorgado la beca de posgrado que permitió la realización de esta tesis doctoral.

A los directores del ISAL, el **Dr. Enrique H. Luque** y el **Dr. Guillermo Ramos**, por permitirme formar parte de este grupo de trabajo y apoyarme durante el desarrollo de mi trabajo de investigación a lo largo de todos estos años.

A mis queridas directora y co-directora, las **Dras. Jorgelina Varayoud** y **María Mercedes Milesi**, quienes confiaron en mí desde el principio. Especialmente, gracias por brindarme las enseñanzas necesarias para poder concretar este trabajo de investigación, por estar siempre dispuestas frente a mis inquietudes y necesidades, y por impulsarme a crecer y dar lo mejor de mí. Gracias por su paciencia, su cariño, y sus consejos en momentos donde más lo necesité. Sin duda han sido un gran apoyo.

A la **Dra. Adriana Albertengo**, por su valiosa colaboración con el análisis histopatológico y por su excelente disposición en todo momento.

A todos mis **compañeros y amigos del ISAL y de Fisiología Humana**, a los que están y a los que se fueron, por su amistad y por cada momento compartido dentro y fuera del ISAL: Aye, Meli, Gabi, Flor R., Lu, Chula, Clari, Flor A., Luisa, Adri, Ale, Guille P., Guille C, Pao, Beti, Rami, Turco, Pau, Gise, Vicky, Vir L, Rocío, Lau B., Mile, Vero, Lauri, Vir T., Silvi, Mari, Ger, Yamil, Guille R., Cori, Horacio, Moni, Juan, Juanca, Nacho, Walter y Marcos.

A mis amigas y hermanas de la vida **Eve, Gisi, Calu, Jessi, Anto, Mari, Vero, Luisi, Caro y Flor**, porque a pesar de la distancia que nos separa siempre estuvieron conmigo de una u otra manera, incentivándome a cumplir todas las metas que me propongo.

A mis padres, **Ofelia e Isidro**, y mi hermano, **Federico**, mis pilares de la vida, por su amor incondicional, por guiarme a ser cada día una mejor persona y motivarme para alcanzar todos mis sueños. Todos mis logros se los debo a ustedes.

A mi amor, **Rodrigo**, por ser la mejor compañía a lo largo de estos años, por entenderme, aconsejarme y acompañarme en cada emprendimiento. Por aceptarme tal cual soy, por brindarme el amor más puro y sincero, y compartir mis alegrías y tristezas. Porque sin su apoyo todos estos logros no hubiesen sido posibles.

A todas aquellas personas que formaron parte de esta etapa e hicieron posible la realización de esta tesis doctoral.

PUBLICACIONES

Los resultados obtenidos durante la realización de esta tesis forman parte de las siguientes publicaciones:

Capítulos de libros

- **M Guerrero Schimpf**, MM Milesi, EH Luque, J Varayoud (2018), Evaluation of development of the rat uterus as a toxicity biomarker, En: *Methods in Molecular Biology*, (Ed: JM Walker), Springer.

Publicaciones en revistas internacionales indexadas

- **M Guerrero Schimpf**, MM Milesi, EH Luque, J Varayoud (2018) Glyphosate-based herbicide enhances the uterine sensitivity to estradiol in rats. *J Endocrinol*. <http://dx.doi.org/10.1530/JOE-18-0207>.
- PI Ingaramo, J Varayoud, MM Milesi, **M Guerrero Schimpf**, R Alarcón, M Muñoz-de-Toro, EH Luque (2017) Neonatal exposure to a glyphosate-based herbicide alters uterine decidualization in rats. *Reprod Toxicol* 73: 87-95.
- **M Guerrero Schimpf**, MM Milesi, PI Ingaramo, EH Luque, J Varayoud (2017) Neonatal exposure to a glyphosate based herbicide alters the development of the rat uterus. *Toxicology* 376: 2-14.
- PI Ingaramo, J Varayoud, MM Milesi, **M Guerrero Schimpf**, M Muñoz-De-Toro M, EH Luque (2016) Effects of neonatal exposure to a glyphosate-based herbicide on female rat reproduction. *Reproduction* 152 (5): 403-415.

Además he participado en otros trabajos que dieron origen a las siguientes publicaciones:

- MP Gastiazoro, **M Guerrero Schimpf**, M Durando, GP Lazzarino, MF Andreoli, O Zierau, EH Luque, JG Ramos, J Varayoud (2018) Induction of uterine hyperplasia after cafeteria diet exposure. *Mol Cell Endocrinol*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2018.06.007>.

- PI Ingaramo, MM Milesi, **M Guerrero Schimpf**, JG Ramos, L Vigezzi, M Muñoz-De-Toro, EH Luque, J Varayoud (2016) Endosulfan affects uterine development and functional differentiation by disrupting Wnt7a and β -catenin expression in rats. *Mol Cell Endocrinol* 425: 37-47.

ÍNDICE GENERAL

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	i
UNIDADES	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	ix
INTRODUCCIÓN	
<i>1 Diferenciación organogenética del útero. Etapa postnatal</i>	1
1.1 Genes de la familia Hox	3
1.2 Genes de la familia Wnt	4
1.3 Receptores de hormonas esteroides ováricas.....	5
1.3.1 Receptor de estrógenos	8
1.3.2 Receptor de progesterona	9
<i>2 Diferenciación funcional del útero y su regulación. Etapa adulta</i>	10
2.1 Modificaciones hormonales durante el ciclo estral de la rata.....	11
2.2 Gestación y regulación hormonal del proceso de decidualización	14
2.2.1 Vía de señalización RP/COUP-TFII/Bmp2.....	17
<i>3 Lesiones pre-neoplásicas y neoplásicas del tracto reproductor femenino</i>	19
3.1 Lesiones pre-neoplásicas en útero	19
3.2 Lesiones neoplásicas en útero.....	21
3.2.1 Leiomioma uterino	21
3.2.2 Carcinoma endometrial.....	22
3.3 Lesiones neoplásicas en vagina	22
<i>4 Perturbadores endócrinos: Efectos sobre la salud reproductiva y el desarrollo de tumores ginecológicos</i>	23
<i>5 Mecanismos de acción de perturbadores endócrinos</i>	25
<i>6 Herbicidas a base de glifosato</i>	27

6.1 Niveles ambientales y exposición ambiental y ocupacional.....	28
6.2 Efectos de glifosato sobre la reproducción y el desarrollo	29
6.3 Efectos de glifosato en relación a su potencial carcinogénico.....	30

OBJETIVOS

1 <i>Objetivo general</i>	33
2 <i>Objetivos específicos</i>	33

MATERIALES Y MÉTODOS

1 <i>Animales</i>	34
1.1 Diseño experimental	34
2 <i>Evaluación de los efectos del HBG sobre la diferenciación organogénica del útero</i> 35	
2.1 Procedimiento	35
2.2 Disección de cuernos uterinos	36
2.3 Procesamiento de muestras.....	36
2.3.1 Estudios por microscopía óptica.....	37
2.3.2 Estudios por técnicas de biología molecular	37
2.4 Evaluación de las características histomorfológicas del útero.....	38
2.5 Expresión de marcadores de citodiferenciación celular y de diferenciación organogénica.....	39
2.5.1 Cuantificación de la proliferación celular	42
2.5.2 Cuantificación de la expresión proteica por análisis digital de imágenes	43
2.6 Evaluación de la expresión génica mediante RT-PCR en tiempo real	44
2.6.1 Extracción de ARN total.....	44
2.6.2 Transcripción reversa (RT).....	45
2.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real	45
2.6.4 Electroforesis en gel de agarosa	47
2.7 Metodologías para la determinación de cambios epigenéticos.....	48
2.7.1 Análisis bioinformático	48
2.7.2 Análisis del estado de metilación del ADN mediante MSRE-PCR	48
2.7.3 Determinación de modificaciones post-traduccionales de histonas mediante el ensayo de ChIP	49

3 <i>Evaluación de los efectos del HBG sobre la sensibilidad uterina al E2</i>	51
3.1 Ovariectomía bilateral	52
3.2 Armado y colocación de implantes.....	52
3.3 Experimento piloto para evaluar la sensibilidad uterina al E2	53
3.4 Obtención de muestras de sangre y disección de cuernos uterinos	53
3.5 Determinación de los niveles séricos de E2.....	54
3.6 Evaluación de las características histomorfológicas del útero.....	54
3.7 Evaluación de la proliferación celular, la expresión de receptores hormonales y marcadores moleculares asociados a una respuesta uterina alterada al E2	55
4 <i>Evaluación de los efectos del HBG sobre el ciclo estral y los niveles séricos de E2 y P4</i>	57
4.1 Ciclo estral	58
4.2 Determinación de los niveles séricos de E2 y P4	58
5 <i>Evaluación de los efectos del HBG sobre la fertilidad de la hembra y la diferenciación funcional del útero durante el período post-implantatorio</i>	59
5.1 Evaluación de la fertilidad de la hembra	59
5.2 Evaluación de la diferenciación funcional del útero durante el período post- implantatorio.....	60
5.2.1 Expresión de desmina y evaluación del área de decidualización	61
5.2.2 Vía de señalización RP/COUP-TFII/Bmp2.....	61
6 <i>Evaluación de los efectos del HBG sobre el desarrollo de lesiones pre-neoplásicas y neoplásicas en útero y vagina</i>	63
6.1 Incidencia de lesiones ginecológicas en animales de edad avanzada.....	63
7 <i>Análisis estadístico</i>	64

RESULTADOS

1 <i>Efectos del HBG sobre la diferenciación organogenética del útero</i>	65
1.1 La exposición a HBG produce hiperplasia endometrial	65
1.2 Caracterización de la citodiferenciación celular	67
1.3 Proliferación celular.....	67

1.4 Expresión de proteínas involucradas en la diferenciación organogenética del útero	68
1.4.1 Receptor de estrógenos alfa	68
1.4.2 Receptor de progesterona	70
1.4.3 Wnt7a.....	71
1.4.4 Hoxa10.....	72
1.5 La exposición postnatal a HBG produce el silenciamiento del gen Hoxa10 a través de modificaciones epigenéticas	73
2 <i>Efectos del HBG sobre la sensibilidad uterina al E2</i>	75
2.1 Niveles séricos de E2.....	76
2.2 Caracterización de la respuesta uterina al tratamiento con E2: ensayo piloto.....	76
2.3 Efectos de la exposición a HBG sobre la sensibilidad uterina al E2	79
2.3.1 Histomorfología uterina.....	79
2.3.2 Proliferación celular	81
2.3.3 Expresión de receptores de estrógenos	81
2.3.4 Expresión de moléculas asociadas a una respuesta uterina alterada al E2 ...	84
3 <i>Efectos del HBG sobre el ciclo estral y los niveles séricos de E2 y P4</i>	86
3.1 La exposición postnatal al HBG altera el ciclo estral.....	86
3.2 Análisis de los niveles séricos de esteroides sexuales en animales postnatalmente expuestos a HBG	86
4 <i>Efectos del HBG sobre la fertilidad de la hembra y la diferenciación funcional del útero durante el período post-implantatorio</i>	87
4.1 La exposición postnatal a HBG altera la fertilidad de la rata hembra	87
4.2 Diferenciación funcional del útero durante el período post-implantatorio.....	89
4.2.1 Morfometría de los sitios de implantación y de las células deciduales	89
4.2.2 Evaluación de la vía de señalización RP/COUP-TFII/Bmp2	91
5 <i>Efectos del HBG sobre el desarrollo de lesiones pre-neoplásicas y neoplásicas en útero y vagina</i>	93
5.1 La exposición postnatal a HBG induce lesiones neoplásicas en útero y vagina	94

DISCUSIÓN

<i>1 La exposición postnatal a HBG altera la diferenciación organogénica del útero ...</i>	100
<i>2 El tratamiento con HBG incrementa la sensibilidad del útero al E2</i>	105
<i>3 La exposición postnatal a HBG altera la fertilidad produciendo pérdidas post-implantatorias</i>	109
<i>4 Exposición a HBG y desarrollo de tumores en la rata</i>	112
CONCLUSIONES.....	116
BIBLIOGRAFÍA.....	118

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

αSMA	Alfa actina de músculo liso
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
AM	Antimesometrial
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Bmp2	<i>Bone Morphogenetic Protein 2</i>
BPA	Bisfenol A
ChIP	Inmunoprecipitación de la cromatina
CLs	Cuerpos lúteos
col.	colaboradores
COUP-TFII	<i>Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II</i>
Ct	Ciclo umbral
DAB	Diaminobencidina
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
DES	Dietilestilbestrol
DG	Día de gestación
DPN	Día postnatal
DNMT3a	ADN metiltransferasa 3a
DNMT3b	ADN metiltransferasa 3b
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato
DOI	Densidad óptica integrada
E2	17 β -estradiol
EG	Epitelio glandular
EL	Epitelio luminal
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPA	Agencia de Protección Ambiental
ES	Estroma subepitelial
GGH	Glándulas con glándulas hijas

H&E	Hematoxilina-eosina
H3K9me3	Histona 3 trimetilada en la lisina 9
HBG	Herbicida a base de glifosato
Hox	Homeobox
Hoxa10	Homeobox A10
HRE	<i>Hormone response element</i>
IHQ	Inmunohistoquímica
L19	Proteína ribosomal L19
M	Mesometrial
MM	Miometrio
MPTs	Modificaciones post-traduccionales
MSRE-PCR	<i>Methylation-Sensitive Restriction Enzymes-PCR</i>
M&M	Materiales y Métodos
IP	Complejo inmunoprecipitado
OVX	Ovariectomizada
P4	Progesterona
PCB	Bifenilos policlorinados
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Perturbadores endócrinos
REα	Receptor de estrógenos alfa
REβ	Receptor de estrógenos beta
REs	Receptores de estrógenos
RfD	Dosis de referencia
RIA	Radio inmunoanálisis
RP	Receptor de progesterona
RT	Transcripción reversa
SI	Sitios de implantación
SEM	Error estándar medio
TAE	Tris-acetato-EDTA
Vv	Fracción de volumen
Wnt	<i>Wingless-related MMTV integration site</i>

UNIDADES

%	Porcentaje
% p/v	g/100 ml
°C	Grados Celsius
µm	Micrómetro
g	Gramo
mg	Miligramo
µg	Microgramo
ng	Nanogramo
pg	Picogramo
hs	Horas
min	Minutos
ml	Mililitro
µl	Microlitro
M	Molar
mM	Milimolar
nmol	Nanomol
pmol	Picomol
kDa	Kilodalton
kpb	Kilopares de bases
pb	Pares de bases
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundo
V	Voltaje

RESUMEN

El útero es un órgano fundamental para la reproducción en mamíferos. La diferenciación organogénica del mismo es un proceso regulado por diversos mecanismos endócrinos, celulares y moleculares, y se completa durante las primeras semanas de vida postnatal en roedores. Estos mecanismos programan a las células uterinas durante el proceso de diferenciación temprana para responder apropiadamente a las señales hormonales durante la vida adulta. Por lo tanto, esta etapa de la vida es un período crítico del desarrollo, en el cual la exposición a compuestos perturbadores endócrinos (PE) puede alterar el programa normal de diferenciación e inducir cambios permanentes en la estructura uterina y su funcionalidad, con consecuencias adversas para la salud reproductiva.

El glifosato es el ingrediente activo de una serie de formulaciones de herbicidas de amplio espectro que se utilizan de forma masiva en todo el mundo para controlar las malezas en áreas tanto urbanas como rurales. En la actualidad no existe consenso respecto al potencial carcinogénico y de disrupción endócrina de glifosato y sus formulaciones. Distintos organismos que evaluaron el potencial carcinogénico de glifosato, arribaron a diferentes conclusiones. Mientras que la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria concluyó que “no se detectaron evidencias de carcinogenicidad para glifosato en estudios realizados en ratas y ratones”, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer de la Organización Mundial de la Salud encontró que “hay suficientes evidencias de carcinogenicidad en animales de laboratorio”, por lo que lo clasificó en el año 2015 como “probable carcinógeno para el ser humano” (Grupo 2A). De la misma manera, mientras que algunos estudios han documentado que glifosato y sus formulaciones son capaces de inducir la activación del receptor de estrógenos alfa ($RE\alpha$) y modular la expresión de genes estrógeno-sensibles, la Agencia de Protección Ambiental de EE.UU (EPA), concluyó que glifosato no presenta propiedades de PE, al no detectar una interacción con las vías de señalización del sistema endócrino.

En relación a los antecedentes disponibles acerca de las consecuencias de la exposición a glifosato sobre órganos reproductivos, la mayoría se limita a los efectos sobre el desarrollo y la funcionalidad del tracto reproductor masculino. Los estudios referidos al tracto genital femenino, son escasos y no aportan evidencias de efectos sobre la funcionalidad del mismo en la etapa adulta, especialmente cuando los órganos

hormono-dependientes son expuestos a situaciones endócrinas endógenas o exógenas particulares como la gestación o el tratamiento con hormonas. Por lo tanto, el objetivo de la presente tesis doctoral fue evaluar la influencia de la exposición postnatal a un herbicida a base de glifosato (HBG) sobre la diferenciación organogenética y funcional del útero de la rata, y determinar si se producen consecuencias a largo plazo sobre la fertilidad y el desarrollo de tumores ginecológicos. Para ello, crías hembra de rata de la cepa Wistar recibieron inyecciones subcutáneas cada 48 hs desde el día postnatal (DPN) 1 hasta el DPN7 con solución fisiológica (control) o una formulación comercial a base de glifosato (HBG) en una dosis de 2 mg de glifosato/kg/día (en el orden de magnitud de la dosis segura para glifosato de 1mg/kg/día, definida por la EPA). Luego del tratamiento, las crías hembra de ambos grupos experimentales fueron distribuidas al azar en cinco experimentos diferentes.

En la primera etapa, se evaluaron los efectos de la exposición postnatal a HBG sobre la diferenciación organogenética del útero. Para ello, las crías fueron sacrificadas en dos etapas diferentes del desarrollo postnatal: *i*) en DPN8, para determinar la respuesta aguda a la exposición a HBG, al que definimos como período neonatal; y *ii*) en DPN21, para investigar si los efectos persisten y/o se manifiestan 15 días después de finalizado el tratamiento, al que definimos como período prepuberal. En el útero de estos animales se evaluaron las características histomorfológicas, la citodiferenciación epitelial y estromal, la proliferación celular mediante inmunomarcación para Ki67, y la expresión de diversas moléculas involucradas en la diferenciación organogenética del órgano, tales como: receptores de esteroides (RE α y receptor de progesterona (RP)), genes homeóticos (Hoxa10) y de la familia de Wnt (Wnt7a). A su vez, en DPN8 se realizaron estudios para evaluar posibles modificaciones epigenéticas, mediante la determinación de la expresión del ARNm de las enzimas ADN metiltransferasas, y el estado de metilación del ADN y de modificaciones post-traduccionales de histonas en regiones potencialmente regulatorias del gen Hoxa10. Los resultados indicaron que la exposición a HBG produce alteraciones de la morfología uterina, evidenciadas por hiperplasia epitelial y aumento del espesor del estroma y del miometrio circular, sin modificaciones en los patrones de citodiferenciación epitelial y estromal en DPN8. Asimismo, detectamos que estas modificaciones estaban vinculadas a un incremento en la proliferación celular y a alteraciones en la expresión del RE α , RP y Hoxa10. En relación a Hoxa10, detectamos que el silenciamiento en la expresión del gen estaba asociado a

mayores niveles de la histona 3 trimetilada en la lisina 9 e hipermetilación del ADN en regiones potencialmente regulatorias. Finalmente, los resultados indicaron que muchos cambios detectados a nivel morfológico y molecular como consecuencia de la exposición a HBG persistieron hasta el período prepuberal (DPN21).

En una segunda etapa, evaluamos si la exposición postnatal a HBG modifica la sensibilidad uterina al 17β -estradiol (E2), utilizando un modelo de rata prepúber ovariectomizada (OVX) sometida a una estimulación crónica con E2. Al destete (DPN21), las ratas hembra fueron OVX bilateralmente y se les colocaron implantes de E2 (1 mg/ml) que se mantuvieron hasta los dos meses de edad (DPN60). En ese momento se recolectaron muestras de útero y se determinaron las características histomorfológicas, la proliferación celular (mediante inmunomarcación para Ki67) y la expresión de genes estrógeno-sensibles, tales como RE α , RE β , Wnt7a y β -catenina. El tratamiento con HBG indujo alteraciones morfológicas, evidenciadas por el desarrollo de hiperplasia uterina, y un incremento en la altura del epitelio luminal y en la densidad de núcleos del estroma. Además, en las hembras expuestas a HBG detectamos un aumento en la proliferación celular inducida por E2, que estuvo acompañado por un incremento en la expresión de los receptores de estrógeno (RE α y RE β) y una desregulación en la vía de señalización de Wnt/ β -catenina.

En una tercera etapa, investigamos los efectos de la exposición a HBG sobre el ciclo estral y los niveles séricos de los esteroides sexuales, E2 y progesterona (P4). Para ello, un grupo de animales control y expuestos a HBG durante la primera semana de vida postnatal se mantuvo con agua y comida *ad libitum* hasta los 4 meses de edad (DPN120). En ese momento y durante cuatro ciclos estrales consecutivos, se evaluó la regularidad del ciclo mediante la realización diaria de extendidos vaginales. Asimismo, en la mañana del estro del primer ciclo evaluado se extrajeron muestras de sangre de la cola para evaluar los niveles séricos de E2 y P4. Las ratas hembra expuestas postnatalmente a HBG presentaron ciclos estrales alterados. Este patrón de ciclicidad se vio reflejado en un aumento en la duración del ciclo estral a expensas de un mayor porcentaje de tiempo en proestro y estro. A su vez, el tratamiento con HBG produjo un incremento en los niveles séricos de E2 y una disminución en los de P4, con un incremento concomitante en la relación E2/P4.

En una cuarta etapa de la tesis, estudiamos los efectos de la exposición al HBG sobre la fertilidad de la hembra y la diferenciación funcional del útero durante el período post-implantatorio. Para ello, un grupo de animales control y expuestos al HBG se mantuvo con agua y comida *ad libitum* hasta alcanzar la madurez sexual (DPN90). En el DPN90, las ratas hembra fueron alojadas individualmente con machos de fertilidad comprobada. Aquellas ratas hembra que durante 3 semanas consecutivas de haberlas puesto a preñar no presentaron espermatozoides en su extendido vaginal, fueron consideradas no preñadas y con este dato se calculó el porcentaje de preñez. Las hembras que resultaron preñadas fueron asignadas a uno de los siguientes experimentos: *i*) Evaluación de la eficiencia reproductiva mediante la determinación de distintos parámetros de fertilidad (nº de cuerpos lúteos; nº de sitios de implantación (SI) y nº de sitios de reabsorción) en día de gestación (DG) 19, y *ii*) Evaluación de una de las principales vías de señalización que regulan el proceso de decidualización: RP/COUP-TFII (del inglés: *Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II*)/Bmp2 (del inglés: *Bone Morphogenetic Protein 2*), en los SI en DG9. La exposición postnatal a HBG no afectó la tasa de preñez puesto que todas las hembras resultaron preñadas. Sin embargo, el grupo expuesto a HBG mostró un incremento en el nº de sitios de reabsorción en DG19, sin cambios en el nº de SI. En DG9, las hembras expuestas a HBG exhibieron una reacción decidual alterada, evidenciada por cambios morfológicos en los SI y por una disminución en la expresión del RP y sus moléculas de señalización, COUP-TFII y Bmp2.

En una última etapa de esta tesis, evaluamos si la exposición postnatal al HBG promueve el desarrollo de lesiones pre-neoplásicas y/o neoplásicas en útero y vagina. Para ello, un grupo de animales control y expuestos postnatalmente a HBG se mantuvo con agua y comida *ad libitum* hasta alcanzar los 20 meses de edad, momento en el cual se extrajeron biopsias de útero y vagina para análisis histopatológico. El tratamiento con HBG provocó el desarrollo de neoplasias ginecológicas, que fueron caracterizadas como leiomioma uterino y rabdomiosarcoma vaginal. Adicionalmente, los animales expuestos a HBG desarrollaron neoplasias benignas en hígado y en la glándula mamaria (adenoma de vías biliares intrahéptico y fibroadenoma mamario).

En conclusión, los resultados de esta tesis muestran que la exposición postnatal a bajas dosis del HBG produce alteraciones en la diferenciación organogénica del útero, y provoca efectos adversos a largo plazo sobre la salud reproductiva, como subfertilidad y

desarrollo de tumores ginecológicos. Diversos mecanismos moleculares podrían estar involucrados en los efectos observados, entre los cuales podemos mencionar: la acción de la formulación como PE, la alteración del epigenoma, el incremento en la sensibilidad uterina al E2, el aumento en la relación E2/P4 a nivel sérico y la alteración de los patrones de ciclicidad estral.

En conjunto, los resultados de esta tesis aportan nuevas evidencias a favor del potencial carcinogénico y de la actividad como PE de los HBGs, como así también conocimiento acerca de los mecanismos moleculares afectados. Consideramos que estos hallazgos contribuirán al desarrollo de políticas sanitarias y de prevención que minimicen el riesgo para la salud humana y animal que implica la exposición a este agroquímico. Sin lugar a dudas, el compromiso de los organismos regulatorios en la adopción de estas políticas y en la búsqueda de alternativas más seguras es una necesidad ineludible.

Por último, consideramos que para el herbicida en estudio como para tantos otros compuestos con actividad de PE a los que estamos expuestos, sería muy importante para nuestra salud y la del ecosistema tener en cuenta el principio de precaución: *“Cuando haya peligro de daño grave o irreversible, la ausencia de información o certeza científica no deberá utilizarse como razón para postergar la adopción de medidas eficaces para impedir la degradación del medio ambiente”*.

ABSTRACT

The uterus is an essential organ for reproduction in mammals. Uterine organogenetic differentiation is regulated by several hormonal, cellular and molecular mechanisms, and is completed during the first postnatal week in rodents. These mechanisms program uterine cells during organogenetic differentiation to respond appropriately to hormonal cues later in life. Therefore, this stage of life is a critical period of development, in which exposure to endocrine disrupting chemicals (EDC) can alter normal differentiation program and induce permanent changes in the structure and function of the uterus, with adverse consequences for reproductive health.

Glyphosate is the active principle of a number of broad spectrum herbicides extensively used all over the world to control weeds in urban and rural areas. In the last years, it has been controversy and debate regarding the carcinogenic and the endocrine disrupting potential of glyphosate and its commercial formulations. Several bodies of experts have evaluated glyphosate carcinogenicity and drawn different conclusions. While the European Food Safety Authority concluded “no evidence of carcinogenicity was confirmed in either rats or mice”, the International Agency for Research on Cancer found there is “sufficient evidence of carcinogenicity in animals” and classified glyphosate as “probably carcinogenic to humans” (Group 2A). Similarly, while some studies have documented that glyphosate and its formulations can induce the activation of the estrogen receptor alpha (ER α) and modulate the expression of estrogen-sensitive genes, the US Environmental Protection Agency (EPA) concluded that glyphosate does not have endocrine disrupting properties, since no evidence of a possible interaction with the endocrine signaling pathways has been detected.

Regarding the available information about the consequences of glyphosate exposure on reproductive organs, most studies have focused on developmental and reproductive effects on the male reproductive tract. To our knowledge, available reports on the adverse consequences on the female reproductive system are scarce and do not provide evidence of effects on functional differentiation during adulthood, especially when hormone-dependent tissues are exposed to particular endocrine situations, such as gestation or exogenous hormonal treatment. Therefore, the aim of the present thesis was to evaluate the influence of postnatal exposure to a glyphosate-based herbicide (GBH)

on the organogenetic and functional differentiation of the rat uterus, and to determine the long-term adverse consequences on female fertility and the development of gynecological tumors. Female Wistar pups were injected subcutaneously every 48 hs from postnatal day (PND) 1 to PND7 with saline solution (control) or a commercial formulation of GBH at a dose of 2 mg of glyphosate/kg/day (in the order of magnitude of the reference dose of 1 mg/kg, assigned for glyphosate by the US EPA). After postnatal treatment, female pups from both experimental groups were randomly divided into five main experiments.

In a first part, we evaluated the effects of postnatal exposure to low doses of a GBH formulation on uterine organogenetic differentiation. Female pups were sacrificed at two different developmental time points: *i*) on PND8, to evaluate the acute response to GBH, defined as the neonatal period, and *ii*) on PND21, to investigate whether the effects persisted and/or were manifested in a stage distant from the GBH exposure, defined as the prepubertal period. In the uteri of these animals, we evaluated histomorphological features, epithelial and stromal cytodifferentiation, cell proliferation by the detection of Ki67, and the expression of proteins involved in uterine organogenetic differentiation, such as: steroid receptors (ER α and progesterone receptor (PR)), homeotic genes (Hoxa10) and members of the Wnt gene family (Wnt7a). In addition, on PND8 we evaluated possible epigenetic modifications by determining the mRNA expression of DNA methyltransferases, and DNA methylation status and histone post-translational modifications in regulatory regions of the Hoxa10 gene. The results indicated that GBH-exposure induces alterations in uterine morphology, evidenced by epithelial hyperplasia and increased stromal and circular myometrium thickness, with normal epithelial and stromal cytodifferentiation patterns on PND8. In addition, we detected that these modifications were linked to augmented cell proliferation and alterations in the expression of ER α , PR and Hoxa10. Regarding Hoxa10 gene, we detected that silencing in its expression was associated with higher levels of trimethylated histone 3 in lysine 9 and hypermethylation of DNA in regulatory regions. Finally, the results indicated that many changes detected at the morphological and molecular levels as a consequence of GBH exposure persisted until the prepubertal period (PND21).

In a second part, we evaluated whether postnatal GBH exposure might modify the sensitivity of the uterus to 17 β -estradiol (E2), using a model of prepubertal

ovariectomized (OVX) rats submitted to chronic stimulation with E2. At weaning (PND21), a subset of female rats were bilaterally OVX and treated with capsules filled with E2 (1 mg/ml) until they were two months of age. On PND60, uterine samples were removed to evaluate histomorphological features, cell proliferation by the detection of Ki67 and the expression of estrogen-sensitive genes, such as ER α , ER β , Wnt7a and β -catenin. GBH treatment induced morphological alterations in the rat uterus that were evidenced by the development of uterine hyperplasia, increase of luminal epithelial cell height and higher stromal nuclei density. In addition, GBH-exposed females showed increase in E2-induced cell proliferation, induction of both ER α and ER β , and deregulation of Wnt/ β -catenin signaling pathway.

In a third step, we evaluated whether a brief postnatal exposure to GBH disrupts estrous cyclicity and serum levels of the sex steroids, E2 and progesterone (P4). A subset of control and GBH-exposed animals were kept with feed and water *ad libitum*, without further treatment until they were four month of age (PND120). From PND120 and during four consecutives cycles, the estrous cycle was daily monitored by vaginal smears. In addition, blood from the tail was obtained on the morning of the estrus of the first cycle to determine E2 and P4 serum levels. GBH-exposed rats showed alterations in estrous cyclicity. Accordingly, GBH females exhibited prolonged estrous cycles and spent more time in proestrus and estrus. Moreover, an increased level of E2 and decreased level of P4, with a concomitant increase in E2/P4 ratio, was detected in GBH-exposed rats.

In a fourth stage of the thesis, we investigated whether postnatal GBH exposure alters female fertility and uterine functional differentiation during the post-implantation period. On PND90, a subset of female rats were housed individually for three consecutive weeks with males of proven fertility to allow several possible matings. Female rats that become pregnant were assigned to one of the following experiments: *i*) Evaluation of the reproductive performance, by determining the pregnancy rates, the number of corpora lutea, and the implantation and resorption sites on gestational day (GD) 19, and *ii*) Evaluation of one of the endocrine signaling pathways that regulates uterine decidualization: PR/COUP-TFII (Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II)/Bmp2 (Bone Morphogenetic Protein 2) at the implantation sites (IS) on GD9. Postnatal exposure to GBH did not affect the pregnancy rate since all females became pregnant. However, the GBH-exposed group showed a significant

increase in the number of resorption sites on GD19, without changes in the number of IS. On DG9, females postnatally treated with GBH showed alterations in uterine decidualization, evidenced by morphological changes at the IS and downregulation of PR and its signaling molecules, COUP-TFII and Bmp2.

In the last part of the thesis, we evaluated whether GBH postnatal exposure promotes the development of pre-neoplastic and neoplastic lesions in uterus and vagina of aged rats. A subset of control and GBH-exposed animals were kept with feed and water *ad libitum*, without further treatment until adulthood. Animals were sacrificed at 20 months of age, and the uteri and vagina were dissected and processed for histopathology. We found that GBH treatment elicited the development of gynecological neoplasms, characterized as uterine leiomyoma and vaginal rhabdomyosarcoma. Additionally, GBH-exposed animals developed benign neoplasms in the liver and in the mammary gland (intrahepatic bile duct adenoma and mammary fibroadenoma).

In conclusion, our results show that postnatal exposure to low doses of GBH not only alters uterine organogenetic differentiation, but also causes long-term adverse effects on female reproductive health, such as subfertility and the development of gynecological tumors. Several molecular mechanisms could be involved in the adverse effects induced by GBH exposure, among which we can mention: endocrine disruption, epigenetic modifications, enhanced sensitivity of the rat uterus to E2, increased E2/P4 serum levels and abnormal estrous cyclicity.

Overall, the results of this thesis provide new evidences about the carcinogenic potential and endocrine disrupting activity of GBHs, as well as knowledge about the molecular mechanisms involved. We believe that these findings will contribute to the development of health and prevention policies that minimize the risk to human and animal health that exposure to this agrochemical implies. Undoubtedly, the commitment of regulatory bodies in the adoption of these policies and in the search for safer alternatives is strictly necessary.

Finally, we consider that for the herbicide under study as for many other compounds with EDC activity to which we are exposed, it would be very important for our health and the environment to take into account the precautionary principle: *“Where there are threats of serious or irreversible damage, lack of full scientific certainty shall not be*

used as a reason for postponing cost-effective measures to prevent environmental degradation”.

INTRODUCCIÓN

*“Lo importante es no dejar de cuestionar.
La curiosidad tiene su propia razón de existir”.*

Albert Einstein

El útero es un órgano fundamental para la reproducción en mamíferos. Entre sus principales funciones fisiológicas podemos mencionar: **i)** el transporte, almacenamiento y maduración de espermatozoides; **ii)** la provisión de un ambiente adecuado para la implantación, supervivencia, y desarrollo del embrión y las membranas extraembrionarias asociadas; y, **iii)** la contracción rítmica de la musculatura uterina, necesaria para la expulsión de las crías durante el parto.

1 | Diferenciación organogénica del útero. Etapa postnatal

El desarrollo organogénico y la diferenciación de la mayoría de los órganos del tracto reproductor femenino se completan durante el período prenatal. Sin embargo, el útero no se encuentra completamente desarrollado o diferenciado al nacimiento. El establecimiento de la histoarquitectura específica del tejido uterino se completa postnatalmente en roedores (ratas y ratones) y animales domésticos [1-3]. El patrón de diferenciación radial que tiene lugar durante esta etapa del desarrollo establece las tres capas histológicas de la pared uterina: endometrio, miometrio, y perimetrio. La morfogénesis postnatal del útero presenta eventos comunes en todos los mamíferos, que incluyen: **i)** la organización y estratificación del estroma endometrial; **ii)** la diferenciación y el crecimiento del miometrio; y, **iii)** el desarrollo y la diferenciación de las glándulas endometriales a partir del epitelio luminal (adenogénesis) [4].

En ratas y ratones, el desarrollo postnatal del útero es muy similar, y la morfología del órgano se establece en el día postnatal 15 (DPN15) en ambas especies [5]. Al nacimiento, el útero de la rata y del ratón carece de glándulas endometriales y consiste en un epitelio simple sostenido por un mesénquima indiferenciado. Entre el nacimiento y el DPN10, el mesénquima uterino se diferencia en el estroma endometrial radialmente orientado, el miometrio circular interno y el miometrio longitudinal externo (Figura 1) [5]. La alfa actina de músculo liso (α -SMA) y los filamentos intermedios desmina y vimentina se utilizan como marcadores de diferenciación celular para miocitos, miofibroblastos y fibroblastos. Estos marcadores son específicos de tejido y su patrón de expresión se encuentra regulado durante los procesos de desarrollo [5,6]. En el DPN5 en ratones y DPN7 en ratas, invaginaciones epiteliales comienzan a formar brotes de epitelio glandular (yemas) en el estroma en desarrollo, lo que marca el inicio del proceso de adenogénesis (Figura 1). Sin embargo, la presencia de las glándulas endometriales no se observa hasta el DPN7 en el ratón y DPN9 en la rata [7-9]. A partir

de este momento y hasta el DPN15 (Figura 1), los procesos de tubulogénesis, ramificación y enrollamiento dan origen en roedores a glándulas tubulares simples ligeramente enrolladas que se extienden a través del estroma hasta alcanzar la capa circular interna del miometrio[8]. La citodiferenciación epitelial (glandular y luminal) se caracteriza por la expresión de citoqueratina 8 (CK8), una queratina específicamente encontrada en células epiteliales que componen epitelios cilíndricos simples (Figura 2), y que es esencial para el mantenimiento de la integridad celular y la diferenciación epitelial [10].

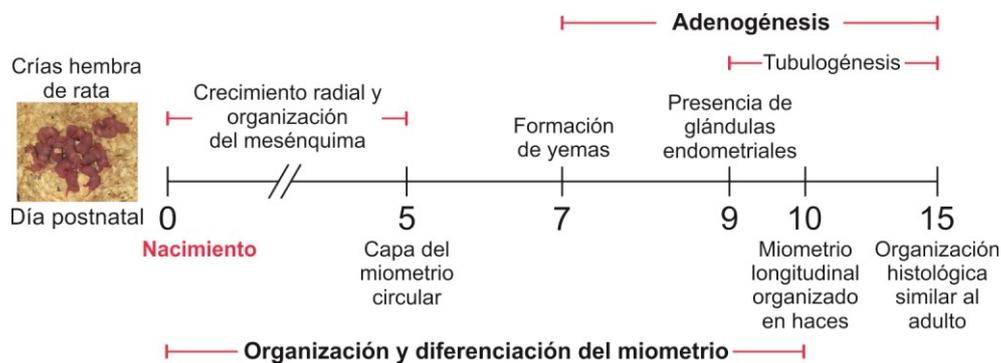


Figura 1. Representación esquemática de la secuencia de eventos durante la morfogénesis postnatal uterina en la rata. Modificado de Guerrero Schimpf y col., 2018.

La proliferación de las células uterinas durante el desarrollo postnatal es crítica para el crecimiento normal del útero y su morfogénesis. Las células uterinas epiteliales, estromales y miometriales proliferan rápidamente durante el período neonatal [11,12]. Sin embargo, la proliferación disminuye con la edad, alcanzando su punto más bajo entre los DPN15-20, para luego aumentar en los animales jóvenes con el inicio de la pubertad y el aumento en los niveles circulantes de 17β -estradiol (E2) [11,13]. Además, la proliferación epitelial es fundamental para aspectos críticos de la adenogénesis uterina, tales como la gemación del epitelio glandular y la invasión del estroma por parte de las glándulas uterinas nacientes [14].

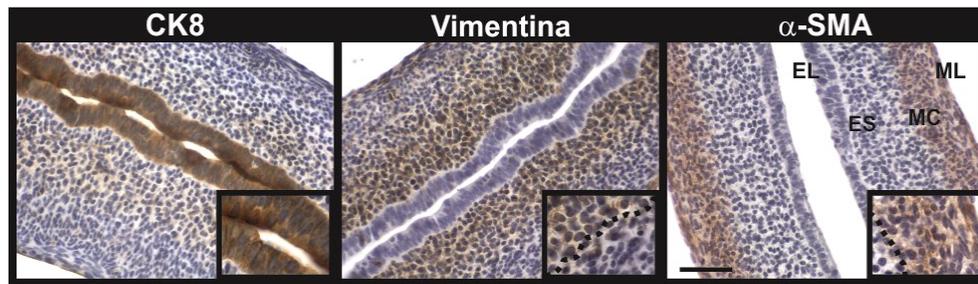


Figura 2. Marcadores de citodiferenciación celular en útero de DPN8. Se muestra la inmunomarcación para citoqueratina 8 (CK8), vimentina y alfa actina de musculo liso (α SMA), marcadores de diferenciación para células epiteliales, fibroblastos y miocitos. EL, epitelio luminal; ES, estroma subepitelial; MC, miometrio circular; ML, miometrio longitudinal. Barra: 50 μ m. Modificado de Guerrero Schimpf y col., 2018.

El proceso de diferenciación organogénica del útero está regulado por interacciones epitelio-mesénquima finamente orquestadas por la expresión de genes morforegulatorios específicos y numerosas cascadas de genes que regulan la diferenciación de las células madre, la proliferación y el crecimiento tisular [15]. Los genes morforegulatorios involucrados en estos procesos de desarrollo comprenden aquellos que codifican: *i*) miembros de la familia Hox, *ii*) miembros de la familia Wnt, y *iii*) los receptores de hormonas esteroides ováricas [4,16].

1.1 | Genes de la familia Hox

Los genes homeóticos de la familia Hox (del inglés: *Homeobox*) cumplen un rol esencial en el establecimiento de patrones de expresión específicos que definen los límites tisulares a lo largo del eje anteroposterior del cuerpo durante el desarrollo. En diferentes especies, como humanos y roedores, los genes Hox se encuentran agrupados en cuatro clusters separados: A, B, C y D, los que a su vez están compuestos por 9-13 genes [15]. Estos genes poseen una secuencia altamente conservada de 183 pb que codifica para un dominio de 61 aminoácidos, denominado homeodominio. Este dominio tiene la capacidad de unirse al ADN y actuar como factor de transcripción, alterando la expresión de genes que le confieren a las células identidad espacial inequívoca en las diferentes regiones a lo largo del eje antero-posterior del cuerpo [16,17].

Dentro de esta familia de genes Hox, los genes Hoxa10 y Hoxa11 intervienen en la morfogénesis uterina regulando la diferenciación y segmentación del conducto de Müller (Figura 3A) [3]. En ratones modificados genéticamente se ha observado que la alteración en la expresión de estos genes produce cambios anatómicos significativos en

la organización espacial y estructural del útero que conducen a anomalías reproductivas en la etapa adulta [18]. La interrupción en la expresión del gen **Hoxa10** provoca que el 25% de la porción anterior del útero se diferencie a oviducto, [19], mientras que la delección del gen **Hoxa11** produce una disminución en el número de glándulas endometriales y un menor desarrollo del estroma endometrial [20].

1.2 | Genes de la familia Wnt

Los genes *Wnt* (del inglés: *Wingless-related MMTV integration site*) son los homólogos en vertebrados de los genes “*Wingless*” de *Drosophila Melanogaster*, implicados en el establecimiento de patrones de polaridad de los segmentos corporales durante la embriogénesis de la mosca [21]. En los humanos y en roedores, codifican para una familia de glicoproteínas secretadas que incluye al menos 16 miembros con secuencias altamente conservadas, y que exhiben roles cruciales en la embriogénesis, en la interacción célula-célula, y en la proliferación y diferenciación celular [22,23].

Seis miembros de esta familia (Wnt4, Wnt5a, Wnt7a, Wnt7b, Wnt11 y Wnt16) se expresan en el útero durante el desarrollo [24]. Durante la diferenciación postnatal, Wnt4, Wnt5a y Wnt16 se expresan predominantemente en el estroma endometrial mientras que Wnt7a, Wnt7b y Wnt11 en el epitelio uterino. Ratones con delección del gen que codifica para Wnt5a o Wnt7a presentan malformaciones en el tracto reproductor femenino e infertilidad. Entre las alteraciones detectadas en los mutantes para el gen Wnt5a se encuentran cuernos uterinos de menor diámetro con un epitelio luminal normal, pero con ausencia de glándulas endometriales y estructuras cervicales y vaginales bien definidas [25]. En forma similar, los ratones deficientes en Wnt7a poseen útero hipoplásico con un epitelio luminal estratificado rodeado de una pequeña capa de estroma que carece de glándulas endometriales, un miometrio hiperplásico y desorganizado, y bajos niveles de expresión de Wnt4, Wnt5a, Hoxa10 y Hoxa11 [26]. En el mismo sentido, la desregulación de β -catenina que es un mediador intracelular crítico de la vía de señalización canónica de Wnt, induce la formación de metaplasia escamosa en el epitelio luminal y de hiperplasia en el epitelio glandular [27], confirmando la importancia de la vía de señalización Wnt/ β -catenina en el mantenimiento del diferenciación epitelial del útero.

Se ha definido que se produce un control mutuo entre la expresión de Wnt7a y Wnt5a. Por un lado, la expresión de **Wnt7a** sería indispensable para una correcta organización

epitelial y miometrial, y para el establecimiento del patrón de crecimiento radial de las células mesenquimales (Figura 3B). La expresión de Wnt7a en el epitelio luminal permitiría el mantenimiento (flechas de puntos) de altos niveles de expresión de Wnt5a, y además de Wnt4, Hoxa10 y Hoxa11 en el estroma uterino. A su vez, las señales inducidas por la expresión de Wnt5a producirían una represión de Wnt7a en las invaginaciones del epitelio luminal. De acuerdo a los datos experimentales, esta caída en la expresión de Wnt7a sería necesaria para el correcto desarrollo de las glándulas endometriales. Por lo tanto, las interacciones mediadas por Wnt determinarían el destino de las células epiteliales luminales, lo que les permitiría seguir las diferentes etapas del proceso de adenogénesis (invaginación, diferenciación y formación de las glándulas uterinas) [4,25].

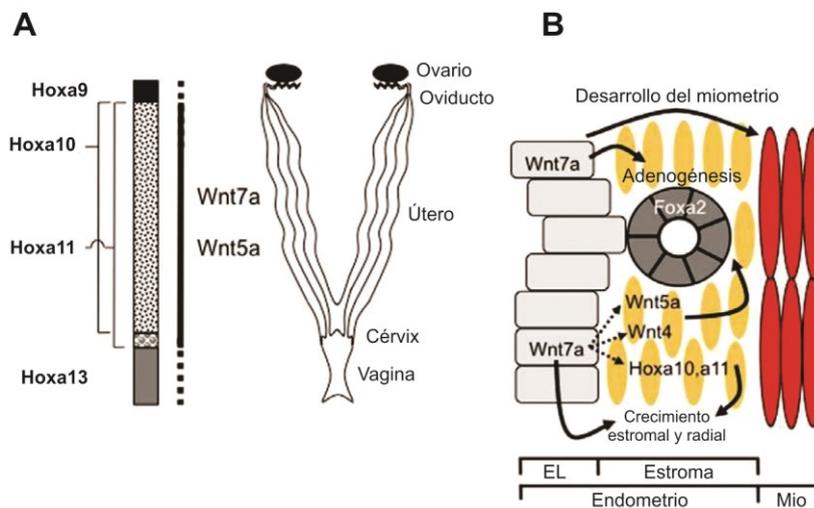


Figura 3. Expresión de genes Hox y Wnt durante la diferenciación organogénica del útero del ratón. (A) Representación esquemática de la expresión espacial de los genes Hox y Wnt en el tracto reproductivo femenino durante el desarrollo. (B) Hipótesis sobre el rol de los genes Hox y Wnt en el patrón de diferenciación radial y el proceso de adenogénesis durante el desarrollo postnatal del útero. EL, epitelio luminal; Mio, miometrio. Modificado de Spencer y col., 2012.

1.3 | Receptores de hormonas esteroides ováricas

Los esteroides ováricos E2 y progesterona (P4) son reguladores clave del crecimiento, diferenciación y funciones fisiológicas de muchos tejidos, incluyendo el tracto reproductivo femenino. Estas hormonas ejercen su acción a través de su unión a receptores específicos, miembros de la superfamilia de receptores nucleares que actúan como factores de transcripción. Estos receptores, al unirse a su ligando o fosforilarse, dimerizan e interaccionan con secuencias específicas del ADN altamente conservadas

denominadas elementos de respuesta a hormona (HRE, del inglés: *Hormone Response Element*), traduciendo señales provenientes del medio ambiente extracelular y alterando la expresión génica para así llevar a cabo la acción biológica de las hormonas [28].

Los receptores de hormonas esteroides comparten similitudes estructurales y dominios funcionales clave (Figura 4). El dominio A/B en la región amino terminal contiene una función de activación (AF-1) que contribuye a la actividad transcripcional del receptor y es independiente del ligando. Adyacente a él, se encuentra el dominio C o dominio de unión al ADN (DBD), constituido por motivos de dedos de zinc responsables del reconocimiento y unión a sus secuencias blanco en el ADN (HRE). Este dominio es el más conservado entre los distintos receptores y es responsable de su dimerización, lo que permite la formación de homo y heterodímeros. A continuación y cerca del extremo carboxilo terminal, se localiza el dominio E o dominio de unión a ligando (LBD) que contiene una función de transactivación 2 (AF-2) dependiente de la presencia del ligando y que puede interactuar con moléculas coactivadoras y correpressoras de la transcripción [29].

Al menos dos **receptores de estrógenos** (REs) se han estudiado en profundidad hasta la actualidad, el receptor de estrógenos alfa (RE α) y el receptor de estrógenos beta (RE β) (Figura 4A). Dos genes diferentes, *Esr1* y *Esr2*, ubicados en distintos cromosomas codifican para el RE α y el RE β , respectivamente. Los DBD de ambos receptores comparten un 97% de similitud de secuencia, mientras que los LBD comparten sólo un 60% de sus secuencias. Sin embargo, ambos receptores presentan afinidades similares para 17 β -estradiol [30]. Por el contrario, el **receptor de progesterona** está codificado por un único gen en humanos y roedores, y su transcripción a partir de la activación de diferentes promotores origina tres isoformas, RP-A, RP-B y RP-C (Figura 4B) [31]. La isoforma A carece de 164 aminoácidos en el extremo N-terminal que contiene la isoforma B. La isoforma C, en cambio, contiene un DBD truncado, por lo que los efectos biológicos de la P4 estarían mediados principalmente por las isoformas A y B [32].

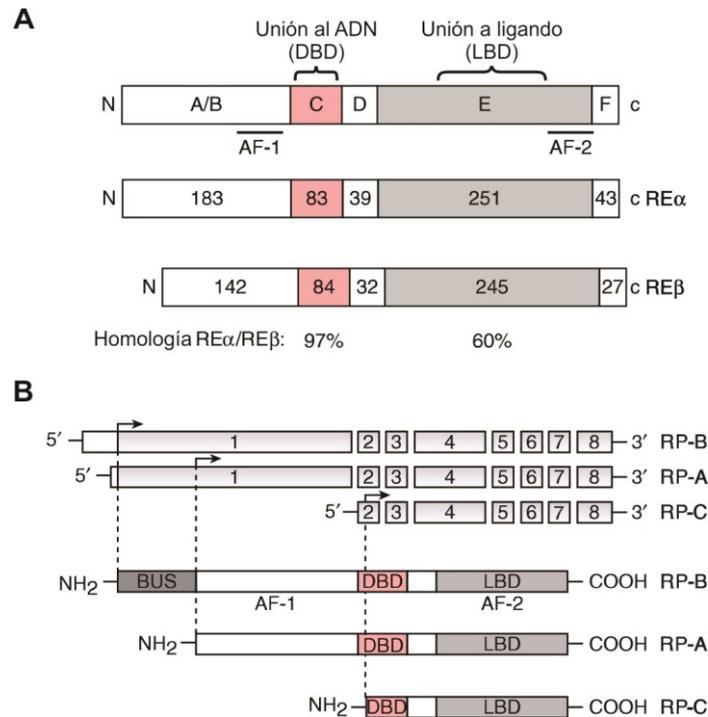


Figura 4. Estructura de los receptores de hormonas esteroides ováricas. (A) Representación esquemática de los receptores de estrógenos alfa (RE α) y beta (RE β). Los números dentro de cada dominio representan la longitud del dominio en aminoácidos. A/B, dominio A/B; C, dominio C; D, región bisagra; E, dominio E; F, dominio F. **(B)** Representación esquemática de las distintas isoformas del receptor de progesterona (RP-A, RP-B y RP-C). Los números del 1 al 8 representan los exones del gen. Las flechas negras indican los distintos sitios de inicio de la traducción. DBD, dominio de unión al ADN; LBD, dominio de unión a ligando; AF-1, dominio de transactivación independiente de ligando; AF-2, dominio de transactivación dependiente de ligando. Modificado de Hewitt y Korach, 2008, y Lee y col., 2008.

En las células, los receptores de las hormonas esteroides ováricas influyen sobre la transcripción génica y producen diversas respuestas celulares a través de dos grandes mecanismos. La **vía genómica clásica** involucra la interacción directa de los receptores con sus genes blanco. La unión de la hormona al receptor induce un cambio conformacional que promueve su dimerización. Así el complejo hormona-receptor migra al núcleo, recluta coactivadores (CoAc) y se une a los HRE localizados en regiones regulatorias de genes blanco (Figura 5-1). El complejo hormona-receptor también puede reclutar a otros factores de transcripción, como AP1, SP1 o C/EBP- β , y regular la expresión de genes que carecen del HRE (Figura 5-2) [30,32]. La **vía no clásica** involucra la activación de vías de señalización en la membrana mediadas por quinasas citoplasmáticas (MAPK, PI3K, PK) y segundos mensajeros (SM), que conducen a la activación de la transcripción (genómica) o al desarrollo de respuestas rápidas que no requieren transcripción ni síntesis proteica (no genómicas) [33]. En el

primer caso, las proteínas quinasas pueden fosforilar y activar a los receptores a partir de la unión de factores de crecimiento (FC) a sus receptores en la membrana celular (Figura 5-3) (este mecanismo se denomina también “vía genómica independiente de ligando”, debido a que se produce en ausencia de ligando), o bien los esteroides sexuales pueden unirse a receptores de membrana y activar cascadas de quinasas que fosforilen factores de transcripción y modifiquen la transcripción de genes específicos (Figura 5-4). Las acciones no genómicas involucran la modulación de segundos mensajeros (Figura 6-5) luego de la unión de los esteroides sexuales a receptores de membrana, tales como calcio intracelular, AMPc y óxido nítrico [33].

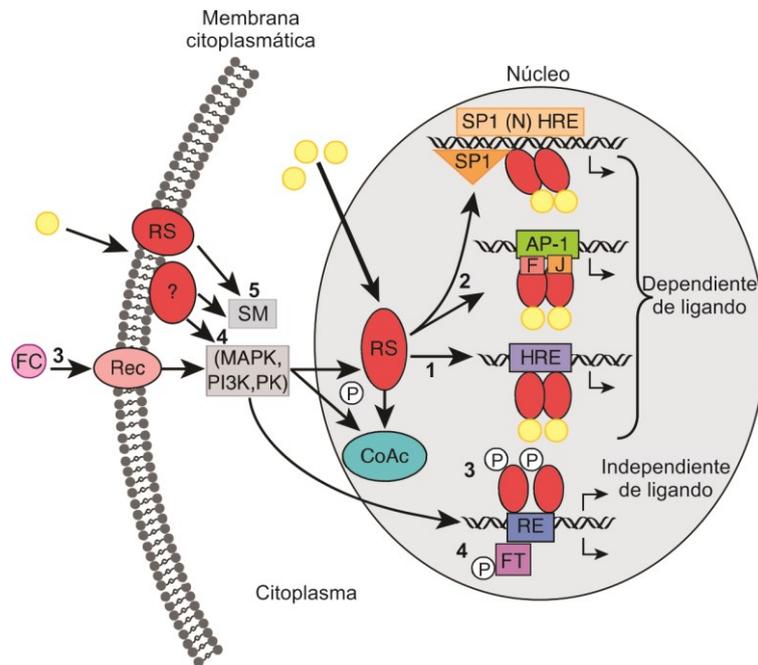


Figura 5. Mecanismos de acción de los esteroides sexuales. Representación esquemática de la vía clásica (1 y 2) y no clásica (3, 4 y 5) de acción de los esteroides sexuales 17 β -estradiol y progesterona, representados en el esquema a través de círculos amarillos. CoAc, coactivadores; F, Fos; FC, factor de crecimiento; FT, factor de transcripción; HRE, elemento de respuesta a hormona; J, Jun; RE, elemento de respuesta; RS, receptor de esteroide; SM, segundo mensajero. Modificado de Hewitt y Korach, 2008, y Binder y col., 2015.

1.3.1 | Receptor de estrógenos

El RE α es la forma predominante en el útero y el principal mediador de los efectos de los estrógenos en este órgano [34]. Por el contrario, y a pesar de su expresión relativamente baja en útero, el RE β actúa como un modulador negativo de las acciones de los estrógenos. Distintos estudios han revelado que ratones mutantes para este gen exhiben una respuesta exacerbada a un tratamiento exógeno con E2 [35,36].

En roedores, la expresión de los REs en el útero en desarrollo ha sido reportada por diversos autores. La inmunomarcación para el RE α se detecta por primera vez en las células mesenquimales del útero fetal en el día gestacional 15 (DG15), mientras que su expresión en el epitelio comienza a observarse en la última etapa del período fetal, y aumenta marcadamente en el DPN4, alcanzando su punto máximo el DPN16 [33]. Se ha descrito que el RE β se expresa en el epitelio uterino durante el período neonatal, y que su expresión disminuye con la edad [35]. A pesar de estos antecedentes, se ha demostrado que el desarrollo y la morfogénesis uterina son normales en ratones mutantes tanto para el RE α como para el RE β [34]. Específicamente, estudios de recombinación tisular han demostrado que la diferenciación del epitelio uterino es independiente de la expresión del RE α en el estroma [7]. Por otro lado, distintos trabajos han revelado que, a diferencia de lo que sucede en el adulto, la proliferación de las células uterinas epiteliales y estromales es independiente de la acción del E2 [11] y de la expresión del RE α en neonatos [13]. De la misma manera, se ha demostrado que el proceso de adenogénesis ocurre normalmente durante el desarrollo postnatal de ratones deficientes para el RE α [13]. Sin embargo, la presencia de los REs en etapas tempranas de la vida hace que el útero y otros órganos del sistema reproductor femenino sean susceptibles a la acción de hormonas y compuestos con actividad hormonal [4].

1.3.2 | Receptor de progesterona

A diferencia de lo que ocurre con la expresión del RE α durante el período fetal en roedores, tanto las células uterinas mesenquimales como epiteliales son negativas para el RP en este período. Al nacimiento, la expresión del RP comienza a detectarse en el epitelio uterino alrededor del DPN3-5, y luego en el estroma, aumentando su expresión con la edad [37,38]. En forma similar a lo que sucede en los ratones mutantes para el RE α , ratones deficientes para el RP exhiben una embriogénesis y un desarrollo uterino postnatal normal [39]. Estudios de recombinación tisular demostraron que la diferenciación del epitelio uterino es independiente de la expresión del RP en el estroma [7]. A su vez, se ha observado que la exposición a E2 y a compuestos con actividad estrogénica durante el período neonatal es capaz de modular la expresión del RP en el neonato [37,40].

El microambiente hormonal durante el período de morfogénesis uterina es crucial ya que una serie compleja de interacciones entre los receptores hormonales y moléculas de

señalización específicas, programará a las células uterinas para responder apropiadamente a señales hormonales durante la vida adulta. Una activación inadecuada de las vías de señalización que regulan los procesos de diferenciación y desarrollo puede afectar los programas organizacionales, alterar las vías normales de desarrollo e inducir cambios permanentes en la estructura y función uterina, con posibles problemas reproductivos a largo plazo [16,41-44].

2 | Diferenciación funcional del útero y su regulación. Etapa adulta

A partir de la pubertad, luego que la morfología uterina se ha establecido, el útero atraviesa diferentes procesos que pueden agruparse como procesos de diferenciación funcional. Los mismos están relacionados con modificaciones del órgano necesarias para su funcionalidad durante la vida adulta. Tanto durante el ciclo estral como durante la preñez se producen profundos cambios regulados principalmente por los niveles de E2 y P4.

Una vez completada la diferenciación organogenética, la pared uterina en los roedores se compone de tres regiones o capas (Figura 6): **i) Perimetrio**, es la capa más externa que recubre al útero; está compuesto por mesotelio y una delgada capa de tejido conjuntivo laxo. Presenta abundantes vasos linfáticos, sanguíneos y fibras nerviosas, y está recubierto por la serosa peritoneal; **ii) Miometrio**, se encuentra subyacente al perimetrio. Está compuesto por dos capas de músculo liso, una capa circular interna y una longitudinal externa, separadas por una capa intermedia de tejido conectivo con abundantes vasos sanguíneos; y, **iii) Endometrio**, constituido por un epitelio cilíndrico simple que recubre el lumen del útero, y glándulas tubulares simples revestidas por un epitelio cúbico simple y rodeadas por una capa de tejido conectivo laxo muy vascularizada, correspondiente al estroma endometrial [8].

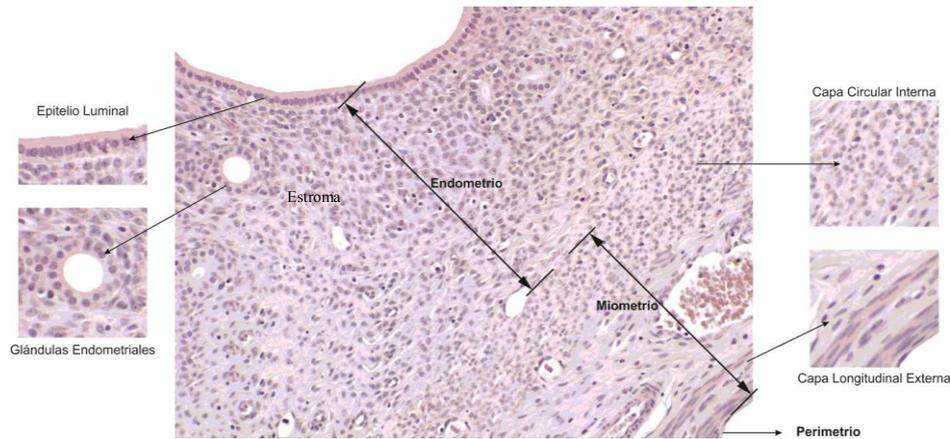


Figura 6. Imagen representativa de una sección histológica de útero de rata coloreado con hematoxilina-eosina. Se observan las características histológicas del tejido: epitelio luminal, glándulas endometriales, estroma, capa circular interna del miometrio, capa longitudinal externa del miometrio y perimetrio. Tomado de Alarcón, 2015.

Como mencionamos anteriormente, a partir de la pubertad, el útero experimenta cambios funcionales cíclicos (proliferación, producción de proteínas de secreción, apoptosis, etc.) en respuesta a cambios en los niveles séricos de las hormonas ováricas [45]. Al igual que durante el período de desarrollo postnatal, las interacciones entre el estroma y el epitelio son críticas para mediar los efectos de estas hormonas, muchos de los cuales ocurren a través de sus receptores específicos [46].

2.1 | *Modificaciones hormonales durante el ciclo estral de la rata*

El inicio de la pubertad en la rata hembra resulta de una cascada de eventos que comienzan con el establecimiento de un patrón de liberación pulsátil de la hormona luteinizante (LH, del inglés: *Luteinizing Hormone*), después de la cuarta semana de vida postnatal, ocho o nueve días antes del inicio del ciclo estral [47].

El ciclo estral se compone de una secuencia de eventos hormonales y de comportamientos, altamente sincronizados que se repiten en el tiempo. Los ciclos reproductivos son precisos en su naturaleza pero presentan gran diversidad entre las especies [48]. La rata hembra es un mamífero poliéstrico y de ovulación espontánea. A diferencia del ciclo menstrual de la mujer, el ciclo estral de la rata se caracteriza por la conducta de apareamiento en forma coincidente con la ovulación, asegurando así la oportunidad para la fertilización y la preñez. Los ciclos estrales ocurren desde el comienzo de la pubertad hasta la senescencia [49]. El momento de la pubertad es variable y depende de la cepa, siendo el peso y la edad los principales factores que la

modifican. La apertura vaginal indica el momento de la pubertad y coincide con la primera ovulación. En la rata, el ciclo estral tiene una duración de 4 a 5 días, sin variaciones estacionales bajo condiciones de bioterio (ciclo luz-oscuridad y temperatura controlados), y consiste de 4 etapas: proestro, estro, metaestro y diestro [50]. La duración del proestro es de aproximadamente 12-14 horas (hs), mientras que el estro se extiende entre 25-27 hs, el metaestro entre 6-8 hs, y el diestro entre 55-57 hs [50].

Durante el ciclo estral, los órganos reproductivos atraviesan cambios cíclicos tanto a nivel histológico como funcional, en respuesta a fluctuaciones en los niveles séricos de las hormonas esteroides ováricas, E2 y P4, que son reguladas por las gonadotrofinas LH y FSH (del inglés *Follicle Stimulating Hormone*), secretadas por la hipófisis anterior. En la Figura 7, se presentan los perfiles de secreción de las hormonas LH, FSH, E2, P4 y prolactina (PRL) durante el ciclo estral de la rata.

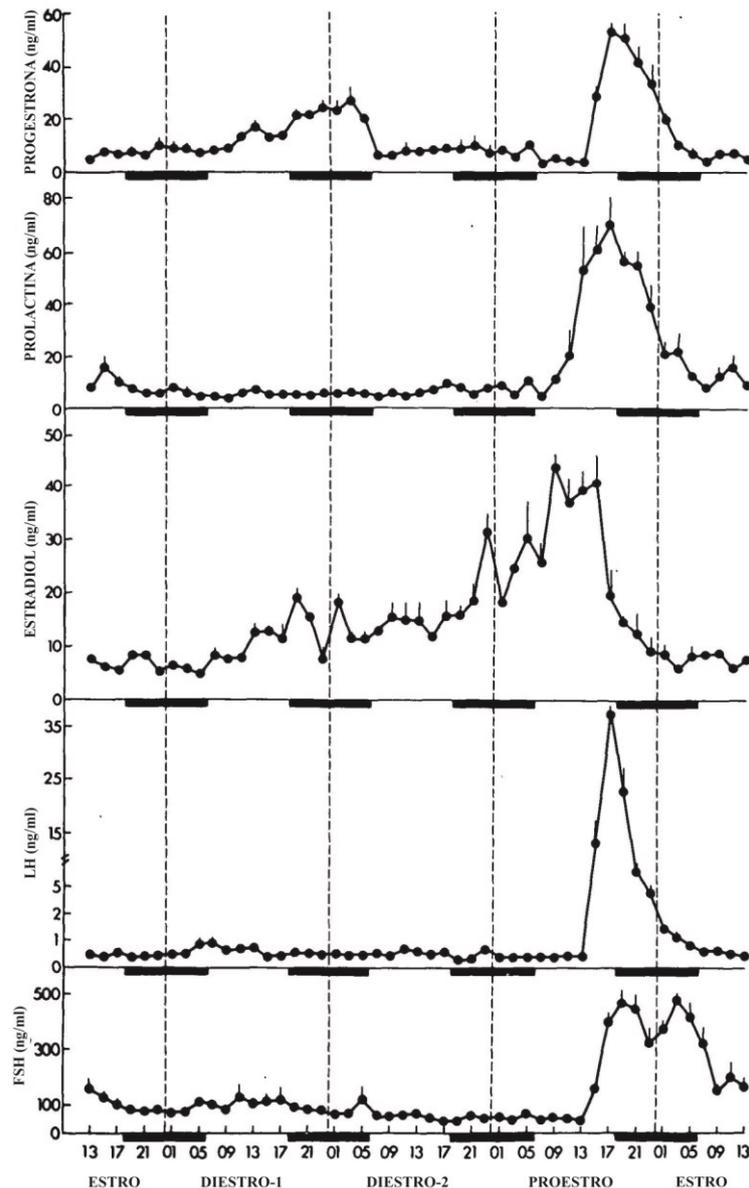


Figura 7. Niveles hormonales de progesterona (P4), prolactina (PRL), 17 β -estradiol (E2), hormona luteinizante (LH) y hormona foliculo estimulante (FSH) durante el ciclo estral de la *rata*. Los números sobre el eje x representan distintos momentos del día considerando, 24 horas de reloj. Las barras en negro representan el período de oscuridad. Las líneas de punto verticales señalan la medianoche. Cada punto representa el promedio de la concentración hormonal con su desviación estándar. Modificado de Smith y col., 1975.

Los perfiles de secreción de LH muestran una secreción pulsátil, con frecuencias más altas durante el proestro y más bajas durante el estro/diestro. El pico de LH durante el proestro estimula a los folículos preovulatorios a ovular y a formar los cuerpos lúteos (CLs) [50]. Dos picos de FSH peri-ovulatorios estimulan el crecimiento de folículos más pequeños. El primer pico se correlaciona con el de LH y el segundo pulso está asociado con una disminución de la inhibina después de la ovulación. La secreción de

PRL en la mayor parte del ciclo estral es baja y estable desde la tarde del proestro hasta la mañana del estro. Durante la tarde del proestro, la secreción de PRL se eleva para producir un pico pre-ovulatorio que es coincidente con el aumento de la LH. En los roedores, la PRL es luteotrófica y esencial para el mantenimiento del CL durante los primeros días de gestación. La fase lútea del ciclo estral en roedores es transitoria, y la implantación no puede ocurrir a menos que el CL se mantenga debido a los altos niveles de PRL [50]. Durante el metaestro se produce el primer pico de P4 que es secretada por los CLs. Los niveles de P4 luego decaen durante el segundo día del diestro cuando comienzan a aumentar los niveles de E2. El segundo pico de P4 se produce casi de manera simultánea con el pico de LH. El ciclo se completa durante el proestro cuando ocurre el pico de E2 que estimula la liberación de gonadotrofinas que conducen a la ovulación [49]. Los efectos de la variación hormonal a través del ciclo estral pueden monitorearse mediante la observación de los cambios histológicos del epitelio vaginal [51]. Dichos cambios se visualizan a través de la observación directa de extendidos vaginales o por su estudio histológico en muestras incluidas en parafina.

Como mencionamos previamente, son las hormonas esteroideas derivadas del ovario las que dirigen los ciclos estrales o menstruales en los mamíferos y son, por lo tanto, esenciales para el desarrollo y el mantenimiento de la preñez. La respuesta uterina al E2 pre-ovulatorio es requerida para preparar al tejido para cuando se produzca el incremento en los niveles de P4. Asimismo, el aumento de P4 que acompaña a la ovulación, también produce cambios críticos que preparan al tejido uterino para que ocurra la implantación [33].

2.2 | *Gestación y regulación hormonal del proceso de decidualización*

La gestación en la rata tiene una duración de 22-24 días. El establecimiento y mantenimiento de la preñez en la rata involucra dos eventos endócrinos. El primero es desencadenado por el apareamiento, en el que la estimulación cervico-vaginal y de los flancos desencadena un reflejo neuroendócrino que estimula la secreción bifásica (una diurna y otra nocturna) de PRL hipofisaria. El aumento de PRL induce la expresión de receptores de LH en las células lúteas que estimula la síntesis de P4 necesaria para el mantenimiento de la preñez [49]. El segundo evento endócrino necesario para mantener la preñez, depende no sólo del éxito del proceso de implantación, sino también del proceso de decidualización y del desarrollo normal del feto. En los roedores preñados,

la placenta y las células deciduales del endometrio producen hormonas similares a la PRL, que ejercen el efecto luteotrófico necesario para mantener la función de los CLs hasta el final de la preñez [52,53].

Las hormonas esteroides E2 y P4 desempeñan un rol fundamental en los procesos de implantación y decidualización, actuando a través de sus receptores análogos. La preparación del útero en los roedores durante los primeros días de gestación (DG1 y DG2), comienza cuando los niveles elevados de E2 provenientes de la secreción ovárica en el estadio pre-ovulatorio estimulan la proliferación de las células epiteliales luminales y glandulares [54]. A partir de la tarde del DG2 los niveles séricos de E2 disminuyen, y en el DG3 se produce un incremento en los niveles de P4 proveniente de los CLs recientemente formados, que induce la proliferación en el estroma subepitelial. Estos cambios están acompañados por una inducción de la expresión del RP en el estroma subepitelial [55-57]. En el DG4 se produce la secreción ovárica pre-implantatoria de E2 que, en acción sinérgica con la P4, producen dos efectos. Por un lado, potencian la proliferación celular en el estroma subepitelial, y por el otro, las células epiteliales cesan su proliferación y se produce su diferenciación. En este momento, el útero se vuelve receptivo a la implantación del blastocisto y se origina un *cross-talk* entre el blastocisto y el útero que asegura el inicio de la implantación [58-60]. La implantación en el ratón y en la rata se produce con una diferencia de 24 hs. Mientras que en el ratón dicho proceso ocurre en la noche del DG4 [61], en la rata la primera señal de la reacción de acoplamiento (etapa de adhesión) en el proceso de implantación ocurre en la noche del DG5 [62].

En roedores, una vez que los blastocistos se unen al epitelio luminal uterino, las células del estroma endometrial inician una transformación morfológica y funcional denominada **decidualización**, que da lugar a la formación de la decidua, un tejido compacto y especializado propio de la preñez [63]. El tejido decidual tiene un rol fundamental en el establecimiento de la interacción materno-fetal, de la cual dependerá el correcto avance de la preñez. El desarrollo de la decidua influirá en la regulación de la invasión trofoblástica para una correcta orientación y desarrollo placentario, y en la regulación de la respuesta inmune materna hacia el embrión semialogénico [63]. Además, la decidua rodea al embrión en desarrollo proveyéndolo de una barrera física que media el intercambio de gases y productos de desecho, y funciona como fuente de nutrientes y hormonas antes del desarrollo de una placenta funcional [64,65]. Esta

función es posible gracias a que las células deciduales poseen un perfil secretorio y biosintético propio, que difiere del que presentan las células estromales que les dieron origen. Específicamente, se caracterizan por mostrar un aumento en los niveles de expresión de fosfatasa alcalina, proteínas estructurales como **desmina** [66], y proteínas de secreción, como las proteínas relacionadas a prolactina, factores de crecimiento y citoquinas [58,67].

La decidualización es un proceso finamente regulado en tiempo y espacio. Comienza en las proximidades del embrión implantado, en el polo antimesometrial (AM) del endometrio uterino, dando lugar a la decidua antimesometrial (DAM), y luego se extiende hacia el polo mesometrial (M), resultando en la decidua mesometrial (DM) (Figura 8A) [68]. Las células deciduales del AM y M presentan distintos fenotipos morfológicos y funcionales como resultado de una diferenciación específica [65,69].

Las células estromales del polo **antimesometrial** se diferencian a un tipo celular de aspecto epiteloide que se caracteriza por la acumulación de glicógeno y lípidos en el citoplasma, el aumento en el número de lisosomas y la gran cantidad de uniones célula-célula, resultando en un tejido muy compacto que anidará al embrión en desarrollo [70]. A su vez, las células de la DAM se caracterizan por la adquisición de poliploidía (múltiples copias de ADN genómico en el núcleo celular) por el mecanismo de endoreduplicación [58]. La zona de la DAM que estará en contacto con el embrión se desarrolla primero y se denomina zona decidual primaria (ZDP) (Figura 8A). Su formación en roedores ocurre entre los DG5 y 6 cuando las células estromales cesan su proliferación (Figura 8B) [58,68]. Las células de la ZDP son grandes, con citoplasma basófilo, dos o más núcleos, retículo endoplásmico abundante, y mitocondrias, lisosomas y complejos de Golgi bien desarrollados [68]. Luego del desarrollo de la ZDP, las células circundantes del estroma experimentan mitosis y se diferencian a células poliploides, mono o binucleadas, con gran extensión de citoplasma, constituyendo la zona decidual secundaria (ZDS) de la DAM (Figura 8A) [71]. Para el DG8, la reacción decidual se extiende hasta la zona adyacente a la capa circular del miometrio (adm) (Figura 8A), y finalmente, la DAM alcanza su máximo desarrollo en la rata en DG10 [72]. La regresión progresiva de la DAM por apoptosis comienza en estadios relativamente tempranos de la preñez (DG8-10), y da lugar a la formación de una delgada capa alrededor del embrión en DG12, conocida como decidua capsular (Figura 8B) [68].

La diferenciación de las células estromales se extiende hacia el lado **mesometrial** del endometrio en DG8 y forma la DM. Las células de esta zona son más pequeñas y aisladas que las células de la DAM, presentan una forma irregular y contienen un solo núcleo [70]. La DM alcanza su máximo desarrollo en la rata en DG12 y con el tiempo, la zona central es invadida por células trofoblásticas del cono ectoplacentario (cep) dando como resultado la formación de la placenta definitiva en DG14 (Figura 8B). Entre los DG14-16, la DM sufre regresión apoptótica y finalmente, para el DG19, se encuentra confinada a una región uterina marginal que forma el componente materno de la placenta, la decidua basal (Figura 8B) [68].

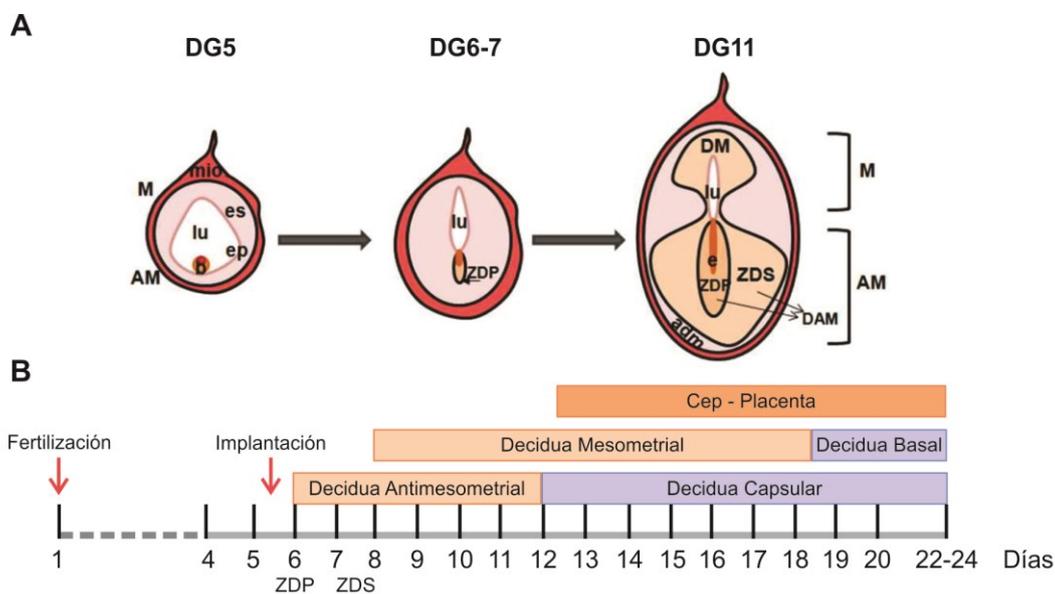


Figura 8. Desarrollo de la decidua en la rata. (A) Representación esquemática de una sección transversal de un sitio de implantación en distintos días de gestación (DG). (B) Línea de tiempo del desarrollo decidual. AM, zona antimesometrial; M, zona mesometrial; ZDP, zona decidual primaria; ZDS, zona decidual secundaria; DAM, decidua antimesometrial; DM, decidua mesometrial; lu, lumen uterino; es, estroma; ep, epitelio; e, embrión; cep, cono ectoplacentario; mio, miometrio; adm, área adyacente al miometrio indiferenciada. Modificado de Fonseca y col., 2012.

2.2.1 | Vía de señalización RP/COUP-TFII/Bmp2

La hormona esteroidea P4, actuando a través de sus receptores específicos (RP-A y RP-B) desempeña un rol fundamental en los procesos de implantación y decidualización, activando múltiples vías de señalización paracrina que regulan la proliferación y diferenciación de las células uterinas [63,73]. Algunos autores han demostrado que durante los primeros días de gestación (DG3 y 4) se observa un incremento en los niveles de expresión del RP tanto en el estroma como en el epitelio uterino [73]. En ese

momento, el efecto que produce la P4 a través de su receptor consiste en inhibir la proliferación en el epitelio luminal y glandular, e inducir la proliferación y diferenciación de las células del estroma uterino [57]. Wang y col. (1998) han reportado que la isoforma A se expresa de forma predominante durante la fase secretoria y durante la primera etapa de la gestación, sugiriendo que el RP-A es el principal efector de la acción de la P4 sobre el endometrio, preparando al útero para la implantación, la decidualización y el mantenimiento de la gestación [74].

A través de los hallazgos de múltiples estudios, se ha demostrado que la P4 media el proceso de decidualización a través de la activación de la vía de señalización Ihh/Ptch1/COUP-TFII/Bmp2 (Figura 9) [75]. La P4, a través de la unión a sus receptores, activa una compleja serie de eventos moleculares mediados por IHH (del inglés: *Indian Hedgehog*), un miembro de la familia de morfogenes *hedgehog* que se expresa en el epitelio endometrial justo antes del momento de la implantación [76,77]. La señalización de IHH se transmite al estroma uterino a través de los receptores Ptch1/Smo (del inglés: *Patched 1/Smoothened*), los cuales inducen la expresión de COUP-TFII (del inglés: *Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transcription Factor II*) en las células del estroma [78]. Finalmente, COUP-TFII estimula la expresión de Bmp2 (del inglés: *Bone Morphogenetic Protein 2*), el cual promueve la decidualización uterina [79].

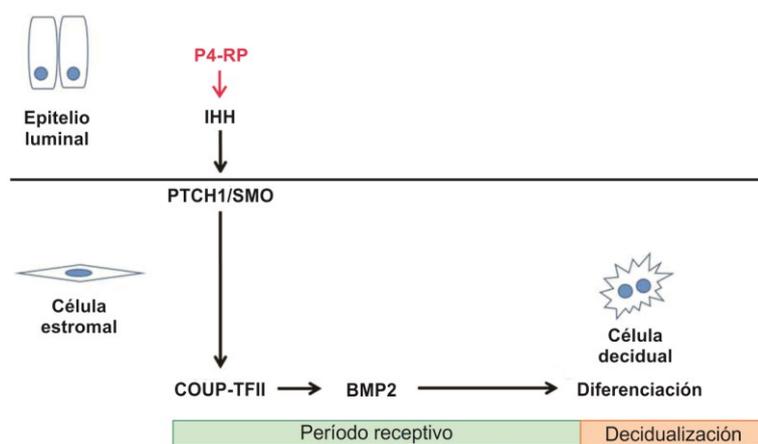


Figura 9. Representación esquemática de la vía de señalización que regula el proceso de decidualización. Se muestra la vía de señalización regulada por progesterona (P4) que dirige la diferenciación de las células del estroma uterino. Modificado de Bhurke y col., 2016.

COUP-TFII es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares cuya expresión se incrementa en el estroma uterino durante la preñez temprana. Estudios realizados en

ratones con delección condicional para COUP-TFII en útero demostraron que esta molécula regula la receptividad endometrial y el proceso de decidualización mediante la supresión de la actividad del RE α en el epitelio luminal y la estimulación de la expresión de Bmp2 [63,78]. El morfogen Bmp2 se expresa en el estroma uterino en las cercanías de los sitios de implantación y su expresión persiste a través de la fase temprana de la decidualización. Mientras que la pérdida de la expresión de Bmp2 en el útero produce fallas en el proceso de decidualización, una disminución en la expresión uterina del RP y Bmp2 estaría relacionada con una mayor incidencia de reabsorciones fetales [78,80,81].

Una respuesta alterada del endometrio a los esteroides ováricos o cualquier perturbación en las vías de señalización que dirigen e integran los cambios moleculares tempranos en las células endometriales, compromete los eventos subsiguientes necesarios para la correcta implantación y el desarrollo embrionario [63].

3 | Lesiones pre-neoplásicas y neoplásicas del tracto reproductor femenino

Cuando se producen alteraciones en la diferenciación funcional, relacionadas con cambios en las respuestas celulares a la acción de los esteroides ováricos, el útero y otros órganos hormono-dependientes como la vagina o la glándula mamaria, pueden presentar alteraciones en los procesos de crecimiento que pueden traducirse en el desarrollo de lesiones pre-neoplásicas o neoplásicas. En este sentido, diferentes antecedentes indican que los estrógenos pueden ser clasificados como importantes agentes etiológicos en el cáncer del tracto reproductor femenino [82]. Como reguladores clave de la diferenciación celular y el crecimiento, los estrógenos tienen el potencial de producir inestabilidad en el ADN, inducir hiperplasia y promover la transformación neoplásica de células estrógeno-sensibles [83].

3.1 | Lesiones pre-neoplásicas en útero

Diversas lesiones pre-neoplásicas que afectan tanto al epitelio luminal como glandular uterino han sido descritas en la bibliografía. Entre las lesiones que se detectan en el **epitelio luminal** del útero se destaca la atipia celular. Esta lesión se caracteriza por la presencia de células pleomórficas con núcleos hipocrómicos, bordes citoplasmáticos

poco definidos, y disposición atípica, que indica pérdida de la polarización celular (Figura 10A vs. B). Este tipo de lesión puede conducir al desarrollo de hiperplasia endometrial atípica, tanto luminal como glandular [84].

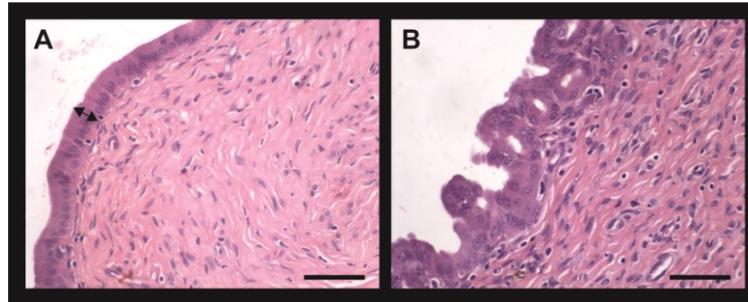


Figura 10. Alteraciones en el epitelio luminal uterino. (A) Altura epitelial normal de un animal en estro (flecha doble). **(B)** Epitelio luminal con atipia celular. Barras: 50 μ m.

Como mencionamos anteriormente, las **glándulas** uterinas normales se caracterizan por presentar un epitelio simple cúbico y diversas formas, como redondeada, ovalada o alargada (Figura 11A, puntas de flecha). Entre las lesiones glandulares pre-neoplásicas detectadas en útero, podemos mencionar: a) **glándulas con metaplasia escamosa**, caracterizadas por poseer dos o más capas de células, constituyendo una estratificación del epitelio glandular (Figura 11B); b) **glándulas quísticas**, usualmente de gran tamaño, amplia luz y epitelio simple plano (Figura 11C); c) **glándulas con anomalías celulares**, caracterizadas por poseer células cilíndricas, relación núcleo/citoplasma baja, bordes citoplasmáticos pocos definidos, núcleos con la cromatina más laxa y/o disposición atípica de las células (Figura 11D y E); y d) **glándulas con glándulas hijas** (GGH), caracterizadas por exhibir varias formas (redondas, elongadas, tortuosas, estrelladas) y tamaños, y presentar glándulas dentro del epitelio de la glándula madre, o bien en la superficie externa de la glándula madre (como glándulas en ciernes) (Figura 11F y G) [85,86]. Estos tipos morfológicos glandulares presentan el potencial de proliferar, dividirse y producir hiperplasia endometrial en un estadio avanzado. Específicamente, las glándulas quísticas pueden conducir al desarrollo de **hiperplasia endometrial quística**. Esta lesión está caracterizada por la presencia de una agrupación de glándulas quísticas, de aspecto tortuoso, y glándulas que poseen el lumen dilatado. El estroma que rodea este tipo de lesión es a menudo menor que el del endometrio circundante (Figura 11H e I) [87].

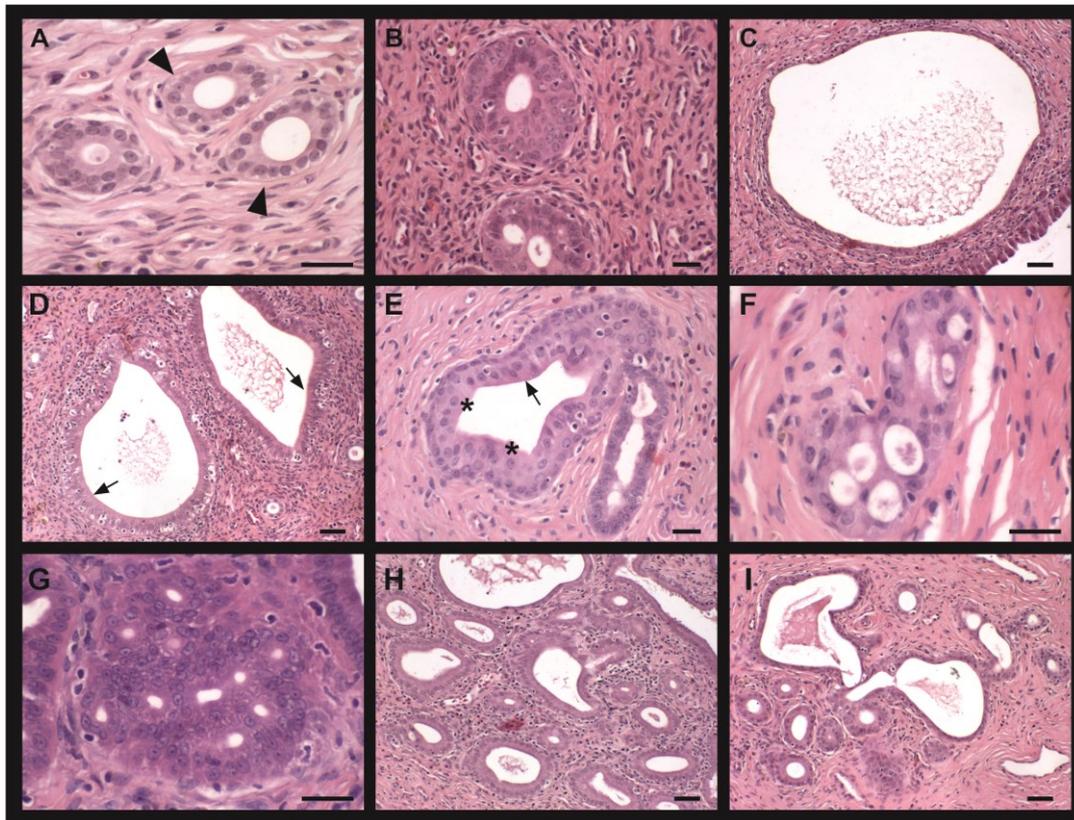


Figura 11. *Imágenes representativas de diferentes tipos de lesiones glandulares uterinas.* (A) Glándulas normales (puntas de flecha). (B) Glándulas con metaplasia escamosa. (C) Glándula quística. (D y E) Glándulas con anomalías celulares. Las flechas negras indican epitelio simple cilíndrico. Los asteriscos indican núcleos hipocrómicos de disposición atípica. (F y G) Glándulas con glándulas hijas. (H e I) Hiperplasia endometrial quística. Barras: (A, B, F y G) 25 μ m, (C, D, H e I) 50 μ m.

3.2 | Lesiones neoplásicas en útero

Los tumores uterinos más frecuentes que afectan el cuerpo del útero (parte superior del órgano) se pueden clasificar en: *i*) leiomiomas uterinos (también conocidos como fibromas), y *ii*) carcinomas endometriales.

3.2.1 | Leiomioma uterino

Los **leiomiomas uterinos** son los tumores benignos más comunes del tracto reproductor femenino entre las mujeres en edad fértil [88]. Su frecuencia puede ascender al 70% en mujeres pre-menopáusicas. Estas neoplasias se originan en las células del músculo liso del miometrio y se asocian con menorragia, dolor pélvico, aborto espontáneo e infertilidad. La tasa de prevalencia de los leiomiomas uterinos es aproximadamente del 25-50%, y representan la principal causa de histerectomía en Estados Unidos. A pesar de ello, la causa de desarrollo de los fibromas uterinos es en gran parte desconocida. Sin

embargo, existen algunos factores de riesgo establecidos como edad temprana de la menarca (menos de 10 años), obesidad, nuliparidad y menopausia tardía (más de 55 años). En mujeres adultas, se considera que el principal factor de riesgo es la exposición prolongada a estrógenos sin oposición de P4 [89].

3.2.2 | Carcinoma endometrial

El carcinoma endometrial es un tumor maligno que afecta principalmente a mujeres post-menopáusicas. Existen diferentes subtipos, siendo los más comunes los de tipo epitelial, que pueden ser clasificados como **adenocarcinomas de tipo I** (80% de los casos de cáncer endometrial) o adenocarcinomas de tipo II (10% de los casos). Los de tipo I presentan hormonodependencia, y están asociados con altos niveles de estrógenos en combinación con bajos niveles de P4 [90]. Los antecedentes muestran que la exposición ininterrumpida durante largo tiempo a estrógenos, conduce a hiperplasia endometrial, lo cual incrementa las posibilidades de desarrollar hiperplasia atípica y eventualmente cáncer endometrial tipo I [91]. En cambio, los de tipo II no están asociados a la estimulación con estrógeno o P4 [90]. Otros tipos de tumores endometriales menos frecuentes (entre el 3 y 9% de los tumores endometriales) son los sarcomas uterinos, que presentan un comportamiento más agresivo.

3.3 | Lesiones neoplásicas en vagina

Los **tumores de vagina** son neoplasias extremadamente raras, que representan a nivel mundial el 1-3% de todas las neoplasias ginecológicas. Los tipos histológicos más comunes son el carcinoma de células escamosas (66-95% de los casos) y el adenocarcinoma (5-15%). Los sarcomas vaginales son tumores raros de origen mesenquimático, que representan el 2-3% de todas las neoplasias malignas vaginales y se observan en mujeres de todas las edades [92]. Específicamente, el **rabdomiosarcoma** (RMS) es un tumor mesenquimatoso maligno con diferenciación a músculo esquelético, que se origina como consecuencia de una alteración en el crecimiento y la diferenciación de las células precursoras miogénicas [93]. Se identifican tres tipos histológicos: alveolar (20%), embrionario (60%) y pleomorfo (20%). Los tipos alveolar y embrionario son los sarcomas de partes blandas más frecuentes en la infancia y la adolescencia, y habitualmente aparecen antes de los 20 años de edad [93]. Hasta el momento, no se conoce con exactitud cuáles son las causas que producen este tipo de tumor. Sin embargo, se sabe que estas neoplasias estarían

relacionadas con algunos síndromes genéticos [94]. Además, ciertos trabajos han asociado el RMS infantil con una historia materna de abortos, siendo el riesgo mayor a mayor número de abortos [95].

Las células que derivan del mesénquima embrionario presentan positividad para vimentina, una proteína que forma parte de los filamentos intermedios del citoesqueleto celular. Durante el proceso de miogénesis, las células mesenquimáticas primitivas se diferencian en células del tejido muscular y van adquiriendo en forma secuencial la expresión de proteínas específicas del músculo, como miogenina y desmina. En primera instancia, las células madre mesenquimales que inician el proceso de diferenciación hacia células del músculo esquelético, adquieren la expresión de miogenina en el estadio de miofibroblasto. En una etapa posterior, y durante el proceso de maduración, las células adquieren la expresión de desmina [96]. Las células tumorales del RMS presentan mutaciones en diferentes factores de transcripción y componentes de las vías de señalización que regulan este proceso, que hacen que la maduración de las células se detenga en algún estadio del desarrollo miogénico [93].

4 | Perturbadores endócrinos: Efectos sobre la salud reproductiva y el desarrollo de tumores ginecológicos

En el último medio siglo, los trastornos ginecológicos que afectan al sistema reproductor femenino han incrementado y se han convertido en un problema de salud. Entre ellos se destacan la infertilidad, las complicaciones asociadas al embarazo, como partos prematuros y bajo peso al nacer, y los tumores hormono-dependientes, como cáncer de endometrio y ovario [97]. Numerosas evidencias sugieren que la exposición a contaminantes ambientales podría considerarse un factor de riesgo para el desarrollo de estas patologías ginecológicas, especialmente cuando la exposición ocurre durante períodos críticos de desarrollo [98].

Entre los contaminantes ambientales, se ha evidenciado la presencia masiva de diversos químicos capaces de producir alteraciones en el sistema endócrino de seres humanos y animales silvestres. Estas sustancias conjuntamente han sido denominadas disruptores o **perturbadores endócrinos (PE)**, y constituyen un grupo heterogéneo de compuestos que comprenden contaminantes orgánicos persistentes, pesticidas (fungicidas, herbicidas e insecticidas), químicos industriales, ingredientes de cosméticos, productos

farmacéuticos y de higiene personal, y sustancias vegetales naturales con actividad estrogénica, clasificados como fitoestrógenos (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de los perturbadores endócrinos según el tipo y el uso.

Clasificación	Ejemplos específicos
Contaminantes orgánicos persistentes	Dioxinas
	Bifenilos policlorados (PCB)
	Diclorodifeniltricloroetano (DDT)
	Retardantes de llama bromados
Pesticidas	Vinclozolina (funguicida)
	Atrazina (herbicida)
	Clorpirifos (insecticida)
	Endosulfán (insecticida)
Químicos industriales	Ftalatos (agentes químicos de estabilización)
	Ésteres de ftalatos (plastificantes)
	Bisfenol A (BPA) (policarbonatos plásticos y resinas epoxy)
Ingredientes de productos farmacéuticos y de cuidado personal	Etinilestradiol y levonorgestrel (anticonceptivos orales)
	Dietilestilbestrol (DES) (tratamientos antiabortivos)
	Tamoxifeno (tratamiento oncológico)
	Triclosán (antimicrobiano)
	Galaxolida (fragancia utilizada en perfumes y colonias)
Fitoestrógenos	Isoflavonas: genisteína y daidzeína

Modificado de *United Nations Environment Programme and the World Health Organization*, 2013.

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, del inglés: *Environmental Protection Agency*) define a los PE como “agentes exógenos que interfieren con la síntesis, secreción, transporte, unión a receptores, acción o degradación de las hormonas endógenas responsables de mantener la homeostasis, reproducción, desarrollo y/o conducta” (<http://www.epa.gov>). En 2012, la *Endocrine Society* definió a los PE como químicos exógenos o mezclas de químicos que interfieren con cualquier aspecto de la acción hormonal [99]. Estos compuestos no poseen una estructura química similar a la de las hormonas esteroides naturales, sin embargo, muchos de ellos han demostrado tener actividad estrogénica, por lo que han sido denominados xenoestrógenos [100].

La evidencia más clara de que la exposición a xenoestrógenos durante el desarrollo fetal puede afectar la salud reproductiva humana surgió del uso generalizado del potente estrógeno sintético dietilestilbestrol (DES). A partir de 1940, el DES fue prescrito a mujeres embarazadas para prevenir abortos espontáneos y complicaciones del

embarazo, e incluso administrado a los recién nacidos para mejorar la ganancia de peso [97]. Sin embargo, en la década del setenta, su utilización fue prohibida debido a que se detectó que las hijas de mujeres tratadas con DES durante el embarazo, padecían graves problemas ginecológicos, como anomalías estructurales del tracto reproductor (útero en forma de T), infertilidad, complicaciones graves asociadas al embarazo (embarazo ectópico y abortos espontáneos), menopausia temprana (antes de los 45 años de edad), alta incidencia de displasia vaginal y mayor riesgo de desarrollar adenocarcinoma de células claras en cérvix y vagina [97,101].

Efectos similares a los observados en humanos por exposición a DES se han descrito en numerosos modelos animales, incluyendo malformaciones oviductales, subfertilidad y una mayor incidencia de fibromas uterinos, particularmente en una cepa de ratas que desarrolla estas lesiones en forma espontánea [89]. De la misma manera, la exposición a contaminantes ambientales con actividad de PE ha demostrado impactar negativamente sobre la salud reproductiva. Yoshizawa y col. (2009) realizaron un estudio *in vivo* donde ratas Harlan Sprague-Dawley expuestas por vía oral y en forma crónica a dioxinas y PCB mostraron una mayor incidencia de hiperplasia endometrial quística, metaplasia escamosa luminal en útero y carcinoma uterino [102]. Otros autores observaron que la exposición a químicos organoclorados como DDT, PCB y metoxicloro, promueve el desarrollo de endometriosis en modelos murinos [103]. De la misma manera, distintos estudios reportaron que la exposición postnatal a endosulfán y BPA produce subfertilidad asociada a fallas pre-implantatorias [104,105]. En conjunto, estos datos sugieren que la exposición a sustancias con actividad hormonal representa un riesgo aumentado de desarrollar trastornos reproductivos, especialmente cuando la exposición se produce durante etapas críticas de desarrollo.

5 | *Mecanismos de acción de perturbadores endócrinos*

En los últimos años, se ha definido que uno de los posibles mecanismos de acción de los PE implica la inducción de modificaciones epigenéticas en regiones regulatorias de genes clave para los órganos donde ejercen sus efectos. En este sentido, los antecedentes indican que el **epigenoma** es particularmente vulnerable a una desregulación durante los períodos de desarrollo y diferenciación. Esto se debe a que los

patrones de metilación o modificación post-traduccionales de histonas necesarios para el desarrollo y la funcionalidad de los tejidos, se programan durante esta etapa [41].

Una modificación epigenética de la cromatina involucra cambios heredables en la expresión génica, sin cambios en la secuencia de ADN. Entre las modificaciones epigenéticas conocidas podemos resaltar las **modificaciones post-traduccionales (MPTs) de histonas** y la **metilación del ADN**. Las histonas pueden sufrir múltiples modificaciones enzimáticas en residuos específicos (lisina, arginina, y serina) de su extremo N-terminal como acetilación/deacetilación y metilación/demetilación, a través de la acción de enzimas con actividad de histona acetiltransferasa, histona deacetilasa (HDAC), histona metiltransferasa (HMT) e histona demetilasa. Estas MPTs pueden alterar las cargas y la estructura de la cromatina, permitiendo la interacción o repulsión entre los nucleosomas y el ADN, lo que a su vez, dificultará o facilitará la accesibilidad de los factores de transcripción al ADN [42]. Respecto al rol que cumple cada modificación en la regulación de la transcripción génica, podemos mencionar que la metilación de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9me) desempeña una función dual en el mantenimiento de una estructura condensada de la cromatina (heterocromatina) y en la activación de la transcripción génica. Se ha demostrado que H3K9me es capaz de unirse a la proteína HP1 (del inglés: *Heterochromatin Protein 1*). HP1 es responsable de la represión transcripcional mediante el reclutamiento de la enzima ADN metiltransferasa (DNMT, del inglés: *DNA Methyltransferase*) 3b, y la formación y el mantenimiento de la heterocromatina [43,44]. Por otro lado, algunos estudios sugieren que la presencia de H3K9 trimetilada (H3K9me₃) en regiones codificantes de genes activos en mamíferos estaría asociada a la activación de la transcripción, mientras que su presencia en regiones promotoras cumpliría un rol opuesto [45,46].

Además de las MPTs en las histonas, la **metilación del ADN** posee un profundo impacto epigenético. Este proceso actúa como una marca epigenética estable y heredable que es crítica para procesos celulares normales, incluyendo la regulación de la expresión génica durante el desarrollo y la reparación del ADN. La unión covalente de un grupo metilo a un residuo de citosina en dinucleótidos CpG (denominado sitio CpG) es realizada por las enzimas DNMTs. A diferencia del rol que cumple la enzima DNMT1 (involucrada en el mantenimiento del patrón de metilación del ADN después de cada ciclo de replicación celular), las enzimas DNMT3a y DNMT3b son las que establecen los patrones de metilación *de novo* del ADN. Los sitios CpG están

comúnmente metilados a través de todo el genoma. Sin embargo, normalmente no lo están en las denominadas islas CpG. Las islas son regiones “ricas en CpG” que contienen grandes cantidades de sitios CpG (>60%), y que en algunos casos se ubican en la región regulatoria 5’ o promotora de un gen [47]. Pequeños cambios en los niveles de metilación en determinados sitios CpG del promotor de un gen pueden tener un efecto significativo sobre la expresión génica. La metilación de los residuos de citosina es permanente, irreversible, y resultará en la represión transcripcional. El proceso de metilación del ADN impacta en la expresión génica y la estructura de la cromatina de varias maneras. Principalmente, las citosinas metiladas pueden ser usadas como sitios de acoplamiento para proteínas de unión a metilos, las cuales luego reclutan complejos remodeladores de la cromatina que contienen enzimas HDACs, resultando en el condensamiento de la estructura de la cromatina.

La exposición a compuestos ambientales durante procesos de desarrollo puede alterar el patrón epigenético normal, producir cambios en la expresión génica e incrementar la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades durante la vida adulta. En este sentido, modificaciones en el patrón de metilación del ADN y en las MPTs de histonas en regiones regulatorias de diferentes genes, como Hoxa10 y el RE α , se han asociado con una mayor incidencia de neoplasias y trastornos reproductivos en animales postnatalmente expuestos a DES, BPA y endosulfán [106-108]. Específicamente, se ha detectado hipermetilación en regiones regulatorias del gen Hoxa10 en carcinomas uterinos de ratones de 18 meses de edad postnatalmente expuestos a DES [109]. Por otro lado, la hipometilación de los promotores del RE α por exposición a endosulfán se ha asociado con alteraciones en la expresión de genes estrógeno-sensibles en el período peri-implantatorio y con fallas en la implantación [107]. Además, se han descrito modificaciones en los niveles de diversas enzimas involucradas en mecanismos epigenéticos, como HDACs e HMT, en animales expuestos *in utero* a BPA que presentaron una respuesta uterina al E2 alterada [110].

6 | *Herbidas a base de glifosato*

Entre las formulaciones de herbidas disponibles en nuestro país, aquellas que contienen glifosato (N-fosfonometil glicina) como principio activo representan aproximadamente el 80% [111]. Esta serie de formulaciones presentan un amplio

espectro de acción (no selectivo) y se utilizan para erradicar las malezas en áreas agrícolas y para la desecación química post-cosecha. Además de los usos tradicionales en la agricultura, los herbicidas a base de glifosato (HBGs) son empleados en los hogares, en el mantenimiento de espacios públicos y en el control de la flora acuática [112]. Se estima que la utilización de este tipo de herbicidas se ha incrementado ~100 veces a nivel mundial entre 1974 y 2014, produciéndose un aumento abrupto a partir de 1996 con la introducción de cultivos genéticamente modificados tolerantes al herbicida (como soja, maíz y algodón), y la consecuente expansión de las áreas sembradas tanto en nuestro país como en el resto del mundo [113,114]. El uso masivo del herbicida condujo a la aparición de malezas resistentes a los HBGs, que derivó en el aumento de las dosis y el número de aplicaciones del producto [115].

6.1 | Niveles ambientales y exposición ambiental y ocupacional

En Argentina, las concentraciones medioambientales de glifosato y su principal metabolito, el ácido aminometilfosfónico (AMPA), han sido evaluadas en diferentes matrices que rodean las principales áreas de producción de cereales y oleaginosas. Los datos revelaron la presencia de glifosato y AMPA en el agua y sedimentos de ríos, arroyos y lagunas de áreas rurales y suburbanas en las provincias de Buenos Aires [116-118], Santa Fe [119], Córdoba [120] y Entre Ríos [119,121]. Las áreas más contaminadas revelaron concentraciones de glifosato en agua de 700 µg/l en la provincia de Buenos Aires [118], y de 2,15 y 3,29 mg/kg en sedimentos de ríos de las provincias de Córdoba y Entre Ríos, respectivamente [119-121]. Además, se detectaron niveles elevados de glifosato y AMPA en muestras de suelo de pueblos rurales y de campos destinados a la agricultura, prácticamente en forma ubicua y en concentraciones de glifosato de hasta 3,89 y 5,0 mg/kg [118,121,122]. Otra matriz en donde se detectaron niveles de glifosato y AMPA fue en el polvo derivado de la erosión de un campo de la provincia de La Pampa, un año después de la última aplicación del herbicida [123]. Esto pone de manifiesto que el polvo que proviene de campos donde se aplica el herbicida podría constituir una fuente importante de contaminación aérea. A su vez, residuos de glifosato y AMPA han sido detectados en una serie de alimentos para consumo humano y animal, en fórmulas alimenticias a base de soja para niños e incluso en agua envasada [124-127]. En Argentina, se encontraron niveles de glifosato muy elevados, por encima del orden de los mg/kg, en semillas y plantas de soja transgénica en campos de las provincias de Santa Fe y Salta. Algunas de estas muestras superaron el

límite máximo de residuos permitidos para alimentos de 20 mg/kg establecido por la Unión Europea [128,129].

Estudios de biomonitorio realizados en muestras humanas detectaron la presencia de glifosato en la orina de individuos que habitan en áreas tanto urbanas como rurales de Europa y Estados Unidos [130,131]. En este último país, un estudio reciente realizado en mujeres embarazadas encontró una correlación positiva entre los niveles de glifosato en orina y la residencia en zonas rurales [132]. Otro estudio realizado en Tailandia que arrojó resultados preocupantes, detectó glifosato en el suero de mujeres embarazadas y de sangre de cordón umbilical en concentraciones que estuvieron en el rango de 0,2-189,1 ng/ml y 0,2-94,9 ng/ml, respectivamente. La presencia de glifosato en las madres al momento del parto estuvo fuertemente asociada a factores como su ocupación laboral como agricultoras, y la residencia próxima a zonas de cultivos o con familiares que realizaban tareas agrícolas [133]. En conjunto, estas evidencias sugieren que existe un riesgo de exposición ambiental y ocupacional a glifosato tanto a nivel local como mundial, lo que ha despertado el interés y la preocupación por conocer sus efectos sobre la salud humana.

6.2 | Efectos de glifosato sobre la reproducción y el desarrollo

En los últimos años, un tema de preocupación se ha centrado en las propiedades toxicológicas de los productos químicos utilizados en las formulaciones de los HBGs. Estas formulaciones se comercializan en forma de mezclas que contienen glifosato y diferentes coformulantes (disolventes, agentes penetrantes, conservantes y tensioactivos) cuya identidad a menudo no se revela porque se considera información comercial confidencial. Varios estudios que compararon los efectos de los HBGs, sus coformulantes y glifosato grado técnico revelaron que los HBGs son más tóxicos que el ingrediente activo, lo que sugiere que los coformulantes también pueden considerarse una fuente de toxicidad [134,135].

Los estudios en modelos animales han demostrado que la exposición a formulaciones que contienen glifosato durante períodos de desarrollo como la gestación, la lactancia y la etapa prepuberal, induce efectos adversos en el sistema reproductivo de ratas macho. Estos efectos se manifestaron en el período puberal y en el organismo adulto, e incluyeron: disminución en el número de espermatozoides y en la producción diaria de esperma, incremento en el porcentaje de espermatozoides anormales, y disminución de

los niveles de testosterona en suero [136-139]. Estudios *in vitro* han demostrado efectos tóxicos a bajas dosis en células relacionadas a la reproducción tales como células embrionarias, de placenta y de Sertoli [140-142].

Estudios *in vitro* e *in vivo* han documentado diversos efectos inducidos por glifosato y sus formulaciones en distintos tejidos hormono-dependientes, tales como testículo, ovario, útero y glándula mamaria, que indicarían una posible actividad como PE [143-146]. Algunos de los efectos más relevantes incluyeron la inhibición de la enzima aromataasa, responsable de la conversión irreversible de andrógenos a estrógenos, la inducción de la proliferación de células de cáncer de mama a través de la activación del RE α [147,148], y alteraciones en el proceso de esteroidogénesis. En un trabajo de nuestro laboratorio, determinamos la actividad estrogénica de una formulación a base de glifosato utilizando un modelo *in vivo*, y detectamos que el herbicida produjo modificaciones en la regulación de genes estrógeno-sensibles, similares a las inducidas por 17 β -estradiol [145]. Asimismo, observamos que la exposición postnatal a un HBG provocó un adelantamiento en el desarrollo de la glándula mamaria de ratas macho, que estuvo acompañado por un aumento en las estructuras terminales altamente proliferativas (*terminal end buds*), y un incremento en la proliferación celular y en la expresión del RE α [146]. A pesar de los antecedentes reportados en la literatura científica, la EPA, a través del programa de identificación de disruptores endócrinos, expresó que glifosato no presenta propiedades de un compuesto con actividad de PE, puesto que no se han detectado evidencias de una posible interacción con las vías de señalización del sistema endócrino [149]. Por lo tanto, el potencial de glifosato como PE continúa siendo incierto.

6.3 | Efectos de glifosato en relación a su potencial carcinogénico

En relación al desarrollo de tumores, los antecedentes sobre los efectos de glifosato y sus formulaciones son controversiales. En el año 2015 la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, OMS) reclasificó a glifosato como “probable cancerígeno para humanos” (grupo 2A), incluyendo en su análisis más de 500 trabajos científicos realizados en todo el mundo que utilizaron tanto glifosato como sus formulaciones comerciales [150]. Esta clasificación se basa en que si bien la evidencia de carcinogénesis en humanos es limitada, las pruebas en animales de laboratorio son suficientes. Además se detectaron efectos genotóxicos y estrés oxidativo en células de

diversas especies que fueron propuestos como mecanismos de carcinogenicidad [150]. Por el contrario, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha concluido que el herbicida no demuestra propiedades carcinogénicas ni mutagénicas, basándose en toda la evidencia disponible para glifosato (el principio activo de las formulaciones), e incluyendo datos no publicados de la industria [151,152]. La EFSA declaró que “es improbable que el glifosato suponga un riesgo de cáncer para las personas y que la evidencia no apoya su clasificación con respecto a un potencial carcinogénico” [153]. Por lo expuesto anteriormente, el potencial carcinogénico de glifosato y sus formulaciones continúa siendo incierto.

En un estudio sobre la condición de salud de los habitantes de la localidad cordobesa de Monte Maíz, cuya principal actividad económica es la agricultura, reveló un aumento en las tasas de incidencia y mortalidad por cáncer con respecto a los promedios provinciales y nacionales. Los autores resaltaron que la elevada frecuencia de cáncer está en concordancia principalmente con altos niveles de glifosato y su metabolito AMPA, en comparación con otros agroquímicos analizados [122]. Los indicios que señalan efectos carcinogénicos de glifosato en humanos se sustentan en estudios de exposición ocupacional al herbicida en poblaciones de Estados Unidos, Canadá y Suecia que mostraron riesgos aumentados de linfoma no Hodgkin [154-156]. Sumado a esto, ensayos experimentales *in vivo* e *in vitro* en relación a los efectos de glifosato o sus formulaciones comerciales refuerzan estas evidencias. George y col. (2010) observaron que una formulación comercial de glifosato actuó como “promotor” en el desarrollo tumoral en un modelo de melanoma en ratones [157]. Otros autores atribuyeron a glifosato el aumento de la incidencia de carcinoma tubular renal, hemangiosarcoma y adenoma de las células de los islotes pancreáticos en modelos murinos [150].

La evidencia de la posible actividad de glifosato como PE ha despertado el interés y la preocupación por conocer sus efectos sobre el desarrollo/diferenciación, la capacidad reproductiva y el desarrollo de tumores en animales y seres humanos. Hasta el momento, los antecedentes disponibles acerca de las consecuencias de la exposición a glifosato están en su mayoría limitados a los efectos sobre el desarrollo y la funcionalidad del tracto reproductor masculino. Los estudios referidos al tracto genital de la hembra, son escasos y no aportan evidencias de efectos sobre la funcionalidad del mismo en la etapa adulta, especialmente cuando los órganos hormono-dependientes son expuestos a situaciones endócrinas endógenas o exógenas particulares como la

gestación o el tratamiento con hormonas. Dado que el útero es uno de los principales órganos blanco de la acción de las hormonas esteroides, nuestra hipótesis propone que *la exposición postnatal temprana a formulaciones comerciales de glifosato podría interferir con su normal desarrollo y diferenciación. En relación a los efectos a largo plazo, proponemos que se pueden producir alteraciones en la funcionalidad uterina, que podrían asociarse con subfertilidad y una mayor predisposición al desarrollo de tumores.*

OBJETIVOS

*“Si mi mente puede concebirlo,
y mi corazón puede creerlo,
entonces puedo lograrlo”.*

Muhammad Ali

OBJETIVOS

1 | Objetivo general

Evaluar la influencia de la exposición a un herbicida a base de glifosato durante el desarrollo postnatal temprano sobre la diferenciación organogenética y funcional del útero de la rata. Determinar si se producen consecuencias a largo plazo sobre la fertilidad y el desarrollo de tumores ginecológicos.

2 | Objetivos específicos

Estudiar los efectos de la exposición postnatal a bajas dosis de una formulación comercial a base de glifosato, en diferentes etapas de la vida del animal:

- **Durante la etapa prepuberal:**

- 1) Evaluar los efectos sobre la diferenciación organogenética del útero; y,
- 2) Determinar si modifica la sensibilidad del útero a un tratamiento exógeno con E2.

- **Durante la vida adulta:**

- 3) Investigar si produce alteraciones en el ciclo estral y en los niveles séricos de los esteroides sexuales, 17 β -estradiol y progesterona;
- 4) Estudiar los efectos sobre la fertilidad de la hembra y la diferenciación funcional del útero durante el período post-implantatorio; y,
- 5) Evaluar si promueve el desarrollo de lesiones pre-neoplásicas y/o neoplásicas en útero y vagina.

MATERIALES Y MÉTODOS

*“No se sale adelante celebrando éxitos
sino superando fracasos”.*

Orison Swett Marden

1 | Animales

Los animales fueron manipulados de acuerdo a la Guía de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Academia Nacional de Ciencias de Estados Unidos y el protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL. Se utilizaron ratas hembra de la cepa Wistar pertenecientes al bioterio del Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL, CONICET-UNL), que se encuentra en la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL. Los animales fueron mantenidos durante todo el experimento en condiciones controladas de temperatura (22 ± 2 °C) y con fotoperíodo de 14 hs de luz (desde las 05.00 hs hasta las 19.00 hs) y 10 hs de oscuridad. Tuvieron libre acceso al agua y al alimento balanceado en forma de pellets (Nutrición Animal, Rafaela, Argentina). Para reducir al mínimo la exposición a otros productos químicos con actividad estrogénica, el agua fue provista en mamaderas de vidrio con tetinas de acero inoxidable y los animales fueron alojados en jaulas de acero inoxidable con camas de viruta de madera previamente esterilizada (adquirida en el Centro de Medicina Comparada, Instituto de Ciencias Veterinarias - ICIVET, CONICET-UNL).

1.1 | Diseño experimental

Al momento del nacimiento (día postnatal 0, DPN0) los animales fueron pesados y sexados de acuerdo a la distancia ano-genital. El tamaño de la camada se ajustó a ocho crías hembra por madre; en caso de tener un número menor a ocho hembras por madre, la camada se completó con una cantidad apropiada de machos. Las crías fueron asignadas al azar a cada uno de los siguientes tratamientos neonatales ($n \geq 8$ por grupo): **i)** solución salina (control), y **ii)** herbicida a base de glifosato (HBG) (diluido en solución salina) en una dosis de 2 mg de glifosato/kg/día. La formulación comercial utilizada fue Roundup Full II[®] (Monsanto, Argentina), una formulación líquida soluble en agua que contiene 66,2% de sal potásica de glifosato (equivalente a una concentración de glifosato ácido de 54% p/v) como principio activo. La formulación además contiene coadyuvantes y compuestos inertes, no especificados en la etiqueta de la formulación. La dosis de glifosato seleccionada y utilizada en los experimentos se encuentra en el orden de magnitud de la dosis de referencia o segura (RfD, 1 mg/kg/día) establecida por la EPA [158]. Además, cabe destacar que esta dosis es representativa de los residuos de glifosato encontrados en granos de soja [128,129], y se encuentra en el

orden de magnitud de los niveles ambientales de glifosato detectados en nuestro país [117,118,121]. Las crías recibieron inyecciones subcutáneas de vehículo o HBG cada 48 hs, desde el DPN1 hasta el DPN7. La dosis de glifosato fue calculada teniendo en cuenta la concentración de glifosato ácido en la formulación (54 g de glifosato ácido por cada 100 ml de HBG) y el peso promedio de las crías al momento del tratamiento.

Luego del tratamiento postnatal, las crías hembra de ambos grupos experimentales fueron distribuidas al azar en cinco experimentos diferentes teniendo en cuenta los objetivos específicos.

2 | Evaluación de los efectos del HBG sobre la diferenciación organogénica del útero

En esta etapa del trabajo nos interesó determinar los efectos de la exposición a HBG sobre:

- 1) Las características histomorfológicas del útero;
- 2) La citodiferenciación celular uterina; y,
- 3) La expresión de diferentes proteínas implicadas en la diferenciación organogénica del útero.

Adicionalmente nos propusimos evaluar si se producían alteraciones en la expresión del gen homeótico *Hoxa10*, y si las mismas estaban acompañadas por alteraciones epigenéticas como mecanismos de acción del herbicida.

2.1 | Procedimiento

Crías hembra de cada grupo experimental (n=8 ratas/grupo) fueron sacrificadas en dos etapas diferentes del desarrollo postnatal: **i)** el DPN8, para determinar la respuesta aguda a la exposición a HBG, al que definimos como período neonatal; y **ii)** el DPN21, para investigar si los efectos persisten y/o se manifiestan 15 días después de finalizado el tratamiento, al que definimos como período prepuberal. En ambos DPNs seleccionados para el estudio, se procedió al sacrificio de los animales y se realizó la disección de los cuernos uterinos (Figura 12).

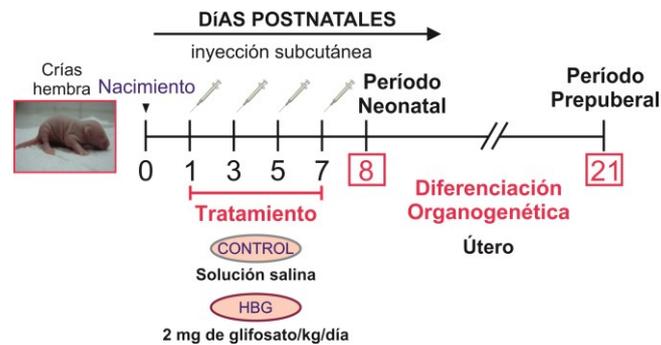


Figura 12. Esquema del diseño experimental utilizado para evaluar los efectos de la exposición postnatal a HBG sobre la diferenciación organogenética del útero. La línea de tiempo indica los días postnatales.

2.2 | Disección de cuernos uterinos

Para la obtención de biopsias de útero los animales fueron anestesiados en cámara de CO₂, y luego sacrificados por decapitación. Posteriormente, los animales fueron colocados sobre una tabla de disección sujetándolos de sus extremidades, con el abdomen hacia arriba, y se desinfectó el campo quirúrgico con alcohol al 70%. Se procedió a levantar la piel con pinza de punta “diente de ratón” a unos 1.5 cm del orificio vaginal y con la tijera de punta roma se practicó una incisión en un ángulo de 45° hacia los laterales, hasta la altura de las últimas costillas, quedando expuestos los músculos abdominales. Con pinza anatómica de punta roma y tijera de punta fina se practicó la misma maniobra quirúrgica sobre los músculos abdominales, quedando expuesta la cavidad abdominal. Con pinza anatómica de punta roma se separaron las asas intestinales y la grasa mesentérica hacia un lado, visualizando el tracto genital. Finalmente, con tijera de punta fina se realizó la disección de ambos cuernos uterinos. Las muestras obtenidas fueron procesadas de acuerdo al tipo de estudio a realizar.

2.3 | Procesamiento de muestras

Las muestras de útero obtenidas fueron procesadas de diferentes maneras de acuerdo a los siguientes propósitos:

- i) Estudios por microscopía óptica, y
- ii) Estudios por técnicas de biología molecular.

2.3.1 | Estudios por microscopía óptica

Las biopsias de útero fueron fijadas durante 6 hs en formol buffer al 10% v/v en PBS (buffer fosfato salino) pH 7,5 para conservar las estructuras histológicas del tejido. Luego se realizaron dos lavados con PBS (pH 7,5) de 10 min cada uno, y finalmente las muestras se conservaron en una solución de alcohol al 70% hasta su procesado por técnicas histológicas de rutina para su inclusión en parafina [159]. Durante el procesado histológico, las muestras fueron deshidratadas en alcoholes de graduación creciente, y colocadas en xilol (solvente no acuoso, no polar, miscible en parafina fundida). De esta manera, el alcohol presente en los tejidos fue sustituido por xilol, lo que permitió el aclaramiento de las muestras. Para la inclusión en parafina, las muestras fueron colocadas en estufa a 60 °C dentro de un frasco con parafina fundida. El calor provocó la evaporación de los restos del solvente y de esta forma, los espacios ocupados por xilol fueron impregnados por parafina. Finalmente, las muestras se colocaron en un recipiente con parafina fundida que se dejó solidificar a temperatura ambiente. Este procedimiento permitió la obtención de un bloque de parafina denominado “taco” con el tejido en su interior. Una vez obtenido el taco, se realizaron cortes histológicos seriados de 5 µm de espesor en micrótopo (Leica, Jung RM2025, Leica Instruments GMT, Nussioch, Alemania) que se montaron en portaobjetos pretratados con adhesivo tisular (3-aminopropil trietoxysilano, Sigma-Aldrich) y se secaron en estufa a 37 °C durante 24 hs. Estas muestras fueron utilizadas para: *i*) la evaluación de las características histomorfológicas del útero mediante coloración con hematoxilina-eosina (H&E); y *ii*) el análisis de la citodiferenciación celular y la expresión de diferentes proteínas implicadas en la diferenciación organogénica mediante la técnica de inmunohistoquímica (IHQ).

2.3.2 | Estudios por técnicas de biología molecular

Algunas porciones de los cuernos uterinos fueron disecadas en condiciones estériles, sumergidas rápidamente en N₂ líquido y posteriormente conservadas a -80 °C. Parte de estas muestras fueron utilizadas para realizar extracción de ARN total. Una vez extraído y cuantificado el ARN, se procedió a la obtención de ADN copia (ADNc) por reacciones de transcripción reversa (RT) y luego se realizaron técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. Las muestras restantes se utilizaron para evaluar modificaciones epigenéticas. Parte de las mismas fueron utilizadas para la

extracción de ADN genómico (ADNg), el que luego fue sometido a análisis de los niveles de metilación del ADN. Otras porciones de útero fueron utilizadas para la obtención de cromatina, lo que permitió evaluar MPTs de histonas mediante inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).

2.4 | Evaluación de las características histomorfológicas del útero

Para realizar la caracterización histomorfológica del útero, tres cortes histológicos de cada muestra (5 μm de espesor), separados 25 μm entre sí y realizados en paralelo al eje mayor del útero, fueron teñidos con H&E. Los cortes histológicos se desparafinaron en xilol, se hidrataron en soluciones de alcoholes de graduación decreciente, y se colorearon con hematoxilina de Mayer (1 min) y eosina (30 s). Posteriormente, se deshidrataron y montaron con un líquido de montaje permanente (Eukitt, Sigma-Aldrich). Finalmente, las secciones de tejido coloreadas se examinaron por microscopía óptica utilizando un microscopio Olympus BH2 (iluminación: lámpara halógena de 12 voltios, 100 W, equipado con una fuente de luz estable, Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japón), con el objetivo de evaluar los siguientes parámetros: *i*) incidencia de hiperplasia epitelial luminal (HEL), definida como la presencia de epitelios con más de cuatro capas epiteliales lumbales; *ii*) número de glándulas; y, *iii*) espesor del estroma y del miometrio circular y longitudinal. En todos los casos se evaluaron un total de 10 campos por sección seleccionados al azar, siguiendo la metodología que se describe a continuación:

- i*) Hiperplasia epitelial luminal: se cuantificó el número de capas epiteliales lumbales utilizando una objetiva Dplan 40 \times (apertura numérica = 0,65; Olympus) en DPN8 y una objetiva Dplan de 20 \times (apertura numérica = 0,40; Olympus) en DPN21. La incidencia de HEL se cuantificó determinando el porcentaje de animales que presentaban esta lesión.
- ii*) Número de glándulas: se contaron las glándulas presentes por campo visual utilizando una objetiva Dplan 20 \times , y el resultado se expresó como número de glándulas observadas por campo.
- iii*) Espesor del estroma y del miometrio circular y longitudinal: se realizó mediante análisis digital de imágenes utilizando el software Image Pro-Plus 5.0.2.9 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, EE.UU). Brevemente, las imágenes

fueron obtenidas con la cámara de video color Spot Insight V3.5 (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, EE.UU), acoplada al microscopio Olympus BH2, y utilizando una objetiva Dplan 40×. Para la calibración espacial del analizador, se capturaron imágenes del reticulado de la cámara de Neubauer. Luego de calibrar espacialmente el sistema, se realizaron mediciones de longitud punto a punto en cada uno de los compartimentos uterinos (estroma, miometrio circular y miometrio longitudinal) (Figura 13). Los resultados fueron expresados en micrómetros (μm).

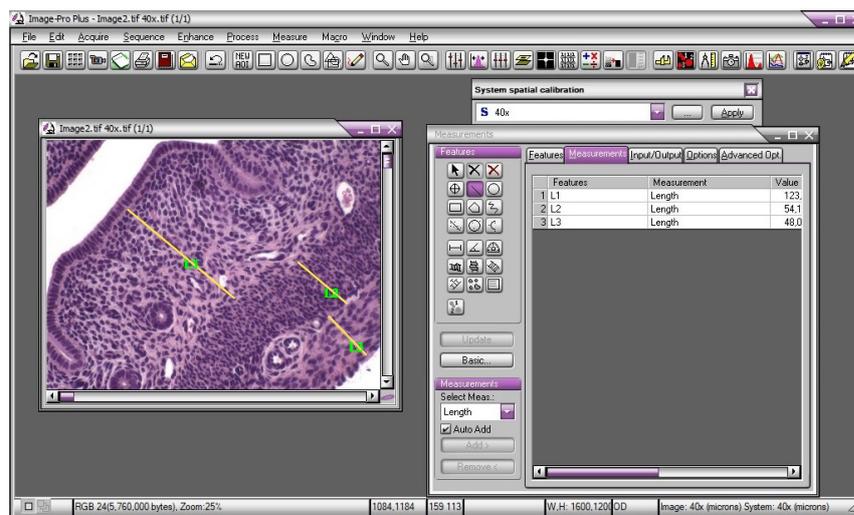


Figura 13. *Determinación del espesor del estroma y del miometrio en un corte longitudinal de útero teñido con hematoxilina-eosina.* Luego de la calibración espacial del software Image Pro-Plus, se realizan mediciones de longitud punto a punto en los compartimentos uterinos de interés. En este ejemplo, las líneas amarillas L1, L2 y L3 representan el espesor del estroma y del miometrio circular y longitudinal, respectivamente.

2.5 | *Expresión de marcadores de citodiferenciación celular y de diferenciación organogénica*

Sobre cortes histológicos de 5 μm de espesor se aplicó la técnica de IHQ con el objetivo de evaluar:

- i)* La expresión de marcadores de citodiferenciación epitelial: **a)** CK8, marcador de células de epitelio simple; y **b)** p63 y pan-CKs (CK1, 5, 10 y 14), marcadores de epitelio estratificado.
- ii)* La expresión de marcadores de citodiferenciación estromal: vimentina, marcador de células derivadas del mesénquima, como los fibroblastos del estroma.

- iii)* La proliferación celular mediante la inmunomarcación de Ki67, proteína expresada en las fases G1, G2, S y M del ciclo celular.
- iv)* La expresión de proteínas involucradas en la diferenciación organogenética del útero: receptores esteroides (RE α y RP), y representantes de la familia de genes Hox (Hoxa10) y Wnt (Wnt7a).

La técnica de IHQ se realizó siguiendo un protocolo previamente optimizado en nuestro laboratorio que utiliza como sistema de revelado la amplificación de la reacción por el método de la estreptavidina conjugada con peroxidasa unida a biotina [160]. Para la detección de las proteínas, se utilizaron métodos de recuperación antigénica que presentaron pequeñas modificaciones según el antígeno a detectar.

Los cortes histológicos fueron desparafinados en xilol e hidratados en una serie de alcoholes de distinta graduación. Las secciones de tejido uterino fueron lavadas en PBS luego de cada paso de la técnica que se detalla a continuación. Para la recuperación antigénica los cortes histológicos fueron sumergidos en buffer citrato 0,01 M pH 6,0 y sometidos a un calentamiento en horno microondas (el detalle del procedimiento se describe en la Tabla 2). Seguidamente, los vidrios se colocaron en una solución al 3% de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 30 volúmenes (vol) en metanol absoluto durante 15 min para realizar el bloqueo de la actividad de peroxidasa endógena. Para el bloqueo de uniones no específicas, los cortes se incubaron 30 min a temperatura ambiente (TA) con una solución de suero normal de caballo (NHS, del inglés: *Normal Horse Serum*) diluida 1/20 en PBS y adicionada con 1,5% de leche en polvo descremada (Sigma-Aldrich). Los cortes fueron incubados en cámara húmeda con el anticuerpo primario específico (14-16 hs a 4 °C), y a continuación con su correspondiente anticuerpo secundario biotinilado (30 min a TA). Finalmente, se realizó la incubación con el complejo estreptavidina-peroxidasa (Sigma-Aldrich) (30 min a TA). Para el revelado de la reacción se utilizó una solución que contiene 2,3 mg del cromógeno diaminobencidina (DAB, Sigma-Aldrich) disueltos en 3,3 ml de buffer Tris-HCl 0,05 M (pH 7,5) y adicionados con 5 μ l de H₂O₂ 30 vol. Se trabajó con un tiempo de reacción de 10 min a TA. Para la inmunodetección del marcador de proliferación Ki67, p63, CK8 y pan-CKs, los cortes fueron contracolorados con hematoxilina de Mayer de forma similar a la descrita en la sección 2.4. Finalmente, los cortes histológicos fueron deshidratados y montados con un líquido de montaje permanente (Eukitt).

En todos los casos se realizaron controles negativos de especificidad, sustituyendo el anticuerpo primario por un suero no inmune, y controles positivos, incluyendo una sección de tejido cuya reacción positiva para la proteína de interés fue comprobada con anterioridad. El protocolo general empleado se muestra en la Tabla 2 y los anticuerpos utilizados en los ensayos de IHQ de esta etapa se detallan en la Tabla 3.

Tabla 2. Protocolo general de la técnica de IHQ.

Desparafinización e hidratación	
Xilol 1, 2 y 3	3 min c/u
Alcohol 100°, 96° y 70°	3 min c/u
PBS	5 min
Recuperación antigénica	
Calentamiento en horno microondas utilizando buffer citrato 0,01 M pH 6,0	Calentar el buffer 3 min a 100% de potencia, agregar las muestras y calentar 11 min a 100% de potencia. Dejar 20 min apagado
PBS	5 min
Bloqueo de actividad de peroxidasa endógena	
Agua oxigenada al 3% en metanol (36 ml metanol + 4 ml H ₂ O ₂ 30 vol)	15 min
PBS	15 min
Bloqueo de uniones no específicas	
NHS 1/20 disuelto en PBS con 1,5% de leche en polvo descremada	30 min (en cámara húmeda)
Anticuerpo primario	
Incubación con el anticuerpo específico	14-16 hs a 4 °C (en cámara húmeda)
PBS	15 min
Anticuerpo secundario biotinilado	
Incubación con el anticuerpo secundario biotinilado	30 min a TA (en cámara húmeda)
PBS	5 min
Estreptavidina-peroxidasa	
Incubación con el complejo estreptavidina-peroxidasa en una dilución 1/150	30 min a TA (en cámara húmeda)
PBS	5 min
Revelado	
Sustrato enzimático (5 µl de H ₂ O ₂ 30 vol) + cromógeno (2,3 mg DAB) disueltos en 3,3 ml de Tris-HCl 0,05 M pH 7,5	10 min
Agua destilada	5 min
Contracoloración con hematoxilina de Mayer (opcional)	
Deshidratación y montaje	
Alcohol 70°, 96° y 100°	1 min c/u
Xilol 1 y 2	2 y 5 min

Montar con medio de montaje permanente (Eukitt)

Tabla 3. Anticuerpos utilizados en los ensayos de IHQ para evaluar marcadores de citodiferenciación celular y de diferenciación organogénica.

Anticuerpo primario utilizado	Dilución	Anticuerpo secundario biotinilado	Proveedor del anticuerpo primario
Anti-CK8 (PH192)	1/1600	Anti-Oveja 1/200 (Sigma-Aldrich)	The Binding Site Limited (Birmingham, UK)
Anti-pan-CK basal (clon 34bE12)	1/100	Anti-Ratón 1/100 (Sigma-Aldrich)	Novocastra (Newcastle upon Tyne, UK)
Anti-p63 (clon 4A4)	1/100	Anti-Ratón 1/100	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)
Anti-Vimentina (clon V9)	1/100	Anti-Ratón 1/100	Novocastra (Newcastle upon Tyne, UK)
Anti-Ki67 (clon MIB-5)	1/25	Anti-Ratón 1/100	Dako Corp. (Carpinteria, CA, USA)
Anti-RE α (clon 6F-11)	1/200	Anti-Ratón 1/100	Novocastra (Newcastle upon Tyne, UK)
Anti-RP (A0098)	1/100	Anti-Ratón 1/100	Dako Corp. (Carpinteria, CA, USA)
Anti-Hoxa10 (sc-17159)	1/400	Anti-Cabra 1/200 (Santa Cruz)	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)
Anti-Wnt7a	1/800	Anti-Conejo 1/200 (Sigma-Aldrich)	Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (Santa Fe, Argentina)*

*El Anti-Wnt7a fue generado y testeado en nuestro laboratorio por Vigezzi y col., 2016.

2.5.1 | Cuantificación de la proliferación celular

La cuantificación de la proliferación en el epitelio luminal y glandular, se realizó determinando el **porcentaje** de células positivas para Ki67, contando como mínimo 2000 células por compartimento y por muestra experimental, y utilizando el microscopio óptico Olympus BH2 con una objetiva de inmersión Dplan 100 \times (apertura numérica = 1,25; Olympus). En el estroma y miometrio la cuantificación de la proliferación se realizó utilizando una grilla cuadrículada de 0,8 mm \times 0,8 mm colocada en el ocular del microscopio (Olympus BH2) y una objetiva Dplan 100 \times , con las que se determinó la **fracción de volumen** (en 20 campos representativos de cada compartimento) aplicando la fórmula descrita por Weibel (1969) [161]: $V_v = P_i/P$, donde V_v es la fracción de volumen estimada del compartimento en estudio, P_i es el número de puntos de la grilla incidentes sobre las células positivas para Ki67, y P es el

número de puntos incidentes sobre el total de células en el compartimento estudiado. Los resultados fueron expresados como $V_v \times 100$.

2.5.2 | Cuantificación de la expresión proteica por análisis digital de imágenes

La cuantificación de la expresión de los receptores esteroides, Hoxa10 y Wnt7a se realizó mediante análisis digital de imágenes, utilizando el software Image Pro-Plus. Para ello se obtuvieron imágenes de los distintos compartimentos histológicos a evaluar con una cámara de video color Spot Insight V3.5, acoplada al microscopio Olympus BH2 con una objetiva plana Dplan 40×. Previo a la captura de imágenes, el microscopio fue acondicionado para la iluminación Koehler y una imagen de referencia de un campo vacío fue utilizada para corregir la iluminación desigual (corrección de sombras). Las imágenes fueron convertidas a escala de grises, se delimitó el compartimento histológico a evaluar (estroma subepitelial: 20-30 μm desde la membrana basal hacia el miometrio; miometrio: 10-15 μm desde la capa más externa hacia la membrana basal) y se calibró el nivel de grises del programa de tal manera que la tinción de fondo (*background*) sea considerada como “cero”. Luego se determinó el área total ocupada por el compartimento seleccionado, el área de marcación positiva y el promedio de la intensidad de marcación (Figura 14). A partir de estos parámetros se calculó la **densidad óptica integrada (DOI)**, definida como la combinación lineal entre el área relativa ocupada por la marcación positiva y la intensidad promedio de dicha marcación: $\text{DOI} = [(\text{Área de marcación positiva} / \text{Área total evaluada}) \times 100] \times \text{Promedio de la intensidad de marcación}$ [162,163]. Debido a que la DOI es un parámetro adimensional, los resultados fueron expresados como unidades arbitrarias. En el epitelio glandular, la expresión proteica se determinó en al menos 10 glándulas endometriales por sección, y dos secciones por animal de diferente profundidad fueron analizadas. Debido a que en la rata la adenogénesis es un evento que se produce a partir del DPN9 [9], la cuantificación en el epitelio glandular se realizó sólo en DPN21. En el resto de los compartimentos uterinos la expresión proteica se analizó en al menos 10 campos seleccionados al azar por sección, y dos secciones por animal fueron evaluadas. Es importante destacar que en el epitelio luminal la cuantificación se realizó en áreas conservadas y sin pliegues.

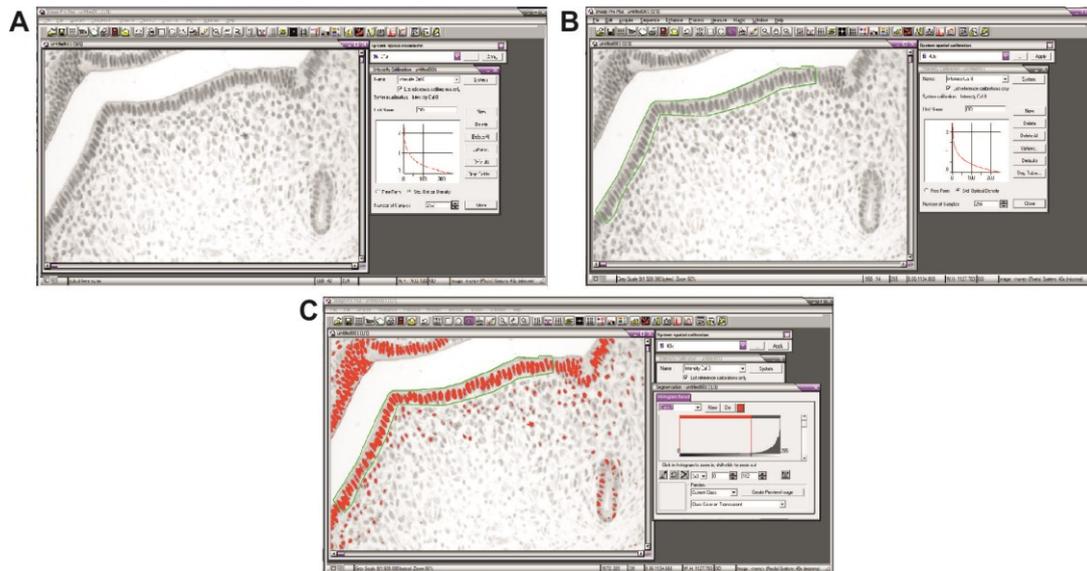


Figura 14. Cuantificación de la expresión proteica en el epitelio luminal uterino mediante análisis digital de imágenes. Las imágenes muestran la secuencia de pasos para la cuantificación de la expresión de proteínas utilizando el software Image Pro-Plus. **(A)** Imagen convertida a escala de grises. **(B)** Selección manual del compartimento uterino a evaluar. En este ejemplo se seleccionó el epitelio luminal (línea verde). **(C)** Selección del rango de marcación positiva en el epitelio luminal (visualizado en rojo).

2.6 | Evaluación de la expresión génica mediante RT-PCR en tiempo real

2.6.1 | Extracción de ARN total

La extracción de ARN total se realizó utilizando el reactivo comercial “TRIZol Reagent” (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina), que se fundamenta en el método del isotiocianato de guanidina-fenol-cloroformo [164]. Brevemente, en el contenedor del homogeneizador Ultra Turrax[®] T25 Basic (IKA - Werke GMBH & Co.KG, Staufen, Alemania) se agregaron 800 µl del reactivo TRIZol por cada 25-50 mg de tejido congelado, y se homogeneizó suavemente. Cuando se utilizaron muestras de animales de DPN8 (peso promedio de los úteros 5 mg), trabajamos con un total de 8 extracciones de ARN total, cada una de las cuales se obtuvo homogeneizando 5 cuernos uterinos para alcanzar la masa adecuada para una buena extracción de ARN total. Durante la homogeneización de la muestra el reactivo preservó la integridad del ARN. El agregado de cloroformo y posterior centrifugación, separó la solución en una fase acuosa y otra fase orgánica. El ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa, de donde fue recuperado por precipitación con alcohol isopropílico, lavado con etanol al 80% y solubilizado en agua libre de ribonucleasas. La concentración de ARN total en las muestras procesadas se determinó mediante la lectura en espectrofotómetro (NanoDrop

Lite, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) a una longitud de onda de 260 nm. Se usó como referencia de la pureza del ARN extraído, la relación entre las absorbancias obtenidas a 260 nm (punto de máxima absorción de ácidos nucleicos) y 280 nm (punto de máxima absorción de proteínas). Solamente se utilizaron aquellas muestras con una relación de absorbancia 260/280 mayor a 1,9. Los ARN obtenidos fueron conservados a -80 °C hasta el momento de la realización de las reacciones de RT.

2.6.2 | *Transcripción reversa (RT)*

A partir de los ARN extraídos se realizaron transcripciones reversas con el fin de obtener los correspondientes ADNc. La RT se llevó a cabo empleando cantidades iguales (1 µg) del ARN total y utilizando la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV, 300 U, Promega, Madison, WI, EE.UU). Se emplearon oligonucleótidos hexaméricos (200 pmoles, Promega) como cebadores de la enzima. Al tubo de reacción se le adicionaron 20 U de inhibidor de ARNasa (RNAout, Invitrogen) y 100 nmol de una mezcla de dNTPs (deoxinucleótidos trifosfatos) y se alcanzó un volumen final de 30 µl con la solución amortiguadora de la reacción provista por el fabricante de la enzima. La reacción de RT se realizó a 70 °C por 5 min y 30 seg con la mezcla de los ARN y los oligonucleótidos hexaméricos, luego se agregó el resto de los reactivos y se continuó la reacción a 37 °C por 90 min y a 42 °C por 15 min. La reacción se detuvo calentando a 80 °C por 5 min y a 94 °C por 30 segundos, y realizando posteriormente un enfriamiento a 25 °C. Las reacciones de RT se llevaron a cabo en el termociclador T18 (IVEMA, Buenos Aires, Argentina). Una vez obtenido el ADNc, se diluyó con agua libre de ARNasas, llevándolo a un volumen final de 60 µl. Como control negativo de la reacción se utilizó el ARN incubado en condiciones idénticas, pero sin transcriptasa reversa.

2.6.3 | *Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real*

Luego de la extracción del ARN total y posterior RT, se determinó la expresión del ARNm de Hoxa10 y de las enzimas ADN metiltransferasas (DNMT3a y DNMT3b) que regulan los niveles de metilación del ADN, mediante ensayos optimizados de PCR en tiempo real. Esta metodología se basa en la detección y cuantificación ciclo a ciclo de una molécula fluorescente (Eva Green en la presente tesis) que se intercala a las hebras de ADN doble cadena. La fluorescencia es detectada y leída por un fluorómetro acoplado al termociclador a medida que transcurre la reacción de PCR.

Para amplificar el gen Hoxa10 y las ADN metiltransferasas se diseñaron oligonucleótidos (Tabla 4) utilizando el software Vector NTI Suite Versión 6.0 (Infomax Inc., North Bethesda, MD, EE.UU). Como control interno (gen de referencia) se utilizó la determinación de ARNm del gen de la proteína ribosomal L19 (Tabla 4). La temperatura de hibridación para cada amplicón se obtuvo a partir del análisis *in silico* utilizando el software Vector NTI (Tabla 4). La especificidad de los oligonucleótidos fue cotejada por comparación directa de su secuencia contra el genoma completo de *Rattus norvegicus* mediante el uso de la herramienta BLAST disponible en la página web del *National Center for Biotechnology Information* (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Tabla 4. Secuencia de oligonucleótidos correspondiente a los genes Hoxa10, Dnmt3a, Dnmt3b y al gen de referencia L19.

Gen	Secuencia	Tamaño del amplicón (pb)	Temperatura de hibridación (°C)
Hoxa10	Sentido: 5'-GAAAACAGTAAAGCCTCTCC-3' Antisentido: 5'-ATAGAAACTCCTTCTCCAGC-3'	148	54
Dnmt3a	Sentido: 5'-GCTGAAGGACCTGGGCATCC-3' Antisentido: 5'-GGCCCCACTCCTGGATATGC-3'	152	61
Dnmt3b	Sentido: 5'-ACCAGAGGCCCGCAGATCAAG-3' Antisentido: 5'-GAGCCATCTCCATCATCCGC-3'	116	58
L19	Sentido: 5'-AGCCTGTGACTGTCCATTCC-3' Antisentido: 5'-TGGCAGTACCCTTCCTCTTC-3'	99	60

Hoxa10, homeobox A10; Dnmt3a, ADN metiltransferasa 3a; Dnmt3b, ADN metiltransferasa 3b; L19, proteína ribosomal L19.

Todas las muestras retro-transcriptas a ADNc fueron amplificadas por duplicado. Los niveles de ADNc fueron detectados utilizando el termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen, Tecnolab, Buenos Aires, Argentina). Para la amplificación, 5 µl de ADNc se combinaron con HOT-FIREPol EvaGreen qPCR Mix Plus (Solis BioDyne, Biocientífica, Rosario, Argentina) y 10 pmoles de cada oligonucleótido en un volumen final de 20 µl. El protocolo general de ciclado utilizado se muestra en la Tabla 5. La pureza de los productos obtenidos fue confirmada mediante curvas de disociación y electroforesis en geles de agarosa de muestras elegidas al azar en cada corrida. Controles sin ADNc fueron incluidos en todos los ensayos.

Tabla 5. Protocolo general de ciclado de PCR en tiempo real.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Nº de ciclos
Desnaturalización inicial	95	15 min	1
Desnaturalización	95	15 seg	
Hibridación	Específica para cada amplicón	15 seg	40
Extensión	72	15 seg	
Lectura	81	4 seg	
Incubación	10	10 min	1

El cálculo de los niveles de expresión relativa de cada muestra se realizó utilizando el método del ciclo umbral (Ct) [165]. El valor de Ct para cada muestra se calculó utilizando el software Rotor-Gene Q Series (Versión 1.7, Qiagen; TecnoLab) con un umbral de ajuste de fluorescencia automática (Rn). La eficiencia (Ef) de la reacción de PCR para cada gen estudiado y para el gen de referencia (L19) fue calculada mediante curvas estándar. Estas curvas se construyeron a partir de la amplificación de cada gen en diluciones seriadas de los ADNc. Luego, de la gráfica del logaritmo de las diluciones de los ADNc vs. su correspondiente Ct, se obtuvo la fórmula de la recta por regresión lineal, a partir de la cual se calculó la eficiencia como $Ef = [10^{(-1/pendiente)} - 1] \times 100$. Dependiendo de las condiciones específicas de la PCR, la eficiencia varió entre 95% y 102%. La expresión relativa de cada gen en los distintos experimentos se determinó utilizando el método de la curva estándar relativa [166]. Para todas las muestras experimentales, la cantidad relativa del gen de interés y del gen L19 fue determinada a partir de la curva estándar previamente realizada para cada gen. La cantidad obtenida correspondiente al gen de interés fue normalizada con la cantidad relativa del gen L19 en cada grupo experimental.

2.6.4 | Electroforesis en gel de agarosa

Las electroforesis horizontales en geles de agarosa (concentraciones de agarosa entre 1% p/v y 3% p/v) se realizaron utilizando buffer Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1× como solución reguladora de electroforesis y patrones de ADN de peso molecular de entre 100 y 1000 pb (CienMarker, Biodynamics, Buenos Aires, Argentina). El agente revelador utilizado fue GelRed® (Biotium), el cual se agregó al gel en una relación de 1 µl de GelRed® 1000× por cada ml de solución de gel. Las corridas se realizaron en una cuba de electroforesis horizontal Bio-Rad PowerPac® 300 (Bio-Rad, California, CA,

EE.UU) manteniendo el voltaje constante a 70V hasta que todo el frente de corrida ingresara al gel, para luego subir el voltaje hasta 80V. Los geles fueron revelados en un transiluminador Foto/UV[®] 1 (Fotodyne Inc.).

2.7 | Metodologías para la determinación de cambios epigenéticos

2.7.1 | Análisis bioinformático

Para la detección de regiones en el genoma que pueden presentar modificaciones epigenéticas utilizamos distintos programas bioinformáticos que nos permitieron: *i*) detectar secuencias que podrían presentar modificaciones en los niveles de metilación del ADN, y *ii*) detectar sitios de unión a factores de transcripción. Para esta etapa del trabajo, analizamos la secuencia del gen Hoxa10 de la rata (número de acceso XM_008762950.2). Utilizamos el software Methyl Primer Express Software v1.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU) para detectar la presencia de islas CpG. Una isla CpG fue definida como una secuencia de ADN igual o superior a 200 pb, con un porcentaje de GC mayor al 50% y un promedio de CpG observado/esperado mayor a 0,6 [167]. Luego se determinó si estas secuencias contenían sitios de reconocimiento para la enzima de restricción sensible a metilación *BstUI* (secuencia de reconocimiento CGCG) (Vector NTI Suite). Teniendo en cuenta estos análisis bioinformáticos, se diseñaron oligonucleótidos (Vector NTI Suite) de forma tal que cada par se encuentre flanqueando los sitios de restricción encontrados (Tabla 6). Para determinar la presencia de sitios de unión a factores de transcripción en las regiones regulatorias del gen encontradas, utilizamos el programa TFSEARCH (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>).

2.7.2 | Análisis del estado de metilación del ADN mediante MSRE-PCR

Para evaluar el estado de metilación del ADN en las regiones potencialmente regulatorias del gen Hoxa10 se utilizó la técnica combinada de digestión con enzimas de restricción sensibles a metilación seguida de PCR en tiempo real (MSRE-PCR, del inglés: *Methylation-Sensitive Restriction Enzymes-PCR*). La extracción de ADNg a partir de muestras de útero de cada grupo experimental (control y HBG) extraídas en DPN8 se realizó por el método del fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. La concentración total de ADNg fue determinada por medición de la absorbancia a 260 nm y el ADN fue almacenado entre 2-8 °C. Para reducir el tamaño de los fragmentos de

ADN, 1 µg del ADNg total fue digerido a 50 °C durante 15 min con 1 µl de FastDigest® *SfiI* (Thermo Scientific) y el producto de digestión fue purificado mediante una extracción con fenol/cloroformo. Luego, 1 µg de ADN digerido con *SfiI* fue incubado en baño de agua (Tecno Dalvo, Santa Fe, Argentina) durante 1 hora con 10 unidades de *BstUI* (New England BioLabs, Beverly, MA, EE.UU) en buffer enzimático 1× a 60 °C, siguiendo las instrucciones del fabricante. Nuevamente, los productos de digestión fueron purificados mediante el método fenol/cloroformo. El nivel de expresión relativo de las diferentes regiones del ADN fue analizado por triplicado en cada muestra mediante PCR en tiempo real tal como se describió en la sección 2.6.3, utilizando las secuencias de los oligonucleótidos descriptos en la Tabla 6.

Como control interno se amplificó una región del gen que no contenía sitios de restricción para *BstUI* (control normalizador) (Tabla 6). Cuando un sitio CpG se encuentra metilado, no es posible su digestión con la enzima sensible a metilación *BstUI*, lo cual permite que el producto sea amplificado. Contrariamente, si el mismo sitio no se encuentra metilado, la enzima genera un corte en la secuencia y no es posible la amplificación del fragmento. Los niveles de metilación relativos se calcularon utilizando el método de curva estándar relativa previamente descrito en la sección 2.6.3.

Tabla 6. Secuencias de oligonucleótidos utilizados en los estudios epigenéticos.

Región del gen Hoxa10	Sentido (5'→ 3')	Antisentido (5'→ 3')
Isla CpG1A	TAGAGAGAGTCTAGCCAGGA	GTTTACGACCACATTGTCAC
Isla CpG1B	ACCCAGCGAGATTCTTGGC	TGAAATCACTGCCAAGGGGC
Isla CpG2	GCCCCTTCGAAAACAGTAA	GATTTTTACAGCGTCCCCAC
Isla CpG3	GCAGAGAAAGGCGTTAAGTT	CCTCCCAATTTACATTTTCC
Isla CpG4	CCGAGAAAACCGAATCCGAG	CAGAAGGATGGGTACAGGCG
<i>Análisis de metilación del ADN</i>		
Control interno	AACTCTTAGAAAATGATGGG	AGGAACAGCATCTTTCTTAA

2.7.3 | Determinación de modificaciones post-traduccionales de histonas mediante el ensayo de ChIP

Para analizar si la exposición a HBG produce MPTs de histonas, utilizamos la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). Específicamente, en la presente tesis nos centramos en los niveles de metilación de la histona H3 en el estado trimetilado de

la lisina 9 (H3K9me3). Esta metodología fue puesta a punto en nuestro laboratorio siguiendo un protocolo modificado de aquel descrito por Kazi y Koos (2007) [168]. Brevemente, 40 mg de útero congelado fueron cortados en pequeñas porciones con bisturí e inmersos en una solución de formaldehído al 1% durante 15 min con el objetivo de generar la fijación de las proteínas del tejido y el ADN (*cross-linking* o entrecruzamiento). Esta reacción se detuvo con la adición de 1,5 ml de glicina 1 M durante 5 min. El tejido fijado luego fue homogeneizado en 600 μ l de buffer de lisis RIPA [compuesto por Nonidet P40 1%, deoxicolato de sodio 0,5%, duodecil sulfato de sodio (SDS) 0,1%, EDTA 2 mM, fluoruro de sodio 50 mM; todos de Sigma-Aldrich] conteniendo inhibidores de fosfatasas (PhosSTOP, Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablet, Roche Diagnostics) y proteasas (Complete Mini, Protease Inhibitor Cocktail Tablet, Roche Diagnostics) disueltos en buffer PBS 0,1 M (pH 7,0). Con el agregado de estas soluciones se procede a la ruptura celular. Los homogenatos fueron centrifugados a 12000 rpm durante 5 min a 4° C y los sobrenadantes fueron removidos y descartados. Los núcleos separados fueron lisados en un buffer de lisis conteniendo SDS [Tris-HCL (pH 8,1) 50 mM, EDTA 5 mM, SDS 0,1%] con el agregado de inhibidores de proteasas y fosfatasas (como se mencionó anteriormente) e incubados en hielo durante 10 min. Luego, las muestras fueron sonicadas en hielo utilizando el Sonicador Vibra-Cell™ VCX750 (Sonics & Materials, Newtown, CT, EE.UU) al 30% de potencia y empleando 40 ciclos de 2 seg cada uno, seguido de un intervalo de 1 min de descanso entre ciclos. De esta manera se obtuvieron fragmentos de cromatina cuyo tamaño varió entre 0,5-1,0 kpb. Luego de la sonicación, las muestras fueron centrifugadas a 14000 rpm durante 10 min a 4 °C. Los sobrenadantes fueron recolectados y almacenados a -80 °C en alícuotas de 50 μ l. Las alícuotas de las muestras sonicadas fueron descongeladas en hielo y se realizó una dilución 1:10 con buffer de dilución [Tris-HCl (pH 8,1) 20 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, tritón X-100 1% e inhibidores de proteasas y fosfatasas]. Luego, 50 μ l de Dynabeads® Proteína A (Invitrogen) fueron incubados con 2,5 μ l de anticuerpo policlonal de conejo Anti-trimetil-Histona H3-Lisina 9 (H3K9me3; EMD Millipore, Darmstadt, Alemania) durante 10 min. Las muestras de cromatina previamente diluidas fueron incubadas con el complejo anticuerpo-Dynabeads® Proteína A durante toda la noche a 4 °C en rotación (tubo que contiene los complejos inmunoprecipitados, IP). Adicionalmente se realizó un tubo control negativo de la inmunoprecipitación mediante la incubación de la cromatina diluida con un volumen de suero normal de conejo en reemplazo del anticuerpo específico. De esta manera se evaluaron los niveles de

inmunoprecipitaciones inespecíficas (tubo IgG). Los complejos inmunoprecipitados (IPs) fueron lavados 3 veces con PBS y luego con buffer Tris-EDTA (pH 8,0). Con el objetivo de eluir los complejos proteína-ADN de las Dynabeads® Proteína A, se agregaron 100 µl de buffer de elución que contiene NaHCO₃ 50 mM y SDS 1% adicionado con 0,5 µl de proteinasa K (Sigma-Aldrich). Esta mezcla de reacción se incubó a 65 °C durante 2 hs en estufa, y luego a 95 °C durante 10 min en baño húmedo, para remover las proteínas y realizar la reversión del entrecruzamiento (*cross-linking*).

Para cada muestra a evaluar se conservó el 10% de la cromatina sonicada sin someterla a inmunoprecipitación. Esta muestra se define como ADN input y es necesario someterla al paso de reversión del entrecruzamiento, en la etapa final de la metodología. Finalmente el ADN obtenido fue purificado utilizando el kit comercial Quick Gel Extraction & PCR Purification Combo (Invitrogen). Los niveles de metilación de la histona H3 se compararon mediante reacciones de PCR en tiempo real, realizadas por triplicado (sección 2.6.3). Las secuencias de oligonucleótidos utilizados para amplificar las diferentes regiones del gen *Hoxa10* se muestran en la Tabla 6. La comparación de la expresión se determinó utilizando el método de la curva estándar relativa y para la construcción de la curva de calibrado (curva estándar) se realizaron diluciones seriadas del ADN input. La expresión de los resultados se realizó en primer lugar normalizando los valores de Ct obtenidos para los IPs con el anticuerpo anti-H3K9me3 específico con los valores de Ct obtenidos para el tubo al cual se le adicionó suero normal de conejo (tubo IgG). Finalmente se realizó una segunda normalización teniendo en cuenta los valores de Ct del ADN input (sin inmunoprecipitar).

3 | *Evaluación de los efectos del HBG sobre la sensibilidad uterina al E2*

Para cumplir este objetivo utilizamos un modelo de rata ovariectomizada (OVX) sometida a una estimulación crónica con E2. En el momento del destete de las crías (DPN21), los animales fueron sometidos a ovariectomía bilateral y se les colocó un implante cargado con 17β-estradiol que se mantuvo hasta el DPN60 (Figura 15). Al momento del sacrificio se determinaron:

- 1) En suero, los niveles de E2 alcanzados al concluir el experimento.
- 2) En útero:

- Las características histomorfológicas,
- La proliferación celular,
- La expresión de receptores hormonales, y
- La expresión de marcadores asociados a una respuesta uterina alterada al E2.

3.1 | Ovariectomía bilateral

Antes de comenzar con esta maniobra quirúrgica, el instrumental de cirugía fue sumergido en alcohol al 70% y se preparó el hilo de sutura. Los animales fueron anestesiados utilizando la mezcla de anestesia disociativa: clorhidrato de ketamina (50 mg/ml, Ketamina 50, Holliday Scott, San Isidro, Buenos Aires, Argentina), clorhidrato de xilazina (20 mg/ml, Kensol® König, Avellaneda, Buenos Aires, Argentina) y acepromacina maleato (10 mg/ml, Acedan, Holliday Scott) en una relación 50:5:1. La mezcla anestésica fue administrada en la cavidad peritoneal en una dosis de 135 µl/100 g de peso corporal. Diez minutos después de la inyección, los animales se colocaron en la tabla de cirugía con el abdomen hacia abajo, sujetos por sus extremidades. El campo quirúrgico fue desinfectado con alcohol al 70% y se procedió a practicar una incisión de 1,5 cm en la línea media de la piel dorsal. Se divulsionó el tejido subcutáneo para separar la piel del tejido muscular subyacente. Posteriormente, se realizaron dos incisiones sobre la pared muscular, una a la izquierda y otra a la derecha, a una distancia de 0,5 cm de la columna vertebral y a 0,5 cm de la última costilla, con el objetivo de ingresar a la cavidad abdominal. Con pinza anatómica de punta roma se localizó la grasa que rodea los órganos genitales internos, y se expuso el ovario manipulando con pinzas la grasa circundante para evitar lesionar los órganos internos. Se ligó el hilio ovárico a nivel de la unión útero-tubárica, asegurando la obstrucción completa de la arteria principal ovárica y se seccionó por arriba de la ligadura, extrayendo el ovario y el oviducto. Se introdujo el resto del tejido expuesto en la cavidad abdominal y se procedió a suturar el peritoneo junto con el tejido muscular con sutura continua.

3.2 | Armado y colocación de implantes

Se utilizaron implantes subcutáneos de silastic (diámetro interno/externo: 1,98/3,18 mm, 19 mm de longitud, Dow Corning Corp., Midland, EE.UU) cargados con 1 mg de E2/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, EE.UU) disuelto en aceite de maíz [169]. Para el armado de

los implantes, se selló uno de sus extremos con silicona, se llenó con la solución de E2 y luego se selló en el extremo restante. Una vez sellados ambos extremos, los implantes se lavaron dos veces durante 15 min con alcohol 96° y se conservaron a temperatura ambiente hasta el momento de su colocación. Previo a su colocación en el animal, los implantes fueron sumergidos durante 24 hs en una solución de PBS 0,05 M, pH 7,5 a 37 °C, a fin de alcanzar un equilibrio en la tasa de liberación de la hormona. A continuación y durante la OVX bilateral, se colocó un implante por animal en forma subcutánea y se suturó la piel con 1 o 2 puntos discontinuos. Una vez finalizado el procedimiento, las ratas OVX se colocaron en jaulas individuales bajo lámpara de calor para su recuperación.

3.3 | *Experimento piloto para evaluar la sensibilidad uterina al E2*

Previo al estudio de los animales expuestos a HBG, realizamos un ensayo piloto utilizando animales controles prepúberes que fueron OVX en DPN21 y a los que se les colocaron implantes tal como describimos anteriormente. Este ensayo se realizó con el objetivo de caracterizar la respuesta uterina al tratamiento exógeno con E2. A un grupo de ratas OVX, se les colocó un implante cargado con vehículo (aceite de maíz) para constituir el grupo control (C+OVX+V, n=5). A otro grupo de ratas OVX se les colocó un implante cargado con E2 (C+OVX+E2, n=8). Estos animales fueron sacrificados en DPN60 (Figura 15).

3.4 | *Obtención de muestras de sangre y disección de cuernos uterinos*

Un grupo de animales expuestos a HBG, fueron sometidos a OVX en DPN21 y se les colocó un implante previamente cargado con E2. De esta manera, se obtuvo un grupo experimental adicional definido como HBG+OVX+E2 (n=7). Para los tres grupos experimentales obtenidos (C+OVX+V, C+OVX+E2 y HBG+OVX+E2), se realizó la obtención de muestras de sangre y la disección de cuernos uterinos en DPN60 (Figura 15).

Para la obtención de muestras, los animales fueron anestesiados en cámara de CO₂ y luego, sacrificados por decapitación. Las muestras de sangre fueron recolectadas en tubos de vidrio de centrífuga e incubados en estufa a 37 °C por 15 min para facilitar la retracción del coágulo. Mediante centrifugación se separó el suero, el cual fue conservado a -20 °C hasta el momento de su utilización. Las biopsias de útero se

obtuvieron tal como se describió en la sección 2.2 y fueron procesadas para su análisis por microscopía óptica (sección 2.3.1) o para extracción de ARN total (sección 2.3.2).

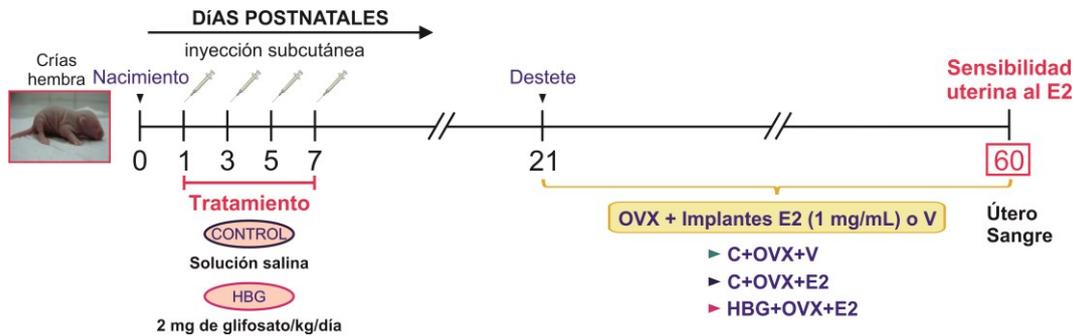


Figura 15. Esquema del diseño experimental utilizado para evaluar los efectos de la exposición postnatal a HBG sobre la sensibilidad uterina al 17β -estradiol (E2). La línea de tiempo indica los días postnatales. C, control; OVX, ovariectomía/ovariectomizado; V, vehículo.

3.5 | Determinación de los niveles séricos de E2

La determinación de E2 sérico se realizó utilizando un kit comercial de RIA ultrasensible para E2 (DSL-4800, Immunotech, Beckman Coulter, República Checa), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, 200 μ l de calibradores, muestras y controles internos de concentración baja y alta fueron incubados con 100 μ l de antisuero de conejo anti-Estradiol durante 1 hora a TA. Luego, cada uno de los tubos fue incubado con 100 μ l de E2 marcado con iodo-125 durante 2 hs. Los complejos E2-anticuerpo fueron inmunoprecipitados con 1 ml de suero de cabra anti-gama globulina de conejo y polietilenglicol durante 20 min a TA. Luego de una centrifugación a 3000 rpm por 20 min y a 4 °C, se aspiró el sobrenadante, se secó suavemente el interior de los tubos y se contaron las cuentas por minuto en un contador gamma (WinSpectral, Modelo 1414, PerkinElmer). La curva estándar para la cuantificación se realizó en paralelo con concentraciones de calibradores comprendidas en un rango de 4,8 a 750 pg/ml. Todas las muestras, calibradores y controles se corrieron por duplicado. La sensibilidad del ensayo fue de 2,2 pg/ml. Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron del 8,9% y 12,2%, respectivamente.

3.6 | Evaluación de las características histomorfológicas del útero

Para el estudio histológico, tres cortes longitudinales de cada muestra (5 μ m de espesor), separados 50 μ m entre sí y realizados en paralelo al eje mayor del útero, fueron coloreadas con H&E como se detalló en la sección 2.4, con el objetivo de

evaluar los siguientes parámetros: *i)* histomorfología uterina; *ii)* densidad de glándulas; *iii)* densidad de núcleos del estroma; *iv)* altura del epitelio luminal y glandular, y espesor del estroma y del miometrio. Para cada parámetro se evaluó un total de 10 campos por sección seleccionados al azar, siguiendo la metodología que se describe a continuación:

- i)* Histomorfología uterina: los cortes histológicos coloreados fueron evaluados por un patólogo cegado al grupo experimental para determinar posibles cambios histomorfológicos en el útero.
- ii)* Densidad de glándulas: se cuantificó como fracción de volumen utilizando una objetiva Dplan 40× y aplicando la fórmula dada por Weibel (1969) tal como se describió en la sección 2.5.1.
- iii)* Densidad de núcleos del estroma: se definió como la relación entre el área ocupada por los núcleos del estroma y el área total del estroma subepitelial (150 μm desde la membrana basal hacia el miometrio). La densidad de núcleos se cuantificó en imágenes obtenidas con la cámara de video color Spot Insight V3.5, acoplada al microscopio Olympus BH2 con una objetiva de Dplan 40×, y utilizando el analizador Image Pro-Plus. Las células infiltrantes y los vasos sanguíneos y/o linfáticos fueron excluidos del análisis.
- iv)* Altura del epitelio luminal y glandular, y espesor del estroma y del miometrio circular y longitudinal: estos parámetros se determinaron sobre imágenes capturadas con la cámara de video color Spot Insight V3.5, acoplada al microscopio Olympus BH2 con una objetiva Dplan 20×, y utilizando el analizador Image Pro-Plus (sección 2.4).

3.7 | Evaluación de la proliferación celular, la expresión de receptores hormonales y marcadores moleculares asociados a una respuesta uterina alterada al E2

Tal como mencionamos anteriormente, para evaluar la respuesta uterina al tratamiento exógeno con E2 se analizó la expresión del marcador de proliferación celular Ki67 y de los REs ($\text{RE}\alpha$ y $\text{RE}\beta$). Adicionalmente, determinamos la expresión de marcadores moleculares asociados a una respuesta uterina alterada al E2, tales como Wnt7a y β -catenina. La proliferación celular se evaluó mediante la técnica de IHQ mientras que la

expresión de los REs, Wnt7a y β -catenina se analizó tanto a nivel ARNm como proteína, mediante la aplicación de las técnicas de RT-PCR en tiempo real e IHQ.

Los niveles de expresión relativa del ARNm de RE α , RE β , Wnt7a, β -catenina y L19 (gen de referencia) fueron cuantificados por RT-PCR en tiempo real utilizando el termociclador Rotor-Gene Q, como se detalló en la sección 2.6.3. Tal como describimos en las secciones 2.6.1 y 2.6.2, a partir de las muestras de útero de cada grupo experimental (C+OVX+V, C+OVX+E2 y HBG+OVX+E2), se realizó la extracción de ARN total y la RT para la obtención de los ADNc correspondientes. Los pares de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los ADNc se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Secuencia de oligonucleótidos correspondiente a los genes RE α , RE β , Wnt7a, β -catenina y al gen de referencia L19.

Gen	Secuencia	Tamaño del amplicón (pb)	Temperatura de hibridación (°C)
REα	Sentido: 5'-ACTACCTGGAGAACGAGCCC-3' Antisentido: 5'-CCTTGGCAGACTCCATGATC-3'	153	60
REβ	Sentido: 5'-TTCTGGGCACCTGTCTCCTT-3' Antisentido: 5'-TAACAGGGCTGGCACAACCTG-3'	166	60
β-catenina	Sentido: 5'-GAGCACATCAGGACACCCAGC-3' Antisentido: 5'-GAGGATGTGGAGAGCCCCAGT-3'	116	60
Wnt7a	Sentido: 5'-CTTACACAATAACGAGGCAGGC-3' Antisentido: 5'-TCTCGGAATTGTGGCAGTGT-3'	126	56
L19	Sentido: 5'-AGCCTGTGACTGTCCATTCC-3' Antisentido: 5'-TGGCAGTACCCTTCCTCTTC-3'	99	60

RE α , receptor de estrógenos alfa; RE β , receptor de estrógenos beta; L19, proteína ribosomal L19.

La pureza de los productos fue confirmada a través de curvas de disociación, y muestras al azar fueron analizadas mediante electroforesis en gel de agarosa (sección 2.6.4). El cálculo del nivel de expresión relativo de cada uno de los genes se realizó mediante el método de la curva estándar relativa (sección 2.6.3).

Para evaluar la expresión proteica de los REs, Wnt7a y β -catenina se realizaron ensayos de IHQ sobre cortes longitudinales de útero de 5 μ m de espesor siguiendo la

metodología de rutina descrita anteriormente en la sección 2.5. Los anticuerpos utilizados en los ensayos de IHQ de esta etapa se detallan en la Tabla 8.

Tabla 8. Anticuerpos utilizados en los ensayos de IHQ.

Anticuerpo primario utilizado	Dilución	Anticuerpo secundario biotinilado	Proveedor del anticuerpo primario
Anti-Ki67 (clon MIB-5)	1/50	Anti-Ratón 1/100 (Sigma-Aldrich)	Dako Corp. (Carpinteria, CA, USA)
Anti-RE α (clon 6F-11)	1/200	Anti-Ratón 1/100	Novocastra (Newcastle upon Tyne, UK)
Anti-RE β (clon EMR02)	1/50	Anti-Ratón 1/100	Novocastra (Newcastle upon Tyne, UK)
Anti- β -catenina (clon E-5)	1/800	Anti-Ratón 1/100	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)
Anti-Wnt7a	1/800	Anti-Conejo 1/200 (Sigma-Aldrich)	Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (Santa Fe, Argentina)*

*El Anti-Wnt7a fue generado y testeado en nuestro laboratorio por Vigezzi y col., 2016.

La proliferación celular se determinó como porcentaje de células positivas para Ki67 en el epitelio luminal y glandular, utilizando una objetiva plana Dplan 40 \times , tal como se describió en la sección 2.5.1. La expresión del RE α , RE β , Wnt7a y β -catenina fue cuantificada por análisis digital de imágenes, utilizando el programa Image Pro-Plus y siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.5.2. Los resultados fueron expresados como DOI. La cuantificación se realizó en el epitelio luminal y glandular, y en el estroma subepitelial, abarcando un área de 150 μ m desde la membrana basal hacia la capa más externa.

4 | Evaluación de los efectos del HBG sobre el ciclo estral y los niveles séricos de E2 y P4

Luego del destete (DPN21), un grupo de animales de cada grupo experimental (control, n=10; HBG, n=11) se mantuvo con agua y comida *ad libitum* hasta alcanzar la adultez. A partir del DPN120 y durante cuatro ciclos estrales consecutivos, se evaluó la regularidad del ciclo mediante la realización diaria de extendidos vaginales [51]. Asimismo, en la mañana del primer estro del ciclo se extrajeron muestras de sangre de la cola para evaluar los niveles séricos de E2 y P4 (Figura 16). Las muestras de sangre

fueron recolectadas en tubos eppendorf y, luego de la retracción del coágulo, se centrifugaron para separar el suero, el cual fue conservado a -20 °C hasta el momento de su utilización.

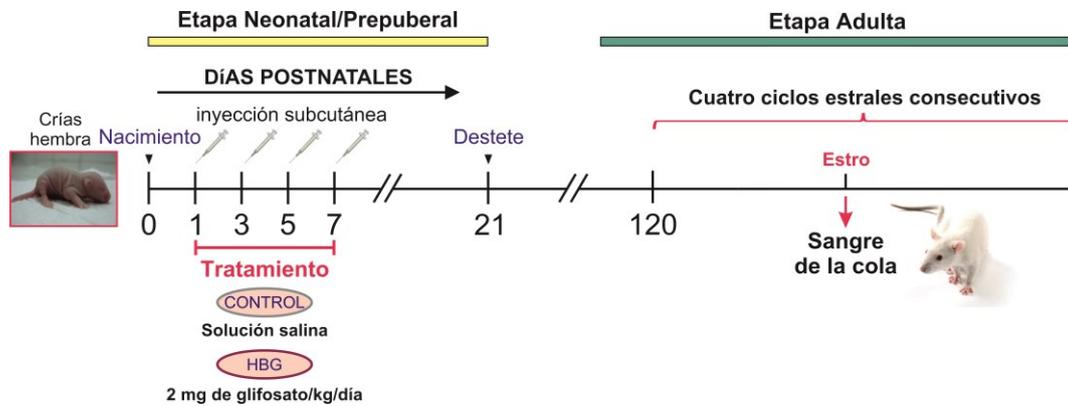


Figura 16. Esquema del diseño experimental utilizado para evaluar los efectos de la exposición postnatal a HBG sobre el ciclo estral y los niveles séricos de E2 y P4. La línea de tiempo indica los días postnatales.

4.1 | Ciclo estral

Para determinar si la exposición a HBG produjo alteraciones en la regularidad del ciclo estral, se realizaron extendidos vaginales diarios en las hembras controles y tratadas con HBG desde el DPN120 y durante cuatro ciclos estrales consecutivos [51]. Los datos fueron expresados como duración del ciclo estral (en días) y porcentaje de tiempo en proestro/estro (% del tiempo en proestro y estro en relación a la duración total de ciclo estral).

4.2 | Determinación de los niveles séricos de E2 y P4

Determinación de E2. La determinación de los niveles séricos de E2 se realizó con un kit comercial de RIA ultrasensible para E2, siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.5.

Determinación de P4. La determinación de los niveles séricos de P4 se realizó utilizando un kit comercial de ELISA (LI4043F1, EIAgen, Adaltis Srl., Italia), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, 25 µl de calibradores, muestras, y controles fueron incubados (1 hr a TA) con 50 µl del conjugado progesterona-enzima (HRP) y 50 µl del anticuerpo anti-progesterona biotinilado en una placa de ELISA sensibilizada con estreptavidina. Seguidamente se descartó el contenido de la placa por aspiración y se realizaron tres lavados con solución de lavado. Para el revelado, se

dispensaron 100 µl del sustrato de la enzima (3,3',5,5'-tetrametilbencidina y H₂O₂) y la placa se incubó durante 20 min a TA. Finalmente, la reacción colorimétrica se detuvo por el agregado de 50 µl de H₂SO₄. Al cabo de 20 seg se realizó la lectura del color generado en cada pocillo por medición de la absorbancia a 620 nm en un lector de placas de microtitulación (Scientific Multiskan EX, Thermo). La curva estándar para la cuantificación se realizó en paralelo con concentraciones de calibradores comprendidas en un rango de 0,3 a 60,0 ng/ml. Todas las muestras, calibradores y controles se corrieron por duplicado. La sensibilidad del ensayo fue de 0,105 ng/ml.

5 | Evaluación de los efectos del HBG sobre la fertilidad de la hembra y la diferenciación funcional del útero durante el período post-implantatorio

Para esta etapa del trabajo, un grupo de animales controles y expuestos a HBG, se mantuvo con agua y comida *ad libitum* desde el destete (DPN21) hasta alcanzar la madurez sexual (DPN90). A partir del DPN90, cada rata hembra fue alojada con una rata macho de fertilidad comprobada. Al día siguiente, aquellas hembras en las que se detectaron espermatozoides en el extendido vaginal fueron consideradas hembras preñadas (DG1).

Las hembras que resultaron preñadas fueron asignadas a uno de los siguientes experimentos:

- i)* Evaluación de la eficiencia reproductiva mediante la determinación del porcentaje de hembras preñadas y la realización de un test de fertilidad en DG19 [104,105] (Figura 17); y,
- ii)* Evaluación de la diferenciación funcional del útero durante el período post-implantatorio (DG9) (Figura 17).

5.1 | Evaluación de la fertilidad de la hembra

Para determinar los efectos de la exposición postnatal a HBG sobre la fertilidad, hembras controles (n=26) y tratadas con HBG (n=30) fueron alojadas individualmente con machos de fertilidad comprobada a los 90 días de edad. Como mencionamos anteriormente, todas las mañanas se realizaron extendidos vaginales, en gota fresca,

para confirmar la preñez de los animales. Se definió como DG1 al momento en el que se observaron espermatozoides en el extendido vaginal junto a células de descamación características del estro [51]. Aquellas ratas hembra que durante 3 semanas consecutivas de haberlas puesto a preñar no presentaron espermatozoides en su extendido vaginal, fueron consideradas no preñadas y con este dato se calculó el **porcentaje de preñez** como el número de hembras preñadas/número de hembras apareadas $\times 100$. Las ratas hembra que resultaron preñadas fueron separadas de las ratas macho, colocadas en jaulas individuales y sacrificadas en DG19 para realizar un test de fertilidad. Para ello, los ovarios fueron extraídos y se cuantificó el número de CLs profusamente irrigados mediante visualización directa de los ovarios con lupa estereoscópica (Leica Corp., Buffalo, NY, EE.UU), dato que indica el número de ovocitos ovulados. En el útero de estos animales se identificaron y cuantificaron los sitios de implantación (SI) y la presencia de reabsorciones fetales. Las reabsorciones son embriones que han implantado y cuyo crecimiento no progresó. Se visualizan en los cuernos uterinos como una masa amorfa de aspecto blanquecino y de tamaño reducido.

5.2 | Evaluación de la diferenciación funcional del útero durante el período post-implantatorio

Otro grupo de hembras preñadas controles (n=8) y expuestas a HBG (n=8) fue sacrificado en la mañana del DG9 (período post-implantatorio) para evaluar eventos moleculares relacionados al proceso de decidualización. Se extrajeron biopsias de todos los SI de cada rata (sección 2.2), los cuales fueron pesados y distribuidos aleatoriamente para ser procesados de acuerdo a distintos propósitos. La mitad de los SI de cada animal fue fijada por inmersión en formol buffer al 10% v/v durante 6 hs y procesada para realizar estudios histológicos e inmunoquímicos (sección 2.3.1). Los SI restantes fueron congelados rápidamente en N₂ líquido y almacenados a -80 °C para su posterior análisis mediante RT-PCR en tiempo real (sección 2.3.2).

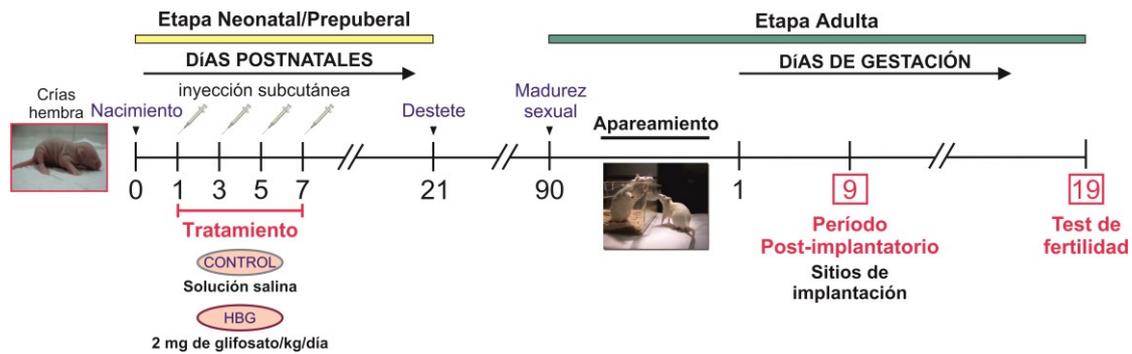


Figura 17. Esquema del diseño experimental utilizado para evaluar los efectos de la exposición postnatal a HBG sobre la fertilidad de la hembra y la diferenciación funcional del útero durante el período post-implantatorio.

5.2.1 | Expresión de desmina y evaluación del área de decidualización

Sobre tres cortes histológicos transversales de los SI (5 μm de espesor), separados 50 μm entre sí, se aplicó la técnica de IHQ (sección 2.5) con el objetivo de evaluar la expresión de desmina como marcador de células deciduales [66]. Como anticuerpo primario se utilizó anti-Desmina (clon DE-R-11, Novocastra) en una dilución 1/6400 y como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo anti-Ratón (Sigma-Aldrich) en una dilución 1/100. Una vez finalizado el ensayo, se capturaron imágenes de la estructura completa de cada uno de los SI utilizando la cámara de video color Spot Insight V3.5 (Diagnostic Instruments) acoplada al microscopio Olympus BH2 con una objetiva plana Dplan 10 \times (apertura numérica = 0,25). Sobre estas imágenes se determinó el área de decidualización (AD), correspondiente al área positiva para desmina, el área endometrial (AE) total y la relación AD/AE, utilizando el analizador Image Pro-Plus. Los resultados se expresaron en milímetros cuadrados (mm^2).

5.2.2 | Vía de señalización RP/COUP-TFII/Bmp2

Siguiendo la metodología descrita en la sección 2.5, se aplicó la técnica de IHQ sobre tres cortes histológicos transversales de los SI (5 μm de espesor), separados 50 μm entre sí, con el objetivo de evaluar la expresión del RP, una molécula clave en el proceso de decidualización. Como anticuerpo primario se utilizó anti-RP (A0098, Dako) en una dilución 1/500 y como anticuerpo secundario un anticuerpo anti-Ratón (Sigma-Aldrich) en una dilución 1/100. La cuantificación de la expresión de RP se realizó mediante análisis digital de imágenes, utilizando el programa Image Pro-Plus y siguiendo el protocolo descrito en la sección 2.5.2. Los resultados fueron expresados como DOI. El

análisis de la expresión del RP se realizó en: *i*) la zona antimesometrial o AM, excluyendo el miometrio, y *ii*) la zona mesometrial o M. En esta última zona, la expresión fue evaluada y cuantificada en cada uno de los compartimentos uterinos: epitelio luminal y glandular, y estroma subepitelial (200 µm desde la membrana basal hacia la capa más externa), también excluyendo el miometrio.

Para analizar si la exposición a HBG impactó negativamente sobre la vía de señalización que regula el proceso de decidualización, los niveles de expresión relativa del ARNm de RP, COUP-TFII y Bmp2 fueron evaluados mediante RT-PCR en tiempo real. Primeramente, se extrajo el ARN total de ocho SI de cada grupo experimental (control y HBG) tal como se describió en la sección 2.6.1. Luego de la realización de la RT (sección 2.6.2), los ADNc fueron amplificados como se describió en la sección 2.6.3 utilizando oligonucleótidos diseñados específicamente con el software Vector NTI Suite (Tabla 9).

Tabla 9. Secuencia de oligonucleótidos correspondiente a los genes RP, COUP-TFII, Bmp2 y al gen de referencia L19.

Gen	Secuencia	Tamaño del amplicón (pb)	Temperatura de hibridación (°C)
RP	Sentido: 5'-GACCAGTCTCAACCAACTAGGC-3' Antisentido: 5'-ACACCATCAGGCTCATCCAG-3'	137	60
COUP-TFII	Sentido: 5'-CCAAGAGCAAGTGGAGAAGC-3' Antisentido: 5'-CGTGGGCTACATCAGACAGA-3'	116	57
Bmp2	Sentido: 5'-TCCATCACGAAGAAGCCATC-3' Antisentido: 5'-CTCATCAGTAGGGACAGAACTTAAA-3'	95	52
L19	Sentido: 5'-AGCCTGTGACTGTCCATTCC-3' Antisentido: 5'-TGGCAGTACCCTTCCTCTTC-3'	99	60

RP, receptor de progesterona; COUP-TFII, del inglés: *chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II*; Bmp2, proteína morfogenética ósea 2; L19, proteína ribosomal L19.

El cálculo del nivel de expresión relativo de cada uno de los genes se realizó mediante el método de curva estándar, y el gen de referencia L19 y el grupo control fueron utilizados para normalizar los valores de Ct (sección 2.6.3).

6 | Evaluación de los efectos del HBG sobre el desarrollo de lesiones pre-neoplásicas y neoplásicas en útero y vagina

Para establecer si la exposición a HBG promueve el desarrollo de lesiones ginecológicas pre-neoplásicas y/o neoplásicas en útero y vagina, aquellos animales que fueron utilizados en la sección 4 (“Evaluación de los efectos del HBG sobre el ciclo estral y los niveles séricos de E2 y P4”) (control, n=10; HBG, n=11) se mantuvieron con agua y comida *ad libitum* desde el destete (DPN21) hasta alcanzar los 20 meses de edad (DPN600) (Figura 18). Teniendo en cuenta la extensa duración del experimento, se realizó un control del peso. Los animales fueron pesados durante la semana de tratamiento y luego, cada diez días a partir del DPN21. Alcanzado el DPN90 y hasta el momento del sacrificio (DPN600), se registró el peso mensualmente, los animales se palparon dos veces por semana, y se examinó el estado de salud general de los mismos durante toda su vida. Con los datos obtenidos se construyó una curva de peso.

Como mencionamos, en el DPN600, y específicamente en la etapa de estro del ciclo estral, se obtuvieron biopsias de útero y vagina (sección 2.2) para su inclusión en parafina (sección 2.3.1) y posterior análisis histopatológico por microscopía óptica (Figura 18).

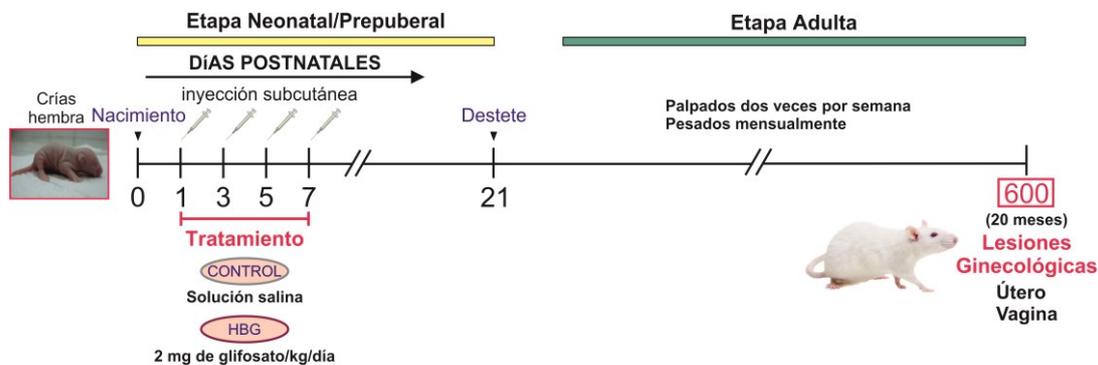


Figura 18. Esquema del diseño experimental utilizado para evaluar los efectos de la exposición postnatal a HBG sobre el desarrollo de lesiones ginecológicas pre-neoplásicas y neoplásicas en útero y vagina. La línea de tiempo indica los días postnatales.

6.1 | Incidencia de lesiones ginecológicas en animales de edad avanzada

Cortes histológicos (5 μm de espesor) de muestras de útero y vagina provenientes de animales de 20 meses de edad (DPN600), realizados en forma longitudinal al órgano y a distintas profundidades, fueron teñidos con H&E tal como se describió en la sección

2.4, con el objetivo de realizar un exhaustivo análisis histopatológico. Los cortes coloreados se examinaron mediante microscopio óptico (Olympus BH2) y se identificaron distintos tipos de lesiones con la ayuda de un patólogo cegado al grupo experimental. La incidencia de las alteraciones detectadas se cuantificó determinando el porcentaje de animales que presentaron al menos una alteración histológica. En útero se evaluó la incidencia de las siguientes lesiones pre-neoplásicas, siguiendo los criterios de Gunin y col. (2001), McLachlan y col. (1980), y el National Toxicology Program (2014): *i*) atipia en el epitelio luminal, *ii*) glándulas con metaplasia escamosa, *iii*) glándulas quísticas, *iv*) glándulas con anomalías celulares, *v*) glándulas con glándulas hijas, y *vi*) hiperplasia endometrial quística. Las lesiones neoplásicas encontradas se caracterizaron mediante ensayos de IHQ para α SMA, desmina y vimentina (Tabla 10), siguiendo los protocolos descritos en la sección 2.5.

Tabla 10. Anticuerpos utilizados en los ensayos de IHQ para caracterizar las lesiones neoplásicas.

Anticuerpo primario utilizado	Dilución	Anticuerpo secundario biotinilado	Proveedor del anticuerpo primario
Anti- α SMA (clon ASM-1)	1/100	Anti-Ratón 1/100 (Sigma-Aldrich)	Novocastra (Newcastle upon Tyne, UK)
Anti-Desmina (clon DE-R-11)	1/50	Anti-Ratón 1/100	Novocastra (Newcastle upon Tyne, UK)
Anti-Vimentina (clon V9)	1/50	Anti-Ratón 1/100	Novocastra (Newcastle upon Tyne, UK)

α SMA, alfa actina de músculo liso.

7 | *Análisis estadístico*

Los resultados obtenidos a lo largo del trabajo de tesis se expresan como la media \pm SEM. Durante el desarrollo de esta tesis, se aplicaron diferentes test estadísticos: *i*) el test de la probabilidad exacta de Fisher fue utilizado para analizar el porcentaje de hembras preñadas y para evaluar la incidencia de las distintas lesiones pre-neoplásicas y neoplásicas halladas; y *ii*) el test no paramétrico de Mann-Whitney fue utilizado para analizar el resto de los resultados obtenidos durante el desarrollo de la tesis. En todos los casos, los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

*“Todo parece imposible
hasta que se hace”.*

Nelson Mandela

1 | Efectos del HBG sobre la diferenciación organogenética del útero

La exposición postnatal a HBG no produjo signos evidentes de toxicidad aguda o a corto plazo sobre las crías. A su vez, no se observaron comportamientos maternos anormales y la supervivencia de la camada no se modificó durante la lactancia. Por otra parte, no se encontraron cambios en la ganancia de peso durante el tratamiento. En los días postnatales estudiados (DPN8 y DPN21), el peso de los animales fue similar entre las ratas expuestas a HBG y las ratas pertenecientes al grupo control: **i)** DPN8: Control $14,22 \pm 0,30$ g vs. HBG $14,28 \pm 0,20$ g ($p > 0,05$); y **ii)** DPN21: Control $36,55 \pm 0,58$ g vs. HBG $35,56 \pm 0,59$ g ($p > 0,05$).

1.1 | La exposición a HBG produce hiperplasia endometrial

El útero de los animales control en DPN8 reveló características histomorfológicas típicas de un tejido uterino acorde para esa edad. Esto es, un epitelio luminal cilíndrico simple sostenido por células estromales, y dos delgadas capas de músculo liso (Figura 19A). Dos semanas más tarde (DPN21), el útero mostró características histomorfológicas de un órgano más desarrollado, compuesto por un epitelio luminal cilíndrico simple, glándulas tubulares revestidas por un epitelio cúbico simple y rodeadas de un estroma endometrial más desarrollado, y un miometrio con sus capas longitudinal y circular bien definidas (Figura 19A). El análisis histológico de los úteros de los animales expuestos a HBG reveló cambios morfológicos importantes que indican una hiperplasia uterina, tanto en el epitelio luminal como en el estroma y miometrio en DPN8. Específicamente, el 75% (6/8) de los animales expuestos a HBG exhibió hiperplasia epitelial luminal (Figura 19B; $p < 0,05$) en asociación con un aumento en el espesor del estroma y del miometrio circular en DPN8 (Tabla 11; $p < 0,05$). Luego de 15 días de concluido el tratamiento (DPN21), el 37,5% (3/8) de los animales expuestos a HBG mostró hiperplasia epitelial luminal (Figura 19B) y el espesor del estroma fue mayor que en los animales controles, aunque no alcanzó significancia estadística (Tabla 11; $p = 0,053$). Es interesante resaltar que en el DPN8 aún no se han formado las glándulas endometriales. Sin embargo, para el DPN21 las glándulas endometriales se encuentran bien definidas. El tratamiento con HBG no produjo cambios en el número de glándulas uterinas detectadas por campo en DPN21 (Tabla 11).

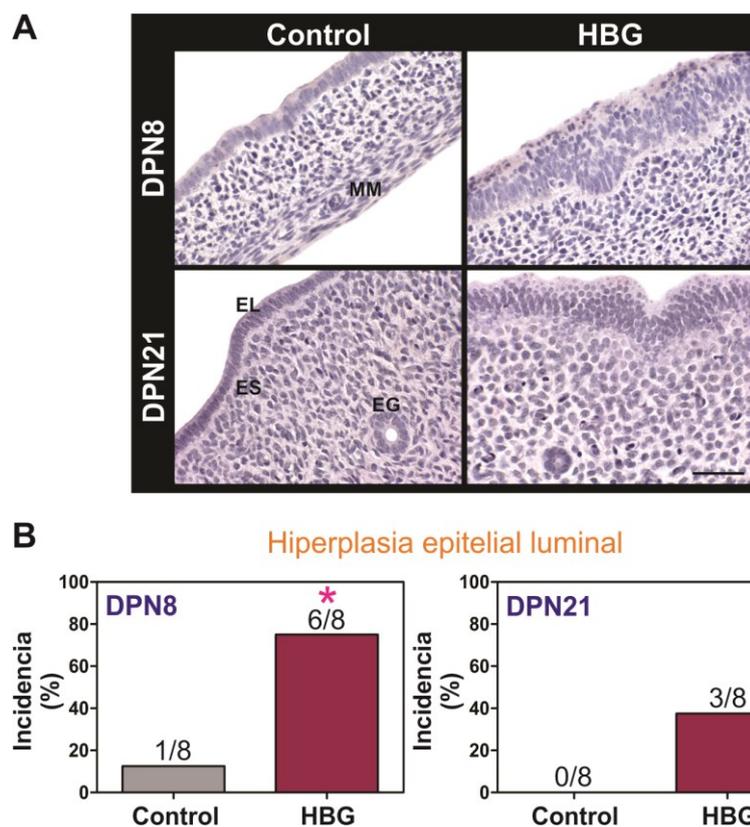


Figura 19. Efecto de la exposición postnatal temprana a HBG sobre la histomorfología uterina durante los períodos neonatal (DPN8) y prepuberal (DPN21). (A) Imágenes representativas que ilustran los cambios morfológicos hallados en cortes histológicos de útero en DPN8 y DPN21, teñidos con H&E. EL, epitelio luminal; EG, epitelio glandular; ES, estroma subepitelial; MM, miometrio. Barra: 50 μ m. (B) Incidencia de hiperplasia epitelial luminal en los animales controles y expuestos a HBG. Los datos se analizaron utilizando el Test de Fisher (* $p < 0,05$).

Tabla 11. Parámetros morfológicos evaluados en cortes histológicos de útero en los períodos neonatal (DPN8) y prepuberal (DPN21).

Parámetros	DPN8		DPN21	
	Control	HBG	Control	HBG
Espesor del estroma (μ m)	84,48 \pm 6,23	118,37 \pm 9,45*	164,75 \pm 1,51	182,24 \pm 10,22
Espesor del miometrio circular (μ m)	22,86 \pm 1,27	28,15 \pm 1,58*	48,18 \pm 1,21	49,30 \pm 2,66
Espesor del miometrio longitudinal (μ m)	19,70 \pm 0,72	21,36 \pm 1,81	36,78 \pm 1,91	45,22 \pm 4,64
Glándulas endometriales (n $^{\circ}$ /campo)	ND	ND	10,58 \pm 0,73	10,84 \pm 0,74

Los valores se expresaron como la media \pm SEM. Los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control (* $p < 0,05$, Test de Mann-Whitney). ND, no detectadas.

1.2 | Caracterización de la citodiferenciación celular

Para dilucidar si la exposición a HBG modificó los procesos de citodiferenciación celular uterina, se evaluó la expresión de distintos marcadores de diferenciación epitelial y estromal en el útero de crías de DPN8, en las cuales se detectó hiperplasia epitelial y estromal. Como se mencionó previamente, la expresión de CK8 se utilizó como marcador de células de epitelio simple, mientras que la expresión de p63 y las pan-CKs (CK1, 5, 10 y 14) como marcadores de epitelio estratificado. La expresión de vimentina fue utilizada para marcar células derivadas del mesénquima, tales como los fibroblastos del estroma. La exposición postnatal al HBG no produjo alteraciones en el patrón de citodiferenciación celular. Las células epiteliales fueron positivas para CK8 (epitelio simple) y negativas para p63 y las pan-CKs (Figura 20). Por su parte, los fibroblastos del estroma expresaron vimentina (Figura 20).

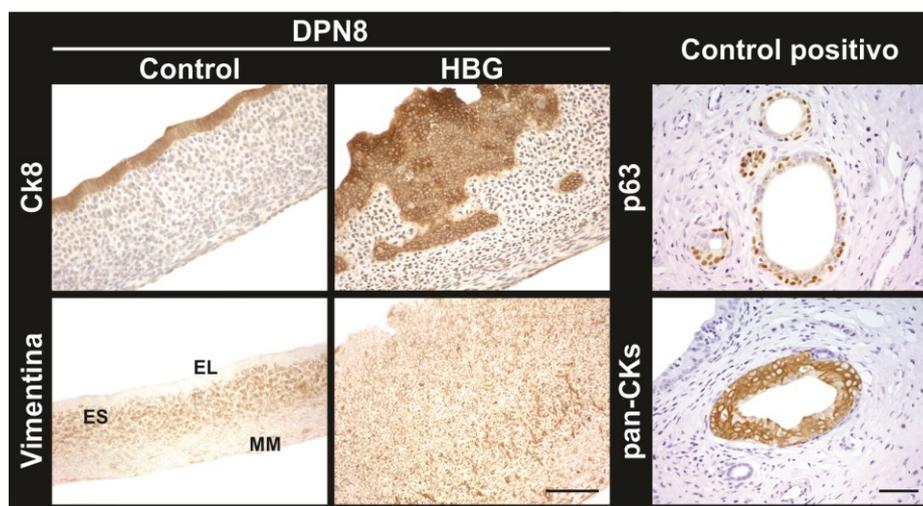


Figura 20. Citodiferenciación epitelial y estromal. Los animales expuestos al HBG presentaron un fenotipo epitelial característico de epitelio simple (CK8 positivo). Dicho epitelio fue negativo para marcadores de células basales de epitelio estratificado (pan-CKs y p63). Los fibroblastos del estroma mostraron positividad para vimentina. Como control positivo para p63 y las pan-CKs se utilizaron muestras de útero de animales de 12 meses de edad que presentan metaplasia escamosa a nivel de las glándulas (es decir, un epitelio estratificado). EL, epitelio luminal; ES, estroma subepitelial; MM, miometrio. Barra: 50 μ m.

1.3 | Proliferación celular

La proliferación de las células uterinas durante el desarrollo postnatal es crítica para el crecimiento normal del útero y su morfogénesis. Alteraciones en este proceso podrían impactar negativamente sobre la diferenciación funcional del órgano durante la vida adulta. En DPN8 las hembras controles presentaron un elevado índice de proliferación

en los distintos compartimentos celulares, lo cual es característico del período neonatal. Por otro lado, y en asociación con los cambios histomorfológicos, la exposición postnatal a HBG produjo un incremento en la proliferación celular en el epitelio luminal ($p < 0,01$) y en el estroma subepitelial ($p < 0,05$), sin cambios en el miometrio (Figura 21A). Imágenes ilustrativas de estos resultados se muestran en la Figura 21B. En DPN21, la proliferación endometrial en los animales controles disminuyó marcadamente en relación al DPN8, alcanzando valores muy bajos a esta edad (menores al 0,05%). No se observaron diferencias entre los grupos experimentales (datos no mostrados).

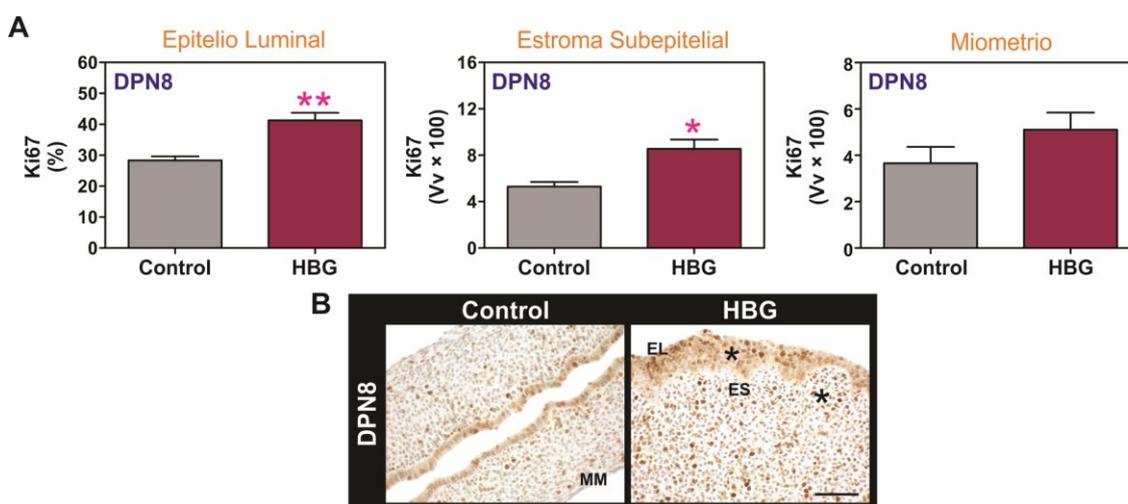


Figura 21. Efecto de la exposición postnatal a HBG sobre la proliferación celular en el período neonatal (DPN8). (A) Cuantificación de la expresión del marcador de proliferación celular Ki67 en el epitelio luminal, estroma subepitelial y miometrio en DPN8. Las barras representan la media \pm SEM (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Test de Mann-Whitney). Vv, fracción de volumen. (B) Imágenes representativas de la inmunomarcación para Ki67 en cortes histológicos de útero en DPN8. Los asteriscos negros indican los compartimentos que mostraron un aumento respecto al grupo control. EL, epitelio luminal; ES, estroma subepitelial; MM, miometrio. Barra: 50 μ m.

1.4 | Expresión de proteínas involucradas en la diferenciación organogénica del útero

1.4.1 | Receptor de estrógenos alfa

Las crías expuestas a HBG mostraron cambios en la expresión del RE α en DPN8 y DPN21. Se detectó un incremento en la expresión del RE α en el estroma subepitelial en DPN8 ($p < 0,05$) y una tendencia similar se observó en el miometrio, aunque para este compartimento no se detectaron diferencias significativas (Figura 22A). Finalmente, en

DPN21 se observó una disminución en la expresión del RE α en el epitelio luminal (Figura 22A; $p < 0,05$). Imágenes representativas de estos resultados se muestran en la Figura 22B.

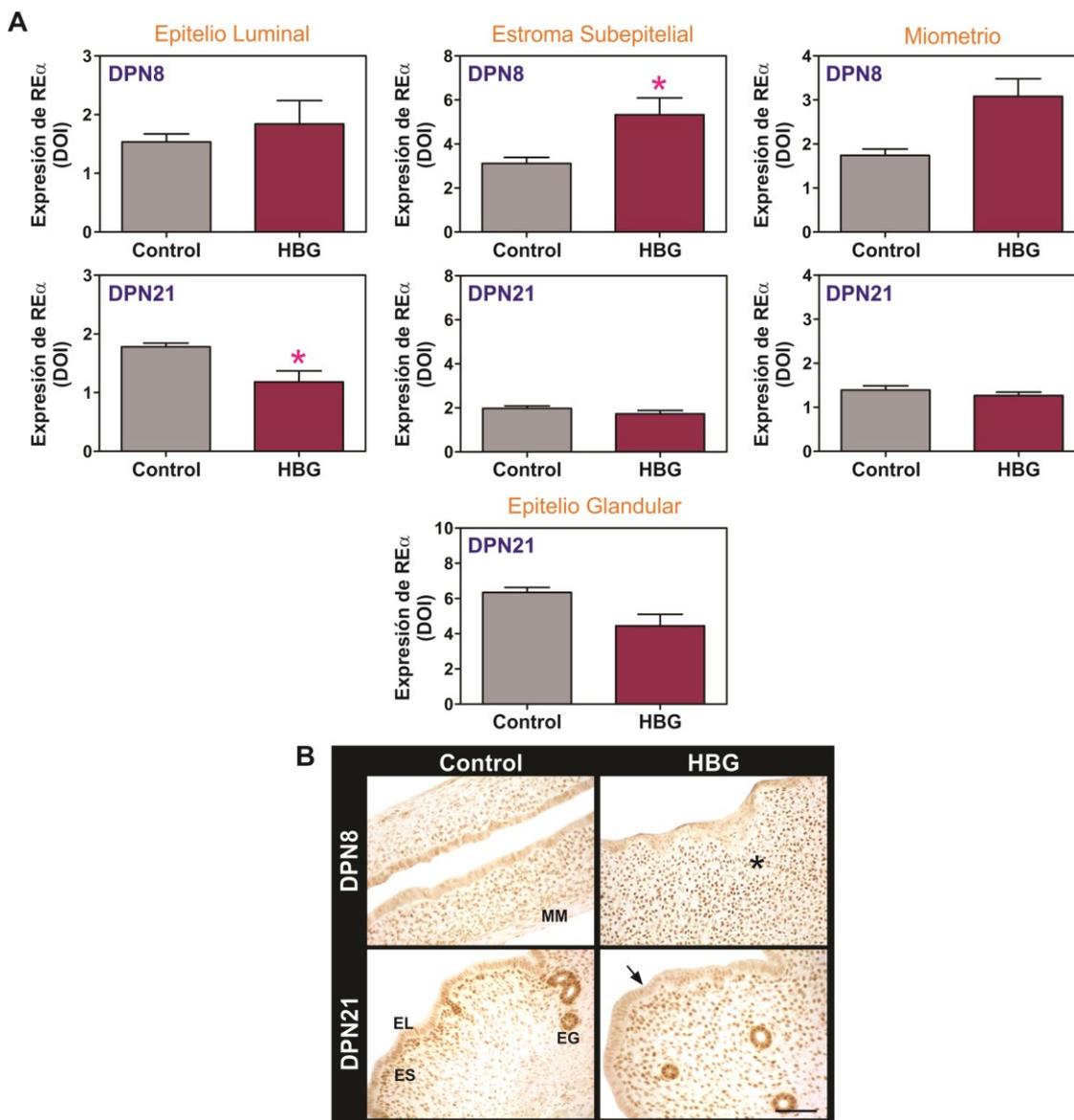


Figura 22. Expresión del receptor de estrógeno alfa (RE α) durante los períodos neonatal (DPN8) y prepuberal (DPN21). (A) Cuantificación de la expresión del RE α en todos los compartimentos uterinos en ratas controles y expuestas a HBG en DPN8 y DPN21. Los resultados fueron expresados como densidad óptica integrada (DOI). Las barras representan la media \pm SEM (* $p < 0,05$, Test de Mann-Whitney). (B) Imágenes representativas de la inmunomarcación para RE α en cortes histológicos de útero en DPN8 y DPN21. El asterisco negro indica el compartimiento que mostró un aumento respecto al grupo control. La flecha indica disminución respecto al grupo control. EL, epitelio luminal; EG, epitelio glandular; ES, estroma subepitelial; MM, miometrio. Barra: 50 μ m.

1.4.2 | Receptor de progesterona

El tratamiento con HBG incrementó notablemente la expresión del RP tanto en el epitelio luminal como en el estroma subepitelial en DPN8 (Figura 23A; $p < 0,01$). La desregulación del RP persistió hasta el período prepuberal (DPN21) (Figura 23A; $p < 0,05$). No se detectó expresión del RP en el miometrio en DPN8 y DPN21, tanto en los controles como en los animales expuestos a HBG. Imágenes ilustrativas de estos resultados se muestran en la Figura 23B.

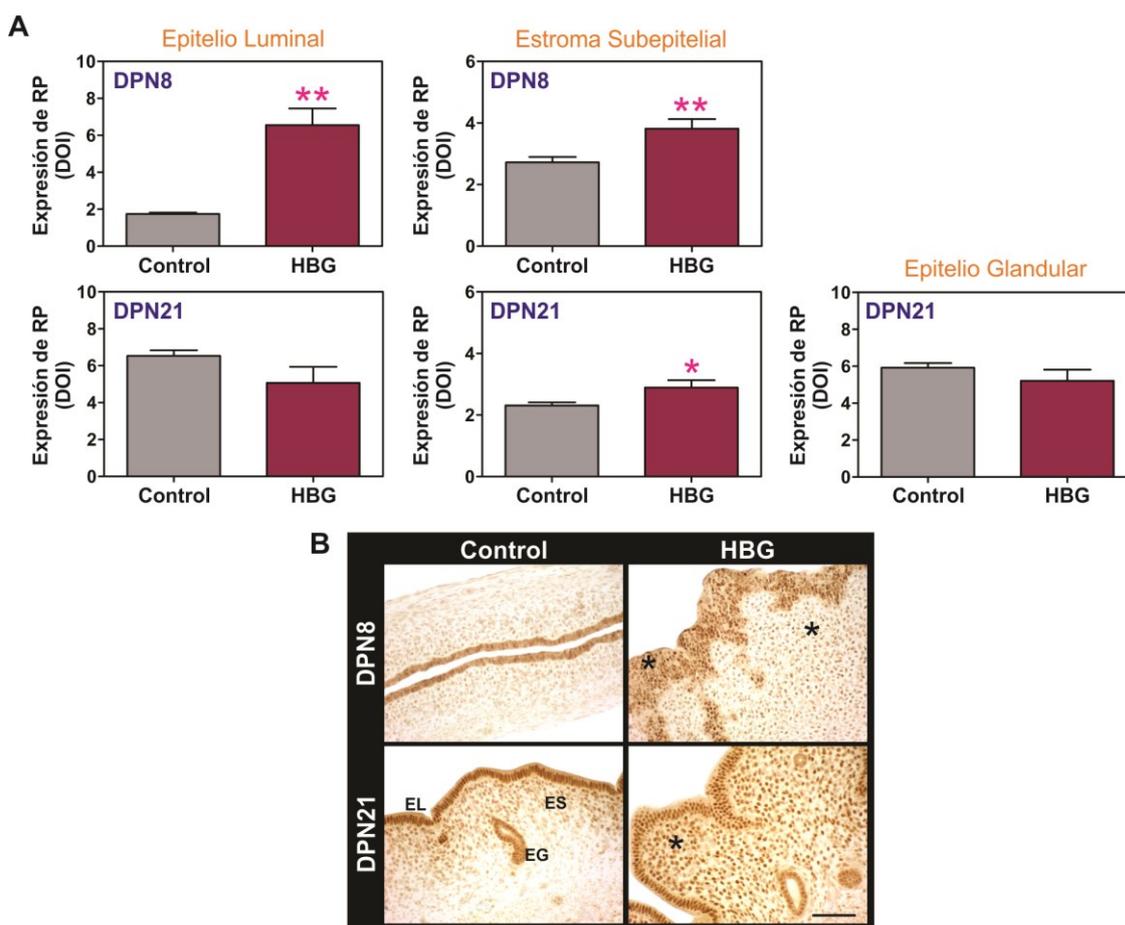


Figura 23. Expresión del receptor de progesterona (RP) durante los períodos neonatal (DPN8) y prepuberal (DPN21). (A) Cuantificación de la expresión del RP en todos los compartimentos uterinos en ratas controles y expuestas a HBG en DPN8 y DPN21. Los resultados fueron expresados como densidad óptica integrada (DOI). Las barras representan la media \pm SEM (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Test de Mann-Whitney). (B) Imágenes representativas de la inmunomarcación para RP en cortes histológicos de útero en DPN8 y DPN21. Los asteriscos negros indican los compartimentos que mostraron un aumento respecto al grupo control. EL, epitelio luminal; EG, epitelio glandular; ES, estroma subepitelial. Barra: 50 μ m.

1.4.3 | *Wnt7a*

En DPN8 no se observaron diferencias en la expresión de *Wnt7a* entre los grupos experimentales. Sin embargo, en DPN21 se detectó una inducción en la expresión de *Wnt7a* en el epitelio glandular y en las células del estroma subepitelial de los animales expuestos a HBG (Figura 24A; $p < 0,01$). Imágenes representativas de estos resultados se muestran en la Figura 24B.

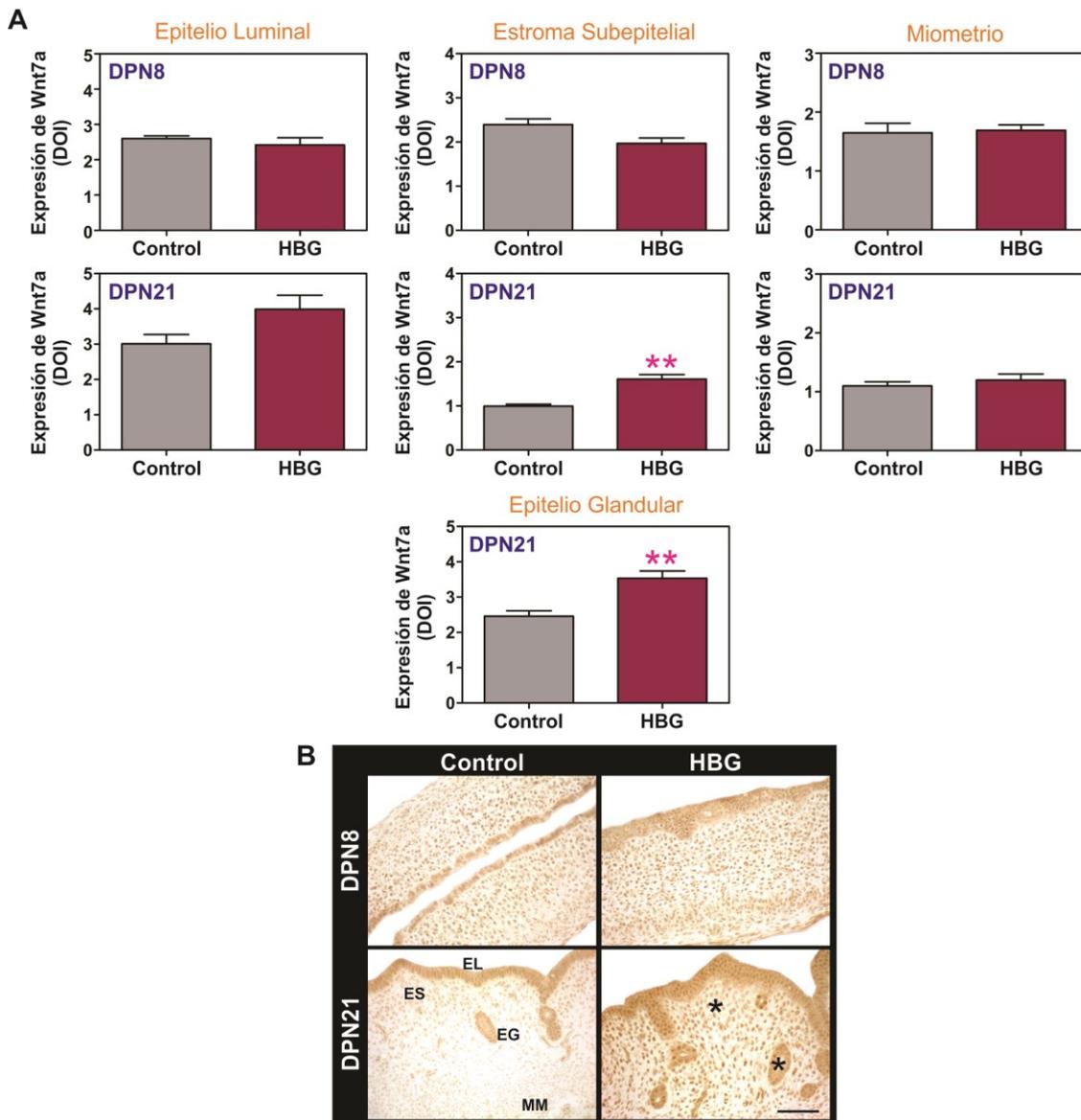


Figura 24. Expresión de *Wnt7a* durante los períodos neonatal (DPN8) y prepuberal (DPN21). (A) Cuantificación de la expresión de *Wnt7a* en todos los compartimentos uterinos en ratas controles y expuestas a HBG en DPN8 y DPN21. Los resultados fueron expresados como densidad óptica integrada (DOI). Las barras representan la media \pm SEM (** $p < 0,01$, Test de Mann-Whitney). (B) Imágenes representativas de la inmunomarcación para *Wnt7a* en cortes histológicos de útero en DPN8 y DPN21. Los asteriscos negros indican los compartimentos que

mostraron un aumento respecto al grupo control. EL, epitelio luminal; EG, epitelio glandular; ES, estroma subepitelial; MM, miometrio. Barra: 50 μ m.

1.4.4 | *Hoxa10*

En DPN8 se observó un incremento en la expresión de *Hoxa10* en las crías expuestas a HBG, tanto en el estroma subepitelial como en el miometrio (Figura 25A; $p < 0,05$). El aumento detectado en el estroma subepitelial persistió hasta el DPN21 ($p < 0,01$) (Figura 25A). Imágenes representativas de estos resultados se muestran en la Figura 25B.

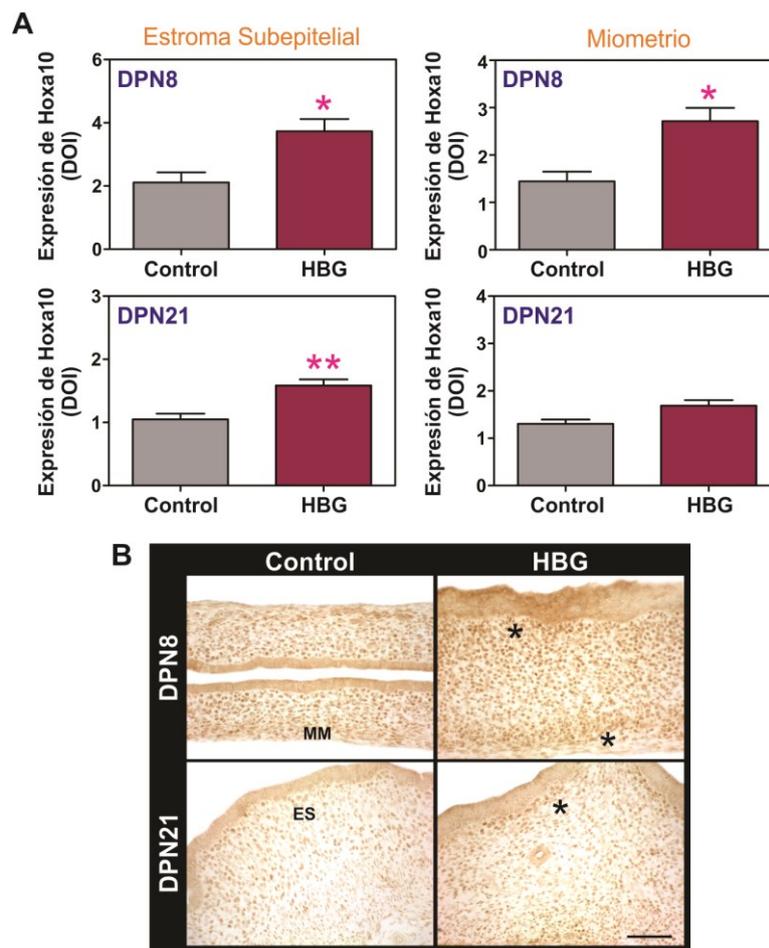


Figura 25. Expresión de *Hoxa10* durante los periodos neonatal (DPN8) y prepuberal (DPN21). **(A)** Cuantificación de la expresión de *Hoxa10* en el estroma subepitelial y miometrio en ratas controles y expuestas a HBG en DPN8 y DPN21. Los resultados fueron expresados como densidad óptica integrada (DOI). Las barras representan la media \pm SEM (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Test de Mann-Whitney). **(B)** Imágenes representativas de la inmunomarcación para *Hoxa10* en cortes histológicos de útero en DPN8 y DPN21. Los asteriscos negros indican los compartimentos que mostraron un aumento respecto al grupo control. ES, estroma subepitelial; MM, miometrio. Barra: 50 μ m.

1.5 | La exposición postnatal a HBG produce el silenciamiento del gen *Hoxa10* a través de modificaciones epigenéticas

Al evaluar la expresión génica de los marcadores de diferenciación organogenética del útero mediante ensayos de RT-PCR en tiempo real, detectamos que la exposición postnatal a HBG provocó una caída en la expresión relativa del ARNm de *Hoxa10* en el útero de las crías de DPN8 (Figura 26A). Para identificar si este cambio podría estar relacionado con modificaciones epigenéticas como posible mecanismo de acción del herbicida, se realizaron diferentes determinaciones relacionadas con el estado de metilación del ADN y las MPTs de histonas. En primer lugar, se evaluó la expresión de las enzimas DNMT3a y DNMT3b (involucradas en la metilación *de novo* del ADN). No se observaron cambios en los niveles de expresión del ARNm de estas enzimas con el tratamiento con HBG (Figura 26B y C).

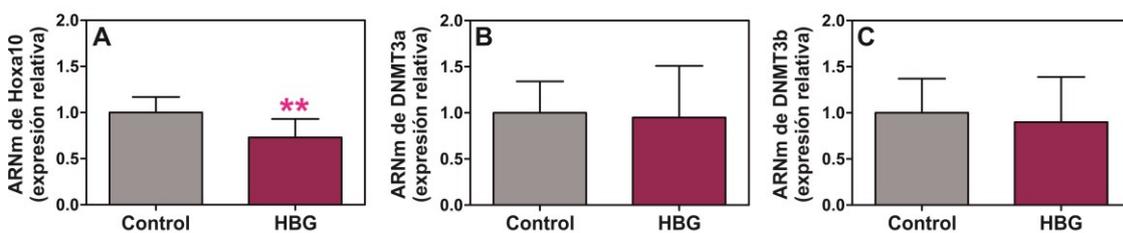


Figura 26. Evaluación de la expresión del ARNm del gen homeótico *Hoxa10* y de las ADN metiltransferasas (DNMT) 3a y 3b durante el período neonatal (DPN8). Cuantificación de la expresión del ARNm de *Hoxa10* (A), DNMT3a (B) y DNMT3b (C) mediante RT-PCR en tiempo real en crías hembra de rata de DPN8. Las muestras fueron normalizadas frente a la expresión de L19 y a los valores del grupo control, al que se le asignó el valor de 1. Las barras representan la media \pm SEM (** $p < 0,01$, Test de Mann-Whitney).

A continuación, utilizando programas bioinformáticos, se detectaron potenciales sitios de metilación del ADN y sitios de unión a factores de transcripción en el gen homeótico *Hoxa10*. El resultado del análisis de los sitios CpG que pueden presentar cambios en la metilación del ADN reveló la presencia de cuatro islas CpG, situadas tanto en regiones intrónicas como exónicas del gen, y diferentes sitios de restricción para la enzima sensible a metilación *BstUI*, los cuales se describen a continuación:

- i) Isla CpG1: esta isla se localizó en el extremo 5' del gen, abarcando el exón 1A y una región no codificante cercana a su extremo 5'. Presentó una longitud de 678 pb y dos sitios de corte para la enzima *BstUI* que fueron denominados como sitios A y B para su posterior estudio (Figura 27). La región no codificante que

abarca esta isla fue definida previamente por Li y col. (2001) como el promotor del exón 1A [109].

- ii) Isla CpG2: esta isla exhibió múltiples sitios de corte para la enzima *BstUI* y se extendió por una longitud de 1848 pb, comprendiendo una región no codificante cercana al extremo 5' del exón 1B, el exón 1B y una región del intrón proximal al extremo 3' del exón 1B. La región no codificante cercana al extremo 5' del exón 1B fue definida previamente por Bromer y col. (2009) como el promotor del exón 1B [108].
- iii) Isla CpG3: esta isla fue más pequeña que las anteriores, comprendiendo una región de 221 pb del intrón más corto, ubicada en forma proximal al exón 2, y presentando un único sitio de corte para la enzima *BstUI*.
- iv) Isla CpG4: esta isla se situó en el exón 2 del gen y se extendió por una región de 336 pb que presentó un único sitio de corte para la enzima *BstUI*.

El análisis *in silico* del gen *Hoxa10* mostró que algunos sitios de restricción se encuentran potencialmente regulados por los factores de transcripción CAAT/proteína de unión al *enhancer* (C/EBP), y Sp1 (del inglés: *Specificity Protein 1*) e YY1 (Yin Yang 1), ambos involucrados en procesos de diferenciación y desarrollo (Figura 27).

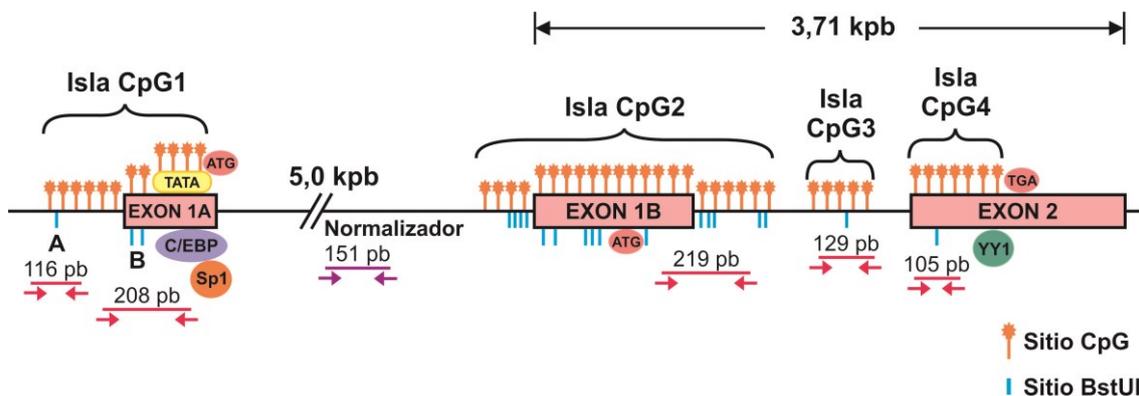


Figura 27. Organización genómica y análisis *in silico* del gen homeótico *Hoxa10* en la rata. Se indican los sitios de reconocimiento de la enzima de restricción sensible a metilación *BstUI* (CGCG) detectados en las islas CpG; el tamaño y posición de la región utilizada como normalizador (línea violeta) para los ensayos de MSRE-PCR; el tamaño y posición de las regiones estudiadas (líneas rojas); la posición y orientación de los oligonucleótidos utilizados para MSRE-PCR y ChIP; la posición de la caja TATA; y los potenciales sitios de unión a los factores de transcripción CAAT/proteína de unión al *enhancer* (C/EBP), *Specificity Protein 1* (Sp1) y Yin Yang 1 (YY1). ATG indica el sitio de inicio de la traducción y TGA el sitio de finalización de la traducción.

La evaluación del estado de metilación del ADN en las distintas regiones del gen *Hoxa10* indicó que el grupo expuesto a HBG presentó mayores niveles de metilación en los diferentes sitios estudiados que componen las cuatro islas CpG detectadas (Figura 28A; $p < 0,05$).

Adicionalmente, determinamos si la metilación de la lisina 9 de la histona H3 estaba modificada en los animales expuestos a HBG, como indicador de alteraciones en las MPTs de histonas. Para esto, los niveles de H3K9me3 en las regiones potencialmente regulatorias del gen *Hoxa10* fueron medidos mediante ensayos de ChIP seguido de PCR en tiempo real. El análisis de metilación de histonas reveló que los animales expuestos a HBG presentaron un incremento en el nivel de la H3K9me3 en tres de las cuatro islas analizadas (Figura 28B; $p < 0,05$).

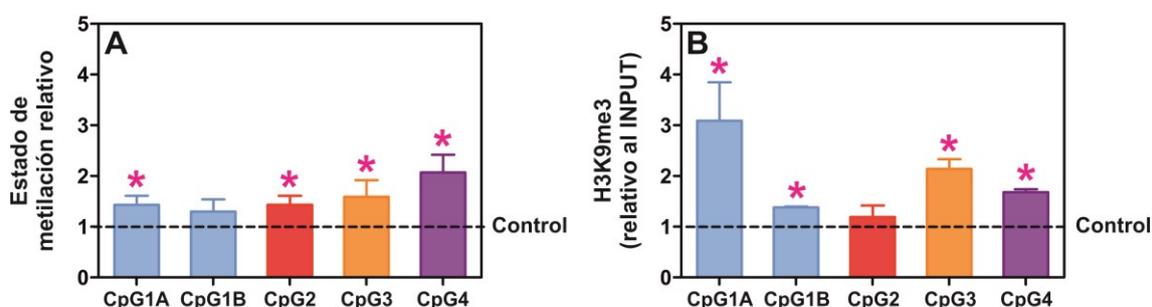


Figura 28. Análisis del estado de metilación del ADN y de la modificación post-traduccional de la histona H3 en las regiones potencialmente regulatorias del gen homeótico *Hoxa10* en DPN8. (A) Análisis del estado de metilación del ADN mediante MSRE-PCR de los sitios correspondientes a las regiones potencialmente regulatorias del gen *Hoxa10*. Las muestras fueron normalizadas frente a la expresión de L19 y a los valores del grupo control, al que se le asignó el valor de 1. Las barras representan la media \pm SEM ($*p < 0,05$, Test de Mann-Whitney). (B) Análisis del estado de metilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me3) en regiones potencialmente regulatorias del gen *Hoxa10* mediante ensayos de ChIP seguidos de PCR en tiempo real. Las muestras fueron normalizadas en relación a la expresión del INPUT (ver M&M para los detalles) y los resultados se muestran relativos al grupo control, al que se le asignó el valor de 1. Las barras representan la media \pm SEM ($*p < 0,05$, Test de Mann-Whitney).

2 | Efectos del HBG sobre la sensibilidad uterina al E2

En la sección anterior describimos que la exposición postnatal temprana a HBG altera la diferenciación organogenética del útero en ratas prepuberales produciendo hiperplasia endometrial, acompañada de un aumento en la proliferación celular y de una mayor expresión del RE α . Teniendo en cuenta estos resultados, nos propusimos evaluar si la

exposición postnatal a HBG incrementa la sensibilidad uterina al E2 utilizando un modelo de rata prepúber OVX sometida a un tratamiento crónico con estrógenos. Para esta etapa, primeramente, se determinaron los niveles séricos de E2 alcanzados con el tratamiento exógeno utilizando los implantes. Luego, mediante un ensayo piloto, determinamos la respuesta uterina al tratamiento con E2 comparando los animales controles que fueron OVX y que recibieron los implantes cargados con E2, con aquellos a los que se les colocaron implantes cargados con vehículo únicamente (aceite de maíz) (C+OVX+V vs. C+OVX+E2). Finalmente, comparamos la sensibilidad al E2 entre los animales control y expuestos postnatalmente a HBG (C+OVX+E2 vs. HBG+OVX+E2). A continuación se describen los resultados obtenidos.

2.1 | Niveles séricos de E2

Para conocer los niveles séricos de E2 alcanzados con los implantes, se determinó la concentración de 17β -estradiol en el suero de los animales de todos los grupos experimentales (C+OVX+V, C+OVX+E2 y HBG+OVX+E2). Como se esperaba, las ratas OVX a las que se les colocaron implantes con vehículo (grupo C+OVX+V), presentaron niveles de E2 que se encontraron por debajo del límite de detección del ensayo. Por el contrario, en los grupos experimentales en los que los implantes estaban cargados con E2, los niveles de E2 detectados alcanzaron concentraciones séricas de E2 de alrededor de 30 pg/ml. No se observaron diferencias en los niveles séricos de E2 entre los grupos control y tratado postnatalmente con HBG (C+OVX+E2: $33,1 \pm 3,3$ pg/ml; HBG+OVX+E2: $31,6 \pm 2,0$ pg/ml, $p=0,90$).

2.2 | Caracterización de la respuesta uterina al tratamiento con E2: ensayo piloto

La caracterización de la respuesta uterina al tratamiento estrogénico se realizó comparando la morfología, la proliferación celular y la expresión de los REs entre los grupos C+OVX+V y C+OVX+E2. La morfología uterina fue claramente distinta entre los animales controles que recibieron vehículo (aceite de maíz) y los que fueron estimulados con E2. A bajo aumento, fue evidente que el área de sección longitudinal fue menor en el útero de las ratas expuestas al vehículo (grupo C+OVX+V) (Figura 29A vs. B). Este grupo presentó un endometrio atrófico, con un epitelio luminal y glandular simple cúbico, y un estroma con células densamente empaquetadas (Figura 29C). Por el contrario, el útero de aquellos animales expuestos a E2 (grupo C+OVX+E2) mostró hipertrofia (epitelio columnar pseudoestratificado) e hiperplasia de bajo grado en el

epitelio luminal, y un estroma con signos de edema y altamente infiltrado por células inflamatorias (Figura 29D).

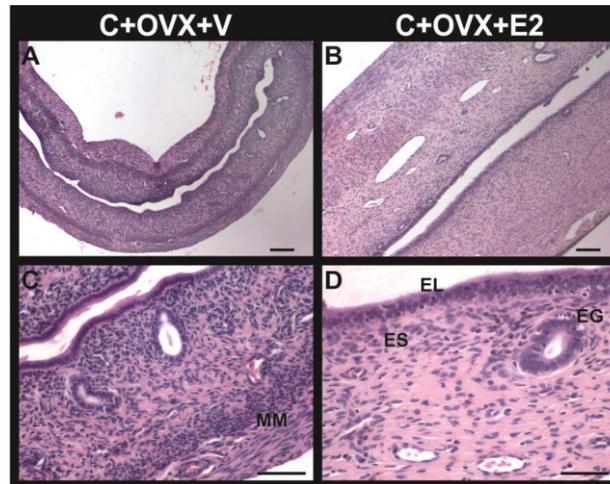


Figura 29. Histología uterina de ratas controles prepúberes OVX luego del tratamiento con vehículo o 17β -estradiol (E2). (A) Imágenes representativas de cortes longitudinales de útero de animales tratados con vehículo (C+OVX+V) o E2 (C+OVX+E2) teñidos con H&E, utilizando una objetiva de 10 \times (A y B) y de 40 \times (C y D). EL, epitelio luminal; EG, epitelio glandular; ES, estroma subepitelial; MM, miometrio. Barras: (A y B) 100 μ m; (C y D) 50 μ m.

La respuesta uterina al E2 implica la modulación diferencial de los REs y cambios en la proliferación celular. En nuestro modelo de exposición, la administración de E2 provocó una disminución en la expresión del RE α (Figura 30A; $p < 0,05$) y una mayor expresión del ARNm del RE β a nivel transcripcional (Figura 30B; $p < 0,05$). El análisis inmunohistoquímico de cortes histológicos de útero reveló que los animales tratados con E2 presentaban una disminución en la expresión del RE α (Figura 30C y D vs. E; $p < 0,05$) y una inducción en la expresión del RE β (Figura 30C y F vs. G; $p < 0,05$) en todos los compartimentos uterinos evaluados. Además, como era de esperar, la tasa de proliferación de los animales sin estímulo hormonal fue despreciable. Por el contrario, la proliferación de las células epiteliales luminales y glandulares presentó un aumento como consecuencia del tratamiento con E2 (Figura 30C y H vs. I; $p < 0,01$).

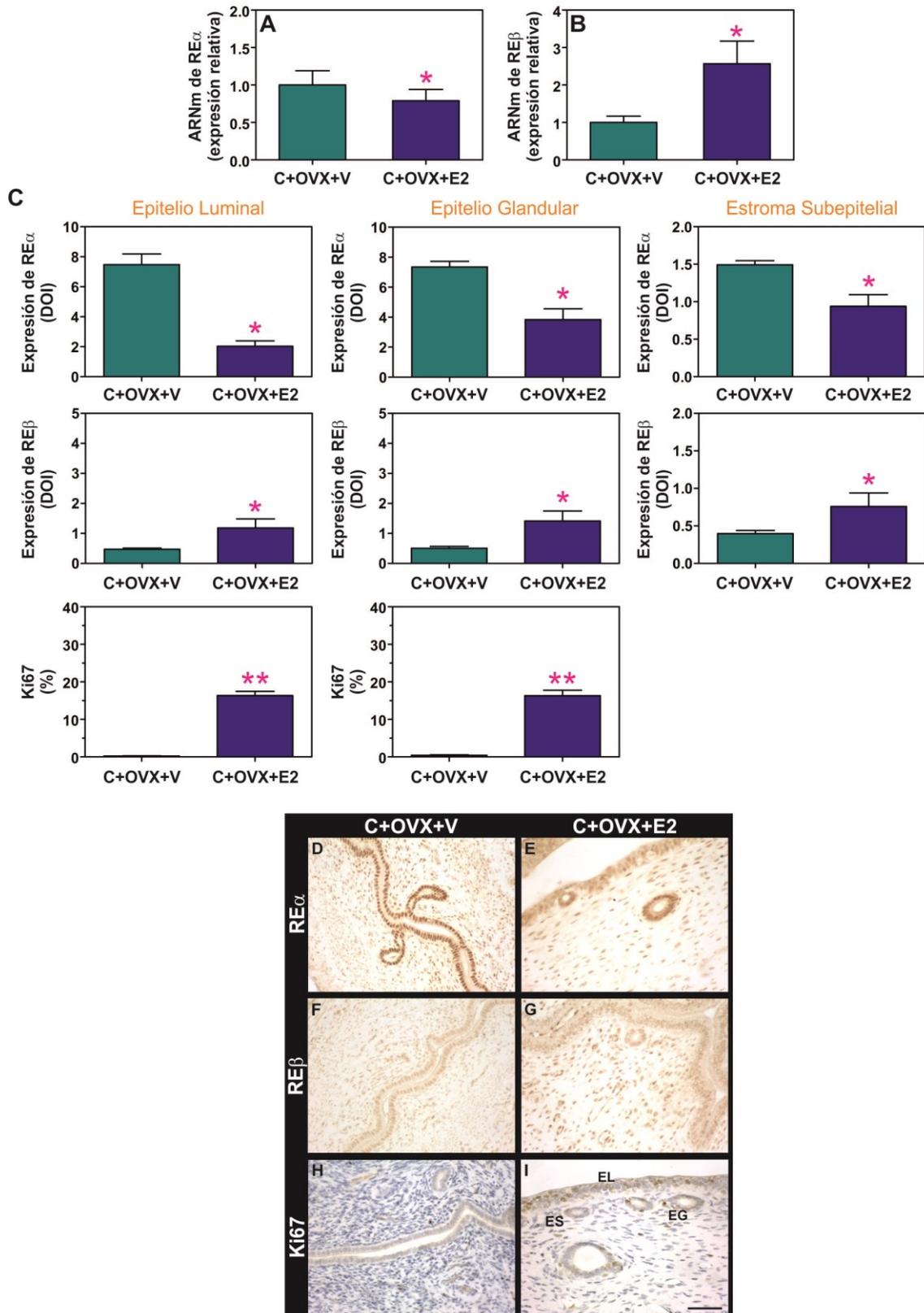


Figura 30. Respuesta uterina a la estimulación con 17 β -estradiol (E2) en ratas controles prepúberes OVX. Proliferación celular y expresión de los receptores de estrógeno alfa (RE α) y beta (RE β). (A y B) Expresión relativa del ARNm del RE α y RE β . Las muestras fueron normalizadas frente a la expresión de L19 y a los valores del grupo C+OVX+V, al que se le asignó el valor de 1. Las barras representan la media \pm SEM (* p <0,05, Test de Mann-Whitney).

(C) La cuantificación de la expresión proteica del RE α y RE β se expresa como densidad óptica integrada (DOI). La proliferación celular se muestra como el porcentaje de células positivas para Ki67. Las barras representan la media \pm SEM (*p<0,05, **p<0,01, Test de Mann-Whitney). (D-I) Imágenes representativas de la inmunomarcación para los REs, RE α (D y E) y RE β (F y G) y el marcador de proliferación celular Ki67 (H e I) en cortes histológicos de útero de los grupos C+OVX+V y C+OVX+E2. EL, epitelio luminal; EG, epitelio glandular; ES, estroma subepitelial. Barra: 50 μ m.

2.3 | Efectos de la exposición a HBG sobre la sensibilidad uterina al E2

Para determinar si la exposición a HBG afecta la sensibilidad uterina al E2, investigamos si se produjeron alteraciones en la histomorfología, la proliferación celular, y la expresión de marcadores moleculares asociados a una respuesta uterina alterada al E2.

2.3.1 | Histomorfología uterina

La Figura 31 muestra imágenes representativas de cortes histológicos de útero teñidos con H&E correspondientes a animales controles y expuestos postnatalmente a HBG, ambos estimulados con E2. Como se mencionó anteriormente, la estimulación con E2 provocó hipertrofia (epitelio columnar pseudoestratificado) e hiperplasia de bajo grado en el epitelio luminal uterino (grupo C+OVX+E2) (Figura 31A y D). El útero de los animales expuestos postnatalmente a HBG y tratados con E2 (grupo HBG+OVX+E2) mostró alteraciones histomorfológicas que reflejan una mayor sensibilidad al tratamiento exógeno con E2. En el 43% (3 de 7) de los animales se observó hiperplasia de alto grado en el epitelio luminal y glandular. El grupo HBG+OVX+E2 mostró áreas de endometrio con un epitelio luminal marcadamente estratificado, con núcleos hipocrómicos y figuras mitóticas (Figura 31B y E), así como glándulas anormales con un epitelio semejante al del epitelio luminal (Figura 31C y F).

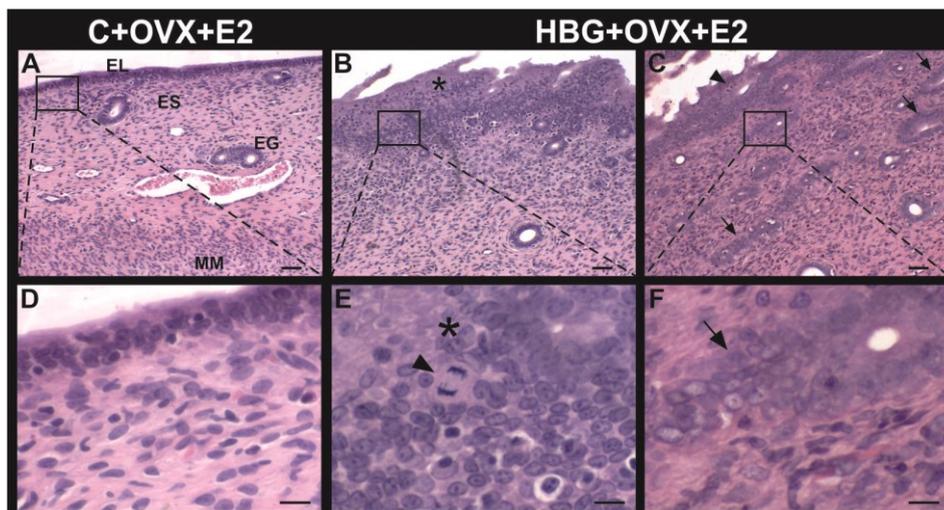


Figura 31. Alteraciones morfológicas uterinas detectadas en animales expuestos postnatalmente a HBG luego de la estimulación exógena con 17β -estradiol (E2). (A y D) Histología uterina normal en ratas controles OVX luego del tratamiento con E2 (C+OVX+E2). (B, C, E y F) Hallazgos histológicos encontrados en ratas expuestas a HBG luego de la estimulación con E2 (HBG+OVX+E2). Se indican glándulas endometriales anormales (flechas) y áreas de endometrio con marcada estratificación del epitelio luminal (asterisco), núcleos hipocrómicos (asterisco) y figuras mitóticas (puntas de flecha). Las áreas histológicas en los recuadros se magnifican en el panel inferior. EL, epitelio luminal; EG, epitelio glandular; ES, estroma subepitelial; MM, miometrio. Barras: (A-C) 50 μ m; (D-F) 10 μ m.

Las alteraciones morfológicas halladas en los animales expuestos postnatalmente a HBG y tratados con E2 consistieron en un incremento en la altura del epitelio luminal (Tabla 12; $p < 0,05$) y un aumento en la densidad de núcleos del estroma (Tabla 12; $p < 0,01$). La evaluación de otros parámetros morfométricos no arrojó diferencias entre los grupos experimentales (C+OVX+E2 vs. HBG+OVX+E2).

Tabla 12. Parámetros morfométricos en secciones uterinas de animales control y expuestos a HBG sometidos al tratamiento con E2.

	C+OVX+E2	HBG+OVX+E2
Altura del epitelio luminal (μ m)	32,04 \pm 4,03	68,10 \pm 13,76*
Altura del epitelio glandular (μ m)	15,30 \pm 1,34	15,42 \pm 1,16
Glándulas endometriales (Vv \times 100)	4,63 \pm 0,21	5,26 \pm 0,40
Densidad de núcleos del estroma (%)	19,99 \pm 0,97	26,04 \pm 1,67**
Espesor del estroma (μ m)	571,25 \pm 39,44	598,12 \pm 42,88
Espesor del miometrio circular (μ m)	159,42 \pm 13,85	198,78 \pm 26,48
Espesor del miometrio longitudinal (μ m)	139,89 \pm 12,63	173,33 \pm 16,69

Los valores se expresaron como la media \pm SEM. Los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Test de Mann-Whitney).

2.3.2 | Proliferación celular

El tratamiento postnatal con HBG incrementó la proliferación celular inducida por E2. El análisis de la expresión de Ki67 en el epitelio luminal indicó que en el grupo HBG+OVX+E2 la proliferación celular fue 1,8 veces más alta ($29,07 \pm 3,89\%$, $p < 0,05$) que en el grupo C+OVX+E2 ($16,36 \pm 1,10\%$) (Figura 32A). Imágenes representativas de estos resultados se muestran en la Figura 32B. Las células del epitelio glandular mostraron cambios similares, pero sin diferencias estadísticamente significativas (C+OVX+E2: $16,32 \pm 1,42\%$; HBG+OVX+E2: $20,16 \pm 3,42\%$, $p = 0,62$) (Figura 32A).

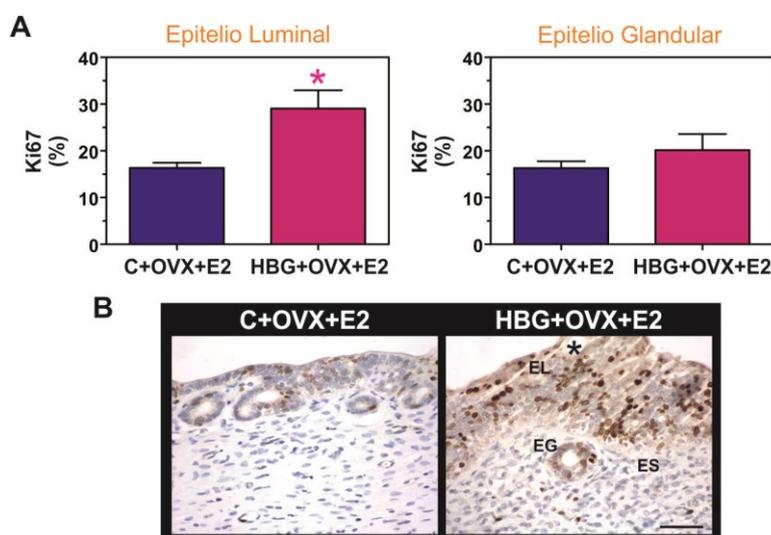


Figura 32. Efectos de la exposición postnatal al HBG sobre la proliferación celular inducida por 17 β -estradiol (E2). (A) Cuantificación de la expresión de Ki67 en el epitelio luminal y glandular. Las barras representan la media \pm SEM (* $p < 0,05$, Test de Mann-Whitney). (B) Imágenes representativas de la inmunomarcación para Ki67 en cortes histológicos de útero. El asterisco negro indica el compartimento que mostró un aumento respecto al grupo control. EL, epitelio luminal; EG, epitelio glandular; ES, estroma subepitelial. Barra: 50 μ m.

2.3.3 | Expresión de receptores de estrógenos

Del mismo modo que en el experimento piloto, la expresión de los REs se evaluó en el útero de los animales control y expuestos a HBG a nivel de proteína y ARNm. Tal como mencionamos anteriormente, la respuesta en un animal control que recibió el tratamiento con E2 consiste en una disminución en la expresión del ARNm del RE α . Cuando comparamos esta respuesta en animales que, a su vez, fueron expuestos

postnatalmente a HBG, la disminución del ARNm del RE α fue más acentuada (Figura 33A; $p < 0,05$). En relación a la inducción del ARNm del RE β observada en respuesta al tratamiento con E2, detectamos que los animales expuestos postnatalmente a HBG mostraron una mayor inducción del transcrito. (Figura 33B; $p < 0,05$). Una respuesta similar se detectó al analizar la expresión de la proteína del RE β en el útero. Los animales expuestos a HBG mostraron una mayor expresión del RE β en todos los compartimentos uterinos evaluados (luminal, glandular y estromal) (Figura 33C; $p < 0,05$) cuando se los comparó con los controles. Respecto al RE α , se observó una fuerte inducción en la expresión de la proteína en el epitelio luminal (Figura 33C; $p < 0,05$) de los animales expuestos a HBG, sin cambios en el epitelio glandular y estroma subepitelial. Imágenes representativas de estos resultados se muestran en la Figura 33D. Los cambios previamente mencionados estarían indicando un aumento en la sensibilidad uterina al E2 en los animales expuestos a HBG.

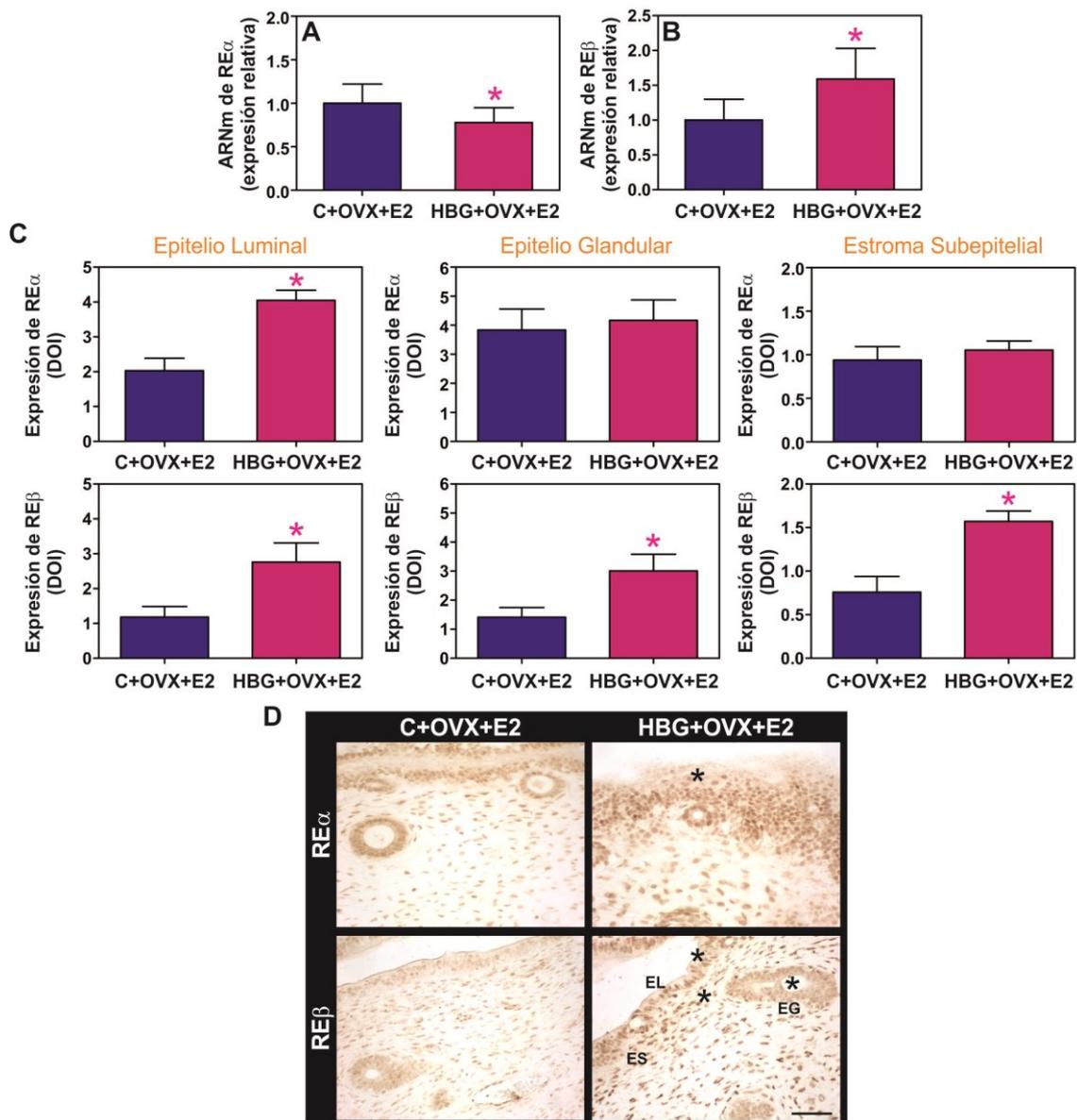


Figura 33. Efectos de la exposición postnatal a HBG sobre la sensibilidad uterina al 17 β -estradiol (E2). (A) Expresión relativa del ARNm del receptor de estrógeno alfa (RE α) y (B) receptor de estrógeno beta (RE β). Las muestras fueron normalizadas frente a la expresión de L19 y a los valores del grupo C+OVX+E2, al que se le asignó el valor de 1. Las barras representan la media \pm SEM (* p <0,05, Test de Mann-Whitney). (C) Cuantificación de la expresión proteica del RE α y RE β . Los resultados fueron expresados como densidad óptica integrada (DOI). Las barras representan la media \pm SEM (* p <0,05, Test de Mann-Whitney). (D) Imágenes representativas de la inmunomarcación para RE α y RE β en cortes histológicos de útero. Los asteriscos negros indican los compartimientos que mostraron un aumento respecto al grupo control. EL, epitelio luminal; EG, epitelio glandular; ES, estroma subepitelial. Barra: 50 μ m.

2.3.4 | *Expresión de moléculas asociadas a una respuesta uterina alterada al E2*

Considerando la importancia de la vía de señalización Wnt/ β -catenina en la proliferación celular en respuesta al E2, se determinaron los niveles de expresión de Wnt7a y β -catenina en el útero de los animales control y expuestos a HBG que recibieron tratamiento con E2, tanto a nivel de ARNm como de proteína. El tratamiento con HBG incrementó los niveles de expresión del ARNm de Wnt7a (Figura 34A; $p < 0,05$), y provocó una disminución en la expresión del ARNm de β -catenina (Figura 34B; $p < 0,05$). Teniendo en cuenta el rol que cumplen estas moléculas de acuerdo a su localización celular, se evaluó el patrón de expresión de Wnt7a y β -catenina por IHQ. Ambos grupos experimentales revelaron un patrón de expresión similar. Wnt7a mostró un patrón de expresión nuclear en el estroma subepitelial, y nuclear y citoplasmático en las células epiteliales uterinas, tanto luminales como glandulares. β -catenina reveló un patrón de expresión citoplasmático y de membrana en el epitelio luminal y glandular, con marcación negativa en el estroma uterino. Si bien no se observaron cambios en el patrón de expresión de Wnt7a y β -catenina, se detectaron diferencias en la intensidad de inmunotinción entre los animales controles y expuestos a HBG. Las ratas hembra expuestas postnatalmente a HBG y tratadas con E2 mostraron un incremento en la expresión de Wnt7a en el epitelio luminal (Figura 34C; $p < 0,05$). Sorprendentemente, la expresión de β -catenina disminuyó notablemente en el epitelio luminal y glandular en los animales tratados con HBG (Figura 34C; $p < 0,05$). Imágenes representativas de estos resultados se muestran en la Figura 34D.

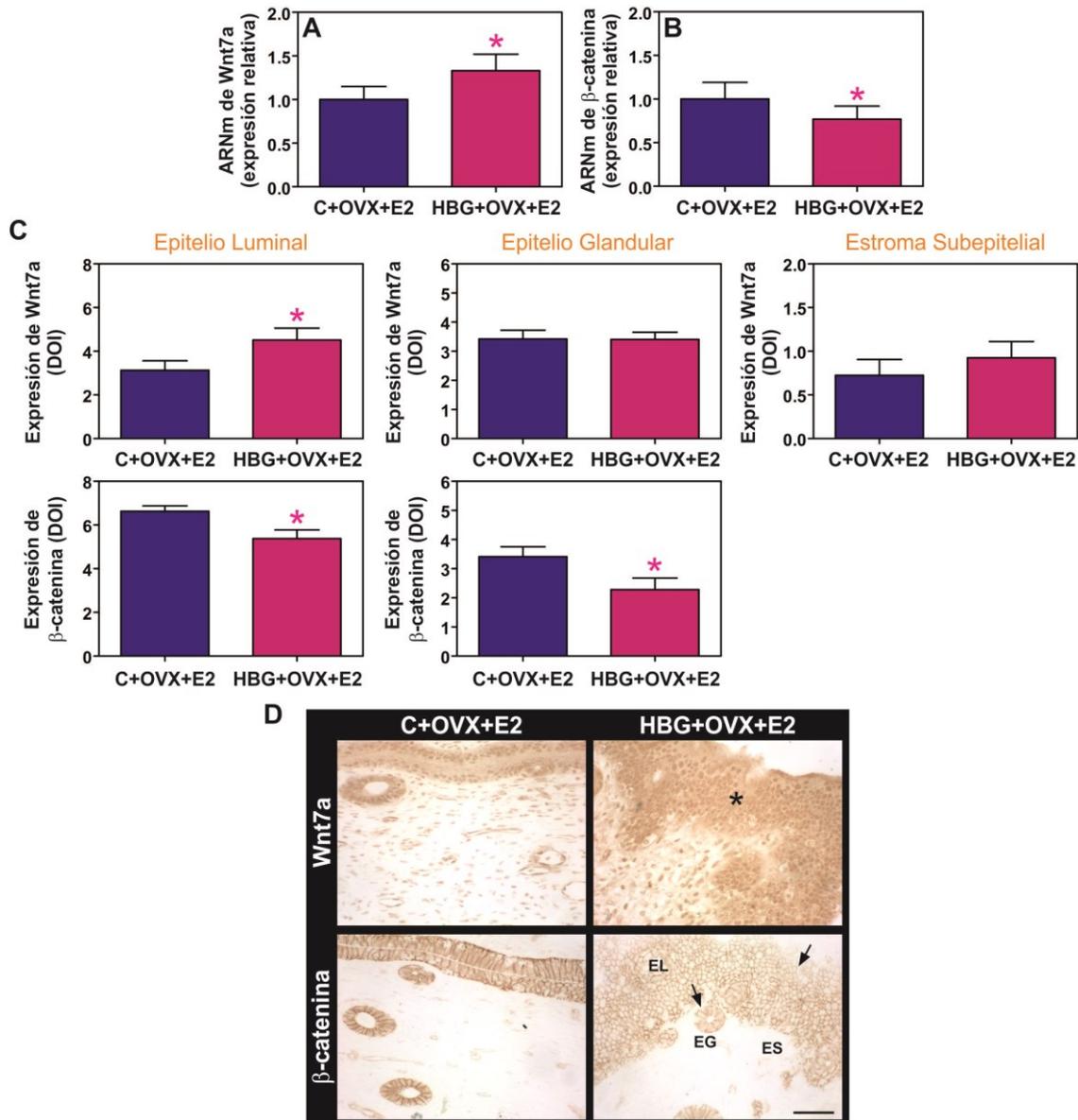


Figura 34. Efectos de la exposición postnatal al HBG sobre la expresión de moléculas asociadas a una respuesta uterina alterada al E2. (A) Expresión relativa del ARNm de Wnt7a y (B) β-catenina. Las muestras fueron normalizadas frente a la expresión de L19 y a los valores del grupo C+OVX+E2, al que se le asignó el valor de 1. Las barras representan la media ± SEM (* $p < 0,05$, Test de Mann-Whitney). (C) Cuantificación de la expresión proteica de Wnt7a y β-catenina. Los resultados fueron expresados como densidad óptica integrada (DOI). Las barras representan la media ± SEM (* $p < 0,05$, Test de Mann-Whitney). (D) Imágenes representativas de la inmunomarcación para Wnt7a y β-catenina en cortes histológicos de útero. El asterisco negro indica el compartimento que mostró un aumento respecto al grupo control. Las flechas indican disminución respecto al grupo control. EL, epitelio luminal; EG, epitelio glandular; ES, estroma subepitelial. Barra: 50 μm.

3 | Efectos del HBG sobre el ciclo estral y los niveles séricos de E2 y P4

Teniendo en cuenta que los animales expuestos a HBG presentaron alteraciones en la diferenciación organogénica del útero y aumento de la sensibilidad uterina a un tratamiento exógeno con E2 durante el período prepuberal, nos preguntamos qué podría ocurrir cuando los animales alcanzaran la madurez sexual. Nos interesó determinar si a largo plazo se detectaban alteraciones en el ciclo estral y en los niveles séricos de los esteroides sexuales, E2 y P4, durante la etapa adulta.

3.1 | La exposición postnatal al HBG altera el ciclo estral

A los cuatro meses de edad (DPN120), todos los animales controles exhibieron ciclos estrales regulares, con una duración de aproximadamente cinco días (Tabla 13). Por el contrario, el análisis del ciclo estral en las hembras expuestas postnatalmente a HBG reveló la presencia de ciclos estrales alterados. Este patrón de ciclicidad se vio reflejado en un aumento en la duración del ciclo estral (Tabla 13; $p < 0,05$) a expensas de un mayor porcentaje de tiempo en proestro y estro (Tabla 13; $p < 0,0001$).

Tabla 13. Evaluación del ciclo estral en ratas hembra de DPN120.

	Control	HBG
Duración del ciclo estral (días)	5,28 ± 0,13	5,46 ± 0,08*
Porcentaje de tiempo en proestro y estro (%)	37,03 ± 1,15	42,42 ± 0,60***

Los valores se expresaron como la media ± SEM. Los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control (* $p < 0,05$, *** $p < 0,0001$, Test de Mann-Whitney).

3.2 | Análisis de los niveles séricos de esteroides sexuales en animales postnatalmente expuestos a HBG

Uno de los mecanismos de acción a través del cual ciertos pesticidas tienen la capacidad de inducir el desarrollo de tumores hormono-sensibles en el útero consiste en provocar un desequilibrio hormonal que conduce a un incremento en la relación E2/P4 [170]. Teniendo en cuenta este antecedente y las alteraciones detectadas en el ciclo estral, decidimos evaluar los niveles séricos de E2 y P4 en muestras de sangre obtenidas de la cola de animales de cuatro meses de edad (DPN120) durante la etapa de estro, para luego determinar la relación E2/P4. En los animales expuestos a HBG se observó un

incremento en los niveles séricos de E2 (Tabla 14; $p < 0,05$) que estuvo acompañado por una disminución marcada en los niveles séricos de P4 (Tabla 14; $p < 0,001$). Estos cambios produjeron un incremento concomitante en la relación E2/P4 (Tabla 14; $p < 0,001$).

Tabla 14. Concentraciones séricas de E2 y P4 en ratas hembra de DPN120.

	Control	HBG
E2 (pg/ml)	28,94 ± 1,36	33,46 ± 1,03*
P4 (ng/ml)	10,97 ± 0,19	7,39 ± 0,65***
Relación E2/P4	2,64 ± 0,12	4,73 ± 0,40***

Los valores se expresaron como la media ± SEM. Los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, Test de Mann-Whitney).

4 | Efectos del HBG sobre la fertilidad de la hembra y la diferenciación funcional del útero durante el período post-implantatorio

Diferentes evidencias muestran que la alteración de la expresión de genes morforegulatorios en el útero durante períodos críticos del desarrollo puede reprogramar las respuestas fisiológicas normales a las hormonas esteroides en la etapa adulta, con consecuencias adversas para la salud reproductiva [171]. Considerando estos antecedentes, nos propusimos evaluar los efectos de la exposición postnatal a HBG sobre la fertilidad de la hembra en la etapa adulta.

4.1 | La exposición postnatal a HBG altera la fertilidad de la rata hembra

Para estudiar los efectos a largo plazo de la exposición postnatal a HBG sobre la eficiencia reproductiva, se evaluaron diferentes parámetros de fertilidad. En primer lugar, se determinó el porcentaje de ratas hembra preñadas, y luego en DG19, se determinó el número de CLs, el número de sitios de implantación y el número de sitios de reabsorción.

La Figura 35A muestra el porcentaje de hembras preñadas correspondiente a ambos grupos experimentales. El porcentaje de ratas preñadas no presentó diferencias con el grupo control. Luego, se procedió a contar el número de CLs presentes en los ovarios,

dato que indica el número de ovulaciones. No se observaron diferencias en el número de cuerpos lúteos totales (CLs/rata: 12-14) entre los grupos experimentales (Figura 35B). En forma similar, el número de SI por rata no se modificó como resultado de la exposición a HBG (Figura 35C). Estos parámetros indican que tanto el número de ovulaciones como de implantaciones no se vio afectado en los animales expuestos a HBG. Sin embargo, se detectó un aumento en el número de sitios de reabsorción en el grupo tratado con HBG (Figura 35D; $p < 0,05$). Las reabsorciones se visualizaron en ambos cuernos uterinos como una masa amorfa de aspecto blanquecino y de tamaño muy reducido (Figura 35E, flechas rojas). Como se puede observar en la Figura 35D, los animales controles presentaron como máximo un sitio de reabsorción, y sólo en algunos casos. Por el contrario, en el grupo expuesto a HBG se detectaron animales que presentaban entre 3 y 8 sitios de reabsorción. Estos resultados indican que la exposición a HBG produjo subfertilidad evidenciada por un aumento en el número de pérdidas post-implantatorias.

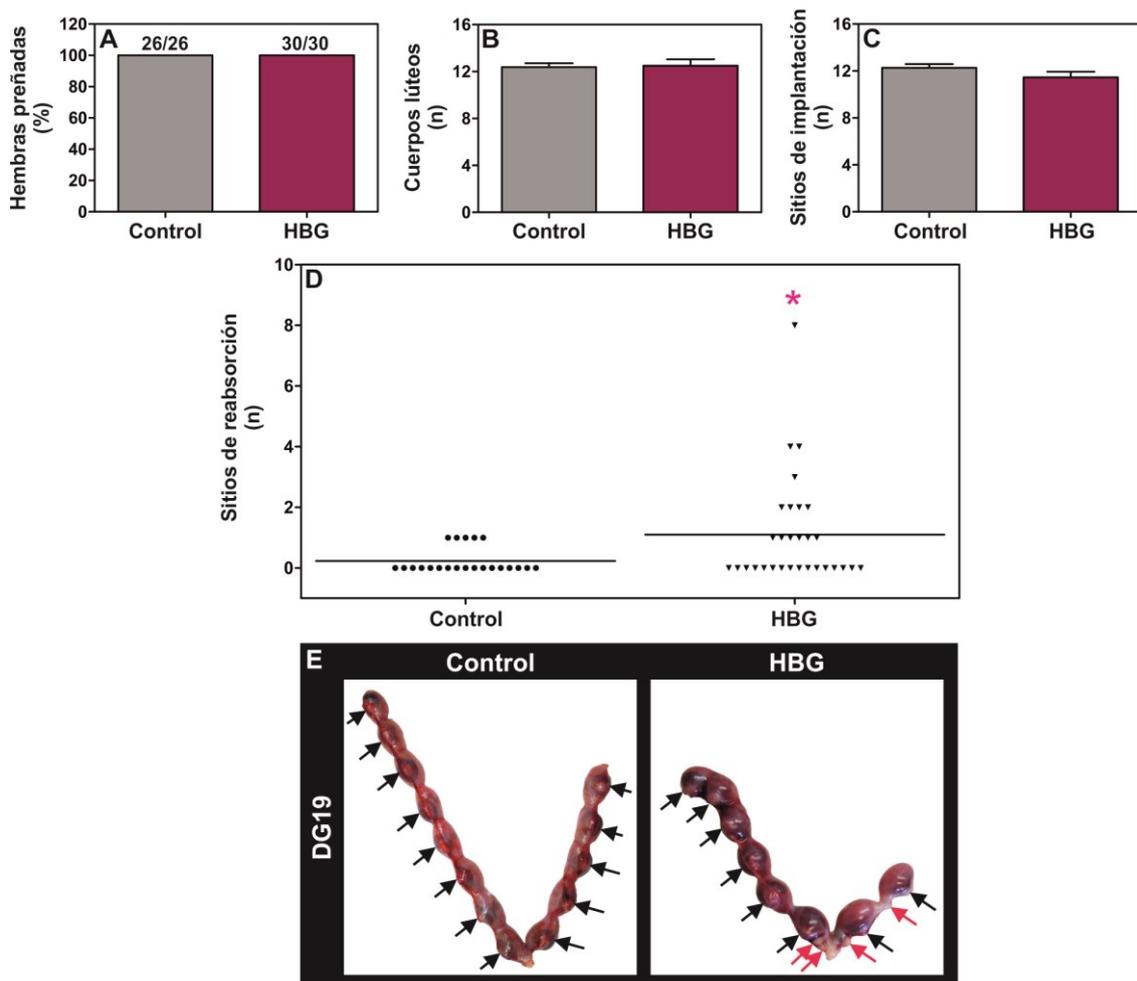


Figura 35. Eficiencia reproductiva de hembras controles y expuestas postnatalmente a HBG. (A) Tasa de preñez. (B) Número de cuerpos lúteos y (C) número de sitios de implantación. Las barras representan la media \pm SEM. (D) Se graficó el número de sitios de reabsorción de cada rata. La línea horizontal indica la media de cada grupo experimental (* $p < 0,05$, Test de Mann-Whitney). (E) Imágenes representativas de los cuernos uterinos de animales control y expuestos a HBG en DG19. Las flechas negras indican sitios de implantación, y las flechas rojas, sitios de reabsorción.

4.2 | Diferenciación funcional del útero durante el período post-implantatorio

Teniendo en cuenta que detectamos subfertilidad asociada a pérdidas post-implantatorias, nos propusimos determinar si estos efectos estaban mediados por alteraciones en la diferenciación funcional del útero durante la preñez. Para ello, nos propusimos estudiar eventos relacionados con los cambios uterinos posteriores a la implantación del embrión. Específicamente, seleccionamos el DG9 ya que consideramos que es una etapa donde la correcta formación de la decidua acompaña a un adecuado desarrollo embrionario. A continuación se describen los estudios realizados en los SI obtenidos en DG9 para evaluar la formación de la decidua.

4.2.1 | Morfometría de los sitios de implantación y de las células deciduales

Cuando analizamos macroscópicamente los SI del grupo control y el grupo expuesto a HBG, observamos que presentaban una apariencia normal en DG9. Cuando determinamos el peso de los SI en el grupo expuesto a HBG, detectamos que fueron significativamente más bajos (Tabla 15; $p < 0,05$).

Luego, nos propusimos analizar la estructura de la decidua utilizando la expresión de desmina como marcador de desarrollo normal de las células deciduales. La Figura 36A muestra una imagen representativa de un corte transversal de un SI de una rata control inmunomarcado para desmina, en la que se puede observar el área de decidualización, dividida en las zonas antimesometrial (AM) y mesometrial (M). En el centro de la decidua AM, se observan la zona embrionaria (E) y la zona decidual primaria (ZDP), adyacente al embrión. Por fuera de la zona AM, se puede observar una fina capa de músculo liso, correspondiente al miometrio, y adyacente a ella, la decidua M que exhibe todos los compartimentos uterinos (epitelio luminal y glandular, estroma y miometrio). En la zona AM se detectó una elevada expresión de desmina en los animales controles que se vio afectada en los animales expuestos a HBG (Figura 36 A y B vs. C).

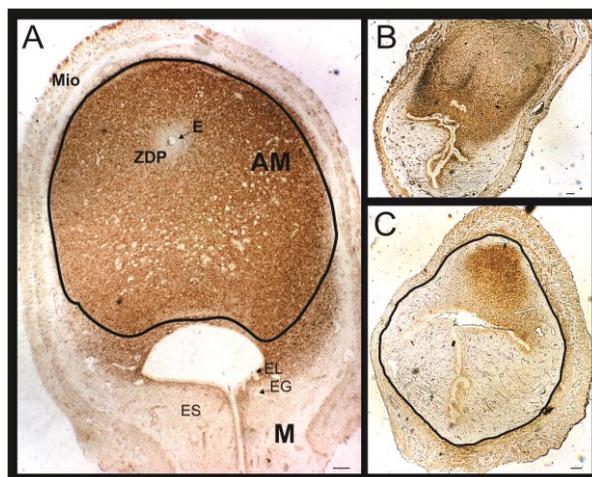


Figura 36. Imágenes representativas de la expresión de desmina en los sitios de implantación de ratas preñadas controles y expuestas a HBG en DG9. (A) Sitio de implantación perteneciente a una rata control mostrando las diferentes zonas de decidualización. La zona antimesometrial (AM) se encuentra marcada con una línea negra continua. E, embrión; ZDP, zona decidual primaria; M, zona mesometrial; EL, epitelio luminal; EG, epitelio glandular; ES, estroma subepitelial; Mio, miometrio. En el panel de la derecha se distinguen dos sitios de implantación representativos del grupo control (B) y HBG (C) a menor aumento. El área endometrial se encuentra marcada con una línea negra continua. Barras: (A) 100 μ m; (B y C) 100 μ m.

Luego, realizamos la cuantificación del área de decidualización (AD) positiva para desmina y del área endometrial (AE). Detectamos una disminución en el área positiva para desmina en el grupo tratado con HBG que se tradujo en una disminución en el AD (Tabla 15; $p < 0,05$). Sin embargo, no se observaron diferencias en el AE entre los grupos experimentales (Tabla 15). Cuando expresamos los resultados como la relación AD/AE, observamos que el grupo expuesto a HBG presentó una disminución de dicha relación a expensas de una menor AD (Tabla 15; $p < 0,05$).

Tabla 15. Parámetros morfométricos en los sitios de implantación en DG9.

	Control	HBG
Peso (mg)	63,33 \pm 2,32	53,37 \pm 3,52*
Área de decidualización, AD (mm ²)	1,55 \pm 2,32	0,71 \pm 0,18*
Área endometrial, AE (mm ²)	3,01 \pm 0,28	3,12 \pm 0,19
AD/AE	0,52 \pm 0,10	0,22 \pm 0,06*

Los valores se expresaron como la media \pm SEM. Los asteriscos indican diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control (* $p < 0,05$, Test de Mann-Whitney).

4.2.2 | Evaluación de la vía de señalización RP/COUP-TFII/Bmp2

Se ha demostrado que la vía de señalización RP/COUP-TFII/Bmp2 regula el proceso de decidualización, a través del cual las células del estroma endometrial se diferencian en células deciduales que acompañan el desarrollo del embrión durante la preñez. Para dilucidar las posibles causas de las pérdidas embrionarias post-implantatorias halladas en los animales expuestos postnatalmente a HBG, se analizó la expresión del RP en los SI en DG9 a nivel proteínico y ARNm. A su vez, se determinó la expresión del ARNm de COUP-TFII y Bmp2, dos moléculas vinculadas a la señalización intracelular mediada por P4. El tratamiento con HBG provocó una disminución en la expresión de la proteína del RP tanto en la zona AM como en el epitelio luminal y glandular de la zona M (Figura 37A; $p < 0,05$). Imágenes representativas de estos resultados se muestran en la Figura 37B. Del mismo modo, el nivel de expresión del ARNm del RP en los SI de los animales expuestos a HBG fue significativamente menor (Figura 37C; $p < 0,001$). Al evaluar la vía de señalización de P4, detectamos una disminución en los niveles de expresión del ARNm de COUP-TFII ($p < 0,01$) y Bmp2 ($p < 0,001$) en el grupo HBG (Figura 37 D y E).

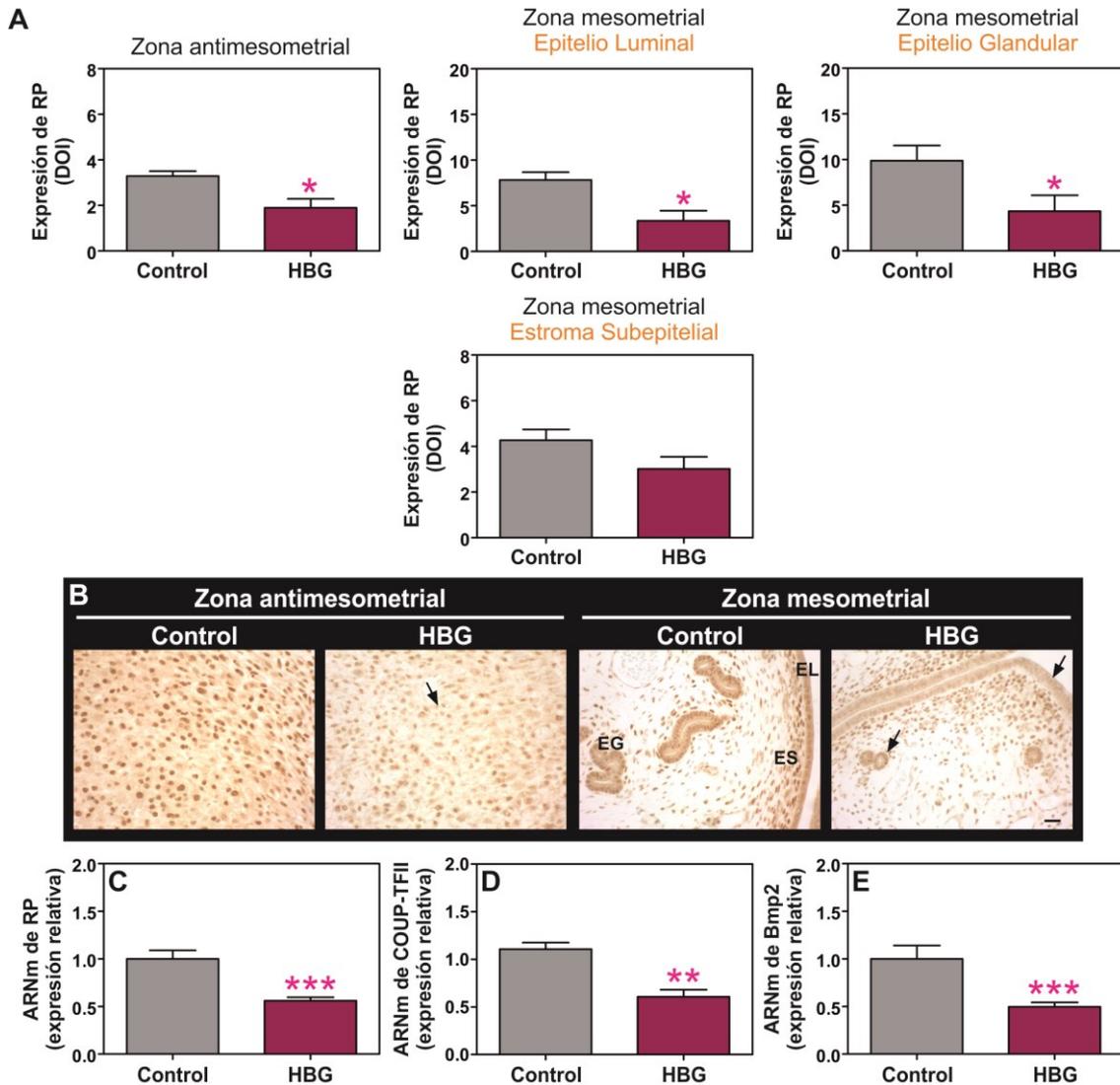


Figura 37. Efectos de la exposición postnatal al HBG sobre la expresión del RP y la vía RP/COUP-TFII/Bmp2 en los sitios de implantación de ratas preñadas en DG9. (A) Cuantificación de la expresión proteica del RP en las zonas antimesometrial y mesometrial de los sitios de implantación. Los resultados fueron expresados como densidad óptica integrada (DOI). Las barras representan la media \pm SEM (* $p < 0,05$, Test de Mann-Whitney). **(B)** Imágenes representativas de la inmunomarcación para el RP en cortes histológicos de los sitios de implantación. Las flechas indican los compartimentos que mostraron una disminución respecto al grupo control. EL, epitelio luminal; EG, epitelio glandular; ES, estroma subepitelial. Barra: 50 μ m. **(C, D y E)** Expresión relativa del ARNm de RP, COUP-TFII y Bmp2. Las muestras fueron normalizadas frente a la expresión de L19 y a los valores del grupo control, al que se le asignó el valor de 1. Las barras representan la media \pm SEM (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Test de Mann-Whitney).

5 | Efectos del HBG sobre el desarrollo de lesiones pre-neoplásicas y neoplásicas en útero y vagina

Los cambios morfológicos y funcionales uterinos implican cambios en la proliferación y diferenciación del endometrio regulados estrictamente por E2 y P4. Se ha demostrado que alteraciones en el proceso de control de la proliferación celular podrían predisponer al desarrollo de lesiones pre-neoplásicas y/o neoplásicas a largo plazo [87]. Parte de los resultados de esta tesis nos permiten sugerir que la exposición a HBG podría predisponer al desarrollo tumoral. Los resultados anteriores indican que la exposición postnatal temprana a HBG:

- i)* Incrementa la sensibilidad uterina al E2, provocando hiperplasia endometrial, con aumento de la proliferación inducida por E2, inducción de los REs (RE α y RE β) y desregulación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina.
- ii)* Produce un aumento en la relación E2/P4 en ratas de 4 meses de edad, que sugiere un microambiente hormonal dominado por E2.

Considerando estos hallazgos, nos propusimos evaluar los efectos de la exposición a HBG sobre el desarrollo de lesiones pre-neoplásicas y/o neoplásicas en útero y vagina, por considerar ambos órganos sensibles a un ambiente hormonal alterado.

En primer lugar, evaluamos el estado de salud general de los animales a lo largo de todo el experimento. Los animales de ambos grupos experimentales se desarrollaron de manera normal hasta el final del experimento (20 meses de edad). Si bien se detectaron variaciones en el peso corporal de los animales tratados con HBG, no se observaron diferencias respecto al grupo control a lo largo del experimento (Figura 38). Un animal expuesto postnatalmente a HBG fue descartado ya que a los 18 meses de edad sufrió un deterioro general de salud. A los 18 (DPN540) y 19 meses (DPN570) de edad, dos animales que habían sido expuestos a HBG fueron sacrificados por la presencia de tumores vaginales de tamaño considerable.

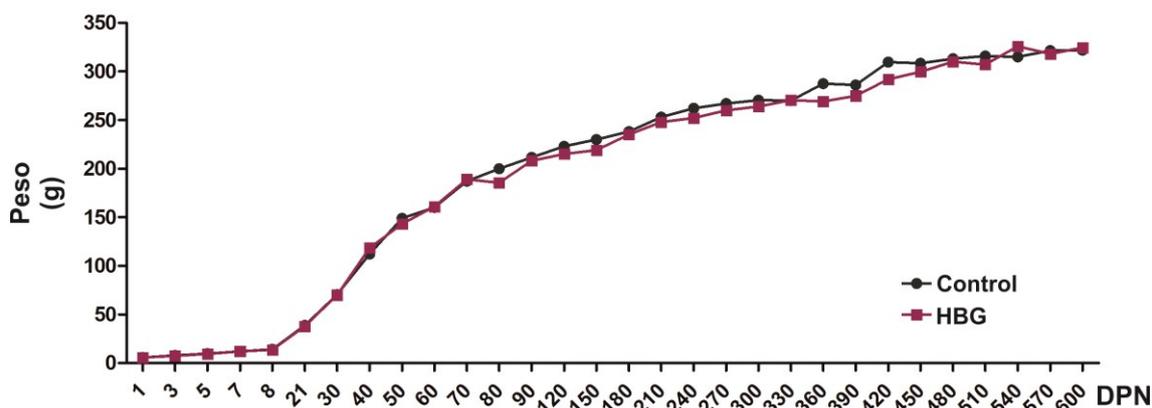


Figura 38. Curva de peso. Se muestra la variación en el peso corporal (expresado en gramos) de los animales control y HBG a lo largo del experimento. A partir de los 90 días de edad el peso fue registrado cada 30 días. DPN, día postnatal.

5.1 | La exposición postnatal a HBG induce lesiones neoplásicas en útero y vagina

El análisis histológico del tejido uterino de las ratas control de edad avanzada (20 meses) reveló características histológicas similares a las observadas en la etapa de estro del ciclo estral [47]. Esto es, un epitelio luminal cilíndrico simple, presencia de numerosas glándulas uterinas formadas por un epitelio simple cúbico, y un alto porcentaje de células apoptóticas en el epitelio luminal y glandular (Figura 39A y B). Al estudiar las lesiones pre-neoplásicas que afectan al epitelio luminal, detectamos que en las ratas hembra expuestas postnatalmente a HBG la incidencia de atipia celular (Figura 39A vs. C) fue 1,8 veces más alta que en los animales controles. Sin embargo, este aumento no resultó ser estadísticamente significativo (Tabla 16). Además, un animal tratado con HBG presentó un epitelio luminal con células cúbicas en toda su extensión, indicativo de atrofia celular (Tabla 16).

Tabla 16. Características histomorfológicas observadas en el epitelio luminal de los animales expuestos postnatalmente a vehículo o a HBG.

	Control	HBG
Epitelio luminal simple cilíndrico	8/11 (72,7%)	4/10 (40%)
Epitelio luminal simple cúbico (atrófico)	0/11 (0%)	1/10 (10%)
Epitelio luminal con atipia celular	3/11 (27,3%)	5/10 (50%)

Los resultados se expresan como el número de ratas con una determinada característica histomorfológica en relación al número total de ratas por grupo. Entre paréntesis se indica el porcentaje de animales afectados.

Al cuantificar las lesiones pre-neoplásicas glandulares, se detectó que la presencia de GGH fue 2,7 veces más frecuente en los animales expuestos postnatalmente a HBG. Sin embargo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas para este tipo de lesión entre los grupos experimentales (Tabla 17; Figura 39B vs. D).

Tabla 17. Incidencia de lesiones pre-neoplásicas y neoplásicas detectadas en útero y en vagina de animales de 20 meses de edad expuestos postnatalmente a vehículo o a HBG.

	Control	HBG
Lesiones pre-neoplásicas uterinas		
Glándulas con metaplasia escamosa	11/11 (100%)	10/10 (100%)
Glándulas quísticas	7/11 (63,6%)	7/10 (70%)
Glándulas con anomalías celulares	8/11 (72,7%)	8/10 (80%)
Glándulas con glándulas hijas	2/11 (18,2%)	5/10 (50%)
Hiperplasia glandular quística	2/11 (18,2%)	2/10 (20%)
Lesiones neoplásicas		
Leiomioma uterino	ND	1/10 (10%)
Rabdomiosarcoma vaginal	ND	2/10 (20%)

Los resultados se expresan como el número de ratas afectadas con una determinada alteración en relación al número total de ratas por grupo. Entre paréntesis se indica el porcentaje de animales que presentó cada lesión. ND, no detectado.

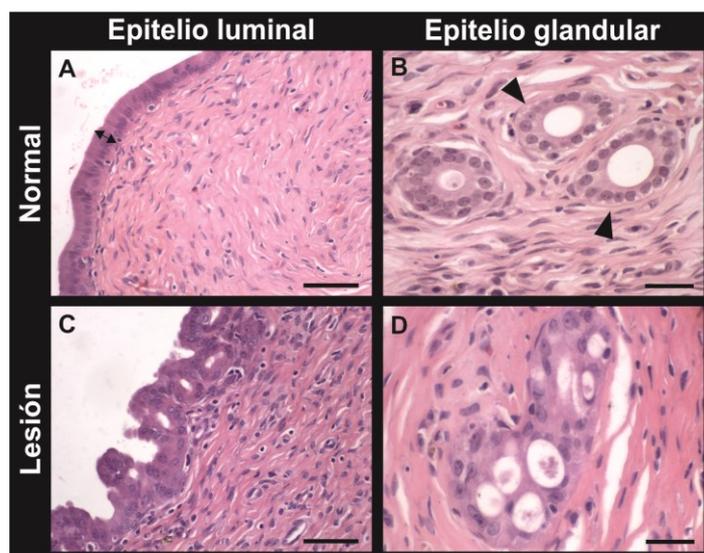


Figura 39. Imágenes representativas que muestran las lesiones más frecuentes en el epitelio luminal y glandular de los animales de 20 meses de edad expuestos postnatalmente a HBG. (A) Altura epitelial normal de un animal en estro (flecha doble). (B) Epitelio glandular normal

(puntas de flecha). **(C)**. Epitelio luminal con atipia celular. **(D)** Glándulas con glándulas hijas. Barras: (A y C) 50 μ m; (B y D) 25 μ m.

Además de las lesiones previamente descritas, la exposición postnatal a HBG provocó el desarrollo de lesiones neoplásicas en útero y vagina. El 10% (1/10) de los animales tratados con HBG desarrollaron leiomioma uterino (Tabla 17), una neoplasia benigna de las células musculares lisas del miometrio (Figura 40A y B). Esta lesión se caracterizó por la presencia de células musculares lisas fusiformes, bien diferenciadas y dispuestas formando haces paralelos (Figura 40C), que mostraron marcación positiva para α SMA (Figura 40D).

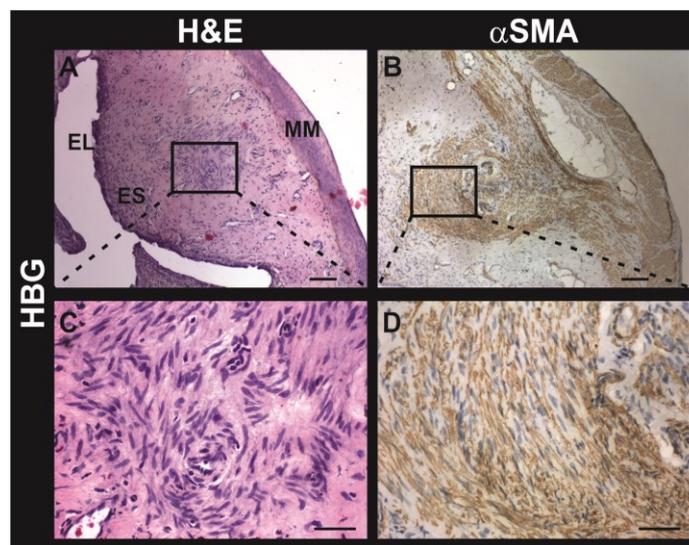


Figura 40. Leiomioma uterino en animales de edad avanzada expuestos postnatalmente a HBG. (A y C) Imágenes de un corte histológico de útero teñido con H&E perteneciente a un animal tratado con HBG donde se muestra la lesión neoplásica detectada en el centro del estroma uterino. (B y D) Imágenes de la inmunomarcación para alfa actina de músculo liso (α SMA), marcador de células musculares lisas utilizado para la caracterización de la lesión. Las áreas histológicas en los recuadros se magnifican en el panel inferior, donde puede observarse la disposición de las células musculares formando haces paralelos. EL, epitelio luminal; ES, estroma subepitelial; MM, miometrio. Barras: (A y B) 100 μ m, (C y D) 50 μ m.

Por otra parte, el 20% (2/10) de los animales expuestos postnatalmente a HBG desarrollaron rhabdomyosarcoma vaginal (Tabla 17), una neoplasia maligna poco frecuente, que tiene su origen en células del músculo estriado que no han logrado diferenciarse por completo. La lesión se caracterizó por la presencia de numerosas células tumorales pequeñas, con núcleos ovales, y poco diferenciadas, situadas en su mayoría, debajo del epitelio vaginal (Figura 41A y C vs. B y D). En las regiones profundas del estroma vaginal, se observó una menor densidad celular y un estroma

laxo con signos de necrosis (Figura 41D). En escasas regiones del tumor fue posible observar células tumorales dispuestas en haces paralelos (Figura 41D). Todas las células del tumor mostraron marcación positiva para vimentina (Figura 42A y C), una proteína que se expresa en las células derivadas del mesénquima. Por el contrario, la mayoría de las células tumorales presentaron marcación negativa para desmina (Figura 42B y D), marcador de células maduras de músculo estriado.

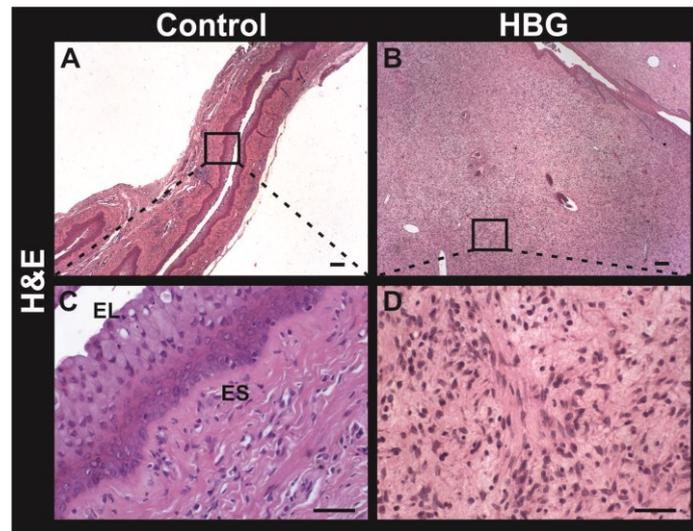


Figura 41. *Rabdomiosarcoma vaginal en animales de 20 meses de edad expuestos postnatalmente a HBG.* Imágenes de cortes histológicos de vagina teñidos con H&E pertenecientes a animales controles (A y C) y tratados con HBG (B y D) donde se puede observar la lesión neoplásica invadiendo el estroma vaginal. Las áreas histológicas en los recuadros se magnifican en el panel inferior. EL, epitelio luminal; ES, estroma subepitelial. Barras: (A y B) 100 μ m, (C y D) 50 μ m.

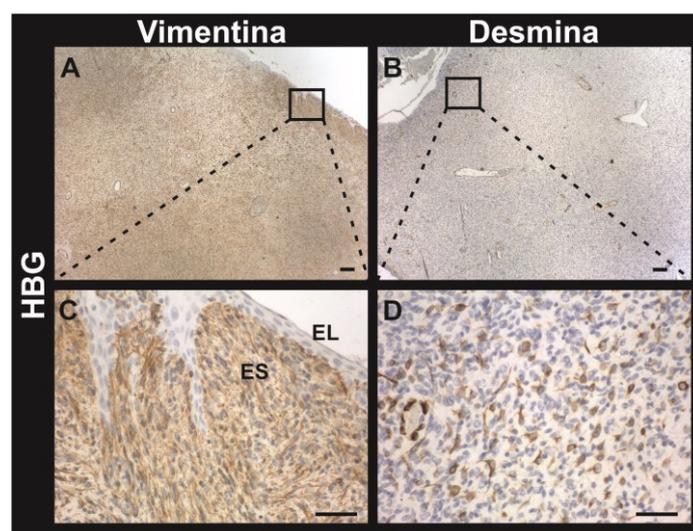


Figura 42. *Caracterización inmunofenotípica del rabdomiosarcoma vaginal detectado en animales de 20 meses de edad expuestos postnatalmente a HBG.* Imágenes de la inmunomarcación para vimentina (A y C) y desmina (B y D). Las áreas histológicas en los

recuadros se magnifican en el panel inferior. EL, epitelio luminal; ES, estroma subepitelial. Barras: (A y B) 100 μ m, (C y D) 50 μ m.

El número total de animales que presentaron lesiones neoplásicas en el tracto reproductor se muestran en la Tabla 18. Además de los tumores detectados en útero y vagina, observamos que los animales expuestos a HBG desarrollaron neoplasias benignas en hígado y en la glándula mamaria, que fueron caracterizadas como adenoma de vías biliares intrahepático y fibroadenoma mamario (Figura 43). En conjunto, estos resultados sugieren que la exposición postnatal temprana a HBG aumenta el riesgo de desarrollar diversos tipos de lesiones neoplásicas en ratas de edad avanzada.

Tabla 18. Resumen de las lesiones neoplásicas halladas en el tracto reproductor de los animales de 20 meses de edad expuestos postnatalmente a HBG.

	Útero		Vagina		Tracto reproductor		Número total de lesiones	
	Incidencia	Valor de p ^a	Incidencia	Valor de p ^a	Incidencia	Valor de p ^a	Incidencia	Valor de p ^a
Control (n=11)	0/11	-	0/11	-	0/11	-	0/11	-
HBG (n=10)	1/10	0,476	2/10	0,214	3/10 ^b	0,090	5/10 ^c	0,012*

Los resultados se expresan como el número de ratas que presentaron una determinada neoplasia en relación al número total de ratas por grupo. ^a Los valores se analizaron mediante el test de la probabilidad exacta de Fischer. ^b Representa el número total de animales que presentaron lesiones neoplásicas en el tracto reproductor. ^c Incluye un animal que desarrolló adenoma de vías biliares intrahepático y un animal que presentó fibroadenoma mamario. El asterisco indica diferencia estadísticamente significativa respecto al grupo control (*p<0,05, Test de Fischer).

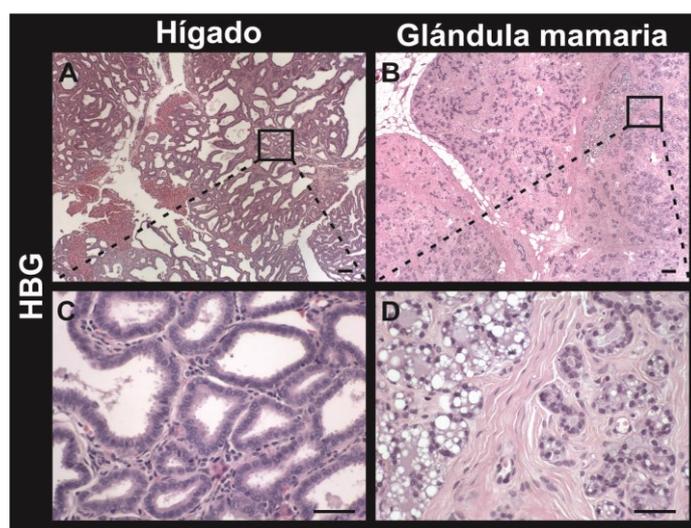


Figura 43. Neoplasias benignas en hígado y glándula mamaria de animales de 20 meses de edad expuestos postnatalmente a HBG. Imágenes de cortes histológicos de (A y C) hígado y (B y D) glándula mamaria teñidos con H&E donde se observa la presencia de un adenoma de

vías biliares intrahepático y un fibroadenoma mamario, respectivamente. Las áreas histológicas en los recuadros se magnifican en el panel inferior. Barras: (A y B) 100 μm , (C y D) 50 μm .

DISCUSIÓN

*“El futuro tiene muchos nombres.
Para los débiles es lo inalcanzable.
Para los temerosos, lo desconocido.
Para los valientes es la oportunidad”.*

Victor Hugo

La diferenciación organogenética del útero es un proceso regulado por diversos mecanismos endócrinos, celulares y moleculares que programan a las células uterinas para responder apropiadamente a las señales hormonales durante la vida adulta. La exposición a compuestos PE durante períodos críticos del desarrollo puede alterar el programa normal de diferenciación e inducir cambios permanentes en la estructura uterina y su funcionalidad, con consecuencias adversas para la salud reproductiva [41,172-175].

1 | La exposición postnatal a HBG altera la diferenciación organogenética del útero

En la primera etapa del trabajo de tesis evaluamos los efectos de la exposición postnatal a un HBG sobre la diferenciación organogenética del útero en dos momentos diferentes del desarrollo postnatal: **i)** el DPN8, para determinar la respuesta aguda a la exposición al HBG, al que definimos como período neonatal; y **ii)** el DPN21, para investigar si los efectos persisten y/o se manifiestan 15 días después de finalizado el tratamiento, al que definimos como período prepuberal. Para ello utilizamos un modelo de exposición breve durante la primera semana de vida, puesto que, el desarrollo postnatal del útero representa un período altamente sensible a la acción de compuestos hormonales y con actividad de PE.

En cuanto a la evaluación histomorfológica, el útero de los animales expuestos a HBG desarrolló hiperplasia en el epitelio luminal (75% de los animales) en asociación con una mayor proliferación celular en DPN8. La evaluación de la citodiferenciación de las células epiteliales indicó un fenotipo normal (células positivas para CK8). Además, en los animales tratados con HBG detectamos un aumento en el espesor del estroma y del miometrio que estuvo acompañado por un incremento en la proliferación celular del estroma. En forma similar, las células estromales mostraron una citodiferenciación específica para estroma uterino (células positivas para vimentina, indicativo de células fibroblásticas). Si bien el aumento de la proliferación celular inducida por el tratamiento con HBG se detectó en DPN8, este aumento no se observó en DPN21, donde la proliferación en ambos grupos experimentales fue despreciable y no mostró diferencias estadísticas. Un resultado interesante fue que el 37.5% de los animales tratados con el herbicida también presentaron un epitelio hiperplásico en DPN21, indicando la

persistencia del efecto 15 días después de finalizado el tratamiento. Se ha demostrado que la exposición a compuestos con actividad hormonal durante períodos críticos del desarrollo puede inducir cambios morfológicos en el útero. En este sentido, un compuesto muy estudiado es el xenoestrógeno DES que, como mencionamos anteriormente, se utilizó en tratamientos para prevenir abortos entre los años 1940-1970. Al realizar estudios de exposición en ratones y hámsters con DES, se detectó hipertrofia [176,177] e hiperplasia [178] en el epitelio luminal a los 8 y 10 días de edad que, en forma similar a nuestros resultados, estuvieron caracterizadas por presentar un fenotipo epitelial normal [176]. A su vez, los ratones exhibieron desorganización celular en el estroma endometrial y en el miometrio, particularmente en la capa circular interna [176,178]. Al igual que con HBG, ratones expuestos durante la primera semana de vida a bajas dosis de DES y a una mezcla de PCB mostraron un incremento en el espesor del miometrio 24 hs después de finalizado el tratamiento [179].

Luego, investigamos si la exposición postnatal temprana a HBG inducía cambios en la expresión de proteínas que regulan la diferenciación organogénica del útero en el período neonatal y prepuberal. Detectamos que la exposición al herbicida incrementó la expresión del RP y de Hoxa10 en el útero, tanto inmediatamente (DPN8) como dos semanas después de finalizado el tratamiento (DPN21). Estas moléculas cumplen un rol clave en los procesos de implantación embrionaria y decidualización del estroma endometrial que tienen lugar en la vida adulta durante la gestación [63]. Diversos estudios han demostrado que cuando un compuesto con actividad de PE altera la expresión de Hoxa10 y/o del RP durante el desarrollo, los animales desarrollan subfertilidad en la etapa adulta [38,104,105,171]. Teniendo en cuenta nuestros resultados y estos antecedentes, podemos sugerir que las ratas expuestas a HBG podrían mostrar efectos adversos sobre la salud reproductiva, tales como infertilidad/subfertilidad.

Además del aumento en la expresión del RP en ambos períodos evaluados, detectamos una inducción en la expresión del RE α en el estroma subepitelial en DPN8, y una disminución en el epitelio luminal de los animales expuestos al HBG en DPN21. Si bien a la fecha, la EPA considera que no hay suficientes evidencias para clasificar a glifosato (el ingrediente activo de las formulaciones) como un PE [149,180], determinados estudios *in vitro* han detectado que este compuesto promueve la proliferación de células de carcinoma mamario mediante la activación del RE α [147,148]. El mecanismo a

través del cual glifosato induciría la activación del RE α es controversial. Algunos autores plantearon la hipótesis de que glifosato podría unirse al receptor y actuar como un xenoestrógeno débil [147], mientras que otros proponen que se trataría de una activación independiente de ligando [148]. En nuestro laboratorio, determinamos la actividad estrogénica *in vivo* de una formulación a base de glifosato utilizando el ensayo uterotrópico y observamos que la formulación produce modificaciones similares a las inducidas por 17 β -estradiol [145]. Los resultados muestran que si bien el herbicida no modifica el peso húmedo del útero como lo hace 17 β -estradiol, altera la transcripción y traducción de moléculas estrógeno-sensibles como el RE α . En concordancia con estos antecedentes, en este trabajo de tesis detectamos que el HBG tiene la capacidad de modular la expresión del RE α en el útero de ratas prepuberales, aportando nuevas evidencias sobre su posible acción como PE.

Por otro lado, además del aumento en la expresión de Hoxa10 en ambos períodos evaluados, detectamos que el tratamiento con HBG incrementó la expresión de Wnt7a en el estroma subepitelial y en el epitelio glandular en DPN21. Tal como mencionamos previamente, se ha demostrado que Wnt7a regula diferencialmente la expresión de Hoxa10 durante el desarrollo y que ambos genes desempeñan un rol fundamental en la morfogénesis uterina [4,26]. Una desregulación en la expresión de Wnt7a conduce a un epitelio luminal estratificado y a un miometrio hiperplásico y desorganizado [26,181]. Además, la alteración en la expresión de Hoxa10 y Wnt7a durante la diferenciación organogénica del útero resulta en el desarrollo de diversas lesiones en la vida adulta, tal como se observa en el útero de ratones expuestos prenatalmente a DES [19,22,182]. Entre las lesiones inducidas por exposición a DES podemos mencionar metaplasia escamosa luminal y glandular, hiperplasia endometrial y aumento del riesgo de desarrollar adenocarcinoma y leiomioma uterino [41].

El gen homeótico Hoxa10 es una molécula clave en la diferenciación uterina durante el desarrollo y en la funcionalidad del órgano durante la vida adulta. Nuestros resultados muestran modificaciones en la expresión de Hoxa10 en respuesta al tratamiento con HBG. Específicamente a nivel transcripcional, detectamos que la exposición postnatal a HBG provocó una disminución en la expresión del ARNm de Hoxa10 en el útero de las crías de DPN8. Se ha demostrado que los mecanismos epigenéticos, como la metilación del ADN y las MPTs de histonas, cumplen un rol importante en la regulación transcripcional de los genes Hox durante el desarrollo [183]. Por otro lado, antecedentes

de nuestro grupo y de otros autores, indican que Hoxa10 es un gen blanco frente a la exposición a PE en el útero y que cambios en su expresión están regulados por mecanismos epigenéticos [108,184]. Teniendo en cuenta estos antecedentes, decidimos evaluar si la caída en la expresión de Hoxa10 en el grupo HBG estaba asociada a cambios epigenéticos en las regiones regulatorias del gen, como posible mecanismo de acción del herbicida. Para ello, analizamos el estado de metilación del ADN y evaluamos alteraciones en MPTs de histonas. Los resultados mostraron que los animales expuestos a HBG presentaban alteraciones epigenéticas que permiten explicar la caída en los niveles del ARNm de Hoxa10 en respuesta al herbicida. Específicamente, detectamos un aumento en los niveles de metilación en las 4 regiones regulatorias estudiadas (Islas CpG1A, 2, 3 y 4). De forma similar a los efectos observados en este trabajo, la exposición *in utero* a DES provocó una disminución en la expresión del ARNm de Hoxa10 en el útero de ratones prepuberales [19], asociada a un incremento en los niveles de metilación del ADN y a un aumento en la expresión del ARNm de la enzima DNMT3b [108]. Otros resultados indicaron que la exposición *in utero* a BPA provocó un aumento en la expresión del ARNm de Hoxa10 en el útero de ratones prepuberales, y en este caso, dicho aumento estuvo acompañado por una disminución en los niveles de metilación del gen [184]. En su conjunto, nuestros resultados y estas evidencias sugieren que la metilación del ADN en regiones regulatorias del gen Hoxa10 representa un mecanismo epigenético que explicaría la acción de determinados PE, especialmente si la exposición se produce durante períodos críticos del desarrollo (prenatal y postnatal).

Con respecto a las MPTs de histonas, evaluamos los niveles de H3K9me3 en regiones regulatorias del gen Hoxa10. Tal como mencionamos, estudios previos sugieren que la presencia de H3K9me3 en regiones codificantes del ADN está asociada a la activación de la transcripción, mientras que su presencia en regiones promotoras cumpliría un rol inhibitorio [185,186]. En este trabajo detectamos un aumento en los niveles de H3K9me3 en el promotor del exón 1A (Isla CpG1A y CpG1B), en regiones intrónicas no codificantes del gen (Isla CpG3), y en la región codificante correspondiente a la Isla CpG4. En conjunto, estos resultados sugieren un efecto principalmente inhibitorio de H3K9me3 sobre la transcripción de Hoxa10. Además, en células madre embrionarias de ratón se han reportado interacciones entre la metilación de H3K9 y la metilación del ADN que contribuyen a la formación de un ciclo de silenciamiento en la expresión

génica. Es decir, la metilación de H3K9 conduce al reclutamiento de DNMTs y a la posterior metilación del promotor. Luego, el ADN metilado, induce la metilación de la H3K9 a través del reclutamiento de proteínas como HDACs y HMTs [187,188].

Además, cabe destacar que a partir del análisis *in silico* de las regiones regulatorias del gen *Hoxa10*, detectamos que algunos de los sitios estudiados en este trabajo se encuentran potencialmente regulados por factores de transcripción tales como: Sp1 (del inglés: *Specificity Protein 1*) e YY1 (Yin Yang 1). Distintos autores han demostrado que estos factores cumplen un rol esencial durante el desarrollo. Embriones de ratón deficientes en Sp1 no sobreviven y presentan fenotipos variables que van desde la detención del desarrollo en una masa de células amorfas hasta el retraso del crecimiento embrionario y el desarrollo de anomalías estructurales [189]. Por otro lado, estudios *in vitro* han descrito que Sp1 es capaz de inducir la expresión de *Hoxa10* en células Ishikawa de adenocarcinoma de endometrio [190]. Respecto al rol de YY1 durante el desarrollo, se ha demostrado que embriones de ratón mutantes para YY1 no superan el período peri-implantatorio y que embriones heterocigotas para esta mutación presentan un retraso madurativo y pueden desarrollar malformaciones [191]. Estudios posteriores revelaron que YY1 reprime la transcripción de los genes homeóticos durante el desarrollo mediante el reclutamiento de HDACs [192]. Cambios en el patrón de metilación del ADN y en MPTs de histonas pueden afectar la unión de estos u otros factores de transcripción al ADN, lo que podría estar asociado a alteraciones en la transcripción o regulación de *Hoxa10*, con consecuencias adversas a largo plazo.

Modificaciones epigenéticas en regiones regulatorias del gen *Hoxa10* han sido vinculadas a diferentes patologías del tracto reproductor. Específicamente, el silenciamiento de *Hoxa10* por hipermetilación del ADN estaría vinculado a patologías endometriales graves como la endometriosis [193] y el carcinoma de endometrio [194,195]. Asimismo, se ha descrito que en la endometriosis se detecta hipoacetilación de las histonas H3 y H4 en los promotores de *Hoxa10*, e hipermetilación global de H3K9 [196]. Por lo tanto, los cambios epigenéticos en *Hoxa10* inducidos por la exposición a HBG, podrían reprogramar el epigenoma, alterar la expresión génica y aumentar la susceptibilidad al desarrollo de patologías reproductivas durante la vida adulta.

En conjunto, los resultados de esta sección muestran que la exposición a dosis seguras de glifosato en la etapa postnatal temprana, modifica el proceso de diferenciación organogenética que caracteriza el desarrollo uterino en la rata e induce alteraciones epigenéticas que conducen al silenciamiento de Hoxa10. Estos cambios podrían alterar la diferenciación funcional del útero en la vida adulta y producir consecuencias adversas sobre la salud reproductiva, tales como infertilidad/subfertilidad, interrupción temprana de la preñez, y desarrollo de neoplasias uterinas.

2 | *El tratamiento con HBG incrementa la sensibilidad del útero al E2*

En la sección anterior hemos detectado que la exposición postnatal temprana a HBG produce hiperplasia endometrial acompañada de un aumento en la proliferación celular y de una mayor expresión del RE α . Teniendo en cuenta estos resultados, nos propusimos evaluar si la exposición postnatal a HBG incrementa la sensibilidad uterina al E2 utilizando un modelo de rata prepúber OVX sometida a un tratamiento crónico con estrógenos.

La respuesta uterina al E2 en roedores ha sido ampliamente estudiada mediante la utilización de diferentes modelos. Elegimos un tratamiento crónico con E2 ya que se ha demostrado que la estimulación estrogénica prolongada desempeña un rol importante en el desarrollo de patologías endometriales como hiperplasia y adenocarcinoma [82]. En este modelo, se comprobó que las concentraciones séricas de E2 en aquellos animales que recibieron los implantes con la hormona, fueron equivalentes a los niveles circulantes durante el ciclo estral de la rata [197], independientemente del grupo experimental. Esto demuestra que la dosis de E2 administrada se encontró en el rango de valores fisiológicos y que todos los animales estuvieron expuestos a niveles de E2 similares.

Utilizando este modelo, detectamos que cuando los animales OVX estuvieron expuestos crónicamente al E2, la histomorfología uterina mostró signos de mayor sensibilidad a la hormona en el grupo tratado con HBG. En estos animales, se detectaron cambios histológicos que caracterizan la hiperplasia endometrial simple y que incluyeron: **i)** hiperplasia en el epitelio luminal y glandular, **ii)** aumento en la altura del epitelio luminal, y **iii)** mayor densidad de núcleos del estroma [87,91]. Alteraciones similares en estos compartimentos uterinos fueron observadas durante el período neonatal (DPN8)

en animales expuestos a HBG [198]. Diversos estudios han demostrado que hámsters y ratones expuestos a DES exhibieron hiperplasia endometrial en etapas tempranas de la vida [178,199], y luego desarrollaron adenocarcinoma de útero durante la vida adulta, a los 18 meses de edad [172,200]. Teniendo en cuenta que la hiperplasia endometrial tiene el potencial de progresar a cáncer de endometrio [91], nuestros hallazgos proporcionan la primera evidencia de un vínculo entre la exposición postnatal a HBG y el desarrollo de lesiones pre-neoplásicas en útero luego de una exposición prolongada al E2.

Además de las alteraciones histomorfológicas, detectamos que las hembras expuestas al HBG presentaron un notable aumento en la proliferación y en la expresión del RE α en las células del epitelio luminal. El RE α desempeña un rol crucial en la proliferación de las células uterinas estimulada por E2. Estudios *in vivo* han demostrado que la expresión del RE α tanto en el estroma como en el epitelio son importantes para inducir la proliferación de las células epiteliales. Winuthayanon y col. (2014) demostraron que la expresión del RE α en el epitelio es esencial para la respuesta uterina al E2 a largo plazo. Su expresión induce genes implicados en la mitosis, la progresión del ciclo celular, y la inhibición de la apoptosis [201]. Estos autores sugieren que la expresión epitelial del RE α puede generar señales autocrinas o proporcionar una retroalimentación positiva a las células del estroma para estimular la proliferación de las células epiteliales [201,202]. Por lo tanto, la hiperplasia epitelial observada en los animales expuestos al HBG podría atribuirse, al menos en parte, a una mayor proliferación en el epitelio luminal debido a un incremento en la expresión del RE α en este compartimento. En concordancia con nuestros resultados, Tica y col. (2016) demostraron que la expresión del RE α se encuentra aumentada en las células epiteliales hiperplásicas que no presentan atipia celular [203].

El RE β cumple un rol importante en la diferenciación y el crecimiento del epitelio uterino [36]. Además, se ha observado que la pérdida de la función del RE β resulta en un aumento en la proliferación inducida por E2 en el útero de ratones neonatos y adultos, destacando su función en la inhibición de la proliferación celular [35,36]. Además de esta acción regulatoria en el tejido endometrial normal, se ha propuesto un rol completamente diferente para el RE β en patologías endometriales proliferativas. El aumento de los niveles del RE β detectado en carcinomas endometriales de alto grado y en estadios avanzados, así como en las células estromales de endometriosis, sugiere que

el RE β estaría involucrado en la proliferación de células anómalas y en la progresión tumoral [204,205]. En este trabajo de tesis, encontramos un aumento en la expresión del RE β (tanto a nivel ARNm como proteína) en los úteros expuestos a HBG luego de la administración de E2. En su conjunto, estos resultados sugieren que alteraciones en la expresión del RE β contribuirían al desarrollo y la progresión de lesiones uterinas proliferativas, lo cual destaca la importancia de la detección de alteraciones en la expresión de RE β , a pesar de no ser considerado el receptor hormonal “clásico” para los estrógenos en órganos hormono-sensibles como el útero.

Hasta el momento, pocos estudios han demostrado la capacidad de glifosato y sus formulaciones comerciales de modular la expresión de los REs. Ensayos de transactivación empleando luciferasa como gen reportero han demostrado que la exposición *in vitro* a distintas formulaciones de HBGs produce la inhibición transcripcional del RE α y el RE β en células HepG2 de hígado humano [206]. Por el contrario, otros estudios demostraron que glifosato (el ingrediente activo de las formulaciones) tiene la capacidad de activar el RE α en células de cáncer de mama hormono-dependiente [147,148]. En este trabajo de tesis, observamos que la exposición postnatal a HBG incrementó la expresión proteica tanto del RE α como del RE β en el útero de la rata después del tratamiento con E2. En concordancia con estos hallazgos, nuestro grupo de trabajo y otros autores hemos detectado que glifosato y sus formulaciones modulan la expresión de ambos subtipos del RE, en el útero de la rata [145] y en la línea celular de cáncer de mama T47D [147]. En conjunto, nuestros resultados aportan nuevas evidencias que respaldan la posible interacción de los HBGs con las vías de señalización inducidas por estrógenos.

En el endometrio, la vía de señalización Wnt/ β -catenina está implicada en diferentes procesos tales como el desarrollo y la proliferación de las células epiteliales en respuesta al E2 [207]. β -catenina cumple una doble función, como molécula de adhesión en las uniones adherentes de la membrana plasmática y como un intermediario clave en la vía de señalización canónica de Wnt [208]. Wnt7a es un miembro de la familia de proteínas de Wnt, y se ha demostrado que esta proteína es regulada por E2 [209] y se encuentra sobreexpresada en ciertas patologías uterinas como endometriosis y cáncer de endometrio [210,211]. En nuestro modelo de estudio, el tratamiento con HBG aumentó la expresión del ARNm y la proteína de Wnt7a en el epitelio luminal, sugiriendo una mayor activación de la vía de señalización Wnt/ β -catenina. Por otro

lado, los cambios en el patrón de expresión de β -catenina fueron diferentes a los observados para Wnt7a. Detectamos una disminución en la expresión de β -catenina en el citoplasma y en la membrana de las células del epitelio luminal y glandular de las ratas expuestas a HBG, con ausencia de marcación nuclear. En concordancia con estos resultados, otros autores observaron una disminución en la expresión de β -catenina en las células epiteliales de lesiones hiperplásicas uterinas en ratones, luego de un tratamiento con litio y E2 [212]. A pesar de que la acumulación nuclear de β -catenina es una alteración bien conocida en la hiperplasia y neoplasia uterinas, se ha demostrado que la expresión de β -catenina en la membrana celular de estas lesiones se encuentra disminuida [213,214]. La pérdida de expresión de β -catenina en la superficie celular desestabiliza y debilita la adhesión célula-célula, favoreciendo la disociación celular [215]. Teniendo en cuenta los cambios morfológicos inducidos por la exposición a HBG, alteraciones en los contactos intercelulares y una activación continua de la vía de señalización Wnt/ β -catenina podrían contribuir al desarrollo de tumores en la vida adulta.

Como mencionamos en la introducción, los estrógenos y sus receptores tienen un profundo impacto en el desarrollo de diversas patologías del tracto reproductor femenino. De acuerdo con este concepto, una mayor sensibilidad al E2 podría provocar alteraciones en la diferenciación funcional del útero y/o predisponer al desarrollo de diversas patologías endometriales. Se ha demostrado que algunos compuestos con actividad de PE que alteran la respuesta fisiológica normal al E2 en diferentes tejidos hormono-dependientes, promueven el desarrollo de lesiones pre-neoplásicas e incluso cáncer en etapas posteriores. La exposición perinatal a bajas dosis de BPA en roedores incrementa la sensibilidad de la glándula mamaria al E2 durante la pubertad [216,217] y promueve el desarrollo de carcinomas mamarios durante la vida adulta [218]. En forma similar, otros autores demostraron que la exposición a BPA durante períodos críticos del desarrollo altera la respuesta uterina y prostática al E2 en ratas de edad avanzada, provocando una mayor incidencia de lesiones pre-neoplásicas en útero [110,219] e induciendo el desarrollo de neoplasia intraepitelial en próstata [220]. Por otro lado, ratones postnatalmente expuestos a bajas dosis de DES que presentaron mayor sensibilidad al E2 durante la pubertad [221], desarrollaron adenocarcinoma endometrial durante la vida adulta [172]. En el presente trabajo, detectamos que la exposición postnatal temprana a HBG alteró la respuesta uterina al E2 en ratas prepuberales, lo que

podría predisponer a alteraciones en la funcionalidad uterina y al desarrollo de patologías endometriales en etapas posteriores.

En conclusión, nuestros resultados mostraron que la exposición a HBG durante períodos críticos del desarrollo incrementa la sensibilidad uterina al E2. El tratamiento con HBG indujo alteraciones morfológicas y moleculares en el útero de la rata que se evidenciaron por el desarrollo de hiperplasia uterina, aumento en la proliferación celular inducida por E2, inducción de los REs (RE α y RE β) y desregulación de la vía de señalización de Wnt/ β -catenina. Estas alteraciones podrían predisponer al desarrollo de patologías endometriales a largo plazo tales como subfertilidad y/o cáncer.

3 | La exposición postnatal a HBG altera la fertilidad produciendo pérdidas post-implantatorias

Como mencionamos anteriormente, la modificación de la expresión de genes morforegulatorios durante períodos críticos del desarrollo puede alterar en la vida adulta la respuesta fisiológica normal del útero a los estímulos hormonales de la gestación, impactando negativamente en la eficiencia reproductiva de la hembra [104,105,171]. Asimismo, una alteración en la respuesta endometrial a los esteroides ováricos puede comprometer la implantación y el desarrollo embrionario [63]. Teniendo en cuenta los resultados de las secciones anteriores, en esta parte de la tesis investigamos los efectos de la exposición postnatal a HBG sobre la fertilidad de la hembra y la diferenciación funcional del útero durante el período post-implantatorio (DG9).

En primer lugar, evaluamos el porcentaje de hembras preñadas y luego, determinamos diferentes parámetros de fertilidad en DG19 con el objetivo de detectar alteraciones permanentes en la capacidad reproductiva de las hembras adultas. El tratamiento con HBG no modificó el porcentaje de animales preñados. Al mismo tiempo, no se detectaron cambios en el número de los CLs presentes en los ovarios de ambos grupos experimentales, lo que sugiere que el tratamiento con HBG no produjo alteraciones en la tasa de ovulación. De forma similar, no se observaron diferencias en el número de los sitios de implantación entre los animales control y tratados con HBG, lo que indicaría que el proceso de implantación no se vio afectado. Sin embargo, detectamos que la exposición postnatal a HBG provocó un aumento en el número de sitios de reabsorción, lo que indicaría un efecto adverso sobre el desarrollo post-implantatorio. En

concordancia con nuestros resultados, diversos estudios realizados en distintos modelos animales han demostrado que la exposición a compuestos PE, como DDT (insecticida organoclorado), triclosán (agente antibacteriano) y distintos tipos de PCBs, produce un incremento en las reabsorciones fetales, con la consecuente muerte y pérdida fetal en distintos estadios de la gestación [222,223]. Hasta el momento, pocos trabajos han evaluado los efectos de la exposición a glifosato y sus formulaciones sobre la reproducción y el desarrollo. Respecto a la toxicidad durante el desarrollo, existen datos experimentales que muestran que la exposición a glifosato grado técnico o a sus formulaciones comerciales produce defectos neurológicos, cardíacos y efectos teratogénicos en embriones de pollo, anfibios y peces [224-226]. En un trabajo reciente de nuestro grupo de investigación hemos detectado que ratas expuestas perinatalmente (*in utero* y durante la lactancia) y por vía oral a una formulación a base de glifosato, exhiben un menor número de crías implantadas en los cuernos uterinos en la etapa adulta y que, a su vez, sus crías presentan crecimiento intrauterino retardado y anomalías congénitas estructurales (fetos siameses, ausencia de extremidades y reducción longitudinal de la cola), sugiriendo que el herbicida provoca efectos adversos transgeneracionales [227].

Algunos estudios epidemiológicos y de biomonitorio han revelado una asociación positiva entre la exposición a glifosato y efectos adversos sobre la salud reproductiva. Un estudio epidemiológico realizado en una población agrícola de Ontario, Canadá, demostró que la exposición materna o paterna a glifosato en forma previa a la concepción aumenta el riesgo de padecer abortos espontáneos entre las semanas 12-19 de gestación [228]. Por otro lado, un estudio de cohorte realizado en mujeres embarazadas de EE.UU reveló que más del 90% de las mujeres presentaban niveles detectables de glifosato en orina (rango 0,5-7,20 ng/ml), y que las mujeres que residían en áreas rurales exhibían los niveles más altos. Además, los autores de este trabajo encontraron una asociación positiva entre los niveles más altos de glifosato en orina y períodos de gestación reducidos [132]. Aunque los datos epidemiológicos son limitados, estas evidencias sugieren que existiría un riesgo para la salud reproductiva por exposición a glifosato. De los resultados de la presente tesis y otros hallazgos de nuestro grupo, podemos concluir que más allá del momento en el que se produzca la exposición al herbicida, los efectos observados están asociados con subfertilidad. Evidenciamos

efectos adversos a largo plazo sobre la capacidad reproductiva de la hembra y el desarrollo del embrión.

En una etapa posterior, evaluamos la diferenciación funcional del útero durante el período post-implantatorio (DG9) para determinar si la exposición postnatal a HBG produce defectos intrínsecos a nivel uterino que puedan explicar las pérdidas post-implantatorias detectadas. Al evaluar la estructura y la morfología de los sitios de implantación en los animales expuestos a HBG en DG9, detectamos una disminución en el peso de los mismos y una reducción en el área de decidualización. Asimismo, observamos que el tratamiento con el herbicida provocó una disminución en la expresión del ARNm del RP, COUP-TFII y Bmp2, que estuvo acompañada por una caída en la expresión proteica del RP en la mayoría de los compartimentos uterinos evaluados en DG9. Efectos similares a los descritos en este trabajo han sido observados por otros autores frente a alteraciones en la vía de señalización del RP y de la expresión de Bmp2 [79,81]. En ratas tratadas con un antagonista del RP durante estadios tempranos de la gestación, se observó una marcada disminución en el tamaño de los sitios de implantación y en el área de decidualización tanto en DG6 como en DG7, demostrando la importancia de la vía de señalización del RP para el desarrollo de la decidua [81]. Además, Lee y col. (2007) observaron que, luego de un estímulo artificial de decidualización, ratones que presentan delección condicional de Bmp2 en útero son incapaces de incrementar el tamaño del cuerno uterino y presentan reacción negativa para fosfatasa alcalina (marcador de células deciduales), evidenciando fallas en el proceso de diferenciación del estroma uterino [79]. Por otro lado, un estudio reciente observó que ratones expuestos a benzo[a]pireno (un hidrocarburo policíclico aromático) durante la gestación exhibieron una respuesta decidual alterada, caracterizada por una disminución en el tamaño de los sitios de implantación, y una caída en la expresión del RP y de Bmp2 entre los DG6-8 [229]. Dado que la vía de señalización del RP es crítica para una preñez exitosa [80], la disminución en la expresión del RP y sus moléculas de señalización, COUP-TFII y Bmp2, observada en los animales expuestos a HBG, sugiere que las pérdidas embrionarias podrían estar asociadas con alteraciones de esta vía en el útero.

En conjunto, los resultados de esta sección muestran que la exposición postnatal a HBG produce subfertilidad, evidenciada por pérdidas embrionarias post-implantatorias en la vida adulta. Al estudiar los mecanismos que gobiernan el proceso de decidualización del

estroma uterino durante la gestación observamos una desregulación en la vía de señalización RP/COUP-TFII/Bmp2, clave para este proceso. Esta alteración podría explicar, al menos en parte, las pérdidas post-implantatorias encontradas en DG19 en el grupo HBG.

4 | Exposición a HBG y desarrollo de tumores en la rata

En secciones anteriores hemos determinado que la exposición postnatal a HBG produce hiperplasia endometrial durante el período neonatal (DPN8), acompañada de un aumento en la proliferación celular y en la expresión del RE α . Además, observamos que los animales expuestos a HBG exhibieron una mayor sensibilidad uterina al E2.

Teniendo en cuenta que el desarrollo de tumores ginecológicos está asociado a un aumento en la sensibilidad a los estrógenos, y considerando el posible efecto xenoestrogénico de glifosato, nos propusimos determinar si la exposición a HBG podría predisponer al desarrollo de lesiones pre-neoplásicas y/o neoplásicas en útero y/o vagina, utilizando animales de 20 meses de edad. A su vez, considerando los antecedentes que indican que alteraciones en la relación E2/P4 estarían asociadas con el desarrollo de tumores hormono-dependientes, nos propusimos determinar los niveles séricos de E2 y P4 en animales expuestos postnatalmente a HBG a los 4 meses de edad (DPN120). Además, a esta misma edad, realizamos una evaluación del ciclo estral de los animales. En relación a este objetivo, los antecedentes indican que la exposición a compuestos con actividad de PE puede producir alteraciones en el ciclo estral así como un desequilibrio en los niveles séricos de los esteroides sexuales. En la presente tesis, observamos que los animales expuestos a HBG presentaron ciclos estrales irregulares, caracterizados por un mayor porcentaje de tiempo abarcado por las etapas proestro y estro, evaluado a los 4 meses de edad. Además, detectamos modificaciones en los niveles séricos de E2 y P4 que llevaron a un incremento en la relación E2/P4. En forma similar a lo detectado con HBG, se ha determinado que la exposición neonatal a bajas dosis de BPA produce el desarrollo de ciclos estrales alterados en la rata, con aumento del porcentaje de tiempo en la etapa estro [230,231] o proestro y estro [232] entre los 3 y 5 meses de edad. Además, en uno de estos trabajos [231] se detectaron niveles séricos elevados de E2 y disminuidos de P4 durante la etapa de estro del ciclo. Por otro lado, la exposición perinatal a bajas dosis del insecticida metoxicloro provocó un aumento en la

duración del ciclo estral en ratas de 2 meses de edad y un incremento en los niveles séricos de E2 durante el proestro [233]. Los antecedentes indican que un incremento continuo en la relación E2/P4 constituye uno de los mecanismos a través de los cuales ciertos pesticidas tienen la capacidad de inducir el desarrollo de tumores estrógeno sensibles en el útero de animales de edad avanzada [170], lo que indica la importancia de los cambios detectados en el presente trabajo de tesis.

En las ratas controles de 20 meses observamos la presencia de lesiones uterinas asociadas con la edad avanzada de los animales. Estas lesiones incluyeron atipia celular en distintas regiones del epitelio luminal del útero, metaplasia escamosa en glándulas, glándulas quísticas, glándulas que presentaron anomalías celulares, GGH e hiperplasia glandular quística (HGQ). En concordancia con estos resultados, un trabajo realizado en nuestro laboratorio [219] detectó que los efectos de la edad ya se observan en animales de 12 y 15 meses de edad, con un incremento en la incidencia de lesiones pre-neoplásicas. De acuerdo con estos hallazgos, el desarrollo de algunas alteraciones como las GGH e HGQ se observaría ya a partir de los 15 meses de edad. Entre las lesiones comúnmente detectadas en roedores de edad avanzada se encuentran la HGQ, la hiperplasia endometrial estromal y los pólipos endometriales [87]. Algunos autores han sugerido que el desarrollo de este tipo de lesiones estaría relacionado con una exposición prolongada a los estrógenos endógenos y/o con un desbalance en los niveles hormonales como consecuencia del envejecimiento, que conduce a un incremento en la relación E2/P4 [87]. En los animales de 20 meses de edad expuestos postnatalmente a HBG detectamos que la presencia de atipia en el epitelio luminal y de GGH fue 1,8 y 2,7 veces más frecuente, respectivamente, que en el grupo control. Teniendo en cuenta la naturaleza pre-neoplásica de estas lesiones, consideramos que sería oportuno aumentar el número de animales para definir la influencia de la exposición a HBG sobre el desarrollo de estas lesiones.

En la actualidad no existe consenso en la literatura científica respecto al potencial carcinogénico de glifosato y sus formulaciones comerciales. En este trabajo de tesis, detectamos que la exposición postnatal a HBG durante la primera semana de vida provocó el desarrollo de neoplasias benignas y malignas en la rata, caracterizadas como leiomioma uterino y rhabdomioma vaginal. Adicionalmente, detectamos tumores en mama e hígado en los animales expuestos a HBG. En concordancia con nuestros resultados, diversos estudios realizados en modelos murinos demuestran que tanto la

exposición al principio activo como a sus formulaciones promueve el desarrollo de distintos tipos de cáncer. Estudios realizados en ratas y ratones de edad avanzada que fueron expuestos por vía oral y en forma crónica a glifosato detectaron una frecuencia elevada de tumores poco frecuentes que incluyeron: adenoma y carcinoma tubular en riñón, hemangiosarcoma y sarcoma histiocítico, y adenoma de las células de los islotes pancreáticos [150]. Estos resultados forman parte de las evidencias que avalan la clasificación de la IARC para glifosato como carcinógeno (grupo 2A) por sus efectos en el desarrollo tumoral en modelos animales. Por otro lado, Seralini y col. (2014) reportaron un aumento en la incidencia de tumores estrógeno-sensibles en la glándula mamaria (fibroadenoma y adenocarcinoma) de ratas hembra de edad avanzada expuestas a una formulación comercial a base de glifosato (Roundup GT Plus[®], 450 g/l de glifosato en la forma de sal isopropilamina) a través del agua de bebida durante 24 meses [234].

En conjunto, los antecedentes previamente mencionados sugieren que tanto glifosato como sus formulaciones comerciales inducirían el desarrollo de tumores en animales de laboratorio. Si bien nuestros resultados no son concluyentes debido al número de animales utilizado, aportan evidencias en relación a los efectos a largo plazo en un modelo de exposición postnatal a bajas dosis del herbicida en animales de laboratorio. Esta etapa del trabajo se completará evaluando un mayor número de animales en cada grupo experimental.

Existen numerosos antecedentes en la bibliografía que demuestran que la exposición a PE durante períodos críticos del desarrollo induce el desarrollo de diversos tipos de tumores en el tracto reproductor de la hembra durante la etapa adulta y en diferentes especies. Cuando se evaluaron los efectos de la exposición a DES en mujeres jóvenes que fueron expuestas *in utero*, se observó una mayor incidencia de adenocarcinoma de células claras en cérvix y vagina [235]. En trabajos con roedores, se detectó que tanto la exposición prenatal como postnatal a DES promueve el desarrollo de neoplasias benignas y malignas en útero y vagina de animales de entre 4 y 18 meses de edad, entre las que se destacan leiomiomas, sarcomas y adenocarcinomas [86,172,200,236]. En forma similar, la exposición a BPA durante la gestación y la primera semana de vida provocó el desarrollo de leiomioma uterino y sarcoma cervical en ratones de 16-18 meses de edad [237,238]. Hasta la fecha, no hay estudios disponibles que hayan reportado el desarrollo de tumores ginecológicos por exposición a glifosato o a sus

formulaciones comerciales. Nuestros hallazgos refuerzan el concepto de que el período de desarrollo postnatal es altamente sensible a la acción de PE, y que esta formulación tendría la capacidad de actuar como tal, promoviendo el desarrollo de tumores a largo plazo.

En la actualidad, las causas que promueven el desarrollo de diversos tipos de tumores, como leiomiomas y rhabdomiomas, no se conocen en su totalidad. Algunos estudios epidemiológicos sugieren que la exposición a contaminantes medioambientales con actividad de PE representaría uno de los factores de riesgo. Específicamente, algunos estudios han demostrado que la exposición *in utero* a DES aumenta el riesgo de desarrollar leiomiomas uterinos en la vida adulta [239]. Por otra parte, existen evidencias sobre una asociación positiva entre la exposición ocupacional a herbicidas derivados del ácido fenoxiacético y el desarrollo de distintos tipos de sarcomas (hemangiosarcomas y rhabdomiomas) [240,241]. En lo que respecta a glifosato, los datos sobre la exposición ocupacional o comunitaria y el desarrollo de distintos tipos de neoplasias han demostrado ser limitados, enfatizando la necesidad de realizar estudios epidemiológicos y de monitoreo biológico en trabajadores laboralmente expuestos (aplicadores y fabricantes del herbicida) y en poblaciones vulnerables, como mujeres embarazadas, niños y habitantes de pueblos rurales [112,242]. Estos estudios permitirán actualizar los niveles de exposición esperados, y arribar a mejores conclusiones respecto al riesgo que implica la exposición a los HBGs.

CONCLUSIONES

*“No hay mejor reparación de un perjuicio
que su propia evitación”.*

Roberto Vazquez Ferrerira

CONCLUSIONES

Diversos factores hormonales y medioambientales pueden alterar la diferenciación organogénica del útero e inducir cambios permanentes en la estructura y función del órgano, con consecuencias adversas para la salud reproductiva. Los antecedentes acerca de las consecuencias de la exposición a glifosato y sus formulaciones comerciales están en su mayoría limitados a los efectos sobre el desarrollo y la funcionalidad del tracto reproductor masculino. Los estudios que evalúan las consecuencias sobre el tracto genital femenino son escasos. En base a esto, en la presente tesis decidimos estudiar la influencia de la exposición postnatal a bajas dosis de un HBG sobre la diferenciación organogénica y funcional del útero, evaluando los efectos a largo plazo sobre la fertilidad y el desarrollo tumoral en la rata.

Los resultados obtenidos durante la **etapa prepuberal** sugieren que la exposición postnatal temprana a bajas dosis de HBG:

- 1) Altera el desarrollo y la diferenciación postnatal del útero, produciendo hiperplasia endometrial y modificaciones en la expresión de proteínas que regulan la diferenciación morfogénica de este órgano.
- 2) Induce modificaciones epigenéticas que conducen al silenciamiento en la expresión del gen homeótico *Hoxa10* en el útero de animales prepuberales.
- 3) Produce alteraciones morfológicas, celulares y moleculares que evidencian un incremento en la sensibilidad uterina al E2.

Durante la **etapa adulta** observamos que la exposición postnatal a HBG:

- 1) Altera el ciclo estral y la relación E2/P4 a nivel sérico.
- 2) Produce subfertilidad, evidenciada por pérdidas embrionarias post-implantatorias.
- 3) Modifica los mecanismos hormonodependientes que regulan el proceso de decidualización durante la gestación. Concretamente, observamos una desregulación en la vía de señalización RP/COUP-TFII/Bmp2, clave para este proceso.

- 4) Aumenta el riesgo de desarrollar lesiones neoplásicas en útero, vagina, hígado y glándula mamaria de ratas de edad avanzada.

En conjunto, los resultados de esta tesis muestran que la exposición postnatal a bajas dosis del HBG produce alteraciones en la diferenciación organogénica del útero, y provoca efectos adversos a largo plazo sobre la salud reproductiva, como subfertilidad y desarrollo de tumores ginecológicos. Diversos mecanismos moleculares podrían estar involucrados en los efectos observados, entre los cuales podemos mencionar: la acción de la formulación como PE, la alteración del epigenoma, el incremento en la sensibilidad uterina al E2, el aumento en la relación E2/P4 a nivel sérico y la alteración de los patrones de ciclicidad estral.

Los resultados de la presente tesis aportan nuevas evidencias a favor del potencial carcinogénico y de la actividad como PE de los HBGs, como así también conocimiento acerca de los mecanismos moleculares afectados. Consideramos que estos hallazgos contribuirán al desarrollo de políticas sanitarias y de prevención que minimicen el riesgo para la salud humana y animal que implica la exposición a este agroquímico. Sin lugar a dudas, el compromiso de los organismos regulatorios en la adopción de estas políticas y en la búsqueda de alternativas más seguras es una necesidad ineludible.

Por último, consideramos que para el herbicida en estudio como para tantos otros compuestos con actividad de PE a los que estamos expuestos, sería muy importante para nuestra salud y la del ecosistema tener en cuenta el principio de precaución: *“Cuando haya peligro de daño grave o irreversible, la ausencia de información o certeza científica no deberá utilizarse como razón para postergar la adopción de medidas eficaces para impedir la degradación del medio ambiente”* [243].

BIBLIOGRAFÍA

*“La experiencia no es lo que te sucede, sino
lo que haces con lo que te sucede”.*

Aldous Huxley

BIBLIOGRAFÍA

- [1] GR Cunha (1976) Stromal induction and specification of morphogenesis and cytodifferentiation of the epithelia of the Mullerian ducts and urogenital sinus during development of the uterus and vagina in mice. *J Exp Zool* 196 (3):361-370.
- [2] GR Cunha, P Young, JR Brody (1989) Role of uterine epithelium in the development of myometrial smooth muscle cells. *Biol Reprod* 40 (4):861-871.
- [3] FF Bartol, AA Wiley, JG Floyd, TL Ott, FW Bazer, CA Gray, TE Spencer (1999) Uterine differentiation as a foundation for subsequent fertility. *J Reprod Fertil Suppl* 54:287-302.
- [4] TE Spencer, KA Dunlap, J Filant (2012) Comparative developmental biology of the uterus: insights into mechanisms and developmental disruption. *Mol Cell Endocrinol* 354 (1-2):34-53.
- [5] JR Brody, GR Cunha (1989) Histologic, morphometric, and immunocytochemical analysis of myometrial development in rats and mice: I. Normal development. *Am J Anat* 186 (1):1-20.
- [6] MK Mehaseb, SC Bell, MA Habiba (2009) The effects of tamoxifen and estradiol on myometrial differentiation and organization during early uterine development in the CD1 mouse. *Reproduction* 138 (2):341-350.
- [7] T Kurita, PS Cooke, GR Cunha (2001) Epithelial-stromal tissue interaction in paramesonephric (Mullerian) epithelial differentiation. *Dev Biol* 240 (1):194-211.
- [8] CA Gray, FF Bartol, BJ Tarleton, AA Wiley, GA Johnson, FW Bazer, TE Spencer (2001) Developmental biology of uterine glands. *Biol Reprod* 65 (5):1311-1323.
- [9] WS Branham, DM Sheehan, DR Zehr, E Ridlon, CJ Nelson (1985) The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17 beta-estradiol. *Endocrinology* 117 (5):2229-2237.
- [10] H Fritsch, R Hoermann, M Bitsche, E Pechriggl, O Reich (2013) Development of epithelial and mesenchymal regionalization of the human fetal utero-vaginal anlagen. *J Anat* 222 (4):462-472.
- [11] Y Ogasawara, S Okamoto, Y Kitamura, K Matsumoto (1983) Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice, assayed by incorporation of [125I]iododeoxyuridine. *Endocrinology* 113 (2):582-587.

- [12] RM Bigsby, GR Cunha (1986) Estrogen stimulation of deoxyribonucleic acid synthesis in uterine epithelial cells which lack estrogen receptors. *Endocrinology* 119 (1):390-396.
- [13] MK Nanjappa, TI Medrano, AG March, PS Cooke (2015) Neonatal uterine and vaginal cell proliferation and adenogenesis are independent of estrogen receptor 1 (ESR1) in the mouse. *Biol Reprod* 92 (3):1-14.
- [14] PS Cooke, TE Spencer, FF Bartol, K Hayashi (2013) Uterine glands: development, function and experimental model systems. *Mol Hum Reprod* 19 (9):547-558.
- [15] GS Daftary, HS Taylor (2006) Endocrine regulation of HOX genes. *Endocr Rev* 27 (4):331-355.
- [16] FF Bartol, AA Wiley, CA Bagnell (2006) Uterine development and endometrial programming. *Soc Reprod Fertil Suppl* 62:113-130.
- [17] H Du, HS Taylor (2015) The Role of Hox Genes in Female Reproductive Tract Development, Adult Function, and Fertility. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6 (1).
- [18] HS Taylor, GB Vanden Heuvel, P Igarashi (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 (6):1338-1345.
- [19] K Block, A Kardana, P Igarashi, HS Taylor (2000) In utero diethylstilbestrol (DES) exposure alters Hox gene expression in the developing Müllerian system. *FASEB J* 14 (9):1101-1108.
- [20] RL Gendron, H Paradis, HM Hsieh-Li, DW Lee, SS Potter, E Markoff (1997) Abnormal uterine stromal and glandular function associated with maternal reproductive defects in Hoxa-11 null mice. *Biol Reprod* 56 (5):1097-1105.
- [21] RT Moon, JD Brown, M Torres (1997) WNTs modulate cell fate and behavior during vertebrate development. *Trends Genet* 13 (4):157-162.
- [22] C Miller, A Pavlova, DA Sassoon (1998) Differential expression patterns of Wnt genes in the murine female reproductive tract during development and the estrous cycle. *Mech Dev* 76 (1-2):91-99.
- [23] S Tulac, NR Nayak, LC Kao, M Van Waes, J Huang, S Lobo, A Germeyer, BA Lessey, RN Taylor, E Suchanek y col. (2003) Identification, characterization, and regulation of the canonical Wnt signaling pathway in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 88 (8):3860-3866.

- [24] K Hayashi, S Yoshioka, SN Reardon, EB Rucker, 3rd, TE Spencer, FJ DeMayo, JP Lydon, JA MacLean, 2nd (2011) WNTs in the neonatal mouse uterus: potential regulation of endometrial gland development. *Biol Reprod* 84 (2):308-319.
- [25] M Mericskay, J Kitajewski, D Sassoon (2004) Wnt5a is required for proper epithelial-mesenchymal interactions in the uterus. *Development* 131 (9):2061-2072.
- [26] C Miller, DA Sassoon (1998) Wnt7a maintains appropriate uterine patterning during the development of the mouse female reproductive tract. *Development* 125 (16):3201-3211.
- [27] JW Jeong, HS Lee, HL Franco, RR Broaddus, MM Taketo, SY Tsai, JP Lydon, FJ DeMayo (2009) Beta-catenin mediates glandular formation and dysregulation of beta-catenin induces hyperplasia formation in the murine uterus. *Oncogene* 28 (1):31-40.
- [28] M Beato, A Sanchez-Pacheco (1996) Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocr Rev* 17 (6):587-609.
- [29] S Ellmann, H Sticht, F Thiel, MW Beckmann, R Strick, PL Strissel (2009) Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. *Cell Mol Life Sci* 66 (15):2405-2426.
- [30] SC Hewitt, KS Korach (2008), Chapter 12 - Estrogen-regulated genes in the endometrium, En: *The endometrium: Molecular, cellular and clinical perspectives (second edition)*, (Ed: JD Aplin, AT Fazleabas, SR Glasser, LC Giudice), Informa Healthcare, Reino Unido, p. 162-175.
- [31] X Li, BW O'Malley (2003) Unfolding the action of progesterone receptors. *J Biol Chem* 278 (41):39261-39264.
- [32] K Lee, J Wang, FJ De Mayo (2008), Chapter 13 - Progesterone-regulated genes in the endometrium, En: *The endometrium: Molecular, cellular and clinical perspectives (second edition)*, (Ed: JD Aplin, AT Fazleabas, SR Glasser, LC Giudice), Informa Healthcare, Reino Unido, p. 176-192.
- [33] AK Binder, W Winuthayanon, SC Hewitt, JF Couse, KS Korach (2015), Chapter 25 - Steroid receptors in the uterus and ovary, En: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Fourth Edition)*, (Ed: TM Plant, AJ Zeleznik), Academic Press, San Diego, p. 1099-1193.
- [34] JF Couse, KS Korach (1999) Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 20 (3):358-417.

- [35] T Nakajima, Y Tanimoto, M Tanaka, P Chambon, H Watanabe, T Iguchi, T Sato (2015) Neonatal estrogen receptor beta is important in the permanent inhibition of epithelial cell proliferation in the mouse uterus. *Endocrinology* 156 (9):3317-3328.
- [36] O Wada-Hiraike, H Hiraike, H Okinaga, O Imamov, RP Barros, A Morani, Y Omoto, M Warner, JA Gustafsson (2006) Role of estrogen receptor beta in uterine stroma and epithelium: Insights from estrogen receptor beta^{-/-} mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (48):18350-18355.
- [37] Y Ohta, Y Fukazawa, T Sato, A Suzuki, N Nishimura, T Iguchi (1996) Effect of estrogen on ontogenic expression of progesterone and estrogen receptors in rat uterus. *Zoolog Sci* 13 (1):143-149.
- [38] MM Milesi, J Varayoud, VL Bosquiazzo, M Muñoz-de-Toro, EH Luque (2012) Neonatal exposure to low doses of endosulfan disrupts the expression of proteins regulating uterine development and differentiation. *Reprod Toxicol* 33 (1):85-93.
- [39] JP Lydon, FJ DeMayo, CR Funk, SK Mani, AR Hughes, CA Montgomery, Jr., G Shyamala, OM Conneely, BW O'Malley (1995) Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes Dev* 9 (18):2266-2278.
- [40] JR Roy, S Chakraborty, TR Chakraborty (2009) Estrogen-like endocrine disrupting chemicals affecting puberty in humans--a review. *Med Sci Monit* 15 (6):137-145.
- [41] J Kitajewski, DA Sassoon (2000) The emergence of molecular gynecology: homeobox and Wnt genes in the female reproductive tract. *BioEssays* 22 (10):902-910.
- [42] J Peretz, L Vrooman, WA Rieke, PA Hunt, S Ehrlich, R Hauser, V Padmanabhan, HS Taylor, SH Swan, CA VandeVoort y col. (2014) Bisphenol A and reproductive health: update of experimental and human evidence, 2007-2013. *Environ Health Perspect* 122 (8):775-786.
- [43] J Varayoud, JG Ramos, M Muñoz-de-Toro, EH Luque (2014), Chapter 10 - Long-lasting effects of neonatal bisphenol A exposure on the implantation process, En: *Vitamins & Hormones*, (Ed: G Litwack), Elsevier, Burlington, p. 253-275.
- [44] CE Reed, SE Fenton (2013) Exposure to diethylstilbestrol during sensitive life stages: a legacy of heritable health effects. *Birth Defects Res C Embryo Today* 99 (2):134-146.
- [45] GA Wood, JE Fata, KL Watson, R Khokha (2007) Circulating hormones and estrous stage predict cellular and stromal remodeling in murine uterus. *Reproduction* 133 (5):1035-1044.

- [46] GR Cunha, PS Cooke, T Kurita (2004) Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. *Arch Histol Cytol* 67 (5):417-434.
- [47] FR Westwood (2008) The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicol Pathol* 36 (3):375-384.
- [48] SM Kilen, NB Shwartz (1999), Estrous cycle, En: *Knobil and Neill's Encyclopedia of Reproduction*, (Ed: E Knobil, JD Neill), Academic Press, Nueva York, EE.UU, p. 59-79.
- [49] JJ Lohmiller, SP Swing (2006), Chapter 6 - Reproduction and breeding, En: *The Laboratory Rat (Second Edition)*, *American College of Laboratory Animal Medicine*, (Ed: M Suckow, S Weisbroth, C Franklin), Academic Press, Burlington, p. 147-164.
- [50] ME Freeman (2006), Chapter 43 - Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat, En: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)*, (Ed: E Knobil, JD Neill), Academic Press, St Louis, EE.UU, p. 2327-2388.
- [51] GS Montes, EH Luque (1988) Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Acta Anat* 133 (3):192-199.
- [52] MJ Soares (2004) The prolactin and growth hormone families: pregnancy-specific hormones/cytokines at the maternal-fetal interface. *Reprod Biol Endocrinol* 2 (51):1-15.
- [53] FW Bazer (1999), Maintenance of pregnancy, En: *Knobil and Neill's Encyclopedia of Reproduction*, (Ed: E Knobil, JD Neill), Academic Press, Nueva York, p. 1002-1006.
- [54] YM Huet-Hudson, GK Andrews, SK Dey (1989) Cell type-specific localization of c-myc protein in the mouse uterus: modulation by steroid hormones and analysis of the periimplantation period. *Endocrinology* 125 (3):1683-1690.
- [55] S Curtis Hewitt, EH Goulding, EM Eddy, KS Korach (2002) Studies using the estrogen receptor alpha knockout uterus demonstrate that implantation but not decidualization-associated signaling is estrogen dependent. *Biol Reprod* 67 (4):1268-1277.
- [56] T Kurita, KJ Lee, PS Cooke, JA Taylor, DB Lubahn, GR Cunha (2000) Paracrine regulation of epithelial progesterone receptor by estradiol in the mouse female reproductive tract. *Biol Reprod* 62 (4):821-830.
- [57] TA Tibbetts, M Mendoza-Meneses, BW O'Malley, OM Conneely (1998) Mutual and intercompartmental regulation of estrogen receptor and progesterone receptor expression in the mouse uterus. *Biol Reprod* 59 (5):1143-1152.

- [58] SK Dey, H Lim, SK Das, J Reese, BC Paria, T Daikoku, H Wang (2004) Molecular cues to implantation. *Endocr Rev* 25 (3):341-373.
- [59] DD Carson, I Bagchi, SK Dey, AC Enders, AT Fazleabas, BA Lessey, K Yoshinaga (2000) Embryo implantation. *Dev Biol* 223 (2):217-237.
- [60] BC Paria, YM Huet-Hudson, SK Dey (1993) Blastocyst's state of activity determines the "window" of implantation in the receptive mouse uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (21):10159-10162.
- [61] YM Huet-Hudson, SK Dey (1990) Requirement for progesterone priming and its long-term effects on implantation in the mouse. *Proc Soc Exp Biol Med* 193 (4):259-263.
- [62] A Psychoyos (1973) Hormonal control of ovoimplantation. *Vitam Horm* 31:201-256.
- [63] MJ Large, FJ DeMayo (2012) The regulation of embryo implantation and endometrial decidualization by progesterone receptor signaling. *Mol Cell Endocrinol* 358 (2):155-165.
- [64] HJ Lim, H Wang (2010) Uterine disorders and pregnancy complications: insights from mouse models. *J Clin Invest* 120 (4):1004-1015.
- [65] G Gibori, PG Jayatilak, I Khan, B Rigby, T Puryear, S Nelson, Z Herz (1987) Decidual luteotropin secretion and action: its role in pregnancy maintenance in the rat. *Adv Exp Med Biol* 219:379-397.
- [66] R Halperin, G Fleminger, PF Kraicer, E Hadas (1991) Desmin as an immunochemical marker of human decidual cells and its expression in menstrual fluid. *Human Reproduction* 6 (2):186-189.
- [67] CA Rasmussen, KE Orwig, S Vellucci, MJ Soares (1997) Dual expression of prolactin-related protein in decidua and trophoblast tissues during pregnancy in rats. *Biol Reprod* 56 (3):647-654.
- [68] BM Fonseca, G Correia-da-Silva, NA Teixeira (2012) The rat as an animal model for fetoplacental development: a reappraisal of the post-implantation period. *Reprod Biol* 12 (2):97-118.
- [69] MB Parr, EL Parr (1989), Chapter 9 The implantation reaction, En: *Biology of the uterus*, (Ed: RM Wynn), Plenum Publishing Corporation, p. 233-277.
- [70] VM Mikhailov (2003) Life cycle of decidual cells. *Int Rev Cytol* 227:1-63.

- [71] SK Dey (1996), Implantation, En: *Reproductive endocrinology, surgery and technology*, (Ed: EY Adashi, JA Rock, Z Rosenwaks), Lippincott-Raven Publishers, Nueva York, p. 421-434.
- [72] G Correia-da-Silva, SC Bell, JH Pringle, NA Teixeira (2004) Patterns of uterine cellular proliferation and apoptosis in the implantation site of the rat during pregnancy. *Placenta* 25 (6):538-547.
- [73] J Tan, BC Paria, SK Dey, SK Das (1999) Differential uterine expression of estrogen and progesterone receptors correlates with uterine preparation for implantation and decidualization in the mouse. *Endocrinology* 140 (11):5310-5321.
- [74] H Wang, HO Critchley, RW Kelly, D Shen, DT Baird (1998) Progesterone receptor subtype B is differentially regulated in human endometrial stroma. *Mol Hum Reprod* 4 (4):407-412.
- [75] AS Bhurke, IC Bagchi, MK Bagchi (2016) Progesterone-regulated endometrial factors controlling implantation. *Am J Reprod Immunol* 75 (3):237-245.
- [76] N Takamoto, I Kurihara, K Lee, FJ Demayo, MJ Tsai, SY Tsai (2005) Haploinsufficiency of chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor II in female reproduction. *Mol Endocrinol* 19 (9):2299-2308.
- [77] K Lee, J Jeong, I Kwak, CT Yu, B Lanske, DW Soegiarto, R Toftgard, MJ Tsai, S Tsai, JP Lydon y col. (2006) Indian hedgehog is a major mediator of progesterone signaling in the mouse uterus. *Nat Genet* 38 (10):1204-1209.
- [78] I Kurihara, DK Lee, FG Petit, J Jeong, K Lee, JP Lydon, FJ DeMayo, MJ Tsai, SY Tsai (2007) COUP-TFII mediates progesterone regulation of uterine implantation by controlling ER activity. *PLoS Genet* 3 (6):1053-1064.
- [79] KY Lee, JW Jeong, J Wang, L Ma, JF Martin, SY Tsai, JP Lydon, FJ DeMayo (2007) Bmp2 is critical for the murine uterine decidual response. *Mol Cell Biol* 27 (15):5468-5478.
- [80] M Wetendorf, FJ DeMayo (2012) The progesterone receptor regulates implantation, decidualization, and glandular development via a complex paracrine signaling network. *Mol Cell Endocrinol* 357 (1-2):108-118.
- [81] AC Mestre-Citrinovitz, V Kleff, G Vallejo, E Winterhager, P Saragueta (2015) A suppressive antagonism evidences progesterone and estrogen receptor pathway interaction with concomitant regulation of Hand2, Bmp2 and ERK during early decidualization. *PLoS One* 10 (4):1-20.

- [82] LG Chuffa, LA Lupi-Junior, AB Costa, JP Amorim, FR Seiva (2017) The role of sex hormones and steroid receptors on female reproductive cancers. *Steroids* 118:93-108.
- [83] NTP (2016) National Toxicology Program. Report on carcinogens, fourteenth edition. Research Triangle Park, NC: U.S Department of Health and Human Services, Public Health Service. Disponible en: <https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/content/profiles/estrogenssteroidal.pdf> Acceso: 4 Septiembre 2018.
- [84] NTP (2014) National Toxicology Program NTP TR-587. Toxicology Studies of Tetrabromobisphenol A (CAS No. 79-94-7) in F344/NTac Rats and B6C3F1/N Mice and Toxicology and Carcinogenesis Studies of Tetrabromobisphenol A in Wistar Han [CrI:WI(Han)] Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). Research Triangle Park, NC: U.S Department of Health and Human Services, Public Health Service.
- [85] AG Gunin, IN Mashin, DA Zakharov (2001) Proliferation, mitosis orientation and morphogenetic changes in the uterus of mice following chronic treatment with both estrogen and glucocorticoid hormones. *J Endocrinol* 169 (1):23-31.
- [86] JA McLachlan, RR Newbold, BC Bullock (1980) Long-term effects on the female mouse genital tract associated with prenatal exposure to diethylstilbestrol. *Cancer Res* 40 (11):3988-3999.
- [87] D Dixon, R Alison, U Bach, K Colman, GL Foley, JH Harleman, R Haworth, R Herbert, A Heuser, G Long y col. (2014) Nonproliferative and proliferative lesions of the rat and mouse female reproductive system. *J Toxicol Pathol* 27 (3-4 Suppl):1-107.
- [88] L Amanti, H Sadeghi-Bazargani, H Abdollahi, F Ehdaevand (2011) Uterine leiomyoma and its association with menstrual pattern and history of depo-medroxyprogesterone acetate injections. *Int J Gen Med* 4:535-538.
- [89] E Diamanti-Kandarakis, JP Bourguignon, LC Giudice, R Hauser, GS Prins, AM Soto, RT Zoeller, AC Gore (2009) Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev* 30 (4):293-342.
- [90] E Weiderpass, F Labreche (2012) Malignant tumors of the female reproductive system. *Saf Health Work* 3 (3):166-180.
- [91] PA Sanderson, HO Critchley, AR Williams, MJ Arends, PT Saunders (2017) New concepts for an old problem: the diagnosis of endometrial hyperplasia. *Hum Reprod Update* 23 (2):232-254.

- [92] T Ghezelayagh, JA Rauh-Hain, WB Growdon (2015) Comparing mortality of vaginal sarcoma, squamous cell carcinoma, and adenocarcinoma in the surveillance, epidemiology, and end results database. *Obstet Gynecol* 125 (6):1353-1361.
- [93] X Sun, W Guo, JK Shen, HJ Mankin, FJ Hornicek, Z Duan (2015) Rhabdomyosarcoma: Advances in molecular and cellular biology. *Sarcoma* (10):1-14.
- [94] J Ferrís I Tortajada, JA Ortega García, JA López Andreu, J García I Castel, O Berbel Tornero, E Llinares Riestra, J Aliaga Vera (2001) Factores de riesgo asociados a sarcomas de partes blandas pediátricos. *Rev Esp Pediatr* 57 (5):445-457.
- [95] MH Ghali, KY Yoo, JT Flannery, R Dubrow (1992) Association between childhood rhabdomyosarcoma and maternal history of stillbirths. *Int J Cancer* 50 (3):365-368.
- [96] T Schultheiss, Z Lin, H Ishikawa, I Zamir, CJ Stoeckert, H Holtzer (1991) Desmin/vimentin intermediate filaments are dispensable for many aspects of myogenesis. *J Cell Biol* 114 (5):953-966.
- [97] United Nations Environment Programme and the World Health Organization (2013), Chapter 2 - Evidence for endocrine disruption in humans and wildlife, En: *State of the science of endocrine disrupting chemicals 2012 : Summary for decision-makers*, (Ed: A Bergman, JJ Heindel, S Jobling, KA Kidd, RT Zoeller), WHO Library Cataloguing, p. 23-188.
- [98] DA Crain, SJ Janssen, TM Edwards, J Heindel, SM Ho, P Hunt, T Iguchi, A Juul, JA McLachlan, J Schwartz y col. (2008) Female reproductive disorders: the roles of endocrine-disrupting compounds and developmental timing. *Fertil Steril* 90 (4):911-940.
- [99] RT Zoeller, TR Brown, LL Doan, AC Gore, NE Skakkebaek, AM Soto, TJ Woodruff, FS Vom Saal (2012) Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society. *Endocrinology* 153 (9):4097-4110.
- [100] National Research Council (1999) *Hormonally Active Agents in the Environment*, En, National Academy Press, Washington DC.
- [101] RN Hoover, M Hyer, RM Pfeiffer, E Adam, B Bond, AL Cheville, T Colton, P Hartge, EE Hatch, AL Herbst y col. (2011) Adverse health outcomes in women exposed in utero to diethylstilbestrol. *New England Journal of Medicine* 365 (14):1304-1314.
- [102] K Yoshizawa, AE Brix, DM Sells, MP Jokinen, M Wyde, DP Orzech, GE Kissling, NJ Walker, A Nyska (2009) Reproductive lesions in female Harlan Sprague-

Dawley rats following two-year oral treatment with dioxin and dioxin-like compounds. *Toxicol Pathol* 37 (7):921-937.

[103] LS Birnbaum, AM Cummings (2002) Dioxins and endometriosis: a plausible hypothesis. *Environ Health Perspect* 110 (1):15-21.

[104] J Varayoud, JG Ramos, VL Bosquiazzo, M Lower, M Muñoz-de-Toro, EH Luque (2011) Neonatal exposure to bisphenol A alters rat uterine implantation-associated gene expression and reduces the number of implantation sites. *Endocrinology* 152 (3):1101-1111.

[105] MM Milesi, R Alarcon, JG Ramos, M Muñoz-de-Toro, EH Luque, J Varayoud (2015) Neonatal exposure to low doses of endosulfan induces implantation failure and disrupts uterine functional differentiation at the pre-implantation period in rats. *Mol Cell Endocrinol* 401:248-259.

[106] L Prusinski, A Al-Hendy, Q Yang (2016) Developmental exposure to endocrine disrupting chemicals alters the epigenome: Identification of reprogrammed targets. *Gynecol Obstet Res* 3 (1):1-6.

[107] MM Milesi, J Varayoud, JG Ramos, EH Luque (2017) Uterine ERalpha epigenetic modifications are induced by the endocrine disruptor endosulfan in female rats with impaired fertility. *Mol Cell Endocrinol* 454:1-11.

[108] JG Bromer, J Wu, Y Zhou, HS Taylor (2009) Hypermethylation of homeobox A10 by in utero diethylstilbestrol exposure: an epigenetic mechanism for altered developmental programming. *Endocrinology* 150 (7):3376-3382.

[109] S Li, L Ma, T Chiang, M Burow, RR Newbold, M Negishi, JC Barrett, JA McLachlan (2001) Promoter CpG methylation of Hox-a10 and Hox-a11 in mouse uterus not altered upon neonatal diethylstilbestrol exposure. *Mol Carcinog* 32 (4):213-219.

[110] L Vigezzi, JG Ramos, L Kass, MV Tschopp, M Muñoz-de-Toro, EH Luque, VL Bosquiazzo (2016) A deregulated expression of estrogen-target genes is associated with an altered response to estradiol in aged rats perinatally exposed to bisphenol A. *Mol Cell Endocrinol* 426:33-42.

[111] M Castro Berman, DJG Marino, MV Quiroga, H Zagarese (2018) Occurrence and levels of glyphosate and AMPA in shallow lakes from the Pampean and Patagonian regions of Argentina. *Chemosphere* 200:513-522.

[112] A Székács, B Darvas (2018) Re-registration challenges of glyphosate in the European Union. *Frontiers in Environmental Science* 6 (78):1-35.

- [113] CM Benbrook (2016) Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ Sci Eur* 28 (1):1-15.
- [114] CASAFE (2012) Mercado Argentino 2012 de productos fitosanitarios. Disponible en: <http://www.casafe.org/publicaciones/estadisticas/> Acceso: 20 Junio 2017.
- [115] T Fischer, D Beyerlee, G Edmeades (2014) Crop yields and global food security. Will yield increase continue to feed the world? *Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra*.
- [116] TM Mac Loughlin, L Peluso, DJG Marino (2017) Pesticide impact study in the peri-urban horticultural area of Gran La Plata, Argentina. *Sci Total Environ* 598:572-580.
- [117] VC Aparicio, E De Geronimo, D Marino, J Primost, P Carriquiriborde, JL Costa (2013) Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere* 93 (9):1866-1873.
- [118] PJ Peruzzo, AA Porta, AE Ronco (2008) Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environ Pollut* 156 (1):61-66.
- [119] AE Ronco, DJ Marino, M Abelando, P Almada, CD Apartin (2016) Water quality of the main tributaries of the Parana Basin: glyphosate and AMPA in surface water and bottom sediments. *Environ Monit Assess* 188 (8):1-13.
- [120] RI Bonansea, I Filippi, DA Wunderlin, DJG Marino, MV Ame (2017) The fate of glyphosate and AMPA in a freshwater endorheic basin: an ecotoxicological risk assessment. *Toxics* 6 (1):1-13.
- [121] JE Primost, DJG Marino, VC Aparicio, JL Costa, P Carriquiriborde (2017) Glyphosate and AMPA, "pseudo-persistent" pollutants under real-world agricultural management practices in the Mesopotamic Pampas agroecosystem, Argentina. *Environ Pollut* 229:771-779.
- [122] M Avila-Vazquez, E Maturano, A Etchegoyen, F Difilippo, B Maclean (2017) Association between cancer and environmental exposure to glyphosate. *International Journal of Clinical Medicine* 8:73-85.
- [123] M Mendez, S Aimar, V Aparicio, N B Ramirez Haberkon, D Buschiazzi, E De Gerónimo, J Costa (2017) Glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) contents in the respirable dust emitted by an agricultural soil of the central semiarid region of Argentina. *Aeolian Research* 29:23-29.

- [124] NR Rodrigues, APF de Souza (2018) Occurrence of glyphosate and AMPA residues in soy-based infant formula sold in Brazil. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 35 (4):723-730.
- [125] O Zoller, P Rhyh, H Rupp, JA Zarn, C Geiser (2018) Glyphosate residues in Swiss market foods: monitoring and risk evaluation. *Food Additives & Contaminants: Part B* 11 (2):83-91.
- [126] J Rendon-von Osten, R Dzul-Caamal (2017) Glyphosate residues in groundwater, drinking water and urine of subsistence farmers from intensive agriculture localities: A survey in Hopelchen, Campeche, Mexico. *Int J Environ Res Public Health* 14 (6):1-13.
- [127] SH Bai, SM Ogbourne (2016) Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. *Environ Sci Pollut Res Int* 23 (19):18988–19001.
- [128] MC Arregui, A Lenardon, D Sanchez, MI Maitre, R Scotta, S Enrique (2004) Monitoring glyphosate residues in transgenic glyphosate-resistant soybean. *Pest Manag Sci* 60 (2):163-166.
- [129] Test-Biotech (2013) High levels of residues from spraying with glyphosate found in soybeans in Argentina. Disponible en: <http://www.testbiotech.org/en/node/926>
Acceso: 12 Junio 2018.
- [130] L Niemann, C Sieke, R Pfeil, R Solecki (2015) A critical review of glyphosate findings in human urine samples and comparison with the exposure of operators and consumers. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 10 (1):3-12.
- [131] PJ Mills, I Kania-Korwel, J Fagan, LK McEvoy, GA Laughlin, E Barrett-Connor (2017) Excretion of the herbicide glyphosate in older adults between 1993 and 2016. *Jama* 318 (16):1610-1611.
- [132] S Parvez, RR Gerona, C Proctor, M Friesen, JL Ashby, JL Reiter, Z Lui, PD Winchester (2018) Glyphosate exposure in pregnancy and shortened gestational length: a prospective Indiana birth cohort study. *Environmental Health* 17 (1):1-12.
- [133] P Kongtip, N Nankongnab, R Phupancharoensuk, C Palarach, D Sujirarat, S Sangprasert, M Sermsuk, N Sawattrakool, SR Woskie (2017) Glyphosate and paraquat in maternal and fetal serums in Thai women. *J Agromedicine* 22 (3):282-289.
- [134] R Mesnage, MN Antoniou (2018) Ignoring adjuvant toxicity falsifies the safety profile of commercial pesticides. *Frontiers in Public Health* 5 (361).

- [135] N Defarge, E Takacs, VL Lozano, R Mesnage, J Spiroux de Vendomois, GE Seralini, A Szekacs (2016) Co-formulants in glyphosate-based herbicides disrupt aromatase activity in human cells below toxic levels. *Int J Environ Res Public Health* 13 (3):1-17.
- [136] E Dallegrave, FD Mantese, RT Oliveira, AJ Andrade, PR Dalsenter, A Langeloh (2007) Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. *Arch Toxicol* 81 (9):665-673.
- [137] RM Romano, MA Romano, MM Bernardi, PV Furtado, CA Oliveira (2010) Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. *Arch Toxicol* 84 (4):309-317.
- [138] W Cai, Y Ji, X Song, H Guo, L Han, F Zhang, X Liu, H Zhang, B Zhu, M Xu (2017) Effects of glyphosate exposure on sperm concentration in rodents: A systematic review and meta-analysis. *Environ Toxicol Pharmacol* 55:148-155.
- [139] J Nardi, PB Moras, C Koeppe, E Dallegrave, MB Leal, LG Rossato-Grando (2017) Prepubertal subchronic exposure to soy milk and glyphosate leads to endocrine disruption. *Food Chem Toxicol* 100:247-252.
- [140] N Benachour, H Sipahutar, S Moslemi, C Gasnier, C Travert, GE Seralini (2007) Time- and dose-dependent effects of roundup on human embryonic and placental cells. *Arch Environ Contam Toxicol* 53 (1):126-133.
- [141] S Richard, S Moslemi, H Sipahutar, N Benachour, GE Seralini (2005) Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. *Environ Health Perspect* 113 (6):716-720.
- [142] VL de Liz Oliveira Cavalli, D Cattani, CE Heinz Rieg, P Pierozan, L Zanatta, E Benedetti Parisotto, D Wilhelm Filho, FR Mena Barreto Silva, R Pessoa-Pureur, A Zamoner (2013) Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. *Free Radic Biol Med* 65:335-346.
- [143] E Cassault-Meyer, S Gress, GE Seralini, I Galeraud-Denis (2014) An acute exposure to glyphosate-based herbicide alters aromatase levels in testis and sperm nuclear quality. *Environ Toxicol Pharmacol* 38 (1):131-140.
- [144] MC Perego, LF Schutz, F Caloni, C Cortinovia, M Albonico, LJ Spicer (2017) Evidence for direct effects of glyphosate on ovarian function: glyphosate influences steroidogenesis and proliferation of bovine granulosa but not theca cells in vitro. *J Appl Toxicol* 37 (6):692-698.

- [145] J Varayoud, M Durando, JG Ramos, MM Milesi, PI Ingaramo, M Munoz-de-Toro, EH Luque (2017) Effects of a glyphosate-based herbicide on the uterus of adult ovariectomized rats. *Environ Toxicol* 32 (4):1191-1201.
- [146] GA Altamirano, MB Delconte, AL Gomez, PI Ingaramo, VL Bosquiazzo, EH Luque, M Munoz-de-Toro, L Kass (2018) Postnatal exposure to a glyphosate-based herbicide modifies mammary gland growth and development in Wistar male rats. *Food Chem Toxicol* 118:111-118.
- [147] S Thongprakaisang, A Thiantanawat, N Rangkadilok, T Suriyo, J Satayavivad (2013) Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. *Food Chem Toxicol* 59:129-136.
- [148] R Mesnage, A Phedonos, M Biserni, M Arno, S Balu, JC Corton, R Ugarte, MN Antoniou (2017) Evaluation of estrogen receptor alpha activation by glyphosate-based herbicide constituents. *Food Chem Toxicol* 108 (Pt A):30-42.
- [149] EPA (2015) EDSP: weight of evidence analysis of potential interaction with the estrogen, androgen or thyroid pathways. Chemical: glyphosate. Office of Pesticide Programs US EPA. <https://www.epa.gov/endocrine-disruption/endocrine-disruptor-screening-program-tier-1-screening-determinations-and> Acceso: 28 de Junio 2018.
- [150] IARC (2017) Some organophosphate insecticides and herbicides. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans* 112:321-412.
- [151] CJ Portier, BK Armstrong, BC Baguley, X Baur, I Belyaev, R Belle, F Belpoggi, A Biggeri, MC Bosland, P Bruzzi y col. (2016) Differences in the carcinogenic evaluation of glyphosate between the International Agency for Research on Cancer (IARC) and the European Food Safety Authority (EFSA). *J Epidemiol Community Health* 70 (8):741-745.
- [152] JV Tarazona, D Court-Marques, M Tiramani, H Reich, R Pfeil, F Istace, F Crivellente (2017) Glyphosate toxicity and carcinogenicity: a review of the scientific basis of the European Union assessment and its differences with IARC. *Arch Toxicol* 91 (8):2723-2743.
- [153] EFSA (2015) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA Journal* 13:4302.
- [154] M Eriksson, L Hardell, M Carlberg, M Åkerman (2008) Pesticide exposure as risk factor for non-Hodgkin lymphoma including histopathological subgroup analysis. *International Journal of Cancer* 123 (7):1657-1663.

- [155] AJ De Roos, SH Zahm, KP Cantor, DD Weisenburger, FF Holmes, LF Burmeister, A Blair (2003) Integrative assessment of multiple pesticides as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men. *Occupational and Environmental Medicine* 60 (9):1-9.
- [156] HH McDuffie, P Pahwa, JR McLaughlin, JJ Spinelli, S Fincham, JA Dosman, D Robson, LF Skinnider, NW Choi (2001) Non-Hodgkin's lymphoma and specific pesticide exposures in men: cross-Canada study of pesticides and health. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10 (11):1155-1163.
- [157] J George, S Prasad, Z Mahmood, Y Shukla (2010) Studies on glyphosate-induced carcinogenicity in mouse skin: a proteomic approach. *J Proteomics* 73 (5):951-964.
- [158] EPA (2017) Glyphosate. Dietary exposure analysis in support of registration review. Disponible en: <https://www.regulations.gov/document?D=EPA-HQ-OPP-2009-0361-0071> Acceso: 12 Abril 2018.
- [159] LC Junqueira, LM Junqueira (1993), *Técnicas básicas en citología e histología*, Livraria Santos Com. Imp. Ltda., São Paulo, Brasil.
- [160] MM Muñoz de Toro, MV Maffini, L Kass, EH Luque (1998) Proliferative activity and steroid hormone receptor status in male breast carcinoma. *J Steroid Biochem Mol Biol* 67 (4):333-339.
- [161] ER Weibel (1969) Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int Rev Cytol* 26:235-302.
- [162] JG Ramos, J Varayoud, C Sonnenschein, AM Soto, M Muñoz De Toro, EH Luque (2001) Prenatal exposure to low doses of bisphenol A alters the periductal stroma and glandular cell function in the rat ventral prostate. *Biol Reprod* 65 (4):1271-1277.
- [163] JG Ramos, J Varayoud, VL Bosquiazzo, EH Luque, M Muñoz-de-Toro (2002) Cellular turnover in the rat uterine cervix and its relationship to estrogen and progesterone receptor dynamics. *Biol Reprod* 67 (3):735-742.
- [164] P Chomczynski, N Sacchi (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162 (1):156-159.
- [165] R Higuchi, C Fockler, G Dollinger, R Watson (1993) Kinetic PCR analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Bio/Technology* 11:1-5.
- [166] S Cikos, A Bukovska, J Koppel (2007) Relative quantification of mRNA: comparison of methods currently used for real-time PCR data analysis. *BMC Mol Biol* 8 (113):1-14.

- [167] E Missaghian, P Kempna, B Dick, A Hirsch, R Alikhani-Koupaei, B Jegou, PE Mullis, BM Frey, CE Fluck (2009) Role of DNA methylation in the tissue-specific expression of the CYP17A1 gene for steroidogenesis in rodents. *J Endocrinol* 202 (1):99-109.
- [168] AA Kazi, RD Koos (2007) Estrogen-induced activation of hypoxia-inducible factor-1alpha, vascular endothelial growth factor expression, and edema in the uterus are mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Endocrinology* 148 (5):2363-2374.
- [169] M Bottner, W Wuttke (2005) Chronic treatment with low doses of estradiol affects pituitary and thyroid function in young and middle-aged ovariectomized rats. *Biogerontology* 6 (4):261-269.
- [170] M Yoshida, K Inoue, M Takahashi (2015) Predictive modes of action of pesticides in uterine adenocarcinoma development in rats. *J Toxicol Pathol* 28 (4):207-216.
- [171] J Varayoud, JG Ramos, VL Bosquiazzo, M Muñoz-de-Toro, EH Luque (2008) Developmental exposure to bisphenol A impairs the uterine response to ovarian steroids in the adult. *Endocrinology* 149 (11):5848-5860.
- [172] RR Newbold, BC Bullock, JA McLachlan (1990) Uterine adenocarcinoma in mice following developmental treatment with estrogens: a model for hormonal carcinogenesis. *Cancer Res* 50 (23):7677-7681.
- [173] RR Newbold, WN Jefferson, E Padilla-Burgos, BC Bullock (1997) Uterine carcinoma in mice treated neonatally with tamoxifen. *Carcinogenesis* 18 (12):2293-2298.
- [174] A Kobayashi, RR Behringer (2003) Developmental genetics of the female reproductive tract in mammals. *Nature Reviews Genetics* 4:969-980.
- [175] CL Walker (2011) Epigenomic reprogramming of the developing reproductive tract and disease susceptibility in adulthood. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 91 (8):666-671.
- [176] A Yoshida, RR Newbold, D Dixon (1999) Effects of neonatal diethylstilbestrol (DES) exposure on morphology and growth patterns of endometrial epithelial cells in CD-1 mice. *Toxicol Pathol* 27 (3):325-333.
- [177] WJ Hendry, 3rd, WW Leavitt (1993) Altered morphogenesis of the immature hamster uterus following neonatal exposure to diethylstilbestrol. *Differentiation* 52 (3):221-227.

- [178] S Yamashita (2006) Expression of estrogen-regulated genes during development in the mouse uterus exposed to diethylstilbestrol neonatally. *Curr Pharm Des* 12 (12):1505-1520.
- [179] R Ma, DA Sassoon (2006) PCBs exert an estrogenic effect through repression of the Wnt7a signaling pathway in the female reproductive tract. *Environ Health Perspect* 114 (6):898-904.
- [180] EFSA (2017) Peer review of the pesticide risk assessment of the potential endocrine disrupting properties of glyphosate. *EFSA Journal* 15 (9):1-20.
- [181] DA Sassoon (1999) Wnt genes and endocrine disruption of the female reproductive tract: a genetic approach. *Mol Cell Endocrinol* 158 (1-2):1-5.
- [182] C Miller, K Dehenhardt, D Sassoon (1998) Fetal exposure to DES results in de-regulation of Wnt7a during uterine morphogenesis. *Nat Genet* 20 (3):228-230.
- [183] M Mallo, CR Alonso (2013) The regulation of Hox gene expression during animal development. *Development* 140 (19):3951-3963.
- [184] JG Bromer, Y Zhou, MB Taylor, L Doherty, HS Taylor (2010) Bisphenol A exposure in utero leads to epigenetic alterations in the developmental programming of uterine estrogen response. *Faseb J* 24 (7):2273-2280.
- [185] CR Vakoc, MM Sachdeva, H Wang, GA Blobel (2006) Profile of histone lysine methylation across transcribed mammalian chromatin. *Mol Cell Biol* 26 (24):9185-9195.
- [186] T Kouzarides (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128 (4):693-705.
- [187] Y Kondo (2009) Epigenetic cross-talk between DNA methylation and histone modifications in human cancers. *Yonsei Med J* 50 (4):455-463.
- [188] S Sharma, TK Kelly, PA Jones (2010) Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31 (1):27-36.
- [189] M Marin, A Karis, P Visser, F Grosveld, S Philipsen (1997) Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell* 89 (4):619-628.
- [190] R Martin, MB Taylor, G Krikun, C Lockwood, GE Akbas, HS Taylor (2007) Differential cell-specific modulation of HOXA10 by estrogen and specificity protein 1 response elements. *J Clin Endocrinol Metab* 92 (5):1920-1926.

- [191] ME Donohoe, X Zhang, L McGinnis, J Biggers, E Li, Y Shi (1999) Targeted disruption of mouse Yin Yang 1 transcription factor results in peri-implantation lethality. *Mol Cell Biol* 19 (10):7237-7244.
- [192] MP Luke, G Sui, H Liu, Y Shi (2006) Yin Yang 1 physically interacts with Hoxa11 and represses Hoxa11-dependent transcription. *J Biol Chem* 281 (44):33226-33232.
- [193] Y Wu, G Halverson, Z Basir, E Strawn, P Yan, SW Guo (2005) Aberrant methylation at HOXA10 may be responsible for its aberrant expression in the endometrium of patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* 193 (2):371-380.
- [194] H Yoshida, R Broaddus, W Cheng, S Xie, H Naora (2006) Deregulation of the HOXA10 homeobox gene in endometrial carcinoma: role in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res* 66 (2):889-897.
- [195] M Fambrini, C Bussani, F Sorbi, A Pieralli, R Cioni (2013) Methylation of the HOXA10 homeobox gene promoter is associated with endometrial cancer: a pilot study. *J Obstet Gynaecol* 33 (5):519-520.
- [196] JB Monteiro, M Colon-Diaz, M Garcia, S Gutierrez, M Colon, E Seto, J Laboy, I Flores (2014) Endometriosis is characterized by a distinct pattern of histone 3 and histone 4 lysine modifications. *Reprod Sci* 21 (3):305-318.
- [197] MS Smith, ME Freeman, JD Neill (1975) The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96 (1):219-226.
- [198] M Guerrero Schimpf, MM Milesi, PI Ingaramo, EH Luque, J Varayoud (2017) Neonatal exposure to a glyphosate based herbicide alters the development of the rat uterus. *Toxicology* 376:1-14.
- [199] WJ Hendry, 3rd, X Zheng, WW Leavitt, WS Branham, DM Sheehan (1997) Endometrial hyperplasia and apoptosis following neonatal diethylstilbestrol exposure and subsequent estrogen stimulation in both host and transplanted hamster uteri. *Cancer Res* 57 (10):1903-1908.
- [200] WW Leavitt, RW Evans, WJ Hendry, 3rd (1981) Etiology of DES-induced uterine tumors in the Syrian hamster. *Adv Exp Med Biol* 138:63-86.
- [201] W Winuthayanon, SC Hewitt, KS Korach (2014) Uterine epithelial cell estrogen receptor alpha-dependent and -independent genomic profiles that underlie estrogen responses in mice. *Biol Reprod* 91 (5):1-10.

- [202] W Winuthayanon, SC Hewitt, GD Orvis, RR Behringer, KS Korach (2010) Uterine epithelial estrogen receptor alpha is dispensable for proliferation but essential for complete biological and biochemical responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (45):19272-19277.
- [203] AA Tica, OS Tica, CV Georgescu, D Pirici, M Bogdan, T Ciurea, SS Mogoanta, CC Georgescu, AC Comanescu, TA Balseanu y col. (2016) GPER and ERalpha expression in abnormal endometrial proliferations. *Rom J Morphol Embryol* 57 (2):413-418.
- [204] SE Bulun, YH Cheng, ME Pavone, Q Xue, E Attar, E Trukhacheva, H Tokunaga, H Utsunomiya, P Yin, X Luo y col. (2010) Estrogen receptor-beta, estrogen receptor-alpha, and progesterone resistance in endometriosis. *Semin Reprod Med* 28 (1):36-43.
- [205] DK Hapangama, AM Kamal, JN Bulmer (2015) Estrogen receptor beta: the guardian of the endometrium. *Hum Reprod Update* 21 (2):174-193.
- [206] C Gasnier, C Dumont, N Benachour, E Clair, MC Chagnon, GE Seralini (2009) Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology* 262 (3):184-191.
- [207] PH van der Horst, Y Wang, M van der Zee, CW Burger, LJ Blok (2012) Interaction between sex hormones and WNT/Beta-catenin signal transduction in endometrial physiology and disease. *Mol Cell Endocrinol* 358 (2):176-184.
- [208] FH Brembeck, M Rosario, W Birchmeier (2006) Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev* 16 (1):51-59.
- [209] Y Wang, M van der Zee, R Fodde, LJ Blok (2010) Wnt/Beta-catenin and sex hormone signaling in endometrial homeostasis and cancer. *Oncotarget* 1 (7):674-684.
- [210] R Gaetje, U Holtrich, T Karn, E Cikrit, K Engels, A Rody, M Kaufmann (2007) Characterization of WNT7A expression in human endometrium and endometriotic lesions. *Fertil Steril* 88 (6):1534-1540.
- [211] Y Liu, F Meng, Y Xu, S Yang, M Xiao, X Chen, G Lou (2013) Overexpression of Wnt7a is associated with tumor progression and unfavorable prognosis in endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer* 23 (2):304-311.
- [212] AG Gunin, VU Emelianov, IU Mironkin, MP Morozov, AS Tolmachev (2004) Lithium treatment enhances estradiol-induced proliferation and hyperplasia formation in the uterus of mice. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 114 (1):83-91.

- [213] M Saegusa, M Hashimura, T Yoshida, I Okayasu (2001) Beta- Catenin mutations and aberrant nuclear expression during endometrial tumorigenesis. *Br J Cancer* 84 (2):209-217.
- [214] MM Florescu, D Pirici, CE Simionescu, AE Stepan, C Margaritescu, S Tudorache, RN Ciurea (2016) E-cadherin and beta-catenin immunoexpression in endometrioid endometrial carcinoma. *Rom J Morphol Embryol* 57 (4):1235-1240.
- [215] M Guarino, B Rubino, G Ballabio (2007) The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathology* 39 (3):305-318.
- [216] M Muñoz-de-Toro, CM Markey, PR Wadia, EH Luque, BS Rubin, C Sonnenschein, AM Soto (2005) Perinatal exposure to bisphenol-A alters peripubertal mammary gland development in mice. *Endocrinology* 146 (9):4138-4147.
- [217] PR Wadia, LN Vandenberg, CM Schaeberle, BS Rubin, C Sonnenschein, AM Soto (2007) Perinatal bisphenol A exposure increases estrogen sensitivity of the mammary gland in diverse mouse strains. *Environ Health Perspect* 115 (4):592-598.
- [218] N Acevedo, B Davis, CM Schaeberle, C Sonnenschein, AM Soto (2013) Perinatally administered bisphenol A as a potential mammary gland carcinogen in rats. *Environmental Health Perspectives* 121 (9):1040-1046.
- [219] L Vigezzi, VL Bosquiazzo, L Kass, JG Ramos, M Muñoz-de-Toro, EH Luque (2015) Developmental exposure to bisphenol A alters the differentiation and functional response of the adult rat uterus to estrogen treatment. *Reprod Toxicol* 52:83-92.
- [220] SM Ho, WY Tang, J Belmonte de Frausto, GS Prins (2006) Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Res* 66 (11):5624-5632.
- [221] RR Newbold, WN Jefferson, E Padilla-Banks, J Haseman (2004) Developmental exposure to diethylstilbestrol (DES) alters uterine response to estrogens in prepubescent mice: low versus high dose effects. *Reprod Toxicol* 18 (3):399-406.
- [222] SA Krieg, LK Shahine, RB Lathi (2016) Environmental exposure to endocrine-disrupting chemicals and miscarriage. *Fertil Steril* 106 (4):941-947.
- [223] X Wang, X Chen, X Feng, F Chang, M Chen, Y Xia, L Chen (2015) Triclosan causes spontaneous abortion accompanied by decline of estrogen sulfotransferase activity in humans and mice. *Sci Rep* 5 (18252):1-11.

- [224] RC Lajmanovich, MT Sandoval, PM Peltzer (2003) Induction of mortality and malformation in *Scinax nasicus* tadpoles exposed to glyphosate formulations. *Bull Environ Contam Toxicol* 70 (3):612-618.
- [225] A Paganelli, V Gnazzo, H Acosta, SL Lopez, AE Carrasco (2010) Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chem Res Toxicol* 23 (10):1586-1595.
- [226] NM Roy, J Ochs, E Zambrzycka, A Anderson (2016) Glyphosate induces cardiovascular toxicity in *Danio rerio*. *Environ Toxicol Pharmacol* 46:292-300.
- [227] MM Milesi, V Lorenz, G Pacini, MR Repetti, LD Demonte, J Varayoud, EH Luque (2018) Perinatal exposure to a glyphosate-based herbicide impairs female reproductive outcomes and induces second-generation adverse effects in Wistar rats. *Arch Toxicol* 92 (8):2629-2643.
- [228] TE Arbuckle, Z Lin, LS Mery (2001) An exploratory analysis of the effect of pesticide exposure on the risk of spontaneous abortion in an Ontario farm population. *Environ Health Perspect* 109 (8):851-857.
- [229] X Li, C Shen, X Liu, J He, Y Ding, R Gao, X Mu, Y Geng, Y Wang, X Chen (2017) Exposure to benzo[a]pyrene impairs decidualization and decidual angiogenesis in mice during early pregnancy. *Environ Pollut* 222:523-531.
- [230] M Fernandez, M Bianchi, V Lux-Lantos, C Libertun (2009) Neonatal exposure to bisphenol A alters reproductive parameters and gonadotropin releasing hormone signaling in female rats. *Environ Health Perspect* 117 (5):757-762.
- [231] M Fernandez, N Bourguignon, V Lux-Lantos, C Libertun (2010) Neonatal exposure to bisphenol A and reproductive and endocrine alterations resembling the polycystic ovarian syndrome in adult rats. *Environ Health Perspect* 118 (9):1217-1222.
- [232] L Monje, J Varayoud, M Muñoz-de-Toro, EH Luque, JG Ramos (2010) Exposure of neonatal female rats to bisphenol A disrupts hypothalamic LHRH pre-mRNA processing and estrogen receptor alpha expression in nuclei controlling estrous cyclicity. *Reprod Toxicol* 30 (4):625-634.
- [233] AE Armenti, AM Zama, L Passantino, M Uzumcu (2008) Developmental methoxychlor exposure affects multiple reproductive parameters and ovarian folliculogenesis and gene expression in adult rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 233 (2):286-296.
- [234] GE Seralini, E Clair, R Mesnage, S Gress, N Defarge, M Malatesta, D Hennequin, JS de Vendomois (2014) Republished study: long-term toxicity of a

Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. *Environ Sci Eur* 26 (1):1-17.

[235] I Palmlund (1996) Exposure to a xenoestrogen before birth: the diethylstilbestrol experience. *J Psychosom Obstet Gynaecol* 17 (2):71-84.

[236] RR Newbold, AB Moore, D Dixon (2002) Characterization of uterine leiomyomas in CD-1 mice following developmental exposure to diethylstilbestrol (DES). *Toxicol Pathol* 30 (5):611-616.

[237] RR Newbold, WN Jefferson, E Padilla-Banks (2009) Prenatal exposure to bisphenol A at environmentally relevant doses adversely affects the murine female reproductive tract later in life. *Environ Health Perspect* 117 (6):879-885.

[238] RR Newbold, WN Jefferson, E Padilla-Banks (2007) Long-term adverse effects of neonatal exposure to bisphenol A on the murine female reproductive tract. *Reprod Toxicol* 24 (2):253-258.

[239] TA Katz, Q Yang, LS Treviño, CL Walker, A Al-Hendy (2016) Endocrine disrupting chemicals and uterine fibroids. *Fertility and sterility* 106 (4):967-977.

[240] M Eriksson, L Hardell, HO Adami (1990) Exposure to dioxins as a risk factor for soft tissue sarcoma: a population-based case-control study. *J Natl Cancer Inst* 82 (6):486-490.

[241] M Kogevinas, H Becher, T Benn, PA Bertazzi, P Boffetta, HB Bueno-de-Mesquita, D Coggon, D Colin, D Flesch-Janys, M Fingerhut y col. (1997) Cancer mortality in workers exposed to phenoxy herbicides, chlorophenols, and dioxins. An expanded and updated international cohort study. *Am J Epidemiol* 145 (12):1061-1075.

[242] LN Vandenberg, B Blumberg, MN Antoniou, CM Benbrook, L Carroll, T Colborn, LG Everett, M Hansen, PJ Landrigan, BP Lanphear y col. (2017) Is it time to reassess current safety standards for glyphosate-based herbicides? *J Epidemiol Community Health* 71 (6):613-618.

[243] Ley General de Ambiente N° 25675, Artículo 4, 6 de Noviembre de 2002.