

EFFECTO DE UN HERBICIDA A BASE DE GLIFOSATO SOBRE EL ISTMO DELOVIDUCTO DE CORDERAS PREPUBERALES.

Alegre, Ana Laura, Lovera, Lourdes

*Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL), Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas,
Universidad Nacional del Litoral – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Santa
Fe, Argentina.*

Directora: Paola I. Ingaramo

Codirector: Ramiro Alarcón

Área: Ciencias Biológicas

Palabras clave: Oviducto, Istmo, Glifosato, Corderas

INTRODUCCIÓN

Los herbicidas a base de glifosato (HBGs), o formulaciones de herbicidas que contienen glifosato (N-fosfonometil glicina) como principio activo, representan aproximadamente el 80% del mercado en nuestro país [Castro Berman y col., 2018]. Estas formulaciones tienen un amplio espectro de acción (no selectivo) y se utilizan para erradicar las malezas [Benbrook, 2016]. Se estima que la utilización de los HBGs se ha incrementado por la aparición de cultivos genéticamente modificados tolerantes al herbicida (como soja, maíz y algodón) y por la expansión de las áreas sembradas tanto en nuestro país como en el resto del mundo [Benbrook, 2016; Vandenberg y col. 2017]. Debido al frecuente e intensivo uso del glifosato, se lo podría considerar como un compuesto pseudo-persistente [Primost y col., 2017]. Se han descrito niveles de glifosato, y su principal metabolito (el ácido aminometilfosfónico, AMPA), en diferentes matrices (aguas superficiales, sedimentos y suelo) [Alarcón, 2020]. Por otro lado, también se han reportado residuos de glifosato en carne, granos, frutas y vegetales [Alarcón, 2020]. En los últimos años se han documentado efectos inducidos por glifosato y sus formulaciones que indicarían una posible actividad como perturbador endócrino [Ingaramo y col., 2020]. Asimismo, hemos demostrado alteraciones permanentes histomorfológicas y moleculares en útero y ovario de corderas expuestas prenatalmente a HBGs [Alarcón y col., 2020].

El tracto reproductor de la cordera se lo puede dividir en ovarios, oviductos, útero, cérvix y vagina. El oviducto es un órgano tubular que conecta el ovario y el útero. Es donde se transportan las gametas (óvulos y espermatozoides), se realiza la fertilización del óvulo y el desarrollo del embrión antes de la implantación. Está compuesto, estructuralmente, por mesosalpinx (capa externa de tejido conectivo), miosalpinx (músculo liso) y endosalpinx (estroma y epitelio). Funcionalmente se divide, desde la región caudal hacia craneal en: unión uterotubárica, istmo, ampolla, infundíbulo y fimbrias. El istmo funciona como reservorio de esperma y permite la entrada gradual del mismo a la ampolla. Esta función se favorece debido a que esta región posee una capa gruesa de miosalpinx [Barton y col., 2020].

Considerando que los herbicidas a base de glifosato son ampliamente utilizados y generan efectos en la salud reproductiva, nuestra hipótesis propone que la exposición posnatal temprana a bajas dosis de un herbicida a base de glifosato induce alteraciones permanentes en el istmo oviductal, pudiendo afectar la fertilidad de la hembra.

Título del proyecto: Exposición prenatal/neonatal a agroquímicos: Su efecto sobre el desarrollo y funcionalidad del ovario

Instrumento: CAI+D

Año de la convocatoria: 2016

Organismo financiador: UNL

Director: Enrique H. Luque

OBJETIVOS

Objetivo general

Investigar en corderas expuestas a un herbicida a base de glifosato (HBG) durante el periodo posnatal temprano (período de alta sensibilidad a perturbadores endocrinos), los efectos permanentes sobre el desarrollo oviductal.

Objetivos específicos

Evaluar en corderas los efectos de la exposición posnatal temprana al HBG sobre el istmo oviductal, luego de finalizado el tratamiento, estudiando:

- el espesor del miosalpinx.
- la tasa de proliferación celular en el miosalpinx.
- la expresión de proteínas y de genes involucrados en el desarrollo de la capa muscular

METODOLOGÍA

Animales y tratamiento

Se utilizaron corderas cruce (Corriedale x Hampshire Down) nacidas durante los meses de agosto y septiembre de 2018 provenientes de partos únicos. Las hembras se asignaron aleatoriamente a uno de los siguientes grupos experimentales:

- i) Control: Solución fisiológica (vehículo) administrada por vía subcutánea (n = 6);
- ii) FSH: pFSH (Folltropin) inyectada por vía intramuscular 50 mg/día durante 3 días (n = 6);
- iii) HBG: Formulación de un HBG (dosis de 1 mg/kg/día) en solución fisiológica por víasubcutanea (n = 4);
- iv) GBH + FSH: Formulación de un HBG (dosis de 1 mg/kg/día) en solución fisiológica por víasubcutánea + tratamiento con pFSH (Folltropin) por vía im 50 mg/día durante 3 días (n = 5).

Desde el día postnatal 1 (DPN1) al DPN14 las corderas recibieron tratamiento con vehículo (solución fisiológica, grupo control), 1mg/kg/día de HBG (grupo HBG). Finalizada la exposición al HBG, a un grupo de corderas se les administró pFSH en 2 inyecciones cada 12 hs durante tres días (DPN41-42-43). Al DPN45 se obtuvieron muestras del istmo para alcanzar los objetivos propuestos. De cada animal, un istmo fue fijado con formol buffer e incluido en parafina para evaluar histomorfología y la expresión de proteínas por inmunohistoquímica. El otro istmo fue colocado en N₂ líquido y conservado a -80 °C para determinar la expresión de genes involucrados en el desarrollo del oviducto. Los istmos oviductales de cada animal para histología o biología molecular se asignaron aleatoriamente.

Características histomorfológicas del istmo.

Para la caracterización histomorfológica del istmo, cortes seriados de 5 µm de espesor transversales al eje mayor del oviducto fueron teñidos con picrosirius-hematoxilina para evaluar el espesor del miosalpinx. La determinación del espesor del miosalpinx se realizó mediante el análisis de las imágenes digitalizadas (10 imágenes por muestra capturadas al azar) utilizando el software FIJI [Schindelin y col., 2012].

Evaluación de proliferación celular y de la expresión proteica de α -actina del músculo liso.

La proliferación celular se determinó por inmunohistoquímica utilizando Ki67 como marcador de células en proliferación, empleando un anticuerpo generado y validado en nuestro laboratorio [Rivera y col., 2011]. La proliferación celular se evaluó por análisis de imágenes digitalizadas empleando el software FIJI y cuantificando los núcleos Ki67-positivos (células proliferantes) con respecto al total de núcleos (positivos y negativos) en el miosalpinx.

La evaluación de la expresión de α -AML se realizó mediante observación de la inmunomarcación de la proteína utilizando un *score* (previamente establecido) de tres intensidades: débil (+), moderada (++) e intensa (+++) realizado, a doble ciego, de forma independiente por tres observadores.

Expresión génica mediante qRT-PCR.

- Extracción de ARN total y transcripción reversa

Previa homogenización del tejido oviductal, se realizó la extracción de ARN total utilizando el reactivo comercial TRIzol Reagent® (Invitrogen). La concentración de ARN total en las muestras se determinó mediante la lectura en espectrofotómetro (NanoDrop Lite, Thermofisher) a una longitud de onda de 260 nm. Solamente se utilizaron aquellas muestras con una relación de absorbancia 260/280 mayor a 1,9. Los ARN obtenidos fueron conservados a -80 °C. Los ARN extraídos fueron retrotranscritos para obtener los correspondientes ADN copia (ADNc) empleando protocolos previamente optimizados [Ingaramo y col., 2017].

- PCR en tiempo real

Mediante qRT-PCR, a partir del ADNc, se determinó la expresión del receptor de estrógenos alfa (RE α) y del receptor de progesterona (RP). Como control interno (gen de referencia o *housekeeping*) se utilizó la determinación del ARNm del gen de la proteína β -Actina. Para la reacción se empleó el reactivo HOT FIREPol EvaGreen® (Solis Biodyne) y el termociclador StepOne (Life Technologies), aplicando protocolos previamente optimizados [Ingaramo y col., 2017].

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Luego del estudio histomorfológico de la región muscular del istmo y la determinación del espesor del miosalpinx, no se observan diferencias entre los distintos grupos experimentales. En la proliferación celular no se observaron diferencias entre los grupos experimentales. Asimismo, no hubo alteraciones en los niveles de expresión de α -AML, ni en la de los receptores esteroideos (RE α y RP); no obstante, se observa una tendencia a menor expresión de RE α y RP en el grupo de corderas control superestimuladas. Estos resultados sugieren que la exposición neonatal a una baja dosis de un HBG no altera el desarrollo del miosalpinx en la región del istmo del oviducto. Esto permite suponer que la fertilización del ovocito no sería afectada.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Alarcón, R. 2020. Exposición posnatal a agroquímicos sobre el desarrollo y la diferenciación del útero.

Alarcón, R; Rivera, OE; Ingaramo, PI; Tschopp, MV; Dioguardi, GH; Milesi, MM; Muñoz-de-

Toro, M., Luque, EH. (2020). Neonatal exposure to a glyphosate-based herbicide alters the uterine differentiation of prepubertal ewe lambs. *Environmental Pollution*, 265, 114874.

Barton, BE; Herrera, GG; Anamthathmakula, P; Rock, JK; Willie, AM; Harris, EA; & Winuthayanon, W. 2020. Roles of steroid hormones in oviductal function. *Reproduction*, 159(3), R125-R137.

Benbrook, CM. 2016 Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe* 28:3.

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

Heap, I; Duke, SO. 2018. Overview of glyphosate-resistant weeds worldwide. *Pest Manag Sci* 74 (5):1040-1049.

Ingaramo, P; Alarcón, R; Muñoz-de-Toro, M. y Luque, EH. 2020. Are glyphosate and glyphosate-based herbicides endocrine disruptors that alter female fertility?. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 110934.

Ingaramo, PI; Varayoud, J; Milesi, MM; Schimpf, MG; Alarcón, R; Muñoz-de-Toro, M; y Luque, EH. 2017. La exposición neonatal a un herbicida a base de glifosato altera la decidualización uterina en ratas. *Toxicología Reproductiva*, 73, 87-95.

Primost, JE; Marino, DJG; Aparicio, VC; Costa, JL; Carriquiriborde, P. 2017 Glyphosate and AMPA, «pseudo-persistent» pollutants under real-world agricultural management practices in the Mesopotamic Pampas agroecosystem, Argentina. *Environ Pollut* 229:771-779.

Rivera, OE; Varayoud, J; Rodríguez, HA; Muñoz-de-Toro, M; EH Luque. 2011. Neonatal exposure to bisphenol A or diethylstilbestrol alters the ovarian follicular dynamics in the lamb. *Reprod Toxicol* 32 (3):304-312.

Schindelin, J; Arganda-Carreras, I; Frise, E; Kaynig, V; Longair, M; Pietzsch, T; y Cardona, A. 2012. Fiji: una plataforma de código abierto para el análisis de imágenes biológicas. *Métodos de la naturaleza* 9 (7), 676-682.

Vandenberg, LN; Blumberg, B; Antoniou, MN; Benbrook, CM; Carroll, L; Colborn, T; Everett, LG; Hansen, M; Landrigan, PJ; Lanphear, BP; Mesnage, R; vom Saal, FS et al. 2017. Is it time to reassess current safety standards for glyphosate-based herbicides? *J Epidemiol Community Health* 71(6):613-618.