



LA EXPOSICIÓN PERINATAL A GLIFOSATO PURO O UNA FORMULACIÓN COMERCIAL ALTERA MECANISMOS MOLECULARES UTERINOS INVOLUCRADOS EN LA IMPLANTACIÓN EMBRIONARIA

Cadaviz Fernandez, Dalma

Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL) CONICET – UNL

Directora: Milesi, María Mercedes

Codirectora: Varayoud, Jorgelina

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Glifosato, Útero, Subfertilidad.

INTRODUCCIÓN

La exposición ambiental y ocupacional a pesticidas de uso agrícola, como los herbicidas a base de glifosato, se ha asociado con infertilidad (Mesnage et al., 2014). Uno de los principales problemas que se traducen en subfertilidad o infertilidad femenina están asociados con fallas en la implantación embrionaria.

OBJETIVOS

1. Investigar si la subfertilidad caracterizada por fallas en la implantación embrionaria previamente detectada en animales expuestos perinatalmente a una formulación comercial a base de glifosato (HBG), podría estar mediada por alteraciones en parámetros hormonales y/o mecanismos moleculares uterinos que regulan el proceso de implantación.
2. Evaluar los efectos de la exposición a glifosato puro (Gli) sobre la fertilidad, y en caso de resultar afectada, investigar si alteraciones hormonales y/o uterinas podrían estar implicadas.
3. En base a los objetivos 1 y 2, nos proponemos realizar un estudio comparativo de los efectos de glifosato puro vs. un formulado comercial, a fin de establecer si los efectos son causados por el principio activo (glifosato), los co-formulados o ambos actuando en forma sinérgica.

METODOLOGÍA

Diseño experimental

Ratas hembras (F0) de la cepa Wistar fueron preñadas y distribuidas al azar en 3 grupos experimentales: Control, HBG2 y Gli2. Cada uno de estos grupos fue expuesto desde el día de gestación 9 (DG9) hasta el final de la lactancia (día lactacional 21) a una pasta de alimento con el agregado de agua (vehículo, Control), un herbicida a base de glifosato en una dosis de 2 mg de glifosato/kg/día (HBG2), o una solución acuosa de glifosato grado técnico en una dosis de 2 mg/kg/día (Gli2). La dosis de glifosato utilizada se seleccionó teniendo en cuenta que se encuentra en el orden de magnitud de la dosis segura (RfD, 1 mg/kg/día) establecida por la Agencia de Protección Ambiental de EE. UU (EPA, 2017).

Cuando las crías hembras F1 alcanzaron la madurez sexual, fueron preñadas y sacrificadas en dos etapas de la gestación para evaluar: *i*) la capacidad reproductiva en DG19, y *ii*) parámetros hormonales y mecanismos moleculares uterinos que son claves en el proceso de implantación del embrión en DG5 (periodo pre-implantatorio).

Título del proyecto: Estudio comparativo de los efectos del glifosato puro y sus formulaciones comerciales sobre el desarrollo embrionario y la receptividad uterina.

Instrumento: PICT

Año convocatoria: 2016

Organismo financiador: CONICET

Directora: María Mercedes Milesi

Evaluación de la capacidad reproductiva en DG19

Las hembras F1 de 90 días de edad fueron colocadas con machos de fertilidad comprobada. Aquellas hembras 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 sometidas a un test de fertilidad en DG19 para evaluar: el número de cuerpos lúteos (CLs) en los ovarios, y los sitios de implantación y de reabsorciones fetales en los cuernos uterinos. Por último, se determinó la tasa de pérdidas embrionarias pre-implantatorias, definida como: $[(N^{\circ} \text{ CLs} - N^{\circ} \text{ sitios de implantación}) / N^{\circ} \text{ CLs}] \times 100$ (Milesi et al., 2018).

Evaluación de parámetros hormonales y mecanismos moleculares uterinos que regulan el proceso de implantación en DG5

Obtención de muestras: Un grupo de hembras F1 preñadas sometidas a los diferentes tratamientos descriptos, fueron sacrificadas en la mañana del DG5. Al momento del sacrificio, se recogió sangre para la obtención de suero y se obtuvieron muestras de útero. Porciones de útero se congelaron inmediatamente en N2 líquido y se mantuvieron en freezer (-80°C) hasta la extracción del ARN total, mientras que otra porción del órgano se fijó en formaldehído 4% (6 hs) y se procesó hasta su inclusión en parafina para posterior análisis de inmunohistoquímica (IHQ) (Milesi et al., 2012).

Cuantificación de los niveles séricos de hormonas esteroideas sexuales: Se determinaron los niveles séricos de estradiol (E2) y progesterona (Pg) mediante RIA y ELISA, respectivamente, utilizando kits comerciales (Guerrero Schimpf et al., 2018).

Determinación de la expresión uterina de moléculas claves en el proceso de implantación: En cortes histológicos de útero de 5 µm de espesor, se determinó la expresión proteica de los receptores de hormonas esteroideas, a saber, receptor de estrógenos alfa (REα) y receptor de progesterona (RP), por IHQ. La cuantificación se realizó con un sistema de análisis de imágenes digitalizadas, y los resultados se expresaron como densidad óptica integrada (DOI).

Mediante RT-qPCR, se determinó la expresión del ARNm de Hoxa10 (Homeobox A10) y de sus moléculas blanco EMX2 (empty spiracles homeobox 2) e integrina beta 3 (ITGβ3), estrechamente vinculados al proceso de implantación. La expresión relativa de cada gen se determinó utilizando el método de la curva estándar relativa (Milesi et al., 2017).

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como el valor promedio ± SEM. Los datos del test de fertilidad se analizaron mediante el test de varianza (ANOVA) seguido del post-test de Tukey para la posterior comparación de medias. El resto de los datos se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal - Wallis, y se utilizó el post-test de Dunn para la comparación de pares de grupos. Las diferencias fueron consideradas significativas cuando $P < 0.05$.

RESULTADOS

La exposición perinatal a HBG o Gli provoca subfertilidad

La exposición perinatal a HBG2 y Gli2 no afectó el porcentaje de hembras preñadas (Figura 1-A), y el test de fertilidad no reveló diferencias en el número de cuerpos lúteos (Figura 1-B), ni de sitios de reabsorción (Figura 1-C). Sin embargo, se detectó un incremento en el porcentaje de pérdidas embrionarias pre-implantatorias en los grupos expuestos a HBG2 y

Gli2 (Figura 1-D), como consecuencia de una disminución en el número de sitios de implantación (Figura 2).

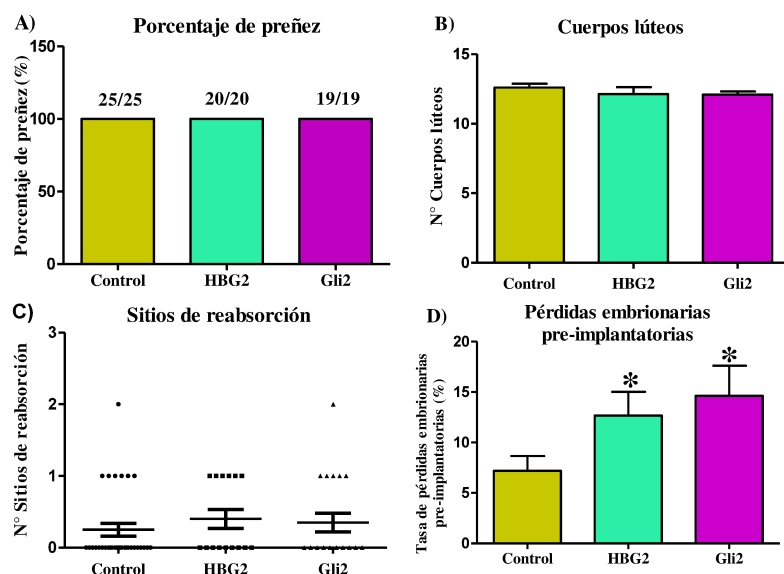


FIGURA 1. Capacidad reproductiva de hembras F1 expuestas perinatalmente a HBG2 o Gli2. A) Porcentaje de hembras preñadas. B) Número de cuerpos lúteos. C) Número de sitios de reabsorciones fetales. D) Tasa de pérdida embrionaria pre-implantatoria. (Promedio \pm SEM; * $p < 0,05$ vs. control)

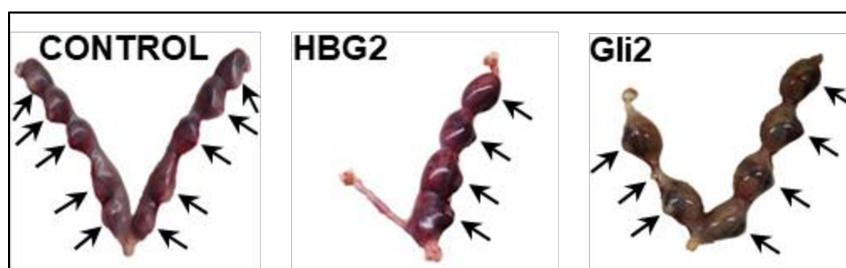


FIGURA 2. Fotografías de úteros preñados correspondientes al DG19 de ratas F1 control y expuestas perinatalmente a HBG2 o Gli2. Ambos grupos tratados muestran una disminución en el número de sitios de implantación. Las flechas negras indican sitios de implantación.

La exposición perinatal a HBG o Gli produce alteraciones hormonales y moleculares uterinas en el periodo pre-implantatorio

Las hembras perinatalmente expuestas a HBG2 y Gli2 presentaron un incremento en los niveles séricos de E2 (Figura 3-A), en asociación con una mayor expresión uterina del RE α (Figura 3-B). No se detectaron cambios en los niveles séricos de Pg, ni en la expresión uterina del RP (resultados no mostrados).

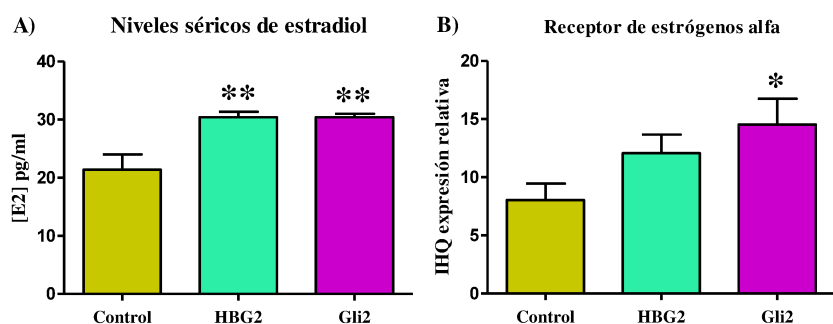


FIGURA 3. A) Determinación de los niveles séricos de estradiol (E2) y, B) cuantificación de la expresión uterina del receptor de estrógenos alfa (RE α) en animales expuestos perinatalmente a HBG2 o Gli2.

En cuanto a la expresión de genes críticos para la implantación embrionaria, detectamos una disminución significativa en la expresión uterina de *Hoxa10* (Figura 4-A) y su molécula downstream *ITGB3* (Figura 4-B), sin cambios en la expresión de *EMX2* (Figura 4-C).

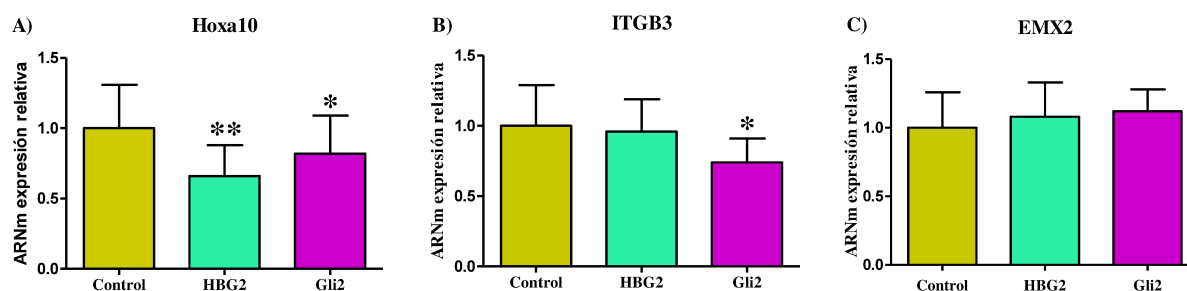


FIGURA 4. Evaluación de la expresión del ARNm de genes claves en el proceso de implantación en animales expuestos perinatalmente a HBG2 o Gli2 mediante RT-qPCR. A) *Hoxa10*, B) Integrina beta 3 (*ITGB3*), C) *EMX2*. Las muestras fueron normalizadas frente a la expresión de *L19* y a los valores del grupo control, al que se le asignó el valor de 1.

CONCLUSIONES

La exposición perinatal a bajas dosis de glifosato puro o de un formulado comercial a base de glifosato produjo subfertilidad en ratas hembras, como consecuencia de una disminución en el número de crías implantadas en el útero. Las causas de la falla implantatoria podrían estar relacionadas con: *i*) el incremento de los niveles séricos de E2 y de la expresión de su receptor a nivel uterino en el periodo pre-implantatorio, que se ha demostrado acorta la ventana de implantación, y *ii*) la alteración en la expresión de genes claves (*Hoxa10* e *ITGB3*) para la preparación del útero hacia el estado receptivo. Finalmente, los resultados del presente trabajo sugieren que el principio activo glifosato es el principal causante de los desórdenes reproductivos detectados, dado que el tratamiento con glifosato puro o su formulación comercial indujeron efectos similares.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Guerrero Schimpf M, Milesi MM, Luque EH, & Varayoud J.**,2018. Glyphosate-based herbicide enhances the uterine sensitivity to estradiol in rats. *Journal of Endocrinology*, 239, 1-17.
- Mesnager, R., Defarge, N., Spiroux de Vendômois, J., & Séralini, G. E.**, 2014. Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. *BioMed research international*, 1-8
- Milesi, M.M., Lorenz, V., & Pacini, G.**, 2018. Perinatal exposure to a glyphosate-based herbicide impairs female reproductive outcomes and induces second-generation adverse effects in Wistar rats. *Archives of Toxicology*, 92, 2629–2643.
- Milesi, M.M., Varayoud, J., Ramos, J.G., & Luque, E.H.**, 2017. Uterine ER α epigenetic modifications are induced by the endocrine disruptor endosulfan in female rats with impaired fertility. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 454, 1-11.
- Milesi, M.M., Varayoud, J., Bosquiaz, V.L., Muñoz-de-Toro, M., & Luque, E.H.**, 2012. Neonatal exposure to low doses of endosulfan disrupts the expression of proteins regulating uterine development and differentiation. *Reproductive Toxicology*, 33, 85-93.