

EFFECTOS DE UN HERBICIDA A BASE DE GLIFOSATO SOBRE MOLECULAS INVOLUCRADAS EN LA DINAMICA FOLICULAR OVÁRICA DE CORDERAS PREPUBERALES.

Alegre, Ana, 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: Glifosato, Corderas, Desarrollo folicular

INTRODUCCION

Los herbicidas a base de glifosato (HBGs), o formulaciones de herbicidas que contienen glifosato (N-fosfometil 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 en la agricultura para erradicar las malezas, y en usos no agrícolas (como espacios públicos o para el control de flora acuática) [Benbrook, 2016; Székács y Darvas, 2018]. Estos herbicidas son considerados un riesgo para el medioambiente y la salud, ya que su frecuencia de utilización y las tasas de aplicación se han incrementado, por esta razón, se los podría considerar como pseudo-persistentes [Primost y col., 2017]. Se han descrito niveles de glifosato, y su principal metabolito (el ácido aminometilfosfónico, AMPA), en diferentes matrices (aguas superficiales, sedimentos, suelo, carne, granos, frutas y vegetales) [Alarcón, 2020]. En los últimos años se reportaron efectos inducidos por glifosato y sus formulaciones que indicarían una posible actividad como perturbador endócrino [Ingaramo y col., 2020].

El desarrollo ovárico y la formación de folículos en las corderas es similar al de los humanos. Ambos comienzan su desarrollo en el útero materno y, al nacer, las hembras contienen el número de folículos para toda la vida. En corderas recién nacidas, las gónadas tienen folículos en diferentes estadios foliculares, desde folículos primordiales hasta pequeños antrales; diferentes autores consideran que los ovarios son estructural y funcionalmente activos [Alarcón y col., 2019]. Los ovarios de corderas son sensibles a la exposición a disruptores endócrinos durante la vida intrauterina y durante la vida posnatal temprana [Rivera y col., 2011]. En trabajos previos hemos demostrado alteraciones histomorfológicas y moleculares en útero y ovario, así como cambios en la dinámica folicular de corderas expuestas posnatalmente a HBGs [Alarcón y col., 2019].

Título del proyecto: Efecto de agroquímicos en ovario y oviducto de especies de interés zootécnico

Instrumento: PIP

Año de la convocatoria: 2020

Organismo financiador: CONICET

Director: Dr. Enrique H. Luque

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar en una especie de interés zootécnico (*Ovis aries*) si la exposición a un herbicida a base de glifosato (HBG) administrado durante una etapa posnatal temprana (período de alta sensibilidad a perturbadores endócrinos) altera procesos críticos del desarrollo folicular ovárico y la fertilidad de la hembra.

Objetivos específicos

- Investigar por medio de técnicas de biología molecular la expresión de diferentes genes involucrados en la regulación de la dinámica folicular ovárica.
- Evaluar por inmunohistoquímica la expresión de moléculas reguladoras de la dinámica folicular sobre el tejido ovárico.

METODOLOGÍA

Animales y tratamiento

Se utilizaron corderas cruce (Corriedale x Hampshire Down) nacidas durante los meses de agosto y septiembre de 2018. Desde el día posnatal 1 (DPN1) al DPN14 las corderas se dividieron en dos grupos: un grupo Control que recibió solución fisiológica y el grupo HBG que recibió la formulación de HBG, ambas por vía oral. Finalizada la exposición, a un grupo de corderas se les administró Hormona Folículo Estimulante de origen porcino (pFSH) por vía intramuscular durante tres días (DPN 41-42-43) quedando conformados los cuatro grupos experimentales: i) Control: solución fisiológica (vehículo) administrada por vía oral (n=6). ii) HBG: formulación de un HBG (dosis de 1 mg/kg/día) en solución fisiológica por vía oral (n=4). iii) FSH: solución fisiológica + pFSH inyectada por vía intramuscular 50 mg/día (n=6). iv) HBG + FSH: formulación de un HBG (dosis de 1 mg/kg/día) por vía oral + tratamiento con pFSH por vía intramuscular 50 mg/día durante 3 días (n=4). Al DPN45 los animales se pesaron, se realizó el sacrificio y se obtuvieron los ovarios. Un ovario de cada cordera se congeló inmediatamente en N₂ líquido y se mantuvo en freezer (-80°C) hasta la extracción del ARN total [Alarcón, 2020] para su posterior estudio. El otro ovario de cada cordera se fijó en formaldehído 4% y se incluyó en parafina para el estudio histomorfológico del órgano.

Expresión génica mediante qRT-PCR

- Extracción de ARN total y transcripción reversa

A partir de muestras congeladas se realizó la extracción de ARN total utilizando el reactivo comercial TRIzol Reagent® (Invitrogen). Los ARN obtenidos fueron conservados a -80°C y 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 de genes implicados en la regulación de la dinámica folicular: receptor de estrógenos alfa (ESR1), receptor de estrógenos beta (ESR2), receptor de progesterona (PR), folistatina (FST), receptor de activina tipo II (ACVRII) y proteína morfogénica ósea 15 (BMP15). Como control interno se utilizó la

determinación del ARNm del gen 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].

Estudios histológicos de los ovarios

En muestras ováricas incluidas en parafina, se realizaron cortes seriados de 5 μ m de espesor. Mediante inmunohistoquímica se evaluó la expresión de hormona antimülleriana (AMH) y proteína morfogénica ósea 4 (BMP4), estas moléculas están implicadas en la regulación de la dinámica folicular y fueron cuantificadas en las células de la granulosa ovárica. La cuantificación se realizó mediante el análisis de las imágenes digitalizadas utilizando el software FIJI [Schindelin y col., 2012] y los resultados fueron expresados como densidad óptica integrada.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Los resultados demuestran que las ovejas tratadas con HBG presentaron una disminución significativa ($p < 0,05$) en la expresión de ARNm de ESR1 (56%), PR (75%), ACVR11 (85%) y BMP15 (88%). En el grupo FSH observamos una disminución de FST (81%), ACVR11 (77%) y BMP15 (93%). Mientras que en el grupo HBG+FSH solo se observó una disminución en ACVR11 (68%) y BMP15 (81%). Estos resultados se exponen en la Figura 1.

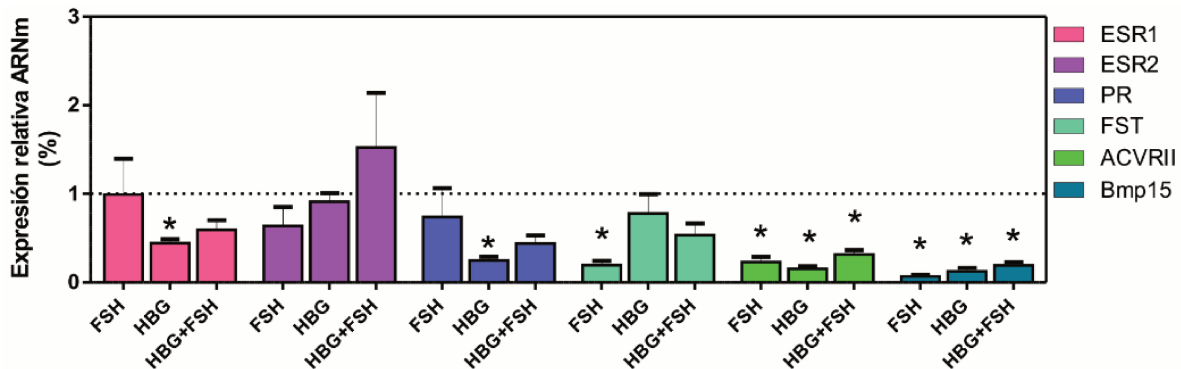


Figura 1. Expresión del ARN mensajero de genes en ovario.

La evaluación inmunohistoquímica de AMH se realizó en folículos primordiales, preantrales y antrales, y observamos una disminución en los folículos antrales de las corderas tratadas con HBG (54%) y de las superestimuladas con FSH (42%) pero no expuestas a HBG, que se refleja en la Figura 2. Esto podría indicar un aumento en el reclutamiento folicular y un agotamiento más acelerado de la reserva folicular. Por otra parte, en los mismos estadios foliculares estudiamos la expresión inmunohistoquímica de BMP4 demostrando una disminución de su expresión en folículos primordiales de corderas tratadas con HBG (31%), estos resultados se evidencian en la Figura 3.

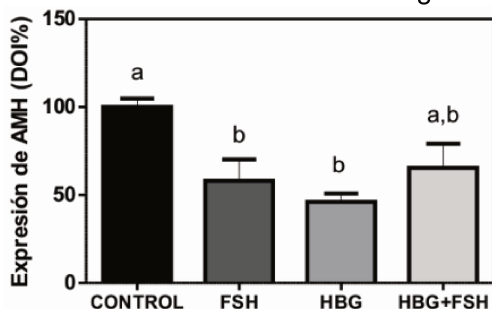


Figura 2. Expresión de AMH en folículos antrales.

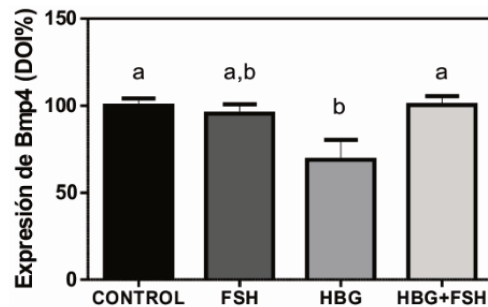


Figura 3. Expresión de BMP4 en folículos primordiales.

Los cambios en la expresión de genes implicados en el desarrollo folicular junto con la disminución en la expresión inmunohistoquímica de AMH y BMP4 en la granulosa de los folículos, sugieren que la exposición neonatal a una dosis baja de HBG como la estimulación con FSH, alteran la regulación de los folículos ováricos. Estos resultados respaldan nuestro estudio anterior sobre los efectos de HBG en el desarrollo folicular en corderas prepuberales, agregando nueva evidencia de expresión génica alterada que serían responsables de los cambios en el desarrollo folicular.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Alarcón, R. 2020. Exposición posnatal a agroquímicos sobre el desarrollo y la diferenciación del útero. Tesis doctoral. Biblioteca virtual UNL. URI: <https://hdl.handle.net/11185/5730>.

Alarcón, R; Rivera, OE; Ingaramo, PI; Tschopp, MV; Dioguardi, GH; Milesi, MM; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, EH. 2019. Neonatal exposure to a glyphosate-based herbicide alters the uterine differentiation of prepubertal ewe lambs. *Environmental Pollution*, 265:114874.

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.

Ingaramo, PI; Alarcón, R; Muñoz-de-Toro, M.; Luque, EH. 2020. Are glyphosate and glyphosatebased herbicides endocrine disruptors that alter female fertility? *Molecular and Cellular Endocrinology*, 518:110934.

Ingaramo, PI; Varayoud, J; Milesi, MM; Schimpf, MG; Alarcón, R; Muñoz-de-Toro, M; Luque, EH. 2017. La exposición neonatal a un herbicida a base de glifosato altera la deciduación 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. *Environmental Pollution*, 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. *Reproductive Toxicology*, 32:304-312.

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

Székács, A; Darvas B. 2018. Re-registration Challenges of Glyphosate in the European Union. *Frontiers in Environmental Science*, 6:78. DOI: 10.3389/fenvs.2018.00078.