



LA EXPOSICIÓN TEMPRANA A GLIFOSATO, ¿AFECTA LA MORFOLOGÍA DEL ÚTERO DE RATAS ADULTAS?

Acosta Espalter, Micaela

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

Directora: Durando, Milena de Lourdes

Codirectora: Milesi, Maria Mercedes

Área temática: Ciencias de la Salud

Palabras clave: útero, glifosato, tumores.

INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud (OMS) a través de la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer reclasificó en marzo de 2015 al glifosato en el grupo 2A como probable cancerígeno en humanos.

Esta disposición se adoptó teniendo en cuenta antecedentes *in vitro* y en animales de laboratorio. Existen evidencias que confirman la relación entre el uso aumentado del glifosato y una gran variedad de desórdenes y enfermedades, incluyendo cambios metabólicos, varios tipos de cáncer (por ejemplo: linfoma no Hodgkin), daño al ADN, toxicidad reproductiva, daño renal, entre otras, representando un riesgo para la salud humana (Ferrante y col., 2023). También en 2015 la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria concluyó que el herbicida no tiene propiedades carcinogénicas ni mutagénicas. El potencial carcinogénico del glifosato y de los herbicidas a base de glifosato (HBG) aún no está claramente definido. En ratas hembras expuestas tempranamente a HBG, ya detectamos: hiperplasia uterina y mamaria y alteraciones hormonales (Guerrero Schimpf y col., 2017; Zanardi y col., 2020). Considerando el uso masivo de HBG en Argentina y países del cono sur, y dadas las controversias mencionadas, consideramos importante diseñar modelos experimentales para contribuir a dilucidar sus potenciales efectos.

OBJETIVOS

- 1- Evaluar las características histomorfológicas del útero: altura de epitelio, espesor del estroma subepitelial y espesor del miometrio.
- 2- Evaluar la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) como marcador de angiogénesis (proceso necesario para el desarrollo de tumores).

Título del proyecto: EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL HERBICIDA GLIFOSATO ASOCIADO AL DESARROLLO DE TUMORES UTERINOS.

Instrumento: CAI+D

Año de la Convocatoria: 2020

Organismo financiador: UNL

Directora: Varayoud, Jorgelina

DISEÑO EXPERIMENTAL

Animales y tratamiento: se utilizaron ratas Wistar preñadas que parieron en el día de gestación 23. Al momento del nacimiento (día postnatal 0, DPN0) las crías fueron pesadas y sexadas de acuerdo a la distancia ano-genital. Las crías hembras fueron asignadas al azar a uno de los siguientes tratamientos:

- i) solución fisiológica -SF- (grupo control, n=7),
- ii) herbicida a base de glifosato (HBG, n=8) diluido en SF 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 Agencia de Protección Ambiental (de Estados Unidos). Las crías recibieron inyecciones subcutáneas de SF o HBG cada 48 h, desde el DPN1 hasta el DPN7. Desde el DPN21, las crías hembra se mantuvieron con agua y comida (alimento balanceado) *ad libitum* hasta los 20 meses de edad. Estas hembras adultas se sacrificaron en la fase de estro del ciclo estral (Montes & Luque, 1988). Se obtuvieron biopsias de útero que se fijaron en formaldehído 4% (6 h) y luego, fueron procesadas hasta su inclusión en parafina. Se realizaron cortes histológicos de 5 µm de espesor, utilizando un micrótopo rotativo Leica.

Análisis morfológico: sobre cortes teñidos con hematoxilina-eosina se determinaron los siguientes parámetros morfométricos: altura del epitelio luminal, espesor del estroma subepitelial y del miometrio (longitudinal más circular) (Zanardi, 2023). Estas mediciones se realizaron sobre imágenes digitalizadas obtenidas utilizando una cámara de vídeo color (Spot Insight V3.5, Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA) acoplada a un microscopio Olympus BH2 y utilizando el programa Image J.

Expresión de VEGF: sobre cortes histológicos se realizó una técnica de inmunohistoquímica. Brevemente, los cortes fueron sometidos a desparafinización, seguido de hidratación y recuperación antigénica en horno de microondas utilizando buffer citrato (pH: 6). Luego del bloqueo de la peroxidasa endógena los cortes fueron incubados con el anticuerpo primario (Anti-VEGF Santa Cruz Biotechnology) diluido 1/25, durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, los cortes fueron incubados con el anticuerpo secundario conjugado con biotina (anti-mouse, obtenido y validado en el ISAL) durante 30 minutos y la reacción fue revelada mediante el sistema extravidina-peroxidasa, usando diaminobencidina (Sigma-Aldrich) como sustrato cromogénico. La cuantificación de la expresión proteica se realizó sobre imágenes digitalizadas y con el software Image J. Se determinó el área relativa y la intensidad de marcación positiva. Los resultados se expresaron como Densidad Óptica Integrada (DOI) (Durando y col. 2011; Milesi y col. 2015).

Análisis estadístico: los resultados fueron analizados mediante test no paramétricos y expresados como el promedio ± SEM. Los valores de p<0,05 fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

1- Características histomorfológicas del útero:

Altura de epitelio luminal (µm): Control: 27,78 ± 1,79 vs HBG: 27,73 ± 1,48 (p>0,05).

Espesor del estroma subepitelial (μm): Control: $676,76 \pm 51,83$ vs HBG: $615,95 \pm 49,04$ ($p > 0,05$).

Miometrio μm : Control: $281,60 \pm 38,07$ vs HBG: $294,99 \pm 33,68$ ($p > 0,05$).

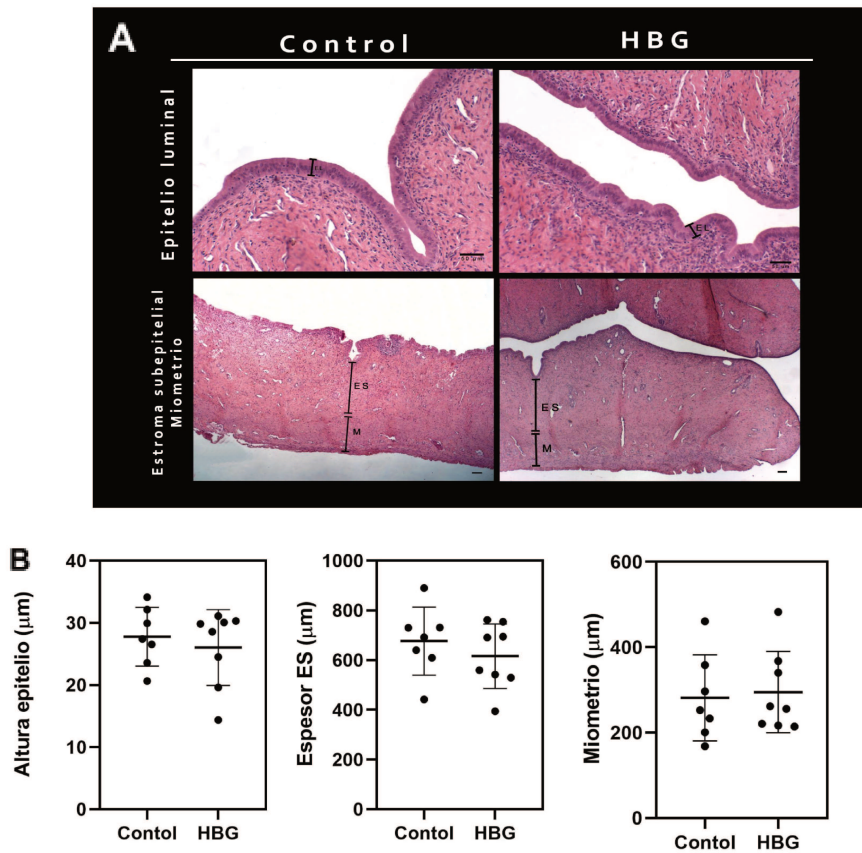
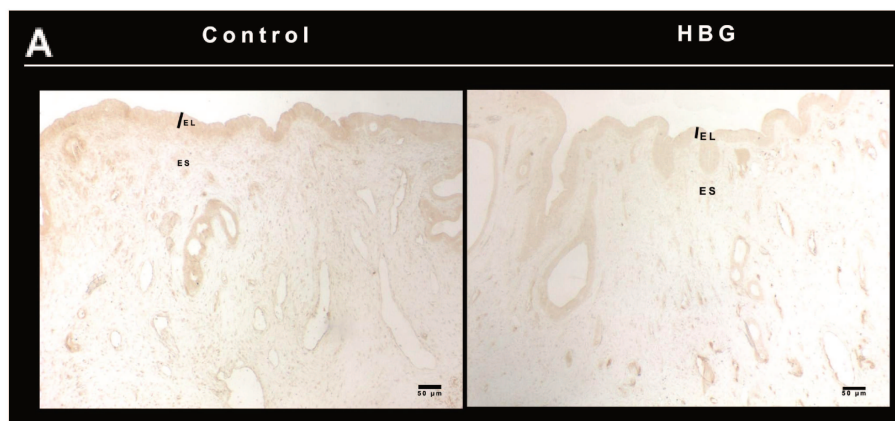


Figura 1: Efecto de HBG sobre los parámetros morfológicos del útero. A) Imágenes de epitelio luminal, estroma subepitelial y miometrio representativas de cortes uterinos teñidos con hematoxilina-eosina. Barra 50 μm . B) Parámetros morfométricos.

2- Expresión del VEGF:

En epitelio luminal (expresado como DOI): Control: $0,026 \pm 0,004$ vs HBG: $0,018 \pm 0,004$ ($p > 0,05$).

En estroma subepitelial (expresado como DOI): Control: $0,010 \pm 0,002$ vs HBG: $0,008 \pm 0,002$ ($p > 0,05$).



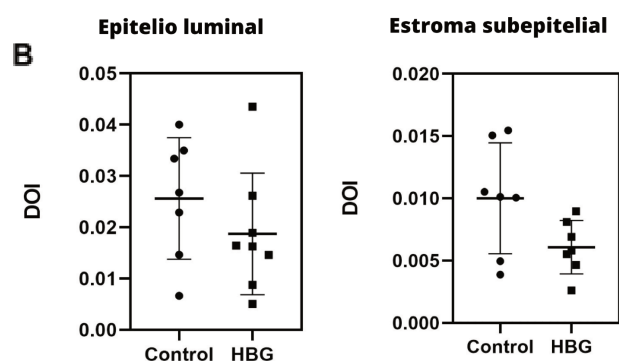


Figura 2: Expresión de VEGF en útero. A) Imágenes representativas de la expresión de VEGF en epitelio luminal y estroma subepitelial. La marcación positiva se observa de color marrón. Barra 50 μ m. B) Cuantificación de la expresión de VEGF (DOI) en epitelio luminal y estroma subepitelial.

CONCLUSIONES

La exposición temprana a HBG no modificó las características morfométricas evaluadas (altura del epitelio luminal, espesor del estroma subepitelial y miometrio) ni modificó la expresión del VEGF en epitelio y estroma del útero de animales adultos.

Los resultados obtenidos pueden asociarse a un proceso normal de envejecimiento de los animales y se postula que cualquier alteración inducida por el HBG podría haberse detectado estudiando animales más jóvenes.

No obstante, en experimentos que se realizaron en paralelo con éste, se ha detectado que la exposición a bajas dosis de HBG genera alteraciones uterinas que comprometen la fertilidad de las hembras.

Todos los resultados, en su conjunto, alientan a seguir estudiando los posibles efectos de éste y otros contaminantes, para aportar evidencia científica que pueda ser tenida en cuenta por los organismos de control nacionales e internacionales, en pro de la salud humana y animal.

BIBLIOGRAFÍA

- Durando y col.**, *J Steroid Biochem Mol Biol.* 127: 35-43; 2011. doi: 10.1016/j.jsbmb.2011.04.001.
- Ejecutivo, D., & Operativa, G. (s/f).** **Glifosato. Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.** Recuperado el 30 de julio de 2023, de <https://www.efsa.europa.eu/es/topics/topic/glyphosate>.
- Ferrante, M., y col.**, (2023). Glyphosate and environmental toxicity with “One Health” approach, a review. *Environmental Research*, 235(116678), 116678.
- Guerrero Schimpf y col.**, *Toxicology* 376: 2-14; 2017. doi:10.1016/j.tox.2016.06.004
- IARC monograph on glyphosate. (s/f).** **Who.int.** Recuperado el 30 de julio de 2023, de <https://www.iarc.who.int/featured-news/media-centre-iarc-news-glyphosate>.
- Milesi y col.**, *Mol Cell Endocrinol.* 401: 248-259; 2015. doi:10.1016/j.mce.2014.11.028
- Montes, G S, and E H Luque.** *Acta anatomica* 133: 192-199; 1988. doi:10.1159/000146639
- Zanardi, M. V. (2023)** *Gynecological tumors: influence of lifestyle factors on its development.* [Tesis de doctorado, Instituto de Salud y Ambiente del Litoral-UNL-CONICET, Santa Fe, Argentina and Institut für Zoology-TUD, Dresde, Germany].