

ESTUDIO DE MECANISMOS MATERNOS Y PLACENTARIOS ASOCIADOS AL RETARDO DEL CRECIMIENTO FETAL POR EXPOSICIÓN AL HERBICIDA GLIFOSATO

Luna, Larisa.

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 (CONICET).

Director/a: Virginia Lorenz
Codirector/a: Jorgelina Varayoud

Área: Ciencias de la Salud

Palabras clave: herbicida glifosato, retardo del crecimiento fetal, placenta

INTRODUCCIÓN

La exposición a factores ambientales puede derivar en un crecimiento fetal reducido y en cambios estructurales y funcionales permanentes (Pinheiro y col. 2008). El crecimiento fetal es un proceso complejo que involucra factores maternos, de la placenta y el feto (Gicquel & Le Bouc 2006). Entre los contaminantes ambientales, los pesticidas revisten gran importancia. En nuestro país y a nivel mundial, los herbicidas a base de glifosato (HBGs) son los agroquímicos más aplicados para la eliminación de malezas en cultivos extensivos, espacios urbanos y domicilios (Benbrook 2016; Castro Berman y col. 2018). Las formulaciones de los HBGs están constituidas por el ingrediente activo, glifosato (GLI), junto a una serie de co-formulados. Actualmente, existe gran controversia en relación a si los efectos adversos son causados por el ingrediente activo solamente o por sus formulaciones.

OBJETIVOS

En este trabajo investigamos si GLI y/o un HBG inducen cambios en parámetros feto-placentarios en fetos de madres expuestas perinatalmente a estos compuestos. En segunda instancia, nos preguntamos si los posibles efectos de la exposición a GLI y/o HBG estarían relacionados con alteraciones maternas y/o de la funcionalidad de la placenta. Para ello, llevamos a cabo determinaciones en busca de:

- Alteraciones maternas mediante la determinación de parámetros hormonales y/o metabólicos a partir de suero de ratas.
- Alteraciones placentarias asociadas a la funcionalidad del órgano determinando la expresión de genes críticos para el crecimiento y angiogénesis feto-placentaria en muestras de placenta mediante PCR en tiempo real (qPCR).

Por último, realizamos un estudio comparativo entre glifosato (GLI), y su formulado comercial (HBG) para establecer si dichos compuestos actúan a través de vías de acción similares.

METODOLOGÍA

A) Esquema experimental y obtención de muestras

Empleamos un modelo de exposición perinatal (durante la gestación y lactancia) en ratas en el cual los compuestos en estudio se administraron a través del alimento como se describe en trabajos previos de nuestro laboratorio (Milesi & Lorenz y col. 2018; Lorenz y col., 2020).

Para esto, ratas preñadas (F0) de la cepa *Wistar* se dividieron al azar en los siguientes grupos experimentales:

- **Control:** recibieron pasta de alimento con el vehículo (agua destilada).
- **HBG:** recibieron pasta de alimento con el agregado de un herbicida a base de glifosato (Roundup Full II; 66,2% de sal de glifosato de potasio).

Título del proyecto: Determinación de los mecanismos que producen retardo del crecimiento fetal por exposición a glifosato: estudio de factores maternos y feto-placentarios.

Instrumento: PICT; Organismo financiador: ANPCyT

Año de convocatoria: 2019

Director del proyecto: Lorenz, Virginia.

- **GLI:** recibieron pasta de alimento con el agregado de una solución acuosa de glifosato grado técnico (96% de pureza, Sigma)

La dosis de glifosato seleccionada de 2 mg/kg de peso corporal/día es considerada una dosis baja ya que se encuentra en el orden de magnitud de la dosis crónica de referencia (cRfD) (EPA, 2017) correspondiente a 1 mg/kg de peso corporal/día.

Las ratas F0 preñadas recibieron los compuestos en estudio desde el DG9 hasta el día del parto (DG23) y durante los 21 días de lactancia. Desde el destete, las crías hembra (F1) se mantuvieron con agua y alimento balanceado *ad libitum* hasta el día postnatal (DPN)90. A partir de ese momento, las hembras (F1) fueron puestas a preñar. En DG19 las ratas preñadas fueron sacrificadas y se extrajeron los fetos y sus respectivas placentas de los úteros (detalles en *Determinaciones: "Parámetros fetales y placentarios en la descendencia F2"*). Al mismo tiempo, se recolectaron las siguientes muestras:

- Suero a partir de sangre troncal de las madres F1
- Placentas de cada madre (n: máximo 10 por camada). Las placentas fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y trasladada a -80°C donde se mantuvieron hasta su utilización.

B) Determinaciones

1- Parámetros fetales y placentarios en la descendencia F2

En hembras preñadas en DG19, se removieron los cuernos uterinos y se extrajeron los fetos y sus respectivas placentas. Los mismos fueron examinados por su morfología y pesados. Con estos datos, se calculó el índice placentario: peso de la placenta/peso del feto. También, se determinó la longitud fetal desde la parte superior de la cabeza hasta la parte inferior de las nalgas (longitud anca-coronilla). Los fetos se clasificaron según como pequeño (PEG) (< percentil 10), apropiado (AEG) (percentil 10-90) o grande (GEG) (>percentil 90) para la edad gestacional, utilizando una curva de distribución de frecuencias construida con el peso de fetos F2 controles de nuestra colonia; la cual mostró una distribución de tipo Gaussiana.

2- Parámetros metabólicos y hormonales séricos en las madres F1

A partir de suero de madres F1, se realizaron determinaciones metabólicas: niveles de glucemia, creatinina, HDL-colesterol, LDL-colesterol, triglicéridos y colesterol total; y determinaciones hormonales: niveles de progesterona y T4 libre. Las mismas fueron derivadas y llevadas a cabo en un laboratorio privado de la ciudad de Santa Fe.

3- Expresión de genes vinculados a la funcionalidad placentaria

A partir de biopsias de placenta de DG19, se purificó el ARN total utilizando el reactivo TRIZOL. Luego, se llevaron a cabo reacciones de transcripción reversa utilizando 1 µg de ARN total. Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar los genes de interés: Igf2 y su receptor (Igf2R), marcadores críticos del normal desarrollo fetal; y Vegfa y su receptor Vegfr1, involucrados en la promoción de la angiogénesis placentaria. Los niveles de transcritos se determinaron mediante ensayos de qPCR, los cuales fueron cuantificados por el método de la curva estándar relativa (Lorenz y col. 2020).

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa Graph Pad (versión 5.1). Los parámetros fetales y placentarios se analizaron mediante el Test ANOVA de un solo factor (seguido del test Tukey para la posterior comparación de las medias). La ocurrencia de fetos pequeños para la edad gestacional (PEG) y el riesgo relativo asociado a esta categoría fue analizado mediante el test χ^2 . El resto de los datos se analizaron mediante el test de Kruskal-Wallis. Los resultados se expresan como la media \pm SEM y las diferencias se consideran significativas $p < 0,05$.

RESULTADOS

1- Determinación de parámetros feto-placentarios en la descendencia de fetos F2

En relación a los parámetros feto-placentarios, se observó una disminución en la longitud y peso fetal en ambos grupos de animales expuestos. Si bien no se obtuvo una diferencia en el peso de la placenta, se detectó un incremento en el índice placentario a expensas de la disminución del peso de los fetos en el grupo GLI. Los datos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Parámetros fetales y placentarios de fetos F2 de madres F1 controles y expuestas a un herbicida a base de glifosato (HBG) o glifosato (GLI), su ingrediente activo.

| Parámetros | Control (n: 91 fetos; 8 madres) | HBG (n: 80 fetos; 8 madres) | GLI (n: 108 fetos; 11 madres) |
|-----------------------|------------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| Longitud fetal (cm) | 2.44 ± 0.0121 | 2.39 ± 0.0140 (*) | 2.35 ± 0.0110 (***) |
| Peso fetal (mg) | 1308 ± 12.84 | 1227 ± 15.78 (***) | 1243 ± 13.21 (**) |
| Peso placentario (mg) | 360 ± 3.90 | 349 ± 6.56 | 364 ± 5.47 |
| Índice placentario | 0.278 ± 0.00435 | 0.290 ± 0.00641 | 0.297 ± 0.00614 (*) |

Seguidamente, en la Tabla 2 se muestra el porcentaje de fetos pequeños (PEG), apropiados (AEG) y grandes (GEG) para la edad gestacional en los distintos grupos experimentales.

Tabla 2: Porcentaje de fetos F2 en la categoría pequeños (PEG), apropiados (AEG) y grandes para la edad gestacional (GEG).

| Categoría peso | Control | HBG | GLI |
|----------------|---------|-------|-------|
| PEG fetos (%) | 21,98 | 57,50 | 45,37 |
| AEG fetos (%) | 63,74 | 41,25 | 52,78 |
| GEG fetos (%) | 14,29 | 1,25 | 1,85 |

Estos resultados nos permitieron determinar que se produce un incremento del riesgo relativo de ocurrencia de fetos PEG tanto para el grupo HBG [2,62; IC 95% (1,70; 4,02)], ***p < 0,001 y como para GLI [2,06; 95% CI (1,33; 3,20)], ***p < 0.001. Dichos análisis indican que tanto el formulado comercial como el principio activo inducirían retardo de crecimiento fetal.

2- Evaluación de parámetros metabólicos y hormonales maternos

Para establecer si alteraciones metabólicas y/o hormonales en las madres F1 podrían condicionar el normal desarrollo de los fetos, se determinaron los niveles de las hormonas progesterona y T4 libre que resultan críticas para la progresión de la gestación y el crecimiento del feto, respectivamente. A su vez, se determinaron los niveles séricos de los metabolitos glucosa, creatinina, colesterol total, HDL-colesterol y triglicéridos cuyo desbalance podría estar relacionado a patologías como síndrome metabólico e hipertensión (Tabla 3). En cuanto a LDL-colesterol, no se pudo cuantificar pues todas las muestras arrojaron valores por debajo del límite de detección (<3 mg/dl).

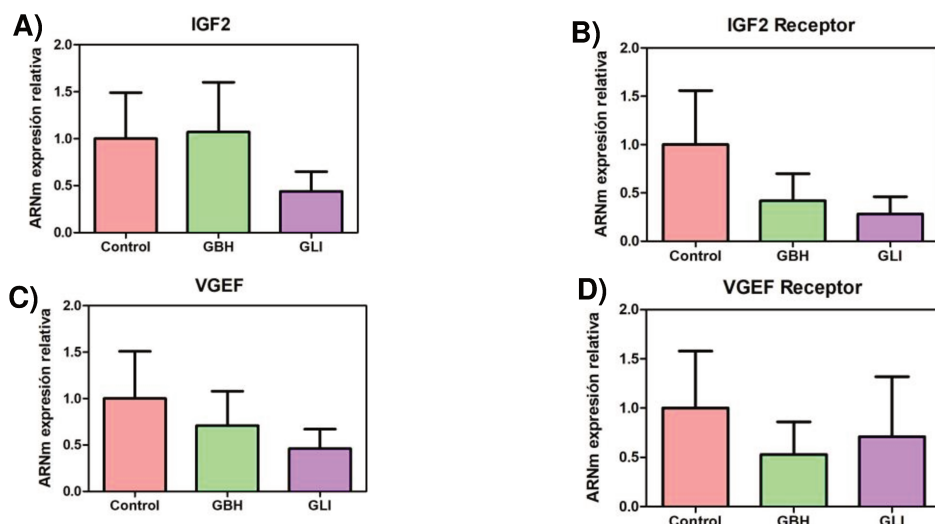
Tabla 3: Parámetros hormonales y metabólicos de hembras F1 y expuestas a HBG o GLI en DG19.

| Niveles hormonales | | | |
|-------------------------------|-------------|--------------|--------------|
| Parámetro | Control | GBH | GLI |
| Progesterona (ng/mL) | 205,3 ± 9,8 | 245,8 ± 24,2 | 223,8 ± 23,9 |
| T4 libre (ng/dL) | 1,29 ± 0,04 | 1,17 ± 0,08 | 1,31 ± 0,08 |
| Niveles de metabolitos | | | |
| Parámetro | Control | GBH | GLI |

| | | | |
|--------------------------|--------------|--------------|--------------|
| Glucosa (mmol/L) | 4,83 ± 0,20 | 4,79 ± 0,14 | 4,59 ± 0,12 |
| Creatinina (mg/dL) | 0,33 ± 0,01 | 0,59 ± 0,27 | 0,31 ± 0,02 |
| Colesterol total (mg/dL) | 87,11 ± 3,41 | 80,17 ± 2,04 | 83,92 ± 2,45 |
| HDL-colesterol (mg/dL) | 43,56 ± 3,00 | 41,00 ± 2,25 | 41,17 ± 2,58 |
| Triglicéridos (mg/dL) | 644,7 ± 70,7 | 591,2 ± 60,0 | 636,4 ± 68,4 |

3- Determinación de la expresión de moléculas críticas para el crecimiento y desarrollo feto-placentario

En cuanto a los niveles de expresión de moléculas críticas para el crecimiento y desarrollo feto-placentario, no se detectaron diferencias en los niveles de transcritos de los marcadores evaluados entre los distintos grupos experimentales (Figuras 1A, B, C y D).



Figuras 1A-D: Niveles de expresión de ARNm de marcadores implicados en el desarrollo feto-placentario en placentas de día gestacional 19 de madres F1 control y expuestas perinatalmente a un herbicida a base de glifosato (HBG) o a glifosato (GLI) mediante qPCR A) *Igf2*, B) *Receptor de Igf2*, C) *Vgef* y D) *Receptor de Vgef*.

CONCLUSIONES

La exposición a un HBG o GLI indujo una disminución del peso y longitud fetal en fetos F2 de madres expuestas perinatalmente a estos compuestos. Además, el tratamiento produjo un incremento del porcentaje de fetos PEG y su riesgo relativo asociado, lo cual evidenciaría un retardo del crecimiento fetal inducido tanto por el HBG como GLI. En cuanto a los mecanismos maternos/placentarios que podrían explicar estos hallazgos, hasta el momento, no hemos detectado diferencias en los marcadores estudiados. Tanto los niveles séricos de metabolitos y hormonas circulantes en las madres F1 como la expresión de los genes placentarios no mostraron diferencias entre los grupos experimentales. Concluimos que la exposición perinatal a una dosis baja tanto de HBG como GLI produce alteraciones reproductivas a largo plazo, causando retardo del crecimiento fetal. En el futuro profundizaremos sobre los mecanismos involucrados para dilucidar posibles vías afectadas a nivel de la placenta y del feto.

BIBLIOGRAFÍA

- Benbrook CM (2016). Environmental Sciences Europe 28, 3.
- Castro Berman y col. (2018). Chemosphere 200, 513-522.
- EPA (2017) <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPP-2009-0361-0068>
- Gicquel C & Le Bouc Y (2006). Hormone Research in Paediatrics 65, 28-33.
- Lorenz V y col. (2020). Food Chemical Toxicology 143:111560.
- Milesi MM & Lorenz V y col. (2018). Archives of Toxicology 92, 2629-2643.
- Pinheiro AR y col. (2008). Clinical Science 114, 381-392.