

En esta sección los trabajos presentados deberán reunir las siguientes condiciones:

1. Deberán estar escritos en castellano.
2. Preferentemente en Word.
3. No deberán superar preferentemente las 25 carillas de hoja tamaño A4, escritas en cuerpo de letra 12, a doble espacio.
4. El ordenamiento de los mismos deberá seguir la estructura clásica de:
 - a. Título.
 - b. Autores, centro al que pertenecen y correo electrónico de contacto.
 - c. Resumen en castellano y en inglés (excluyente) de no más de 200 palabras.
 - d. Palabras clave: no más de 5 (cinco).
 - e. Introducción.
 - f. Material y métodos.
 - g. Resultados.
 - h. Discusión.
5. Las abreviaturas deberán ser definidas al ser mencionadas por primera vez,

excepto aquellas aceptadas por convención (por ejemplo, FIV, ICSI, etc).

6. Tablas y cuadros: en blanco y negro, teniendo especial cuidado de ser bien referidos desde el texto.
 7. Figuras: todas serán en blanco y negro.
 8. Bibliografía: las citas se harán en el texto y se ordenarán en forma correlativa al final del trabajo por orden de aparición. Las citas de revistas deberán consignarse de la siguiente manera:
 - a) apellido completo e iniciales de los 3 primeros autores, sin puntos y separados por comas; si hubiera más, puede colocarse "et al"; b) título del trabajo; c) abreviatura del nombre de la revista (tal como figuran en el Index Medicus); y e) año, volumen, número de la revista (optativo), página inicial y final.
- En todos los casos el envío de trabajos, comentarios y publicaciones deberá hacerse por correo electrónico a la dirección de la secretaría de SAMeR: info@samer.org.ar

Efectos del glifosato sobre el endometrio de ratas hembras

Idelma Serpa,¹⁻² Karina Calvo,² Valentina Torres Monserrat,² Marinés Carbonaro,² Miguel Ángel Martínez,³ Marcelo Rodríguez,¹ Enzo Peralta,¹ Enrique Coscarelli¹

¹ Instituto Universitario Italiano de Rosario (IUNIR), Rosario, Argentina.

² Programa de Asistencia Reproductiva de Rosario (PROAR), Rosario, Argentina.

³ Hospital Provincial, Rosario, Argentina.

Reproducción 2015;30:14-25

Resumen

Objetivo. Evaluar el efecto del glifosato (Roundup Full II®) sobre el status reproductivo en ratas hembras. **Diseño.** Experimental en modelo animal. **Materiales y métodos.** 18 ratas Wistars hembras, adultas, de 80-90 días, con un peso promedio de 300 grs. Nueve fueron seleccionadas al azar para la administración de 300mg/kg/día de Roundup Full II® por un período de 30 días y 9 ratas de iguales características fueron el control. El día del experimento se les realizó análisis colpocitológico para evaluar el ciclo estral y punción cardíaca para dosar FSH, TSH, estradiol (E2) y progesterona (P) mediante inmunoensayo. Los endometrios, extraídos quirúrgicamente, fueron procesados por inmunohistoquímica para el estudio de receptores de progesterona (RP) utilizando doce anticuerpos monoclonales de ratón incluyendo dos nuevos anticuerpos monoclonales (MAbs), PgR636 y PgR1294, que son capaces de reconocer los receptores en muestras previamente fijadas con formol y embe-

bidadas paraafina. Se realizó conteo de células endometriales con el programa Image J. Las variables fueron analizadas con el paquete estadístico SPSS. **Resultados.** El peso de las ratas hembras expuestas mostró una disminución significativa ($P < 0,001$) entre el inicio y el final del experimento. No hubo diferencias significativas con respecto a los valores de FSH ($P = 0,40$), E2 ($P = 0,84$) y TSH ($P = 0,3$). Se encontró una disminución significativa en los niveles séricos de P ($P = 0,004$) en el grupo de exposición. El recuento de células endometriales en las ratas expuestas fue significativamente mayor al de las no expuestas ($P < 0,001$). No se registró expresión de los RP endometrial en ninguno de los dos grupos. **Conclusión.** La exposición al Roundup Full II® afecta el sistema reproductivo en las ratas hembras expuestas. Induce modificaciones a nivel endometrial aumentando el número de células del estroma y disminuyendo los valores séricos de P, con lo que afectaría la receptividad endometrial y capacidad implantatoria. No se pudo demostrar que este efecto sobre la P esté relacionado con una disrupción endocrina mediada por receptores, posiblemente porque la dosis utilizada en este experimento fue relativamente baja.

Correspondencia: Idelma Serpa
E-mail: idelmaserpa@gmail.com

Palabras claves. *Glifosato, ratas hembras, endometrio, progesterona.*

Glyphosate effects on the endometrium of female rats

Summary

Objective. *To evaluate the effects of glyphosate (Roundup Full II®) on reproductive female rats status. Design. Experimental animal model. Methods.* 18 adult female Wistar rats, 80-90 days old and 300g body weight on average. Rats were divided into 2 groups, the glyphosate (n=9) and control group (n=9). On the experimental group there was given 300mg/kg/day of Roundup Full II® for 30 days on water. The experimental day a colposcopy assay was made to evaluate estrus cycle. Concentrations of progesterone (P), thyroid hormone (TSH), FSH and estradiol (E2) in serum were measured using immunoassay. Rats were sacrificed and uterus were excised by surgery. Endometria were fixed in neutral formalin, and embedded in paraffin. Tissue sections were stained with hematoxylin-eosin for endometrium cells counting. Immunohistochemistry were used to investigate progesterone receptor (PR) expression. The panel of twelve antibodies included two new ones (PgR636 and PgR1294) produced prospectively to be resistant to formalin fixation and paraffin embedding. For statistical analysis SPSS software was used. **Results.** Body weight was significantly lower at the end of the experiment on the exposed group ($P < 0,001$). There were not significant differences on FSH ($P = 0,40$), E2 ($P = 0,84$) and TSH ($P = 0,3$) serum levels but there was a significant reduction on P serum levels on exposed group compared with non-exposed group ($P = 0,004$). Endometrial cells count on the glyphosate group showed a significant increase ($P < 0,001$). On both groups not a single antibody for PR tested showed expression. **Conclusion.** Roundup Full II® exposure affects reproductive female system on rats. It produces an increase on endometrium cells count but a decrease on P serum levels. These effects may interfere with endometrial receptivity and implantation process but it was not possible to show that glyphosate is involved on PR endocrine disruption possibly related to the relative low dose used on this experiment.

Key words. *Glyphosate, female rats, endometrium, progesterone.*

Introducción

La infertilidad femenina es un problema de salud por el cual cada vez más parejas realizan una consulta al médico especialista.

Muchas hipótesis asociadas a cambios medioambientales y alimenticios se han propuesto como agentes causales o predisponentes. Existe, por otra parte, un debate no cerrado aún sobre el efecto de los agroquímicos utilizados en los campos de cultivos, sobre todo de sus componentes aditivos.

La regulación de la progesterona (P) es un factor crítico en la fisiología de la reproducción. En los ciclos estimulados para tratamientos de fertilidad se producen mayor número de folículos ováricos, lo que conlleva a mayor producción de P folicular. Esto conduce a un desfase en la cronología histológica endometrial que se manifiesta en un endometrio avanzado, alterando así el diálogo entre el embrión y el endometrio con la consecuente falla de implantación.^{1, 2, 3}

El mecanismo exacto por el cual los altos niveles de P sérica afectan las tasas de implantación es poco claro. Se sugiere que habría una acción directa por parte de los niveles suprafisiológicos de P en la calidad ovocitaria y en la receptividad endometrial.^{4, 5, 6, 7}

En roedores, la acción coordinada de estrógeno y P, regulando la proliferación y diferenciación de las células uterinas en una manera espacio-temporal, determina o establece la ventana de implantación.⁸

La formación y degradación de los pinópodos en las ratas está íntimamente relacionada con los aumentos y disminución de los niveles de P, respectivamente, a nivel endometrial pero sin correlacionarse con las concentraciones absolutas en plasma de estas hormonas. Durante el desarrollo de los pinópodos, los RP A y B disminuyen su expresión en el epitelio y glándulas endometriales.⁹ Salehnia y cols observaron que luego de la administración de P se desarrollaban los pinópodos en la superficie endometrial de las ratas y que la inyección de esta hormona en ciclos de hiperestimulación ovárica acelera la ventana de implantación, disminuyendo la capacidad de diálogo entre el embrión y el endometrio, y la consecuente falla implantatoria.¹⁰ En contraposición, Rashidi y cols mostraron que en ciclos hiperestimulados la administración de P no aceleraba la maduración del endometrio en ratas.¹¹

El rol de los estrógenos y la expresión de sus receptores tampoco son claros en la formación de los pinópodos. En un estudio, la administración de estrógenos en ratas preñadas resultó en pérdida de los pinópodos endometriales dentro de las 18 horas de exposición.¹²

Sorprendentemente, en otro estudio, ratas ovariectomizadas presentaron un mayor número de pinópodos durante la ventana de implanta-

ción, por lo que probablemente existirían otros mecanismos no asociados a las hormonas esteroideas en el desarrollo de estas células.¹³

El ciclo estral en la rata dura 4 a 5 días; es evidentemente corto si se compara con el ciclo menstrual de la mujer, que es de aproximadamente 28 días. Las características fisiológicas de este período se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Resumen de los cambios ováricos, uterinos y vaginales durante el período estral en ratas hembras.

Fase	Ovario	Útero	Vagina	Conducta
Proestro	Crecimiento rápido de folículos. Degeneración de los cuerpos lúteos del ciclo previo.	Útero distendido, con fluido que aumenta su tamaño.	Epitelio grueso. Células epiteliales superficiales. Frotis vaginal con abundancia de células epiteliales.	Estado receptivo a la copulación hacia el final del proestro.
Estro	Maduración de folículos. Ovulación.	Máxima distensión. Inicio de degeneración vacuolar del epitelio uterino.	Epitelio grueso. Capa de células cornificadas en superficie. Frotis vaginal con abundantes células escamosas.	Receptividad máxima. Copulación. Máxima probabilidad de fertilización.
Metaestro	Formación de cuerpos lúteos.	Alguna degeneración vacuolar pero también regeneración.	Descamación del epitelio cornificado. Epitelio delgado. Invasión de leucocitos. Frotis vaginal con abundantes células escamosas	No hay receptividad.
Diestro	Crecimiento de los cuerpos lúteos. Folículos de varios tamaños.	Regeneración del epitelio uterino.	Epitelio delgado. Regeneración del epitelio. Frotis vaginal con abundancia de leucocitos y células epiteliales.	No hay receptividad.

A nivel uterino, el proceso de decidualización del estroma es un componente fundamental para una implantación exitosa. En los roedores este proceso está coordinado por dos eventos básicos: la producción de E2 y P y las interacciones de señalización para la implantación del blastocisto.^{14, 15} La proliferación del estroma endometrial, seguida de la diferenciación en células deciduales está gobernada principalmente por la P.^{16, 17}

En las últimas décadas, la infertilidad femenina ha sido relacionada con factores medioambientales y estilo de vida.¹⁸ Uno de los factores de riesgo frecuentemente asociado es la exposición ocupacional a disruptores endocrinos (DE) químicos^{19, 20} y la exposición directa a pesticidas en las zonas rurales.²¹ Varios estudios muestran una relación entre la disminución de las tasas de fecundabilidad y la exposición a pesticidas comúnmente utilizados en los cultivos.^{22, 13} Esta reducción en la

tasa de fecundabilidad es de gran relevancia y varía entre 20-49%.^{24, 25}

Los receptores nucleares más comúnmente afectados por los DE son: los receptores de estrógenos α y β (RE), receptor de andrógenos (RA), receptores de la hormona tiroidea y receptores de glucocorticoides.

Más recientemente, se ha focalizado la atención en el RP, que parecería tener mayor sensibilidad que los estrogénicos a las acciones de ciertos DE.²⁶ Una inadecuada respuesta a la producción de P debido a alteraciones en los receptores RP A y B podría producir infertilidad, aborto recurrente o proliferación endometrial.²⁷

Roundup Full II[®] es la marca comercial del herbicida forestal de amplio espectro que contiene como principio activo al *glifosato*. Representa el 30% de todos los pesticidas utilizados en agricultura.²⁸ Es un compuesto desarrollado para eliminar

malezas anuales y perennes, gramíneas y latifoliadas, y es de uso frecuente en los campos de soja. Se aplica antes de la siembra de cultivos para que éstos puedan emerger e implantarse en mejores condiciones. En Argentina ha habido un incremento acelerado de siembra de soja en los últimos años.²⁹

Dentro de las formulaciones de glifosato con el nombre *Roundup*[®] (que son aquellas comercializadas por *Monsanto*) se ha mencionado en algunos estudios que existe el coadyuvante denominado POEA (polioxietil amina) que podría tener efectos tóxicos más relevantes que el glifosato solo.^{30,31} No se ha citado que ese componente esté presente en otras marcas comerciales, y el *Roundup*[®] representa el 3,3% de las formulaciones comerciales disponibles en nuestro país.³² También se le atribuye un efecto contaminante del agua y el suelo a su metabolito, el ácido aminometilfosfórico (AMPA).

Controversialmente, el CONICET en su informe 2009, describe que el AMPA es menos tóxico que el glifosato.

Hallazgos experimentales referidos a los efectos no deseados del glifosato, AMPA o del POEA, se basan en 4.046 publicaciones desde la aparición del glifosato en forma comercial, de las cuales 1.013 se vinculan a cuestiones de bioseguridad (y constan en la base *Pub Med*) y de entre ellas, 227 son publicaciones de efectos tóxicos sobre diferentes formas de vida (incluyendo 180 relacionadas con el hombre, 59 de las cuales se seleccionan como de *efecto tóxico en humanos* y 15 informan *capacidad cancerígena*).

La dosis letal 50 (DL50) oral aguda para ratas hizo que el glifosato fuera calificado inicialmente como “*relativamente no tóxico*” para animales. La DL50 se estableció en aproximadamente 5,6 grs de droga/kg de animal según lo informara el grupo *Monsanto* en 1989 ratificando un estudio previo de Street y cols de 1979, desarrollado por el mismo grupo en oportunidad de tramitar el registro de la marca comercial *Roundup*[®].^{33,34}

La OMS, en 1994, estableció que la DL50 para glifosato o AMPA en ratas es de 5.600 mg/kg, corroborando los resultados de *Monsanto*.³⁵

La EPA (*Environmental Protection Agency* – Agencia de protección medioambiental de Estados Unidos) ha clasificado al glifosato como perteneciente al grupo “E” (sin evidencia de efecto carcinogénico en humanos). Esto se basó en la

información disponible en el momento de la evaluación. Sin embargo, esta misma entidad cita luego que “*Esta conclusión no debe ser considerada definitiva dado que el agente podría ser cancerígeno bajo ciertas circunstancias*”.³⁶

Sin embargo, el CONICET establece que el glifosato no es tóxico en las dosis habituales y lo coloca número 110 en las listas de toxicidad a nivel de todos los agroquímicos.

Un estudio a largo plazo (2 años) con ratas albinas a las que se les administró *Roundup*[®], evidenció la alteración hormonal en la regulación del E2 y T en las hembras y aparición de tumores de mama entre otros tipos de carcinomas.³⁷

En otro estudio, llevado a cabo por Dallegrave y cols (2003) se observó un efecto teratogénico luego de exponer ratas preñadas a *Roundup*[®] (500, 750 o 1000 mg/kg) por vía oral desde el día 6 al 15 de la preñez. Los resultados mostraron un 50% de mortalidad en las ratas a la concentración más alta, así como alteraciones óseas (a nivel de cráneo, extremidades y cola) y retardo en el desarrollo del esqueleto de los fetos en forma dosis-dependiente.³⁸

En todos estos estudios citados se muestra el efecto tóxico del glifosato en ratas de laboratorio púberes, adultas, hembras preñadas, y en los fetos expuestos durante la gestación. El glifosato intervendría negativamente sobre el desarrollo y crecimiento tanto en la pubertad como en el producto de la gravidez. Se ha intentado dilucidar el mecanismo por el cual ejercería estos efectos y uno de ellos sería la vía de la aromatasa, parte esencial en el metabolismo de las hormonas esteroideas sexuales. Poco se conoce sobre los alcances del glifosato a nivel de los receptores hormonales.

Hasta el momento, a pesar de la exhaustiva revisión bibliográfica, al respecto no se encontraron publicaciones que evalúen la toxicidad de productos químicos a nivel del endometrio de ratas hembras.

Materiales y métodos

Tipo de estudio: Diseño experimental en animales

Población: Se utilizaron 18 Ratas Wistars hembras, adultas, de 80-90 días, con un peso promedio aproximado de 300 grs. Se decidió trabajar con 9 ratas en el grupo de exposición al *Roundup Full II*[®] y 9 ratas en el grupo de no expuestas, asumiendo una potencia del 95%, según el cálculo del

tamaño muestral con el programa estadístico *Epidat*.

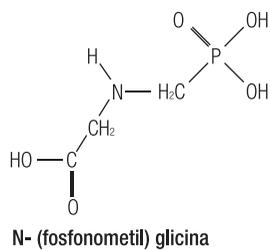
Se les proporcionó un período de 14 días para la adaptación y fueron mantenidos en un ambiente con períodos de luz-oscuridad de 12 horas, a temperatura entre 20-26°C y 30-70% de humedad, con ventilación adecuada del lugar. Las ratas del grupo exposición fueron colocadas en jaulas individuales. Todas las jaulas fueron suspendidas para facilitar la limpieza y eliminación de desechos. La alimentación consistió en una dieta *ad libitum*, a base de alimento balanceado para "rata-ratón". La administración de agua corriente se realizó mediante frascos con sistema de tubo invertido para succión. En el grupo de exposición se adicionó al agua el glifosato en su forma líquida. El agua y la comida se retiraron 16 horas antes del experimento.

Características del producto químico

El producto químico utilizado fue el *Roundup Full II®* (Monsanto Argentina S.A.I.C.).

Fórmula química del principio activo: C₃ H₈ NO₅ P (CAS Reg. No.: 70901-12-1).

Figura 1. Peso molecular del principio activo: 169,09 g/mol.



La identidad química exacta no se especifica ya que es información comercial secreta de la empresa *Monsanto*.

Toxicidad oral aguda Rata, LD50: >3.000 mg/kg peso corporal. Clase IV - Producto que normalmente no ofrece peligro para la clasificación toxicológica de plaguicidas de la OMS.

Dosis

Al grupo de exposición se les administraron 300 mg/kg/día de *Roundup Full II®* (dosis diez veces menor a la DL50) por un período de 30 días,

diluido en el agua suministrada diariamente para su hidratación (el glifosato es muy soluble en agua).

Esta dosis fue seleccionada en forma arbitraria, aunque basada en estudios previos realizados en ratas *Wistars* para analizar los efectos del glifosato. Según Lu,³⁹ la dosis en la cual comienzan a aparecer los efectos tóxicos es de 50 mg/kg; Romano⁴⁰ utilizó dosis de hasta 250 mg/kg/día en sus experimentos con ratas y *Roundup Transbord®*.

Procedimientos

El día del experimento se procedió a realizar anestesia general antes de cualquier tipo de instrumentación (experimentos realizados en forma separada pero con igual procedimiento anestésico). Se utilizó anestesia general inyectable, tiopental, en dosis de 30 mg/kg, aplicada por vía intraperitoneal, mediante una punción en el cuadrante inferior e izquierdo del abdomen de la rata, previa inmovilización, sosteniendo la rata desde su cola con tracción ejercida mediante los dedos índice y pulgar desde el cuello.

El último día del experimento, se les realizó un análisis colpocitológico para evaluar el ciclo estral. Previa anestesia general, se les tomó una muestra de flujo vaginal a través de una micropipeta aspirativa y se preparó un extendido en un porta-objeto; se fijó en etanol y al final del estudio se realizó tinción de hematoxilina-eosina para la posterior evaluación microscópica de las células. Luego se procedió a realizar una laparotomía mediana con escisión completa de útero y ovarios, los cuales fueron colocados en frascos con formol. Posteriormente se realizó una punción intracardíaca con jeringa de tuberculina y aguja intravenosa punzando en el área cardíaca; se obtuvieron 5 ml de sangre aproximadamente de cada rata y se los colocó en tubos *Eppendorf* rotulados para el dosaje hormonal. Los tubos fueron almacenados a -20°C hasta su procesamiento.

Mediciones hormonales

Las determinaciones de hormona tiroideo-estimulante (TSH), estradiol (E2), hormona foliculo estimulante (FSH) y progesterona (P) fueron realizadas mediante inmunoensayo competitivo de quimioluminiscencia directa, utilizando el equipo *Advia Centaur* (*Siemens*). Para el E2 la sensibilidad analítica fue 7 pg/ml y para la FSH fue de 0,3 mUI/ml. Para la P la sensibilidad analítica fue de 0,21 ng/ml.

Histología

Para el análisis posterior de los endometrios de las ratas hembras, se procedió a preparar los tacos de parafina. Luego se realizaron cortes de 5 a 10 micrómetros con un micrótopo con cuchillas de acero y se realizó el montaje sobre un portaobjeto mediante baño termostatzado para con hematoxilina-eosina.

Contaje de células endometriales

Los preparados histológicos de endometrio, teñidos con hematoxilina-eosina, se observaron en 100x con microscopio trinocular *MIKOBA 800*. Se obtuvieron entre 6 y 8 fotos de cada animal de experimentación con la cámara digital *MIKOBA 300*.

Las imágenes en formato TIFF se analizaron con el programa de libre acceso, *Image J (NIH)*. Se delimitaron áreas de aproximadamente 4 mm² para realizar el contaje de las células del estroma endometrial en cada foto. Luego se calculó la cantidad de células por mm² y se compararon los promedios de células por mm² entre los grupos expuestos y no expuestos

Inmunohistoquímica

Los estudios de inmunohistoquímica para evaluar la expresión de los receptores de progesterona (RP) en las ratas hembras expuestas y no expuestas se realizaron a partir de cortes de tejido embebidos en parafina.

Se utilizaron doce anticuerpos monoclonales de ratón obtenidos a partir de *kits* comerciales. El panel incluyó dos nuevos anticuerpos monoclonales (MAbs), PgR636 y PgR1294, que son capaces de reconocer los receptores en muestras previamente fijadas con formol y embebidas en parafina, técnica establecida y comprobada por Edwdars 2002.⁴¹

Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versión 18. Se realizó

la prueba del Kolmogorov-Smirnov para contrastar la hipótesis de que las muestras obtenidas provienen de poblaciones con una distribución normal.

Las variables cuantitativas que se distribuyeron normalmente fueron analizadas con la prueba de *t-Student* para muestras pareadas. En aquellas variables en las que la normalidad fue rechazada, se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para determinar si las diferencias entre las muestras fueron significativas. Un valor de $P < 0,05$ fue considerado como estadísticamente significativo.

Aspectos éticos

Los protocolos experimentales se realizaron de acuerdo a las "Guías para el Cuidado y Uso de animales de Laboratorio", 8ª Edición, actualizada en 2011.⁴² En Materiales y Métodos se explicó sobre los cuidados que se tuvieron en cuenta para el buen trato de los animales durante el experimento y sobre la eutanasia oportuna. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Instituto Universitario de Rosario (IUNIR).

Resultados

Peso antes y después de la exposición a glifosato

Las 9 ratas hembras expuestas y las 9 no expuestas fueron pesadas al inicio y finalización del estudio.

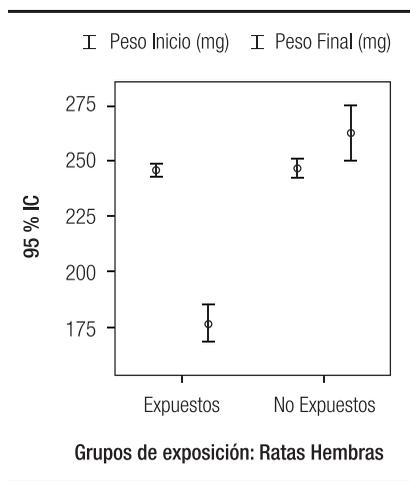
En las ratas expuestas al *Roudup Full II*[®], el peso promedio al inicio del estudio fue de 246 mg (DS: 3,53), mientras que luego de la exposición pesaron en promedio 70 mg menos (Tabla 2). En las ratas no expuestas el peso promedio al inicio fue de 247 mg y al final de 263 mg.

Se encontró una disminución estadísticamente significativa ($t = 17,3$; $P < 0,001$) entre el peso de inicio y el peso al final del experimento en las ratas expuestas al *Roudup Full II*[®]; y un aumento estadísticamente significativo ($t = -3,9$; $P = 0,004$) entre el peso de inicio y el peso final en las ratas no expuestas (Gráfico 1).

Tabla 2. Distribución del peso promedio de las ratas hembras previo al experimento y al final del mismo.

Grupos de exposición: Ratas Hembras		Media	N	Desviación típ.	Error típ. de la media
Expuestos	Peso de Inicio (mg)	246,22	9	3,528	1,176
	Peso final (mg)	176,67	9	10,932	3,644
No Expuestos	Peso de Inicio (mg)	246,89	9	5,442	1,814
	Peso final (mg)	263,00	9	16,447	5,482

Gráfico 1. Distribución del peso de ratas hembras expuestas y no expuestas al glifosato, antes y después de la exposición. *eso molecular del principio activo: 169,09 g/mol.*



Niveles séricos hormonales

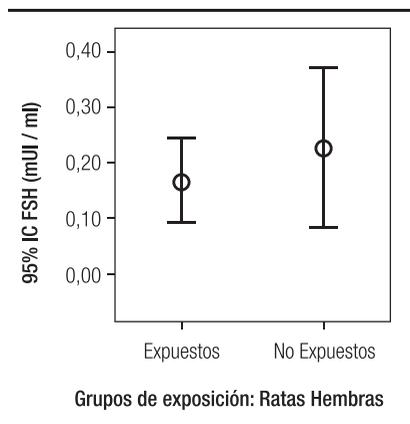
Los valores séricos promedio de FSH en las ratas expuestas fueron de 0,16 mUI/ml (DS: 0,9) y en las ratas no expuestas de 0,22 mUI/ml (DS: 0,19).

Los niveles de E2 en el grupo de exposición fueron en promedio de 35,52 pg/ml (DS:14,4) y en las ratas no expuestas de 37,02 (DS: 16,3).

Los niveles promedio de TSH fueron de 1,37 mUI/ml (DS: 0,49) en las expuestas y 1,97 mUI/ml (DS: 1,57) en las no expuestas.

No hubo diferencias estadísticamente significativas con respecto a los valores séricos de FSH

Gráfico 2. Distribución de los valores séricos de FSH en ratas expuestas y no expuestas al glifosato.



($t = -0,858$; $P = 0,40$); E2 ($t = -0,207$; $P = 0,84$) y TSH ($P = 0,66$) entre los grupos expuestos y no expuestos al Roundup Full II® (Gráficos 2-4).

Con respecto a la P, los valores séricos promedio en las ratas expuestas al glifosato fueron de 3,22 (DS: 1,83), mientras que en las ratas no expuestas de 15,92 (DS: 8,16).

Se encontró una disminución estadísticamente significativa en los niveles séricos de P en las ratas

Gráfico 3. Distribución de los valores séricos de E2 en ratas expuestas y no expuestas al glifosato.

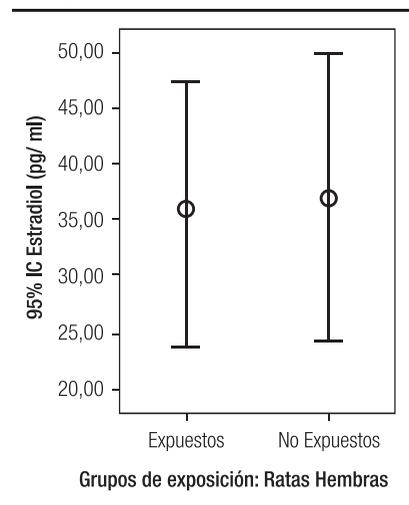
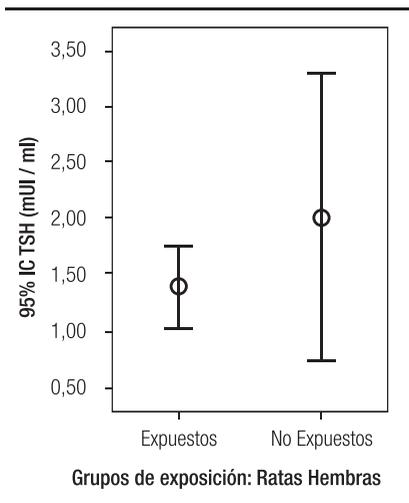
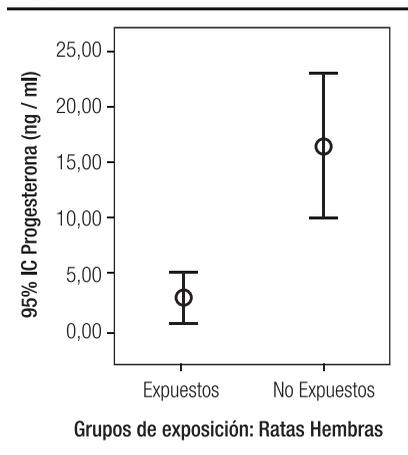


Gráfico 4. Distribución de los valores séricos de TSH en ratas expuestas y no expuestas al glifosato.



expuestas al *Roundup Full II*[®] en comparación con las no expuestas ($t= 9,1$; $P = 0,004$) (Gráfico 5).

Gráfico 5. Distribución de los valores séricos de P en ratas expuestas y no expuestas al glifosato.

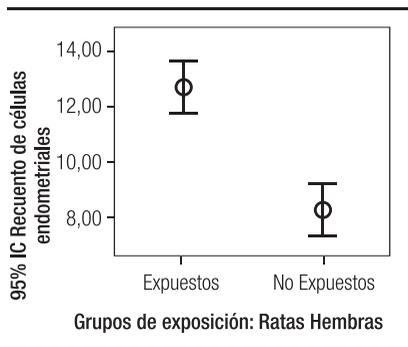


Recuento de células endometriales

Debido a estas diferencias entre los niveles de P se realizó el conteo de las células del estroma endometrial: en las ratas expuestas se encontró un promedio de 12,8 células por mm^2 (DS: 0,41) de estroma endometrial, mientras que en el grupo de no exposición se encontró una media de 7,9 células por mm^2 (DS: 0,34).

El recuento de células endometriales en las ratas expuestas al glifosato fue significativamente mayor al de las no expuestas ($t= 9,1$; $P < 0,001$) (Gráfico 6).

Gráfico 6. Distribución del número de células del estroma endometrial por mm^2 de tejido. Distribución de los valores séricos de P en ratas expuestas y no expuestas al glifosato.



Las siguientes figuras (Figura 2) corresponden a imágenes a 100x (A) y a 400x (C) de una ratita expuesta a *Roundup Full II*[®] mostrando el aumento de la celularidad a nivel del estroma endometrial en comparación con una imagen de endometrio de una ratita no expuesta (B) y (D) (Figura 3).

Figura 2. Foto del tejido endometrial a 100x de una ratita expuesta al glifosato, tinción hematoxilina-eosina (A); foto del tejido endometrial a 100x de una ratita no expuesta al glifosato, tinción hematoxilina-eosina (B).

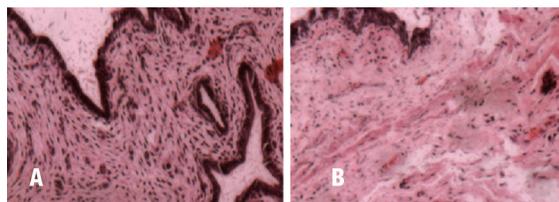
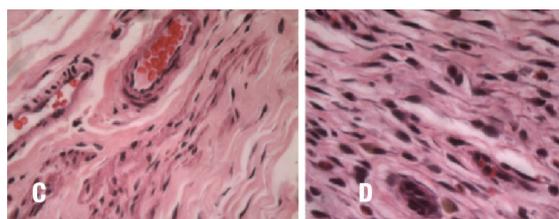


Figura 3. Foto del tejido endometrial a 400x de una ratita expuesta al glifosato, tinción hematoxilina-eosina (C); foto del tejido endometrial a 400x de una ratita no expuesta al glifosato, tinción hematoxilina-eosina (D).



Receptores de progesterona en estroma endometrial

Se procedió entonces a la investigación del rol del glifosato como perturbador endocrino, dados estos hallazgos entre los niveles de P y el número de células endometriales.

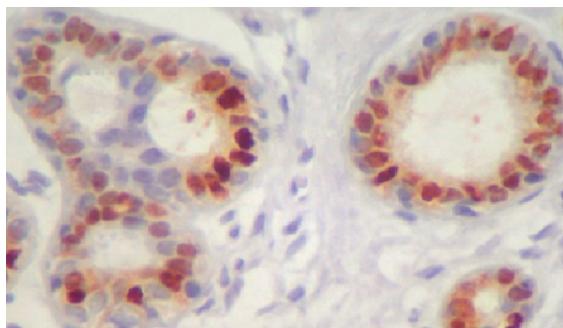
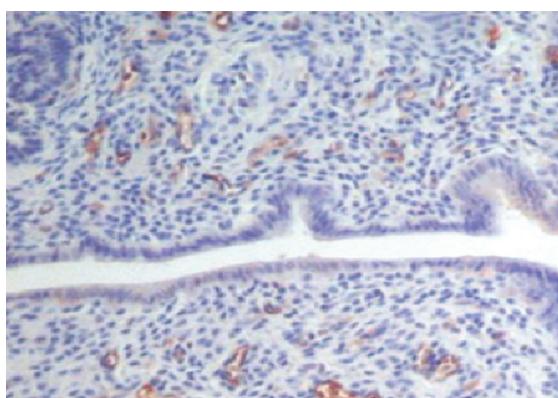
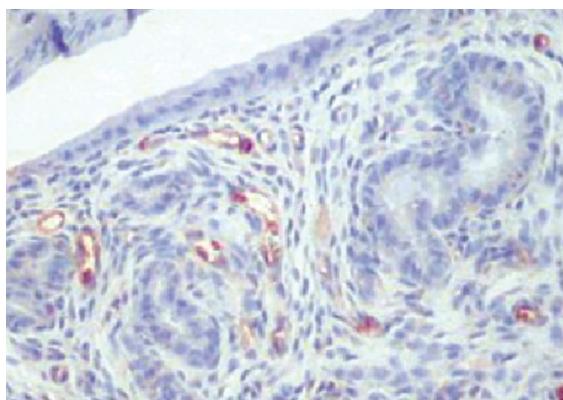
Sin embargo, no se registró expresión de los RP a nivel del endometrio por inmunohistoquímica tanto en las ratas expuestas como en aquellas no expuestas (Tabla 3).

Las siguientes imágenes muestran un control positivo para RP en tejido mamario (Figura 4) en donde aparecen teñidos los receptores a nivel de las células glandulares de los acinos mamarios y dos imágenes de tejido endometrial correspondientes a ratas expuestas (Figura 5) y no expuestas (Figura 6) al *Roundup Full II*[®] en donde las estructuras glandulares no aparecen de diferente color al resto del tejido.

Tabla 3. Expresión de los RP a nivel endometrial en ratas expuestas y no expuestas al glifosato.

Expresión de receptores endometriales	Ratas Expuestas	Ratas No expuestas
RP positivos	0	0
RP negativos	8	8
RP no analizables*	1	1

*No analizables debido a que las muestras sufrieron modificaciones en la arquitectura endometrial al ser procesadas.

Figura 4. Control positivo para RP mediante inmunohistoquímica en tejido mamario.**Figura 5.** Foto de endometrio de ratas no expuestas al glifosato con inmunohistoquímica para RP.**Figura 6.** Foto de endometrio de ratas expuestas al glifosato con inmunohistoquímica para RP.

progestacional. Estas características celulares y la escasa cantidad de leucocitos observados indican que las ratas se encontraban en la fase final del metaestro (Figura 7 A).

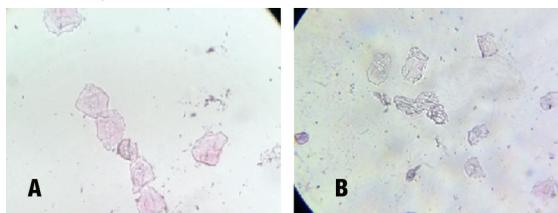
En el grupo de ratas no expuestas al glifosato se observaron células epiteliales queratinizadas, poligonales sin núcleo o con núcleo eosinófilo, con algunas células basales de núcleo grande. Estas características marcan el estadio de estro influenciado por los niveles de E2 (Figura 7 B).

En ambos grupos la citología vaginal presentó escasas células y escasa cantidad de leucocitos.

Colpocitología

El estudio citológico de la vagina evidenció diferencias entre los dos grupos estudiados: expuestos y no expuestos al glifosato.

En el grupo de exposición se pudieron observar algunas células poligonales queratinizadas y una mayor cantidad de células plegadas; estas células son características de la impregnación

Figura 7. A. Colpocitología en fase de estro de ratas expuestas, aumento de 400x tinción hematoxilina-eosina. **B.** Colpocitología en fase de metaestro de ratas no expuestas al glifosato, aumento de 400x, tinción hematoxilina-eosina.

Discusión

Los efectos de los agroquímicos son variables y es difícil medir su impacto real, dado que sus acciones están en relación al tiempo de exposición, dosis, vulnerabilidad específica de cada especie y de cada individuo.

Los resultados de estudios en humanos son difíciles de interpretar debido a variaciones epidemiológicas, geográficas y socioculturales; y a la pausabilidad biológica.

Las publicaciones de experimentos en animales si bien tienen en consideración un menor número de variables, presentan también la limitante de la dosis, tiempo de exposición y tamaño de la muestra.

Es por estos motivos que la literatura publicada hasta el momento sobre el efecto del glifosato a nivel reproductivo es controversial.

La OMS publicó en 2003 que aproximadamente 20 mil mujeres, varones y niños por año murieron por exposición accidental a pesticidas; 3 millones sufrieron consecuencias agudas no fatales y cerca de 3-4 millones de personas experimentaron hasta ese año efectos crónicos por esta exposición.⁴³

En Argentina, de acuerdo a la Resolución 350/99 del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), el principio activo glifosato en su uso normal está dentro del grupo de productos de improbable riesgo agudo: Clase Toxicológica IV. El glifosato está clasificado en la categoría de Menor Riesgo Toxicológico, es decir, banda verde en las etiquetas de los envases, constituyéndose en un producto no dañino para el hombre y el medio ambiente.

Sin embargo, muchos estudios revisados anteriormente en este trabajo muestran alteraciones a nivel de la salud reproductiva en relación a la exposición a agroquímicos, particularmente al glifosato. Esto también ha sido puesto en evidencia por varios autores a través de diseños experimentales en animales.⁴⁴

En la presente investigación, la exposición al *Roundup Full II*[®] mostró en ratas hembras expuestas una afectación en los niveles de P y cambios en el estroma endometrial.

Tanto en humanos como en roedores, la acción coordinada de E2 y P, regulando la proliferación y diferenciación de las células uterinas en una manera espacio-temporal determina o establece la ventana de implantación.⁸

No se han dilucidado aún los valores séricos específicos precisos de cada hormona pero sí se sabe que deben actuar de manera conjunta bajo ciertos niveles críticos, el E2 primero y la P luego.

Así se ha mostrado que altos niveles de estradiol en ciclos estimulados alteran el endometrio de manera tal que se producen fallas de implantación. Es decir, que se requieren de bajas concentraciones de estradiol para que el endometrio se torne receptivo y altas concentraciones para que se transforme en refractario o no receptivo.⁴⁵ También se ha estudiado que altos niveles de P, frecuentes en hiperestimulación ovárica para tratamientos de fertilización asistida, producen cambios histológicos endometriales que no favorecen a la implantación.^{46,47}

El adecuado balance entre E2 y P es lo que permite que el endometrio se torne receptivo para la implantación. La presente investigación, por un lado mostró que la exposición al glifosato produce una disminución en los niveles séricos de P, y por otro, un aumento en la celularidad endometrial.

Estos resultados son controversiales ya que normalmente la P es la responsable de la proliferación celular que presenta el endometrio, previa acción de los estrógenos, cuando se analiza la implantación.

Una explicación factible para esta controversia en los resultados podría ser el hecho de que la exposición prolongada a estrógenos sin oposición con progestágenos conlleva a hiperplasia endometrial y, por ejemplo, consecuente riesgo de cáncer de endometrio, dada la proliferación celular excesiva. Por lo tanto, tal vez no sería la disminución de P lo que produjo hiperplasia del endometrio en las ratas expuestas sino la falta de oposición estrogénica en relación al aumento de P. Estas alteraciones afectan la implantación y podrían ser objeto de análisis en un estudio próximo que evalúe la implantación embrionaria bajo los efectos del glifosato.

En este trabajo no se pudo demostrar que la acción del glifosato para producir estos efectos haya estado mediada por receptores. Deberían investigarse sus efectos a nivel nuclear, mediante la evaluación de ARNm, por ejemplo.

La correlación histológica de la ventana de implantación también es tema de controversias.

Sólo el 15% aproximadamente de los ciclos menstruales en las mujeres tiene la duración es-

tablecida de 28 días y todos los estudios en los que se investigaron marcadores de implantación en relación a la histología fueron llevados a cabo según la duración de un ciclo de 28 días.⁴⁸ Además, estudios génicos para receptividad han desestimado la importancia del fechado histológico para la determinación del endometrio receptivo. Por otro lado, en un estudio en el que se evalúan las características endometriales implantatorias se confirma que la variabilidad inter-observador podría tener una gran repercusión clínica al momento de determinar histológicamente la ventana de implantación.⁴⁹

En el presente trabajo se estableció un modelo matemático para intentar suprimir la apreciación subjetiva del recuento de células endometriales, por lo que los resultados logrados podrían ser consistentes.

El estudio de las células de descamación de la vagina presentó, en el grupo de exposición al glifosato, características de impregnación progesteracional al observarse células coincidentes con la fase de metaestro. Estos resultados no tendrían una correlación con los hallazgos hormonales ni con la expresión de los receptores de P, probablemente debido al escaso número de células vaginales halladas.

Si bien serían necesarios más estudios relacionados con la presente investigación, es importante remarcar que el *Roundup Full II*[®] provoca un desbalance en el ciclo estral, en la producción de P y en el número de células endometriales, afectando así la receptibilidad endometrial. Estos hallazgos marcarían un precedente que hace pensar sobre el posible efecto de este herbicida en la regulación de la implantación en humanos.

Conclusiones

La reproducción es un proceso indispensable en la vida de los organismos ya que debido a ella perduran las especies a lo largo del tiempo.

Desde la revolución industrial, el hombre ha contribuido en gran medida a alterar el medio ambiente a través de diversos mecanismos. El desarrollo de ciertas tecnologías para mejorar el rendimiento de los campos para la agricultura está causando daños severos en el ecosistema.

En las ratas hembras, este trabajo mostró que el glifosato es capaz de inducir modificaciones a nivel endometrial aumentando el número de células

del estroma y disminuyendo los valores séricos de P. Sin bien estos resultados son contradictorios, ambas modificaciones influyen de manera directa en la receptividad endometrial y en la capacidad implantatoria.

Para el análisis más profundo sobre los cambios a nivel del endometrio debería desarrollarse un futuro trabajo de investigación en el cual se evalúe la interacción de un embrión en cultivo de líneas celulares endometriales autólogo expuesto previamente al glifosato. De esta manera se podría conocer más sobre el real impacto del glifosato en la receptividad endometrial.

Referencias

1. Bosch E, Valencia I, Escudero E et al. Premature luteinization during gonadotropin-releasing hormone antagonist cycles and its relationship with in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 2003;80:1444-1449.
2. Kyrou D, Popovic-Todorovic B, Fatemi, HM, et al. Does the E2 level on the day of human chorionic gonadotrophin administration have an impact on pregnancy rates in patients treated with rec-FSH/GnRH antagonist? *Hum Reprod* 2009;24:2902-2909.
3. Papanikolaou, EG, Kolibianakis, EM, Pozzobon C, et al. Progesterone rise on the day of human chorionic gonadotropin administration impairs pregnancy outcome in day 3 single-embryo transfer, while has no effect on day 5 single-blastocyst transfer. *Fertil Steril* 2009; 91:949-952.
4. Bosch E, Labarta E, Crespo J, Simón C, Remohí J, Jenkins J, Pellicer A. Human Circulating progesterone levels and ongoing pregnancy rates in controlled ovarian stimulation cycles for in vitro fertilization: analysis of over 4000 cycles. *Human Reprod* 2010; 25:2092-2100.
5. Vaerenbergh I, Fatemi HM, Blockeel C, Van Lommel L, In't Veld P, Schuit F, Kolibianakis EM, Devroey P, Bourgain C. Progesterone rise on HCG day in GnRH antagonist/rFSH stimulated cycles affects endometrial gene expression. *Reproductive BioMedicine Online* 2011; 22:263-271.
6. Fanchin R, Righini C, Olivennes F et al. Consequences of premature progesterone elevation on the outcome of in vitro fertilization: insights into a controversy. *Fertil Steril* 1997;68:799-805.
7. Aboubakr M. Elnashar. Progesterone rise on the day of HCG administration (premature luteinization) in IVF: An overdue update. *J Assist Reprod Genet* 2010;27:149-155.
8. Dey S, Lim H, Das S, Reese J, Paria B, Daikoku T, Wang H. Molecular Cues to Implantation. *Endocrine Reviews* 2004;25:341-373.
9. Stavreus-Evers, G, Nikas, L, Sahlin, H, Eriksson, B.M. Landgren. Formation of pinopodes in human endometrium is associated with the concentrations of progesterone and progesterone receptors. *Fertil Steril* 2001; 76: 782-791.
10. Salehnia M. Different pattern of pinopodes expression in stimulated mouse endometrium. *Experimental Animals* 2005; 54:349-352.

11. Rashidi B, Rad JS, Roshangar L, Miran RA. Progesterone and ovarian stimulation control endometrial pinopode expression before implantation in mice. *Pathophysiology* 2012;19(2):131-135.
12. Martel D, Monier MN, Roche D, Psychoyos A. Hormonal dependence of pinopode formation at the uterine luminal surface. *Hum Reprod* 1991;6:597-603.
13. Quinn CE, Detmar J, Casper RF. Pinopodes are present in *Lif* null and *Hoxa10* null mice. *Fertil Steril* 2007;88(4):1021-1028.
14. Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet* 2006;7:185-199.
15. Ramathal CY, Bagchi IC, Taylor RN, Bagchi MK. Endometrial decidualization: of mice and men. *Semin Reprod Med* 2010;28:17-26.
16. Grummer R, Chwalisz K, Mulholland J, Traub O, Winterhager E. Regulation of connexin26 and connexin43 expression in rat endometrium by ovarian steroid hormones. *Biol Reprod* 1994;51:1109-1116.
17. Zhang Z, Funk C, Glasser SR, Mulholland J. Progesterone regulation of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor gene expression during sensitization and decidualization in the rat uterus: effects of the antiprogesterin, ZK 98.299. *Endocrinology* 1994;135:1256-1263.
18. Caserta D, Mantovani A, Marci R, Fazi A, Ciardo F, La Rocca C, Maranghi F, Moscarini M. Environment and women's reproductive health. *Hum Reprod Update* 2011;17(3):418-433.
19. Figa-Talamanca I. Occupational risk factors and reproductive health of women. *Occup Med (Lond)* 2006;56:521-531.
20. Fei C, McLaughlin JK, Lipworth L, Olsen J. Maternal levels of perfluorinated chemicals and subfecundity. *Hum Reprod* 2009;24:1200-1205.
21. Frazier LM. Reproductive disorders associated with pesticide exposure. *J Agromedicine* 2007;12:27-37.
22. de Cock J, Westveer K, Heederik D, te Velde E, van Kooij R. Time to pregnancy and occupational exposure to pesticides in fruit growers in the Netherlands. *Occup Environ Med* 1994;51:693-699.
23. Hanke W, Jurewicz J. The risk of adverse reproductive and developmental disorders due to occupational pesticide exposure: an overview of current epidemiological evidence. *Int J Occup Med Environ Health* 2004;17:223-243.
24. Curtis KM, Savitz DA, Weinberg CR, Arbuckle TE. The effect of pesticide exposure on time to pregnancy. *Epidemiology* 1999;10:112-117.
25. Abell A, Juul S, Bonde JP. Time to pregnancy among female greenhouse workers. *Scand J Work Environ Health* 2000;26:131-136.
26. Villa R, Bonetti E, Penza ML, Iacobello C, Bugari G, Bailo M, Parolini O, Apostoli P, Caimi L, Ciana P et al. Target-specific action of organochlorine compounds in reproductive and nonreproductive tissues of estrogen-reporter male mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;201:137-148.
27. Aldad TS, Rahmani N, Leranath C, Taylor HS. Bisphenol-A exposure alters endometrial progesterone receptor expression in the nonhuman primate. *Fertil Steril* 2011;96(1):175-179.
28. Inoue MH, Oliveira-Jr RS, Regitano JB, Tormena CA, Tornisiolo VL, Constantin J. Criterios para avaliacao do potencial de lixiviacao dos herbicidas comercializados no Estado do Parana'. *Planta Daninha* (2003) 21:313-323.
29. Sistema Integrado de Información Agropecuaria, Programa de Servicios Agrícolas Provinciales, Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Disponible en: <http://dev.siaa.gov.ar/series>.
30. Adam A, Marzuki A, Abdul Rahman H, Abdul Aziz M. The oral and intratracheal toxicities of ROUNDUP and its components to rats. *Vet Hum Toxicol* 1997;39(3):147-151.
31. Dallegrave E, Mantese FD, Dalsenter PR, Langeloh A. Acute oral toxicity of glyphosate in Wistar rats. *On Line J Vet Res* 2002;1:29-34.
32. Informe acerca del grado de toxicidad del Glifosato. 2010. Universidad Nacional del Litoral (UNL). Disponible en: www.unl.edu.ar/noticias/media/docs/Informe%20Glifosato%20UNL.pdf.
33. Williams GM, Kroes R, Munro IC. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Reg Toxicol Pharmacol* 2000;31:117-165.
34. CONICET 2009. Op.cit.pág 41.
35. WHO. Glyphosate. Environmental health criteria N° 159. WHO, Geneva;1994.
36. EPA Office of Pesticide and Toxic Substances, U.S. "Second peer review of glyphosate". Memo de W. Dykstra and GZ Ghali, Health Effects Division a R. Taylor, Registration Division, y Lois Rossi, Special Review and Re-registration Division. Washington DC; 30 de octubre de 1991.
37. Séralini GE, Clair E, Mesnage R, Gress S, Defarge N, Malatesta M, Hennequin D, de Vendômois JS. Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. *Food Chem Toxicol* 2012;50:4221-431.
38. Dallegrave E, Mantese FD, Coelho RS, Pereira JD, Dalsenter PR, Langeloh A. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup in Wistar rats. *Toxicol Lett* 2003;142:45-52.
39. Lu FC. A review of the acceptable daily intakes of pesticides assessed by WHO. *Regul Toxicol Pharmacol* 1995;21:352-364.
40. Romano y cols. 2012. Op.cit. pág 37.
41. Press M, Spaulding B, Groshen S, Kaminsky D, Hagerty M, Sherman L, Christensen K, Edwards DP. Comparison of different antibodies for detection of progesterone receptor in breast cancer. *Steroids* 2002 Aug;67(9):799-813.
42. GUIDE LABORATORY ANIMALS FOR THE CARE AND USE. 8° Edition. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute for Laboratory Animal Research. Washington DC.
43. Dinham B, Malik S. Pesticides and human rights. *Int J Occup Environ Health* 2003;9:40-52.
44. Romano y cols. 2012. Op. Cit pág 37.
45. Mirkin S y cols., 2004;Op. cit. pág 12.
46. Labarta y cols, 2011. Op. Cit. pág 11.
47. Bosch E y cols. 2003. Op.cit pág 10.
48. Munster K, Schmidt L, Helm P. Length and variation in the menstrual cycle—a cross-sectional study from a Danish county. *Br J Obstet Gynaecol* 1992;99:422-429.
49. Evans GE1, Phillipson GT, Sin IL, Frampton CM, Kirker JA, Bigby SM, Evans JJ. Gene expression confirms a potentially receptive endometrium identified by histology in fertile women. *Hum Reprod* 2012 Sep;27(9):2747-2755.