

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.<sup>29</sup>

Dentro de las formulaciones de glifosato con el nombre *Roundup*<sup>®</sup> (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.<sup>30,31</sup> No se ha citado que ese componente esté presente en otras marcas comerciales, y el *Roundup*<sup>®</sup> representa el 3,3% de las formulaciones comerciales disponibles en nuestro país.<sup>32</sup> 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*<sup>®</sup>.<sup>33,34</sup>

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*.<sup>35</sup>

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*”.<sup>36</sup>

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*<sup>®</sup>, 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.<sup>37</sup>

En otro estudio, llevado a cabo por Dallegrave y cols (2003) se observó un efecto teratogénico luego de exponer ratas preñadas a *Roundup*<sup>®</sup> (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.<sup>38</sup>

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 aromatasas, 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*<sup>®</sup> 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*.

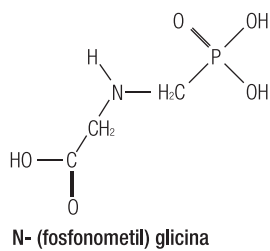
Se les proporcionó un período de 14 días para la adaptación y fueron mantenidos en un ambiente con períodos de luz-oscuridad de 12 horas, a temperatura entre 20-26°C y 30-70% de humedad, con ventilación adecuada del lugar. Las ratas del grupo exposición fueron colocadas en jaulas individuales. Todas 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: C<sub>3</sub> H<sub>8</sub> NO<sub>5</sub> 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,<sup>39</sup> la dosis en la cual comienzan a aparecer los efectos tóxicos es de 50 mg/kg; Romano<sup>40</sup> 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 termostático 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 mm<sup>2</sup> para realizar el contaje de las células del estroma endometrial en cada foto. Luego se calculó la cantidad de células por mm<sup>2</sup> y se compararon los promedios de células por mm<sup>2</sup> 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 Edwards 2002.<sup>41</sup>

### 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.<sup>42</sup> 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.

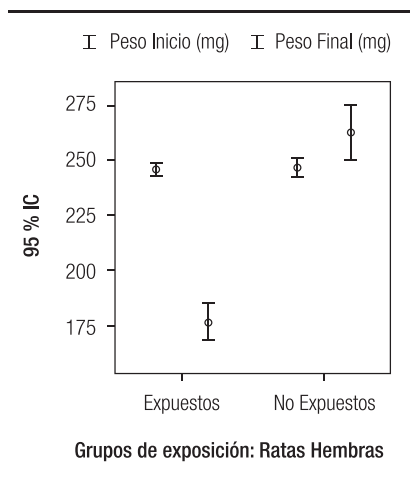
En las ratas expuestas al *Roudup Full II*<sup>®</sup>, el peso promedio al inicio del estudio fue de 246 mg (DS: 3,53), mientras que luego de la exposición pesaron en promedio 70 mg menos (Tabla 2). En las ratas no expuestas el peso promedio al inicio fue de 247 mg y al final de 263 mg.

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*<sup>®</sup>; 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: <b>Ratas Hembras</b>		Media	N	Desviación típ.	Error típ. de la media
<b>Expuestos</b>	Peso de Inicio (mg)	246,22	9	3,528	1,176
	Peso final (mg)	176,67	9	10,932	3,644
<b>No Expuestos</b>	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

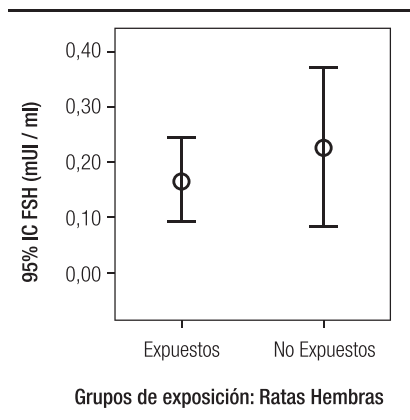
Los valores séricos promedio de FSH en las ratas expuestas fueron de 0,16 mUI/ml (DS: 0,9) y en las ratas no expuestas de 0,22 mUI/ml (DS: 0,19).

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.

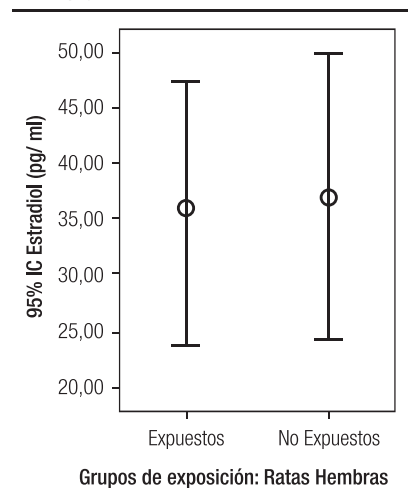


( $t = -0,858$ ;  $P = 0,40$ ); E2 ( $t = -0,207$ ;  $P = 0,84$ ) y TSH ( $P = 0,66$ ) entre los grupos expuestos y no expuestos al Roundup Full II® (Gráficos 2-4).

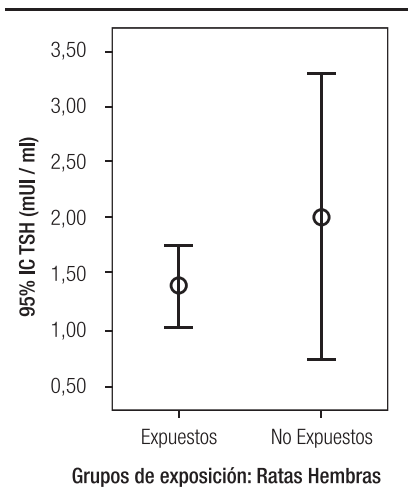
Con respecto a la P, los valores séricos promedio en las ratas expuestas al glifosato fueron de 3,22 (DS: 1,83), mientras que en las ratas no expuestas de 15,92 (DS: 8,16).

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.

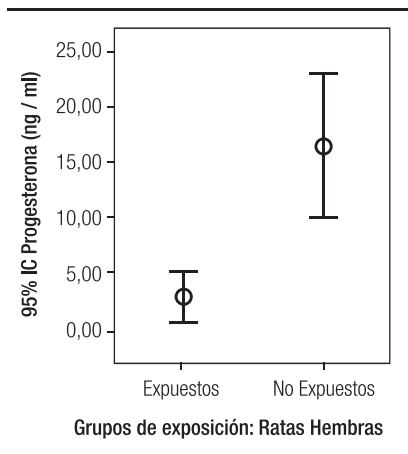


**Gráfico 4.** Distribución de los valores séricos de TSH en ratas expuestas y no expuestas al glifosato.



expuestas al *Roundup Full II*<sup>®</sup> 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.

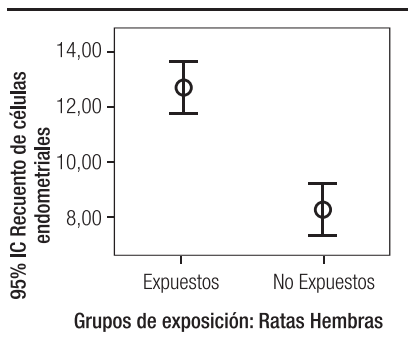


#### Recuento de células endometriales

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  $\text{mm}^2$  (DS: 0,41) de estroma endometrial, mientras que en el grupo de no exposición se encontró una media de 7,9 células por  $\text{mm}^2$  (DS: 0,34).

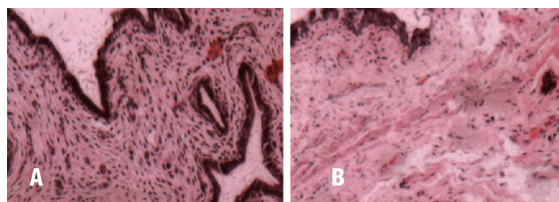
El recuento de células endometriales en las ratas expuestas al glifosato fue significativamente mayor al de las no expuestas ( $t= 9,1$ ;  $P < 0,001$ ) (Gráfico 6).

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

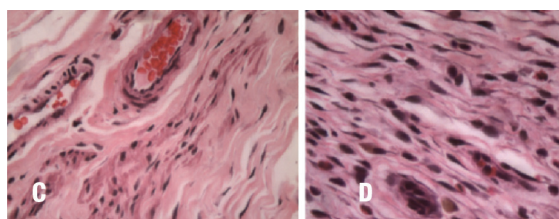


Las siguientes figuras (Figura 2) corresponden a imágenes a 100x (A) y a 400x (C) de rata expuesta a *Roundup Full II*<sup>®</sup> mostrando el aumento de la celularidad a nivel del estroma endometrial en comparación con una imagen de endometrio de una rata no expuesta (B) y (D) (Figura 3).

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



**Figura 3.** Foto del tejido endometrial a 400x de una rata expuesta al glifosato, tinción hematoxilina-eosina (C); foto del tejido endometrial a 400x de una rata 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.

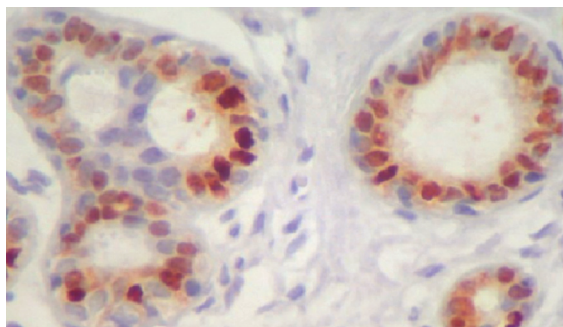
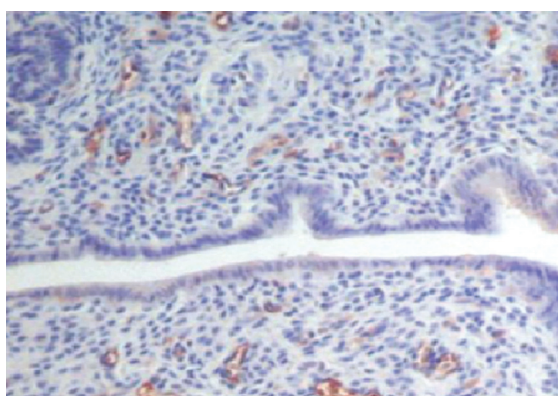
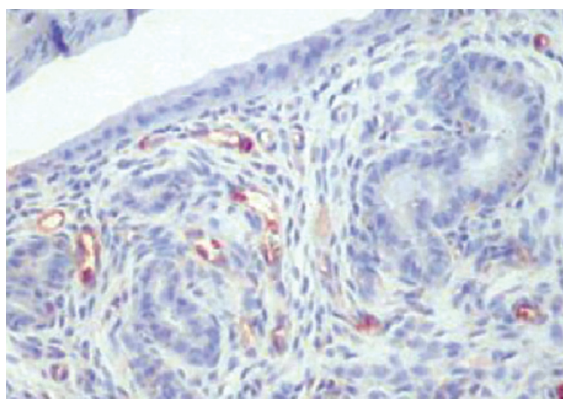
Sin embargo, no se registró expresión de los RP a nivel del endometrio por inmunohistoquímica tanto en las ratas expuestas como en aquellas no expuestas (Tabla 3).

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*<sup>®</sup> 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.