

**Avaliação *in vitro* da interferência do herbicida glyphosate no controle endócrino do crescimento ovariano por neuro-hormônios e prostaglandinas, no caranguejo do estuário *Neohelice granulata***

***In vitro* evaluation of the interference of the herbicide glyphosate on the endocrine control of ovarian growth, by neurohormones and prostaglandins, in the estuarine crab *Neohelice granulata***

DOI: 10.34188/bjaerv5n4-027

Recebimento dos originais: 06/05/2022

Aceitação para publicação: 30/06/2022

**Ivana S. Canosa**

Doctorada en Ciencias Biológicas por la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (DBBE-FCEyN). Instituto IBBEA (CONICET-UBA).  
Intendente Guiraldes 2160, Ciudad Universitaria, pab. 2. CP: 1428  
E-mail: ivisofia@gmail.com

**Gabriela R. Silveyra**

Doctorada en Ciencias Biológicas por la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (DBBE-FCEyN). Instituto IBBEA (CONICET-UBA).  
Intendente Guiraldes 2160, Ciudad Universitaria, pab. 2. CP: 1428  
E-mail: gab.silveyra@gmail.com

**Juliana L. Lofrano**

Licenciada en Ciencias Ambientales por la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía. Instituto IBBEA (CONICET-UBA). Intendente Guiraldes 2160, Ciudad Universitaria, pab. 2. CP: 1428  
E-mail: jlofrano@agro.uba.ar

**Daniel A. Medesani**

Doctorado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (DBBE-FCEyN). Instituto IBBEA (CONICET-UBA). Intendente Guiraldes 2160, Ciudad Universitaria, pab. 2. CP: 1428  
E-mail: medesani@bg.fcen.uba.ar

**Enrique M. Rodríguez**

Doctorado en Ciencias Biológicas por la Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (DBBE-FCEyN). Instituto IBBEA (CONICET-UBA).  
Intendente Guiraldes 2160, Ciudad Universitaria, pab. 2. CP: 1428  
E-mail: enrique@bg.fcen.uba.ar

**RESUMO**

Fêmeas adultas do caranguejo *Neohelice granulata*, da Baía de Samborombón (Província de Buenos Aires), foram utilizadas para experimentos. Os testes *in vitro* foram realizados durante o período pré-reprodutivo, a fim de avaliar o crescimento do ovário isolado na presença do herbicida (em sua formulação comercial Roundup) e/ou extratos de órgãos neuroendócrinos ou inibidores da síntese de prostaglandinas. Para cada teste, foram utilizadas 12 fêmeas, atribuindo um tratamento diferente para cada porção do ovário da mesma fêmea (delineamento de blocos randomizados). As peças de

ovário foram incubadas por 24 h em meio de cultura M199, a 24 °C e atmosfera controlada. Ao final de cada ensaio, os ovários foram processados para análise histológica ou para determinação dos níveis de vitelogenina (Vg) pela técnica de ELISA. Os resultados dos testes realizados com extratos de pedúnculo ocular ou gânglio torácico indicaram que a adição de Roundup (RUP) não modificou significativamente ( $p>0,05$ ) o efeito desses extratos no crescimento ovariano. No entanto, para avaliar se o efeito do RUP em ovários isolados está relacionado à sinalização hormonal exercida pelas prostaglandinas (PGs), foi realizado um ensaio *in vitro* com ibuprofeno (IBF, inibidor da síntese de PGs). O nível de Vg no tratamento com RUP 0,2 mg/L + IBF 10 mg/L foi significativamente menor ( $p<0,05$ ) que o dos grupos Controle, RUP 0,2 mg/L e IBF 10 mg/L. Embora o RUP *per se* tenha produzido uma diminuição ( $p<0,05$ ) nos níveis de vitelogenina abaixo dos níveis de controle, sua combinação com o IBF estimulou ainda mais ( $p<0,05$ ) essa diminuição. Dada a aditividade dos efeitos inibitórios observados entre o ibuprofeno e o RUP, é plausível propor que o modo de ação do RUP possa ser devido à inibição da síntese endógena de PGs no ovário, embora a possível interferência do RUP com o receptor de PGs, ou a inibição de alguma etapa na via de transdução do hormônio prostaglandina, não possa ainda ser descartado.

**Palavras-chave:** glifosato, crustáceos, ovário, hormônios, prostaglandinas.

## ABSTRACT

Adult females of the crab *Neohelice granulata* sampled at from Samborombón Bay (Buenos Aires Province, Argentina), were used. Several *in vitro* tests were carried out during the pre-reproductive period, in order to evaluate the growth of the isolated ovary in the presence of the herbicide (in its commercial formulation Roundup) and/or extracts of neuroendocrine organs or inhibitors of prostaglandin synthesis. For each assay, 12 females were used, assigning a different treatment to each portion of the ovary of the same female (randomized block design). The ovary pieces were incubated for 24 h in M199 culture medium, at 24 °C and controlled atmosphere. At the end of each assay, the ovaries were processed either for histological analysis or to determine the levels of vitellogenin (Vg) using the ELISA technique. The results of the assays conducted with extracts of eyestalk or thoracic ganglion indicated that Roundup (RUP) addition did not significantly ( $p>0.05$ ) modify the effect of such extracts on ovarian growth. However, in order to assess whether the effect of RUP on isolated ovaries is related to the hormonal signaling exerted by prostaglandins (PG), an *in vitro* assay with ibuprofen (IBF, inhibitor of PG synthesis) was performed. The level of Vg in the treatment with RUP 0.2 mg/L + IBF 10 mg/L was significantly lower ( $p<0.05$ ) than that of the Control, RUP 0.2 mg/L, or IBF 10 mg groups. Although RUP *per se* produced a decrease ( $p<0.05$ ) in Vg levels, compared to control, its combination with IBF caused a higher ( $p<0.05$ ) decrease. Given the additivity of inhibitory effects observed between ibuprofen and the RUP, it is plausible to propose that the mode of action of the RUP could be due to the inhibition of the endogenous synthesis of PGs in the ovary, although the possible interference of the RUP with the PGs receptor, or the inhibition of some step in the prostaglandin hormone transduction pathway, cannot yet be ruled out.

**Keywords:** glyphosate, crustaceans, ovary, hormones, prostaglandins.

## 1 INTRODUCCIÓN

El glifosato es un herbicida sistémico no selectivo, de amplio espectro, perteneciente al grupo de los organofosforados. Interfiere con la síntesis de aminoácidos aromáticos en las plantas, mediante la inhibición de la vía del ácido shikimico. El glifosato se utiliza como principio activo de numerosos formulados comerciales, para el control post-emergente de malezas anuales perennes,

principalmente en cultivos de soja, maíz y algodón, trigo y caña de azúcar. Desde su introducción en la década de 1970, este herbicida ha sido considerado como uno de los plaguicidas con mayor tasa de incremento en su producción y uso (Giesy *et al.*, 2000). A nivel mundial, se han reportado niveles máximos de glifosato que varían entre 3 y 7,6 mg/L (Mann y Bidwell, 1999; Giesy *et al.*, 2000; Solomon y Thompson, 2003). En Argentina, los niveles de glifosato en zonas de su cultivo intensivo se han reportado en valores que varían entre 0,1 y 0,7 mg/L en agua, y entre 0,5 y 5 mg/Kg en sedimento (Peruzzo *et al.*, 2008). Más recientemente, se han reportado en la región pampeana de Argentina concentraciones máximas de 1,8 a 1,9 mg/L, encontrándose que entre el 27 y 55 % de las muestras de agua superficial contenían glifosato en concentraciones detectables (Primost *et al.*, 2017).

Se han reportado efectos adversos del glifosato y sus formulados sobre una amplia variedad de invertebrados. En caracoles acuáticos, el glifosato ha causado alteraciones en el metabolismo enzimático (Christian *et al.*, 1993), mientras que abejas *Apis mellifera* expuestas al herbicida mostraron una menor sensibilidad al néctar y un menor desempeño en el aprendizaje (Herbert *et al.*, 2014). En vertebrados, son numerosos los estudios sobre genotoxicidad, citotoxicidad, estrés oxidativo, alteraciones metabólicas, anormalidades en estadíos tempranos del desarrollo y desorganización endocrina por efecto del glifosato (Gill *et al.*, 2017). En particular, se ha reportado en mamíferos una posible interferencia del herbicida con la síntesis y/o señalización de esteroides (Richard *et al.*, 2005; Gasnier *et al.*, 2009). Por otro lado, en peces expuestos durante 40 días a la formulación comercial Roundup de glifosato, se observó una disminución en los niveles de 17 $\beta$ -estradiol (Benck Soso *et al.*, 2007). En diversos vertebrados, se ha observado que el glifosato causa alteraciones a nivel del eje que regula la madurez ovárica: Ren *et al.* (2018) reportaron en ratones una disminución de la expresión de la neurohormona hipotalámica GnRH, así como otros desbalances hormonales en el eje endocrino-reproductivo. En la línea celular humana corioplacentaria JAr, se encontró una disminución de los niveles de progesterona, (Young *et al.*, 2015).

El cangrejo *Neohelice* (= *Chasmagnathus*) *granulata* (Dana, 1851), es una especie de crustáceo decápodo autóctona, que se encuentra ampliamente distribuida en ambientes estuariales de Argentina y Brasil. Esta especie es considerada una de las más abundantes en los ambientes intermareales del Atlántico suboccidental, especialmente en planicies de marea y marismas; la época reproductiva de *N. granulata* comprende los meses de primavera y verano (López Greco y Rodríguez, 1999). Las larvas eclosionan en zonas de elevada salinidad, y tanto las larvas como los adultos sirven de alimento a diversas especies de peces de interés comercial (Sánchez *et al.*, 1991).

El crecimiento ovárico de esta especie se encuentra bajo el control de varias hormonas, entre las cuáles se cuentan neuropéptidos, esteroides, juvenoides y prostaglandinas. Entre las neurohormonas involucrados en el control del crecimiento ovárico, se destaca por un lado la denominada “hormona inhibidora gonadal” (GIH, por sus siglas en inglés), secretada por la glándula del seno ubicada en los pedúnculos oculares de los crustáceos decápodos, que inhibe la vitelogénesis exógena de los oocitos (Fingerman, 1997). Por otro lado, se ha descrito una “hormona estimulante gonadal” (GSH por sus siglas en inglés), producida y secretada por el cerebro y el ganglio torácico, que parece ser esencial para el inicio de la maduración oocitaria (Fingerman y Rodríguez, 2009), y que podría ser una isoforma de la hormona hiperglucemiante (Fanjul-Moles, 2006). Por otro lado, se han reportado efectos estimulantes de varios esteroides, tales como progesterona y estradiol, sobre el crecimiento ovárico de crustáceos, tanto *in vivo* (Medesani et al., 2015; Silveyra et al., 2018; Merlin et al., 2015) como *in vitro* (Zapata et al., 2003; Meunpol et al., 2007). Más aún, existe evidencia de que el mismo ovario es capaz de producir y reconocer tales esteroides (Thongbuakaew et al. 2016, Preechaphol et al, 2010). Con respecto a las prostaglandinas, Spaziani et al. (1993) han observado un aumento gradual de las prostaglandinas E<sub>2</sub> y F<sub>2</sub> durante la vitelogénesis de la langosta de agua dulce *Peneus paeninsulanus*. En el camarón *Macrobrachium rosenbergii* la forma E<sub>2</sub> fue capaz de estimularla síntesis de AMPc en el tejido ovárico (Sagi et al., 1995). Además, se ha observado un aumento en la actividad de la enzima prostaglandina H sintasa en el ovario del cangrejo *Oziothelphusa senex senex* hacia el final de la vitelogénesis, y una estimulación del desarrollo ovárico por inyección de las prostaglandinas F<sub>2</sub> y E<sub>2</sub> (Reddy et al., 2004). Otros autores observaron una mayor maduración ovárica luego de incorporar prostaglandinas en el alimento de camarones (Yano et al., 2000).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar *in vitro*, la relación entre el crecimiento del ovario y el efecto desorganizador del glifosato sobre el control endocrino de la vitelogénesis, ejercido tanto por neurohormonas de origen peduncular y torácico, como por hormonas prostanoides.

## 2 MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Al comienzo del período pre-reproductivo (invierno), se recolectaron ejemplares de hembras adultas de la especie *Neohelice granulata*, de  $10,68 \pm 0,70$  g de peso corporal, en Punta Rasa (36° 18' 16,5" S -56° 46' 18,6" W), extremo sur de la Bahía de Samborombón, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Dado que Punta Rasa se ubica en la región más abierta del estuario del Plata, es considerada como una zona relativamente libre de contaminación. Los animales fueron transportados en contenedores con agua del lugar. En el laboratorio fueron ubicados en peceras con

agua salina 12 g/L (preparada con sales para agua de mar Tetra Marine Salt Pro®, y agua de red declarada), y mantenidos en condiciones controladas de fotoperíodo (14 L:10 O) y temperatura (22 °C), con aireación continua, durante las dos semanas previas al inicio de los experimentos. Durante este período de aclimatación, los cangrejos fueron alimentados *ad libitum* con alimento balanceado elaborado en el laboratorio, con un porcentaje de proteína del 35 %, según Chaulet *et al.* (2012), con una frecuencia de alimentación de tres veces por semana, en una cantidad equivalente al 5% de la masa corporal promedio de los animales por sesión de alimentación, suplementanda con hojas frescas de *Elodea* sp.

### Herbicida

El formulado comercial utilizado en todos los ensayos, referido de aquí en más como RUP, fue Roundup Ultramax® (Monsanto, Argentina), compuesto por gránulos solubles de sal monoamónica que nominalmente contienen como principio activo glifosato (N-[fosfonometil]glicina) en su forma ácida, al 67,9% p/p. El compuesto se pesó en una balanza digital analítica (Ohaus Pioneer, precisión  $\pm 0,0001$  g), y se utilizó agua destilada como solvente para preparar todas las soluciones stock, ajustando el pH a 7, con unas gotas de NaOH 10N. Las soluciones se prepararon al comienzo de cada semana y se almacenaron a 4 °C en frascos de vidrio envueltos en papel aluminio, a fin de resguardarlos de la luz. Las concentraciones se expresan como mg de principio activo/mL de agua de dilución.

### Ensayos in vitro

En cada ensayo, las hembras de *N. granulata* (n= 12) fueron sacrificadas por crionestesia y se les disecó el ovario, que fue pesado en balanza analítica (Ohaus Pioneer, precisión  $\pm 0,0001$  g), y dividido en porciones de igual peso, de manera de asignar una porción similar del ovario de una misma hembra a cada tratamiento (diseño de bloques al azar). Las porciones de ovario se colocaron en placas de 12 pocillos (Corning®) conteniendo cada uno 2 mL de medio de cultivo M199 (Sigma Co.), disuelto en solución salina para crustáceos (Cooke *et al.*, 1977), modificada en su concentración de sales para compensar las presentes en el medio de cultivo. Se agregó a cada pocillo una alícuota de 20  $\mu$ L de la solución *stock* de herbicida, o bien del vehículo, y se realizó la incubación durante 24 hs, en estufa de cultivo a 28 °C, con un flujo de CO<sub>2</sub> de 0,05 L/min. Al término de la incubación, los órganos se retiraron de la estufa, se colocaron en tubos debidamente rotulados conteniendo PBS 1X, y se almacenaron en freezer a -80 °C. Posteriormente se realizó el protocolo de procesamiento de las muestras, de acuerdo a lo indicado más abajo para cada ensayo.

### *Efecto sobre el control endocrino de neurohormonas*

A fin de preparar extractos, tanto de pedúnculo ocular como de ganglio torácico, a cada hembra sacrificada se le extrajeron los pedúnculos oculares y el ganglio torácico con tijera de disección. Los pedúnculos oculares (desprovistos de las omatidias y de la cutícula), así como los ganglios torácicos, fueron homogenizados separadamente en frío, en solución salina de Cooke para crustáceos (Cooke *et al.*, 1977), y luego centrifugados a 10000 xg durante 20 minutos, a 4°C. Se descartó el *pellet* y se obtuvo un extracto conteniendo hormonas pedunculares u hormonas de ganglio torácico, de manera tal que en cada alícuota de 20 µL (agregada al pocillo de incubación según correspondiera) estuviese presente el contenido equivalente a un pedúnculo ocular o a un ganglio torácico. Los tratamientos de este ensayo fueron: Control (vehículo: solución salina de Cooke); RUP 0,2 mg/L; Extracto hormonal; RUP 0,2 mg/L + Extracto hormonal. El extracto hormonal fue de pedúnculo ocular (PO), o bien de ganglio torácico (GT).

Al término del ensayo, los ovarios fueron fijados en solución de Bouin (70% v/v solución de ácido pícrico saturado; 25% v/v formaldehído 40%; 5% v/v ácido acético glacial), durante 5 hs a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se descartó el fijador y se preservaron los ovarios en etanol (EtOH) 70% v/v a temperatura ambiente, hasta su procesamiento histológico, de acuerdo a Canosa *et al.* (2018). Los cortes de los ovarios fueron observados al microscopio óptico para estimar la proporción relativa de cada tipo de oocito, distinguiéndolos en pre-vitelogénicos, intermedios y vitelogénicos, de acuerdo a su grado de desarrollo, en base a trabajos previos realizados en la misma especie (Avigliano *et al.*, 2014; Canosa *et al.*, 2018). Los oocitos eventualmente en reabsorción fueron también contabilizados.

### *Efecto sobre el control endocrino de prostaglandinas*

Con el fin de evaluar si el efecto del Roundup (RUP) sobre los ovarios aislados está relacionado con la vía de síntesis de las prostaglandinas, se realizó un ensayo *in vitro* utilizando ibuprofeno (PM: 206,29; Sigma) como inhibidor de la vía enzimática de síntesis y liberación de prostaglandinas, dado que este fármaco inhibe la enzima ciclooxigenasa. Los tratamientos fueron: Control (vehículo), RUP 0,2 mg/L, Ibuprofeno 10 mg/L (vehiculizado en agua destilada), y RUP 0,2 mg/L en presencia de Ibuprofeno 10 mg/L.

Al término del ensayo, los ovarios disecados se homogenizaron en *buffer* fosfato de sodio 50 mM en relación 1:3 (p/v) utilizando un émbolo de teflón. Cada homogenato fue centrifugado a 10000 xg por 25 min, en centrífuga Eppendorf® 5415D, a 4 °C. Se descartó el *pellet*, el sobrenadante se llevó a un volumen final de 5 mL con PBS 1X, y se centrifugó a 37000 rpm (100000 xg) durante 50 min a 4 °C, en centrífuga Beckman® XL-90 con rotor 90Ti. Se descartó el *pellet* y el

sobrenadante se almacenó a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para la medición por la técnica de ELISA, según Canosa *et al.* (2018).

### Análisis estadístico

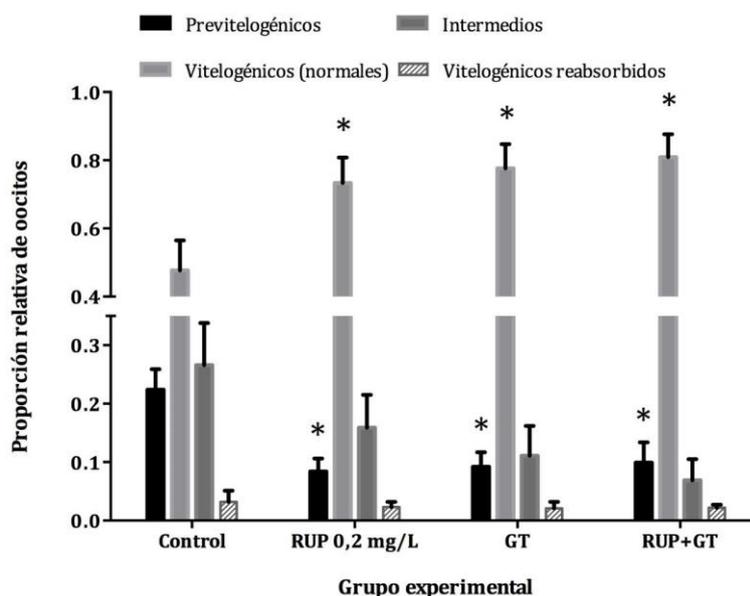
La comparación de diferencias entre medias se realizó mediante un ANOVA con diseño de bloques al azar. Cuando las comparaciones se efectuaron contra el control, se utilizó como post-test Dunnet, mientras cuando se compararon todos los tratamientos entre sí, se utilizó como post-test Tukey (Sokal y Rohlf, 1981). Ante el incumplimiento del supuesto de homogeneidad de varianzas, se incorporó el modelo de bloques al azar a la función de modelado de varianza varIdent, a través del cálculo de la matriz de simetría compuesta (Zuur *et al.*, 2009). Se trabajó en todos los casos con un nivel de significancia del 5%. En los gráficos se encuentran representadas las medias, y las barras de error representan el error estándar.

## 3 RESULTADOS

### Efecto sobre el control endocrino de neurohormonas

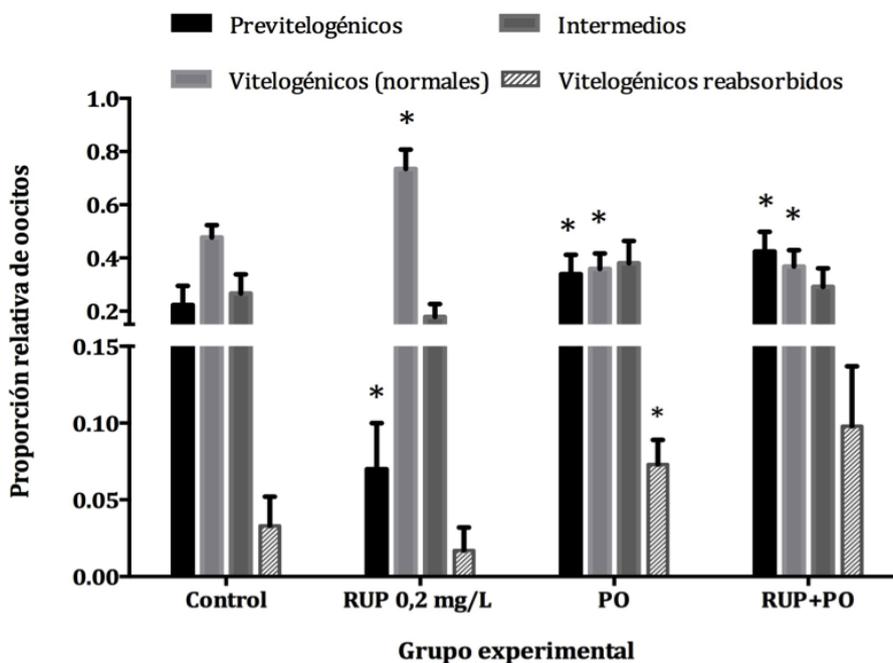
En todos los tratamientos en los cuáles se incubaron los ovarios con extracto de ganglio torácico, aumentó significativamente ( $p < 0,05$ ) la proporción relativa de oocitos vitelogénicos con respecto al control. Un resultado similar ( $p < 0,05$ ) se obtuvo en el grupo tratado solamente con RUP (Figura 1). Concomitantemente, en todos estos tratamientos disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) la proporción relativa de oocitos pre-vitelogénicos, respecto del control.

Figura 1. Proporción relativa de cada tipo de oocitos (pre-vitelogénicos, vitelogénicos, intermedios, y en reabsorción) en el ensayo *in vitro* en presencia de Roundup (RUP) 0,2 mg/L, extracto de ganglio torácico (GT), o una combinación de ambos. Se expresan los valores promedio  $\pm$  error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control.



En el ensayo *in vitro* realizado con ovarios en presencia de RUP 0,2 mg/L, pedúnculo ocular, o una combinación de ambos, la proporción relativa de oocitos vitelogénicos en el tratamiento con sólo el agregado de extracto de pedúnculo fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que la del control (Figura 2); correspondientemente, la proporción relativa de los oocitos pre-vitelogénicos fue significativamente ( $p < 0,05$ ) mayor. Por el contrario, al igual que lo observado en el ensayo con ganglio torácico, en el tratamiento con sólo RUP se observó un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de la proporción relativa de oocitos vitelogénicos y una disminución significativa de los pre-vitelogénicos, en comparación con el control. Sin embargo, cuando se expuso al ovario al extracto de pedúnculo ocular en presencia del herbicida, el resultado fue similar al observado en el tratamiento con extracto de pedúnculo solo, es decir, la proporción de oocitos vitelogénicos disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ), y la de los pre-vitelogénicos tuvo un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) con respecto al control, (Figura 2).

Figura 2. Proporción relativa de cada tipo de oocitos (pre-vitelogénicos, vitelogénicos, intermedios, y en reabsorción) en el ensayo *in vitro* en presencia de Roundup (RUP) 0,2 mg/L, extracto de pedúnculo ocular (PO), o una combinación de ambos. Se expresan los valores promedio  $\pm$  error estándar. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto al control.

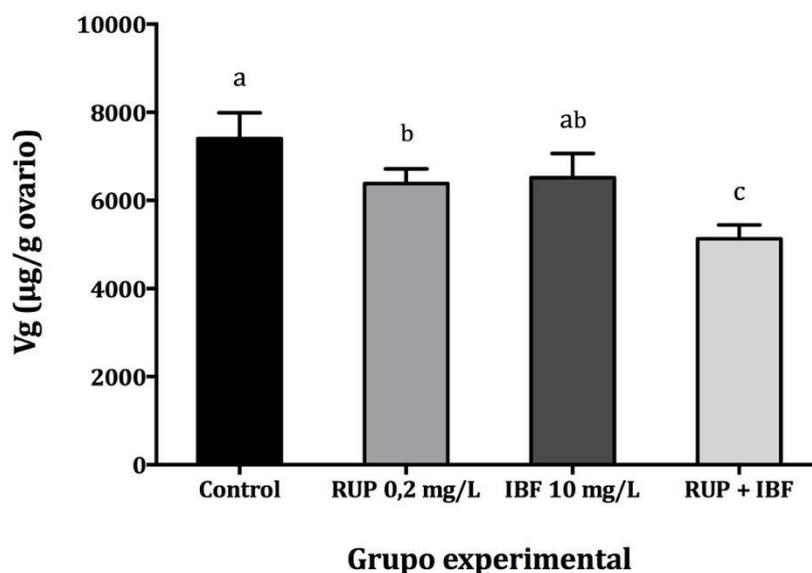


### Efecto sobre el control endocrino de prostaglandinas

En este ensayo, el nivel de vitelogenina en el tratamiento con RUP 0,2 mg/L en presencia de Ibuprofeno 10 mg/L fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que el de los grupos Control, RUP 0,2 mg/L, ó Ibuprofeno 10 mg/L. Si bien el RUP *per se* produjo un descenso en los niveles de

vitelogenina ( $p < 0,05$ ) por debajo de los niveles del control, su combinación con ibuprofeno estimuló aún más ( $p < 0,05$ ) este descenso (Figura 3).

Figura 3. Nivel de vitelogenina ( $\mu\text{g/g}$  ovario) para el ensayo *in vitro* en el que se expusieron los ovarios de las hembras a Roundup, o Ibuprofeno, o a una combinación de ambos. C: Control, IBF: Ibuprofeno 10 mg/L, RUP: Roundup 0,2 mg/L, RUP+IBF: Roundup 0,2 mg/L con la adición de Ibuprofeno 10 mg/L. Se expresan los valores promedio  $\pm$  error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los grupos experimentales.



#### 4 DISCUSIÓN

Se ha reportado que el ganglio torácico (junto con el ganglio cerebral) es el lugar de síntesis y secreción de la GSH, neurohormona que estimularía la vitelogénesis directamente sobre el ovario en varias especies de crustáceos, incluyendo cangrejos (Fingerman, 1997; Charmantier, 1997). Esta hormona comenzaría a elevar sus niveles en el período en el cual el ovario inicia su ciclo de maduración anual (en la especie en estudio, al comienzo del período pre-reproductivo), por lo cual es esperable encontrarla expresada los extractos de ganglio torácico utilizados *in vitro*; de hecho se observó un aumento significativo de la proporción de oocitos vitelogénicos al agregar extracto de ganglio torácico al medio de incubación. En cuanto al efecto del RUP *per se*, se observó también un incremento significativo de la proporción de oocitos vitelogénicos, al igual que en trabajos previos realizados en la misma especie, tanto *in vitro* (Canosa et al., 2021) como *in vivo* (Avigliano et al., 2014). Sin embargo, al exponer simultáneamente los ovarios al herbicida y al extracto de ganglio torácico, las proporciones oocitarias mostraron valores similares a cada uno de estos tratamientos por separado, sugiriendo una ausencia de interacción entre el herbicida y la/s neurohormona/s del ganglio torácico. Al respecto, se ha encontrado evidencia que sugiere que el glifosato podría estar estimulando la secreción de progesterona en el ovario (Canosa et al., 2021),

secreción que sin embargo podría ser co-dependiente de los niveles de GSH. Esta hipótesis requiere aún de corroboración experimental.

En cuanto a la posible interferencia del herbicida con la vía de señalización de las hormonas pedunculares en el ovario, cabe destacar que, al igual que en ensayos previos *in vitro* realizados en la misma especie (Zapata et al., 2003; Medesani et al., 2004), se observó en el presente trabajo una inhibición del crecimiento ovárico al agregar extracto de pedúnculo al medio de incubación, en términos de una menor proporción de oocitos vitelogénicos. Este efecto estaría relacionado con el rol protagónico de la GIH; en efecto, es esperable que los pedúnculos oculares utilizados en este trabajo contuviesen una cantidad relativamente elevada de GIH, dado que se extrajeron de animales que se encontraban al principio del período pre-reproductivo, cuando todavía el ovario se encuentra arrestado por esta neurohormona (Charmantier, 1997). Por otra parte, el efecto del sólo agregado de RUP, fue similar al observado en el ensayo con ganglio torácico, es decir, de incremento de la proporción de oocitos vitelogénicos. Sin embargo, el tratamiento conjunto con RUP y extracto de pedúnculo mostró un resultado similar al tratamiento con solamente el extracto de pedúnculo. Este resultado podría deberse a que el efecto inhibitorio de GIH sobre la maduración ovárica incluiría la supresión del mecanismo estimulante disparado por RUP.

Para poner a prueba la hipótesis de que el RUP podría interferir en la vía de señalización de las prostaglandinas en el ovario, se expuso a los ovarios a RUP, en ausencia o presencia de ibuprofeno. El ibuprofeno inhibe la enzima ciclooxigenasa, responsable de la conversión del ácido araquidónico a prostaglandina  $H_2$ . La evidencia previa obtenida en crustáceos muestra que las drogas antiinflamatorias no-esteroides (e.g., ibuprofeno), interrumpen la biosíntesis de eicosanoides (como las prostaglandinas), reduciendo así la fecundidad, tal como se observó en *Daphnia magna* (Heckmann et al., 2007), especie en la cual los prostanoïdes y los productos de la actividad de la lipoxigenasa parecen ser mediadores importantes de la oogénesis y embriogénesis (Swetha et al., 2011).

En el presente trabajo, el tratamiento con solamente ibuprofeno causó una reducción moderada de los niveles de vitelogenina ovárica. Este resultado estaría indicando un cierto efecto de este inhibidor sobre las prostaglandinas endógenas que actúan localmente en el ovario. Por otra parte, el tratamiento *in vitro* con RUP produjo *per se* un descenso significativo en los niveles de Vg en el ovario. Más aún, en el tratamiento conjunto con RUP e ibuprofeno, tales niveles disminuyeron de manera estadísticamente significativa respecto del control y de los demás tratamientos. Dada la aditividad de efectos inhibitorios observada entre el ibuprofeno y el RUP, es plausible proponer que el RUP podría inhibir la producción local de prostaglandinas, antagonizar al receptor de estas hormonas, o bien inhibir algún paso en la vía de transducción hormonal de las prostaglandinas. Más

aún, los efectos inhibitorios observados previamente por exposición de la especie en estudio a glifosato, tales como el descenso en el nivel Vg y de la síntesis proteica observada *in vitro*, así como el menor crecimiento gonadal observado *in vivo* a 90 días (Canosa et al., 2018), podrían deberse, al menos en parte, al efecto inhibitorio del RUP sobre la secreción o el mecanismo de acción de las prostaglandinas. En ensayos *in vitro* de 48 hs efectuados con líneas celulares de mamíferos, se observó que tanto el glifosato puro como el RUP disminuyeron la secreción de prostaglandinas (Wrobel, 2018).

Por último, resulta llamativo que en ambos ensayos con neurohormonas el RUP produjo una mayor proporción de oocitos vitelogénicos, mientras que en el ensayo con ibuprofeno el mismo herbicida produjo una inhibición del contenido de Vg en el ovario. Esta aparente contradicción ya fue observada en un trabajo previo que evaluó *in vitro* el efecto facilitador del glifosato sobre el efecto estimulante de la progesterona en el ovario de *N. granulata* (Canosa et al., 2021); en este mismo trabajo se verificó, sin embargo, que el tamaño de los oocitos vitelogénicos era significativamente menor que en el control, lo que explica el efecto paradójico del RUP observado en el presente trabajo.

#### **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo fue financiado mediante un subsidio de la programación UBACYT 2020 (code 20020190100014BA)

## REFERENCIAS

- Avigliano, L.; Alvarez, N.B.; Mac Loughlin, C.; Rodriguez, E.M., 2014. Effects of glyphosate on egg incubation, larvae hatching and ovarian re-maturation, in the estuarine crab *Neohelice granulata*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 33: 1879-1884.
- Benck Soso, A.; Gil Barcellos, L.J.; Ranzani-Paiva, M.J.; Kreutz, L.C.; Mezzalira
- Quevedo, R.; Anziliero, D.; Lima, M.; Bolognesi da Silva, L.; Ritter, F.; Calliari Bedin, A.; Finco, J. A., 2007. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundia (*Rhamdia quelen*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23: 308-31307.
- Canosa, I.S.; Silveyra, G.R.; Avigliano, L.; Medesani, D.A.; Rodriguez, E.M., 2018. Ovarian growth impairment after chronic exposure to Roundup Ultramax®, in the estuarine crab *Neohelice granulata*. *Environmental Science and Pollution Research*, 25:1568–1575.
- Canosa, I.S.; Silveyra, G.R.;Lonné, M.N.; Medesani, D.A., Rodríguez, E.M., 2021. *In vitro* interference of a glyphosate commercial formulation with the stimulation of ovarian maturation by progesterone, in the estuarine crab *Neohelice granulata*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 106:583–588
- Charmantier, G.; Charmantier, D.M.; Van Herp, F., 1997. Hormonal regulation of growth and reproduction in crustaceans. En: Fingerman, M.; Nagabhushanam, R.; Thompson, M. F (Eds.), *Recent advances in marine biotechnology*, 1: 109-161.
- Chaulet, A.; Medesani, D.A.; Freitas, J.; Cervino, A.; Cervino, N.; Rodriguez, E.M., 2012. Induction of somatic growth in juvenile crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae), by ecdysone and insulin growth factor. *Aquaculture*, 370–371:1–6.
- Christian, F.A.; Jackson, R.N.; Tate, T.M., 1993. Effect of sublethal concentrations of glyphosate and dalapon on protein and aminotransferase activity in *Pseudosuccinea columella*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 51:703-709.
- Cooke, I.M.; Haylett, B.A.; Weatherby, T.M., 1977. Electrically elicited neurosecretory and electrical responses of the isolated crab sinus gland in normal and reduced calcium salines. *Journal of Experimental Biology*, 101:125-149.
- Fanjul-Moles, M.L., 2006. Biochemical and functional aspects of crustacean yperglycemic hormone in decapod crustaceans: Review and update. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 142C: 390-400.
- Fingerman, M.; Rodríguez, E.M., 2009. Regulación endocrina en crustáceos. En: *Bioteología Marina*, Michel, J.P (Ed.). Editorial AGT Editor, México DF, pp. 277-307.
- Fingerman, M., 1997. Roles of neurotransmitters in regulating reproductive hormone release and gonadal maturation in decapod crustaceans. *Invertebrate Reproduction and Development*, 31: 47–54
- Gasnier, C.; Dumont, C.; Benachour, N.; Clair, E.; Chagnon, M.C.; Seralini, G.E., 2009. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology*, 262, 184-191.
- Giesy, J.P.; Dobson, S.; Solomon, K.R., 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 167: 35-120.

Gill, J.P.K.; Sethi, N.; Mohan, A.; Datta, S.; Girdhar, M., 2017. Glyphosate toxicity for animals. *Environmental Chemistry Letters*, 16: 401-426.

Heckmann, L-H.; Callaghan, A.; Hooper, H.L.; Connon, R.; Hutchinson, T.H.; Maund, S.J.; Sibly, R.M., 2007. Chronic toxicity of ibuprofen to *Daphnia magna*: Effects on life history traits and population dynamics. *Toxicology Letters*, 172: 137-145.

Herbert, L.T.; Vazquez, D.E.; Arenas, A.; Farina, W.M., 2014. Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. *Journal of Experimental Biology*, 217: 3457-3464.

López Greco, L.S.; Rodríguez, E.M., 1999. Annual reproduction and growth of adult crabs, *Chasmagnathus granulata* (Crustacea, Brachyura, Grapsidae). *Cahiers de Biologie Marine*, 40: 155-164.

Mann, R.M.; Bidwell, J.R., 1999. The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 36: 193-199.

Medesani, D.A.; Lopez Greco, L.S.; Rodríguez, E.M., 2004. Interference of cadmium and copper with the endocrine control of ovarian growth, in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata*. *Aquatic toxicology*, 69, 165-174.

Medesani, D.A.; Ferré, L.E.; Canosa, I.S.; Silveyra, G.R.; Rodriguez, E.M., 2015. Induction of vitellogenesis by 17-hydroxyprogesterone and methyl farnesoate during post-reproductive period, in the estuarine crab *Neohelice granulata*. *Invertebrate Reproduction and Development*, 59: 104-110.

Merlin J.; Mohanlal, D.L.; Balasubramanian, C.P.; Sherly, T.; Subramoniam, T., Syamadayal, J.; Ravichandran, P.; Ponniah, A.G.; Gopal, C.; Vijayan, K.K., 2015. Induction of vitellogenesis and reproductive maturation in tiger shrimp, *Penaeus monodon* by 17-estradiol and 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone: *in vivo* and *in vitro* studies. *Invertebrate Reproduction and Development*, 59: 166-175.

Meunpol, O.; Iam-Pai, S.; Suthikrai, W.; Piyatiratitivorakul, S., 2007. Identification of progesterone and 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone in polychaetes (*Perinereis* sp.) and the effects of hormone extracts on penaeid oocyte development *in vitro*. *Aquaculture*, 270: 485-492.

Peruzzo, P.J.; Porta, A.A.; Ronco, A.E., 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution*, 156: 61-66.

Preechaphol, R.; Klinbunga, S.; Ponza, P.; Menasveta, P., 2010. Isolation and characterization of progesterone receptor-related protein p23 (Pm-p23) differentially expressed during ovarian development of the giant tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture*, 308: 75-82.

Primost, J.E.; Marino, D.J.G.; Aparicio, V.C.; Costa, J.L.; 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.

Reddy, P.S.; Reddy, P.R.; Nagaraju, G.P.C., 2004. The synthesis and effects of prostaglandins on the ovary of the crab *Oziotelphusa senex senex*. *General and Comparative Endocrinology*, 135, 35-41.

Ren, X.; Li, R.; Liu, J.; Huang, K.; Wu, S.; Li, Y.; Li, C., 2018. Effects of glyphosate on the ovarian function of pregnant mice, the secretion of hormones and the sex ratio of their fetuses. *Environmental Pollution*, 243: 833-841.

Richard, S.; Moslemi, S.; Sipahutar, H.; Benachour, N.; Seralini, G.E., 2005. Differential effects of glyphosate and Roundup on human placental cells and aromatase. *Environmental Health Perspectives*, 113: 716-720.

Sagi, A.; Silkovsky, J.; Fleisher-Berkovich, S.; Danon, A.; Chayoth, R., 1995.

Prostaglandin E2 in previtellogenic ovaries of the prawn *Macrobrachium rosenbergii*: synthesis and effect on the level of cAMP. *General and Comparative Endocrinology*,

100: 308-313.

Sánchez, F.; Mari, N.; Lasta, C.; Giangiole, A., 1991. Alimentación de la corvina rubia (*Micropogonias furnieri*) en la Bahía Samborombon. *Frente Marítimo*, 8: 43-50.

Silveyra, G.R.; Silveyra, P.; Vatnick, I.; Medesani, D.A.; Rodriguez, E.M., 2018. Effects of atrazine on vitellogenesis, steroid levels and lipid peroxidation, in female red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. *Aquatic Toxicology*, 197: 136-142.

Sokal, R.R.; Rohlf, F.J., 1981. *Biometry*, 2nd edition. Freeman, New York.

Solomon K.R.; Thompson, D.G., 2003. Ecological risks assessment for aquatic organisms from overwater uses of glyphosate. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 6B: 289-324.

Spaziani, E.; Hinsch, G.; Edwards, S., 1993. Changes in prostaglandin E2 and F2 during vitellogenesis in the florida crayfish *Procambarus paeninsulanus*. *Journal of Comparative Physiology*, 163B: 541-545.

Swetha, C.H.; Sainath, S.B.; Reddy, P.R.; Reddy, P.S., 2011. Reproductive endocrinology of female crustaceans: perspective and prospective. *Journal of Marine Science Research and Development*, S3: 001.

Thongbuakaew, Y.; Siangcham, T.; Suwansa-ard, S.; Elizur, A.; Cummins, S.F.; Sobhon, P.; Sretarugsa, P., 2016. Steroids and genes related to steroid biosynthesis in the female giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Steroids*, 107: 149-160.

Wrobel, M.H., 2018. Glyphosate affects the secretion of regulators of uterine contractions in cows while it does not directly impair the motoric function of myometrium in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 349, 55-61.

Yano, I., 2000. Endocrine control of reproductive maturation in economically important crustacea for aquaculture. En: Adiyodi, K.G., Adiyodi, R.G. (Eds.), *Reproductive Biology of Invertebrates*, Vol. X. Wiley, New York, 161-194.

Young, F.; Ho, D.; Glynn, D.; Edwards, V., 2015. Endocrine disruption and cytotoxicity of glyphosate and roundup in human JAr cells in vitro. *Integrative Pharmacology, Toxicology and Genotoxicology*, 1:70-76.

Zapata, V.; Lopez Greco, L.S.; Medesani, D.A.; Rodriguez, E.M., 2003. Ovarian growth in the crab *Chasmagnathus granulata* induced by hormones and neuroregulators throughout the year. In vivo and in vitro studies. *Aquaculture*, 224, 339-352.

Zuur, A.F.; Ieno, E.N.; Walker, N.J.; Saveliev, A.A.; Smith, G.M, 2009. *Mixed effects models and extensions in ecology with R*. Springer, New York.