



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental

**Interferencia del herbicida glifosato sobre el control endocrino
de la reproducción, en el cangrejo de estuario *Neohelice
granulata* (Decapoda, Brachyura)**

Tesis presentada para optar al Título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de
Ciencias Biológicas

Lic. Ivana Sofía Canosa

Director de tesis: Dr. Enrique Marcelo Rodríguez

Consejero de Estudios: Dr. Enrique Marcelo Rodríguez

Buenos Aires, 2019.

RESUMEN

La presente tesis tuvo como objetivo evaluar los efectos causados por el herbicida glifosato, principalmente en su formulación comercial Roundup Ultramax[®], sobre la maduración gonadal y su control endocrino, en hembras y machos del cangrejo *Neohelice granulata*, de extensa distribución en ambientes estuariales de nuestro país. Para evaluar los efectos sobre el crecimiento ovárico, se realizaron bioensayos *in vivo* durante el período pre-reproductivo de las hembras (invierno). El ensayo principal consistió en la exposición de las mismas a dos concentraciones subletales de Roundup de relevancia ambiental (0,01 y 0,2 mg/L) durante todo el pre-reproductivo, realizando además un ensayo adicional que sólo comprendió el primer mes de dicho período. Luego de los tres meses de exposición, se observó un aumento de la glucemia y de lípidos en el músculo, no registrándose diferencias en el nivel de glucógeno y proteínas en ese tejido. En el ovario de las hembras expuestas a 0,2 mg/L de Roundup se observó un descenso significativo del contenido de vitelogenina, en correlación con una disminución en el tamaño de oocitos vitelogénicos y una mayor incidencia de oocitos vitelogénicos en reabsorción; a su vez, se observó un descenso en el contenido de vitelogenina hepatopancreática. No obstante, al mes de iniciado el ensayo, el nivel de vitelogenina aumentó significativamente a la mayor concentración de Roundup, en correspondencia con un aumento en la proporción relativa de los oocitos vitelogénicos. Estos resultados sugirieron que un posible efecto de desorganización endócrina por parte del herbicida, podría haber ocurrido en los animales expuestos *in vivo*. Para validar esta hipótesis, se realizaron ensayos *in vitro* en el ovario, en los cuales se evaluó la posible interferencia del Roundup sobre hormonas relacionadas con el proceso de maduración gonadal. La exposición directa a 0,01 y 0,2 mg/L de Roundup en el medio de incubación provocó un descenso en el contenido de vitelogenina ovárica, observándose el mismo efecto con glifosato puro, pero sólo a 0,2 mg/L. A la mayor concentración de Roundup, se observó además una inhibición de la síntesis proteica. Histológicamente, sin embargo, se observó un avance en la maduración ovárica, sugiriendo nuevamente un posible efecto de desorganización endocrina. La co-incubación del ovario con extracto de ganglio torácico (secretor de un factor estimulante del crecimiento gonadal), o con extracto de pedúnculo ocular (productor de una neurohormona inhibitoria) no mostró una interferencia evidente del Roundup con las neurohormonas o factores presentes en tales extractos. En cambio, sí se observó por parte del Roundup un efecto facilitador del aumento en el contenido de vitelogenina producido por progesterona (1,5 μ M). En un ensayo *in vitro* posterior, en el cuál se incubó el ovario con mifepristona (antagonista de los receptores de progesterona), el agregado del herbicida no modificó el nivel de vitelogenina. Estos resultados sugieren que el Roundup actuaría como inductor de la vía de transducción de la hormona, o eventualmente como un xenoprogéstágeno, aportando indicios para explicar, al menos en parte, la estimulación ovárica observada *in vivo*, al mes de iniciada la exposición. Finalmente, el ensayo *in vitro* realizado con el inhibidor de prostaglandinas ibuprofeno, mostró que el agregado de Roundup aumenta el efecto inhibitorio del ibuprofeno sobre la disminución del contenido de vitelogenina. Este resultado, en conjunto con la inhibición de la síntesis proteica, la menor disponibilidad de vitelogenina en el hepatopáncreas y la mayor incidencia de reabsorciones, aporta indicios para explicar la inhibición del crecimiento ovárico observado al finalizar los tres meses de exposición *in vivo*. En cuanto a los machos, se realizó un primer ensayo *in vivo* de 30 días de duración, dentro del período pre-reproductivo, a fin

de evaluar el efecto sobre la maduración gonadal, tanto del Roundup como del glifosato puro. En este ensayo, se observó con ambos herbicidas una menor ganancia en peso, en correlación con un menor contenido de proteína muscular, si bien el nivel de glucógeno se vio incrementado. El análisis histológico de las gonadas indicó una proporción significativamente más alta de espermatóforos anormales (presentando áreas concéntricas desprovistas de espermatozoides) tanto a 1 mg/l de Roundup como de glifosato puro, en concordancia con una disminución en el número de espermatozoides por espermatóforo. En un segundo ensayo *in vivo*, también de 30 días de duración, se propuso evaluar la viabilidad espermática, mediante la técnica de tinción doble con las sondas fluorescentes Sybr®/ Ioduro de propidio; observándose un aumento no significativo de la mortalidad. Finalmente, se realizó un ensayo *in vitro* incubando testículo y vaso deferente (proximal y medio) con Roundup 1 mg/L, en presencia o ausencia de glándula androgénica. Los resultados obtenidos mostraron que el aumento en el número de espermatozoides por espermatóforo, producido por la glándula androgénica, era revertido a los niveles del control por la exposición a Roundup, sugiriendo que éste podría inhibir la secreción y/o el efecto de la hormona secretada por esta glándula, si bien el herbicida *per se* produjo un descenso significativo en el número de espermatozoides.

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the effects caused by the herbicide glyphosate, mainly in its commercial formulation Roundup Ultramax®, on the gonadal maturation and its endocrine control, of both females and males of the crab *Neohelice granulata*, which has an extensive distribution in estuarial environments of our country. To evaluate the effects on ovarian growth, *in vivo* bioassays were first performed, during the pre-productive period of the females (winter). The main bioassay consisted of exposing the females to two sublethal concentrations of Roundup having environmental relevance (0.01 and 0.2 mg/L) during the complete pre-productive period (three months), also carrying out an additional assay that only included the first month of the mentioned period. After three months of exposure, an increase in blood glucose and muscle lipids was observed, with no significant changes in glycogen or protein in that tissue. In the ovary of the females exposed to 0.2 mg/L of Roundup, however, a significant decrease in the vitellogenin content was observed, in agreement with a decrease in the size of vitellogenic oocytes and a higher incidence of vitellogenic oocytes in reabsorption. On the other hand, a decrease in hepatopancreatic vitellogenin content was observed at the aforementioned concentration. However, one month after the beginning of the assay, the level of vitellogenin increased significantly at the highest Roundup concentration, in relation with an increase in the relative proportion of vitellogenic oocytes, suggesting that some type of endocrine disruption took place at that time of exposure. To validate this hypothesis, *in vitro* tests were performed. Direct exposure to 0.01 and 0.2 mg/L of Roundup in the incubation medium caused a decrease in the content of ovarian vitellogenin, observing the same effect with pure glyphosate, but only at 0.2 mg/L. At this concentration of Roundup, an inhibition of protein synthesis was also observed. Histologically, however, an advance in ovarian maturation was observed, suggesting again a possible effect of endocrine disruption. The co-incubation of ovarian with extract of thoracic ganglion (secretor of a gonadal growth stimulating factor), or with eyestalk extract (producer of an inhibitory neurohormone) did not show any evident interaction of Roundup with the neurohormones or factors present in such extracts. Besides, a facilitating effect of Roundup was observed on the increase in vitellogenin content produced by the addition of progesterone (1.5 μ M) to the incubation medium. In a subsequent *in vitro* assay, in which the ovary was co-incubated with mifepristone (progesterone receptor blocker), the addition of Roundup did not modify the level of vitellogenin. These results suggest that Roundup would act as an enhancer of the hormone transduction pathway, or eventually as a xenoprogestogen, serving as a basis to explain, at least in part, the ovarian stimulation observed *in vivo*, one month after initiating the exposure to Roundup. Finally, the *in vitro* assay performed with the prostaglandin inhibitor ibuprofen showed that the addition of Roundup increases such inhibitory effect, further reducing the vitellogenin content. This result serves as a basis to explain (along with the inhibition of protein synthesis, the lower availability of vitellogenin in the hepatopancreas and the higher incidence of oocyte reabsorption) the inhibition of ovarian growth observed at the end of the three months-*in vivo* exposure. Regarding males, a first 30-day *in vivo* assay was performed within the reproductive period, with both Roundup and pure glyphosate, in order to evaluate the effect on testicular maturation. In this assay, a lower weight gain was observed with both products, in relation with a lower content of muscle protein, although the glycogen level in muscle increased. Histological analysis of the gonads indicated a significantly higher

proportion of abnormal spermatophores (presenting concentric areas devoid of spermatozooids) at 1 mg/L of Roundup or pure glyphosate, in agreement with a decrease in the number of spermatozoa per spermatophore. A second *in vivo* assay, also comprising 30 days of duration, was aimed at evaluating the sperm viability, by means of the fluorescence produced by the staining with the probes Sybr®/propidium iodide. An increase in sperm mortality due to Roundup effects was observed at 1 mg/L, although it was not significant with respect to control. Finally, an *in vitro* assay was performed co-incubating both testis and *vas deferens* (with or without addition of androgenic gland), with the eventual addition of Roundup to the incubation medium, at 1 mg/L. The results obtained showed that the increase in the number of spermatozoa produced by the androgenic gland was reverted to control levels by Roundup, suggesting that it could inhibit the secretion and/or the effect of the hormone secreted by such gland, although the herbicide produced, *per se*, a significant decrease in the number of sperm.

A mi mamá

A mi papá y mi hermana

A mis abuelos

Al Cone

*“Si sirves a la naturaleza, ella te servirá a ti”
Confucio.*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Enrique Rodríguez, director del presente trabajo de tesis. Por haberme dado lugar para que pueda realizar mi doctorado en una temática que amo, como es la toxicología. Por los debates, ideas, correcciones y enseñanzas. Gracias por adornar los almuerzos con historias pasadas super bizarras y graciosas. Y sobre todo, por la enorme comprensión para conmigo en el año más difícil de mi vida, el 2018 que me trajo situaciones familiares muy difíciles de sobrellevar; tu comprensión hizo que no terminara de colapsar. Gracias Doc por el buen ambiente de trabajo y por todas las enseñanzas que se que me servirán de aquí en más!!

Al Dr. Daniel Medesani, nuestro Mede, por la increíble paciencia que parece de otro planeta. Por estar codo a codo en la mesada con los experimentos, y dándome una mano siempre, nunca faltando la buena onda, los chistes, los cantos desafinados y la música. Por todas las discusiones compartidas sobre los datos. Gracias por todo lo que me enseñaste estos 5 años!!! Por escuchar mis audios de whatsapp de 5 minutos de duración, aún en tus vacaciones, o un domingo a la noche. Por la enorme ayuda a lo largo de todo este proceso. Sos una persona excelente!!! Te quiero un montón Mede!!!

A la Universidad de Buenos Aires y al CONICET, porque gracias a las becas de doctorado otorgadas pude realizar este trabajo de postgrado.

A mis compañerxs de laboratorio, que de una forma u otra hicieron que estos años de trabajo sean muy positivos:

A Gaby, compa y amiga, porque desde el principio aprendimos juntas entre charlas y anécdotas. Muuuucho trabajo compartido con risas, catarsis, sesiones de psicoanálisis y obviamente chocolates. Gracias por tu cariño, tus chistes, tus charlas, tus palabras en los momentos difíciles, tus regalitos en el escritorio, tu ayuda en cada experimento. Te quiero mucho!!!!

A Lu Avigliano, con la cual compartí gran parte de los 5 años de doctorado. Por transmitirnos sus experiencias: sus aciertos para que nos sirvan, y sus desaciertos para que no los repitamos!! Por tu sonrisa serena, las charlas compartidas y los cantos tipo cancha en el 101 cuando sonaba Maxi Trusso. Gracias por todo!

A Noe, por todo lo compartido el tiempo que estuvo en el labo. Gracias por tu amistad, tus abrazos, las charlas, tu ayuda con los experimentos y con la histología!! Qué lindo fue el tiempo compartido!! Se te extraña!!

A Cami, por hacer aún más lindo el ambiente de trabajo, por enseñarme un montón de detalles útiles apenas entré, por su ayuda en los experimentos, por su alegría y su locura tan linda.

A las chicas que han estado de pasantes de licenciatura: Naty, Juli, Cata, por los ratos de trabajo compartido y las sonrisas siempre presentes.

A Maru, que llegó al labo el último año. Por la valiosa ayuda, aunque hayas llegado hace poquito, la mano que me diste fue un montón!!!! Fuiste una pieza importante en el terremoto del último año, siempre ayudando con la mejor onda y excelente predisposición! Millones de gracias!!!

A la Dra. Laura López Greco, por la ayuda y experiencia brindada cuando se trató de los experimentos con los machos de cangrejo, por orientarme, por enseñarme la mejor forma de hacer las disecciones, por las consultas siempre respondidas amablemente, por la ayuda a la hora de observar al microscopio. Gracias por las charlas de pasillo y de colectivo, por tu sonrisa siempre presente para conmigo!

A lxs chicxs del labo 50: Anita (la Pipi), Caro, Lia, Dani, Agus. Por las experiencias de trabajo compartidas, y por prestarme insumos siempre con la mejor onda. Por las charlas, las risas, las meriendas compartidas, las catarsis, y las fiestas. Las quiero un montón!! Gracias Amir por estar siempre, ya sea que necesitemos algo en el laboratorio o en la vida, o con tu presencia tan cálida. A lxs chicxs que se incorporaron en el último tiempo: Avril, Santi y Mati, gracias por la buena onda!

A la técnica de Histología Ariadna Battista, por la ayuda brindada con los preparados histológicos, por los *brainstorming* compartidos y las pruebas hasta que los protocolos salieran bien.

A todo el personal del Departamento de Biodiversidad y Biología Experimental: A mi Comisión de Seguimiento de Tesis, por todas las sugerencias brindadas en las reuniones. Al técnico Gabriel Rosa, por asistirme con cuestiones de equipos y algunos insumos precisados. Al

personal de Secretaría, Claudio, Alejandra y Jimena. Al personal de mantenimiento, Carlitos, Sebastián y Leandro. A los investigadores de los laboratorios vecinos, por prestarme algún reactivo o algún equipo cuando fue necesario, o asistirme en alguna duda. A todos aquellos que con un saludo, una charla de pasillo, o una sonrisa le dieron un tinte a cada día.

A mi mamá, no solo por su amor incondicional, sino también por transmitirme su pasión por el saber y por la ciencia, inculcándome el estudio como herramienta para buscar un futuro mejor. Por escucharme hablar sobre mis cosas de trabajo, ya no sabiendo, como dice ella, si hablo “de alguien llamado Elisa, o del ELISA!!!” jajaja. Gracias por bancar mis estreses, sobre todo en los últimos meses. Por tus consejos, por darme fuerza, y por mucho más. Gracias ma!

A mi papá, por siempre poder contar con él, por todas las cosas que hace un buen padre por sus hijos. Por la ayuda brindada sobre todo cuando el estipendio de la beca estaba muy bajo, por ayudarme con las cuestiones de salud de mi mamá, lo cual me ayudó a poder terminar este trabajo. Gracias pa!. A mi hermana, por las charlas, por bancar los audios catárticos de whatsapp de 7 minutos, por la ayuda cuando tenía problemas con las fotos de la tesis. Gracias Na!

A mis familiares, Mamu, tío Carlos, y tía Haydeé.

A Ceci, por escucharme tanto siempre, por tus consejos, por transmitirme fuerza y ánimo, por tu amistad. A Lu, porque desde la distancia fue una excelente compañera y terapeuta. A Vane, Pame, Cris y Maga.

A Nacho (el Cone), verdaderamente mi compañero de vida. No me alcanzan las palabras para agradecerte por todo. Por escucharme millones de veces, por aconsejarme, por bancarme cuando no he tenido días buenos, por compartir conmigo las alegrías. Por el apoyo constante. Por quedarte hasta la madrugada haciéndome compañía mientras escribía; por hacerme compañía hasta tarde en el labo, incluso los días que me tocaron quedarme hasta las 12 de la noche para poder terminar; por ponerte a ayudarme todas esas veces con lo más que podías, y además bancarte mis instrucciones (muchas veces cuando yo ya había perdido la paciencia). Por tu invaluable ayuda en todo lo relacionado con la computadora. Por estar siempre a mi lado, dándome ánimos y fuerza. Fuiste un pilar fundamental para mi todo este tiempo. Te amo con el alma!!! Gracias mi amor!!!

ÍNDICE

<u>ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS</u>	17
<u>INTRODUCCIÓN</u>	20
Modelo de agricultura basado en sistema de labranza cero	21
Herbicidas, toxicidad potencial y problemática asociada a su uso	24
El glifosato y sus formulados	27
Organismos genéticamente modificados	30
Uso del glifosato en la agricultura argentina	32
Niveles ambientales de glifosato	35
Antecedentes de la toxicidad del glifosato en organismos no blanco	36
La especie modelo de estudio: <i>Neohelice granulata</i> . Distribución. Importancia ecológica. Aspectos biológicos generales y reproductivos	37
Control hormonal de la reproducción en crustáceos	45
Desorganización endocrina en crustáceos. Posible efecto del glifosato	57
<u>HIPÓTESIS</u>	61
<u>OBJETIVOS GENERALES</u>	63
<u>CAPÍTULO I: Evaluación <i>in vivo</i> del efecto del herbicida glifosato sobre la maduración ovárica, en hembras adultas de <i>N. granulata</i></u>	65
OBJETIVO PARTICULAR	66
MATERIALES Y MÉTODOS	67
1.1 Animales	68
1.2 Herbicidas	69
1.3 Ensayo <i>in vivo</i> : evaluación de la alteración del crecimiento ovárico frente a concentraciones subletales de Roundup	69
1.3.1 Ensayo <i>in vivo</i> de tres meses de duración	69
1.3.2 Ensayo <i>in vivo</i> de un mes de duración	72

1.4 Validación de las concentraciones nominales	72
1.5 Determinación de los niveles de reservas energéticas	73
1.5.1 Determinación de los niveles de lípidos	73
1.5.2 Determinación de los niveles de glucógeno	75
1.5.3 Determinación de los niveles de proteínas totales	77
1.5.4 Determinación de la glucemia	78
1.6 Determinación de los niveles de vitelogenina	79
1.6.1 Purificación de la vitelogenina de <i>N. granulata</i>	79
1.6.2 Obtención del antisuero	79
1.6.3 Evaluación de la especificidad por Western Blot	80
1.6.4 Protocolo de ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)	82
1.7 Análisis histológicos	86
1.8 Análisis estadístico	88
RESULTADOS	89
Validación de las concentraciones nominales	90
Ensayo <i>in vivo</i> de 90 días de duración	90
Ensayo <i>in vivo</i> de 30 días de duración	96
DISCUSIÓN	99
<u>CAPÍTULO II: Evaluación <i>in vitro</i> de la interferencia del herbicida glifosato en la vía de señalización de neurohormonas y hormonas esteroideas y prostanoides, en hembras adultas de <i>N. granulata</i></u>	110
OBJETIVOS PARTICULARES	111
MATERIALES Y MÉTODOS	112
2.1 Animales	113
2.2 Herbicidas	113
2.3 Ensayos <i>in vitro</i>	113

2.3.1 Evaluación del contenido de vitelogenina luego de la exposición del ovario a glifosato puro y formulado	113
2.3.2 Evaluación de la síntesis proteica luego de la exposición del ovario a Roundup	115
2.3.3 Evaluación histológica luego de la exposición del ovario a Roundup	116
2.3.4 Evaluación de la interferencia del Roundup en la vía de señalización de neurohormonas pedunculares y del ganglio torácico	117
2.3.5 Evaluación de la interferencia del Roundup en la vía de señalización de hormonas esteroideas	119
2.3.6 Evaluación de la interferencia del Roundup en el control endocrino del crecimiento ovárico ejercido por prostaglandinas	122
2.4 Análisis estadístico	123
RESULTADOS	124
Evaluación <i>in vitro</i> del contenido de vitelogenina a concentraciones subletales de Roundup y glifosato puro	125
Evaluación de la síntesis proteica por exposición a Roundup	126
Evaluación histológica de los ovarios expuestos a Roundup	127
Evaluación de la interferencia del Roundup en la vía de señalización de hormonas pedunculares y de ganglio torácico	128
Evaluación de la interferencia del Roundup en la vía de señalización de hormonas esteroideas	132
Evaluación de la interferencia del Roundup en el control endocrino del crecimiento ovárico ejercido por prostaglandinas	137
DISCUSIÓN	138
<u>CAPÍTULO III: Evaluación <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> del efecto del herbicida glifosato sobre la maduración testicular y el control endocrino de la espermatogénesis en machos adultos de <i>N. granulata</i></u>	157
OBJETIVOS PARTICULARES	158
MATERIALES Y MÉTODOS	159
3.1 Animales	160

3.2 Herbicidas	160
3.3 Reconocimiento histológico de los órganos del sistema reproductor	160
3.3.1 Testículos y vasos deferentes	160
3.3.2 Glándula androgénica	161
3.4 Protocolos histológicos	162
3.4.1 Protocolo de inclusión en parafina	162
3.4.2 Coloración Tricrómico de Masson	163
3.4.3 Coloración de ácido periódico de Schiff (PAS)	163
3.4.4 Coloración Alcian Blue	163
3.4.5 Coloración PAS/Alcian Blue	164
3.5 Ensayo <i>in vivo</i> para la evaluación del posible efecto del Roundup y su principio activo sobre la maduración testicular	164
3.6 Medición de las variables histológicas	165
3.7 Ensayo <i>in vivo</i> para la determinación de la viabilidad espermática	166
3.8 Determinación de la viabilidad espermática por fluorescencia	167
3.9 Ensayo <i>in vitro</i> para la evaluación del posible efecto del Roundup como desorganizador endocrino sobre la vía de señalización de la hormona de la glándula androgénica	169
3.10 Análisis estadístico	171
RESULTADOS	172
Histología del sistema reproductor	173
Ensayo <i>in vivo</i> para la evaluación del posible efecto del Roundup y su principio activo sobre la maduración gonadal	177
Ensayo <i>in vivo</i> para la determinación de la viabilidad espermática	184
Ensayo <i>in vitro</i> para la evaluación de la posible interferencia del Roundup y su principio activo sobre el control de la maduración gonadal ejercido por la hormona de la glándula androgénica	188
DISCUSIÓN	190
<u>CONCLUSIONES</u>	203
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	206

Abreviaturas y Símbolos

°C: grados Celsius

%: por ciento

BSA: albúmina sérica bovina

cDNA: *complementary desoxirribonucleic acid*

CHCl₃: cloroformo

CO₂: dióxido de carbono

CPM: cuentas por minuto

DM: diámetro mayor

Dm: diámetro menor

ECD: ecdisona

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

espf: espermátforo

EtOH: etanol

FMOC-CL: 9- fluorenilmetilcloroformato

mg: miligramo

mm: milímetro

g: gramo

GA: glándula androgénica

GF: glifosato puro

GIH: *gonad inhibiting hormone*

g/L: gramos/litro

GP: ganancia en peso

GSH: *gonad stimulating hormone*

GT: ganglio torácico

Ha: hectárea

HCl: ácido clorhídrico

HGA: hormona de la glándula androgénica

³H-Leu: leucina tritiada

HPLC-MS: cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masa

HRP: *horse radish peroxidase*

hs: horas

IBF: ibuprofeno

IGS: índice gonadosomático

IHS: índice hepatosomático

IVSI: índice vasosomático izquierdo

KCl: cloruro de potasio
K₂C₂O₄: oxalato de potasio
kDa: kilodálton
Kg: kilogramo
KH₂PO₄: fosfato de potasio diácido
KOH: hidróxido de potasio
L: litro
M: molar
MeOH: metanol
MF: metilfarnesoato
min: minuto
mL: mililitro
mm: milímetro
mM: milimolar
μg: microgramo
μL: microlitros
μm: micrómetro
μm²: micrómetro cuadrado
n^o: número
N: normal
NaCl: cloruro de sodio
Na₂CO₃: carbonato de sodio
NH₄: amonio
Na₂HPO₄: fosfato de sodio monoácido
NaH₂PO₄: fosfato de sodio diácido
NaKC₄H₄O₆: tartrato de sodio y potasio
NaOH: hidróxido de sodio
Na₂SO₄: sulfato de sodio
nm: nanómetros
O: oscuridad
PAS: *periodic Schiff acid*
PG: progesterona
PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PO: pedúnculo ocular
p/p: peso en peso
p/v: peso en volumen
rpm: revoluciones por minuto
RUP: Roundup

S: sur
seg: segundos
SFB: suero fetal bovino
T: testículo
TCA: ácido tricloroacético
V: voltios
VD: vaso deferente
VDM: vaso deferente medio
VDP: vaso deferente distal
Vg: vitelogenina
v/v: volumen en volumen
W: oeste

INTRODUCCIÓN

Modelo de agricultura basado en sistema de labranza cero

La siembra directa, también llamada labranza cero o labranza de conservación, es un sistema de siembra que consiste en formar una cama de semillas sin labrar previamente el suelo, dejando sobre la superficie el rastrojo del cultivo anterior (conjunto de hojas y tallos que quedan en el terreno tras la cosecha). Esto implica que no se realiza un movimiento importante del suelo (ya sean araduras o rastros), salvo el que efectúan los discos cortadores de la sembradora, que practican una angosta ranura donde se ubicarán las semillas.

Durante siglos, la labranza tradicional ha sido fundamental para la producción agrícola, permitiendo la remoción mecánica de las malezas al enterrarlas, exponer sus raíces para que se sequen, o destruirlas por corte (Baker *et al.*, 2018). Al arar el suelo, se produce sin embargo una modificación de su atmósfera interior, ya que el oxígeno atmosférico que ingresa incrementa los procesos oxidativos de la materia orgánica, liberando dióxido de carbono hacia la atmósfera. Esta descomposición de la materia orgánica libera además una gran cantidad de nutrientes, aumentando así la fertilidad del suelo de manera inmediata (Lenardón, 2010). Sin embargo, durante este proceso el suelo es sometido a una ruptura física, desorganizándolo y alterando el reciclamiento natural de la materia orgánica. Esto explica por qué la labranza tradicional permite muy buenas producciones a corto plazo, pero no así a largo plazo, ya que termina produciendo una disminución de la densidad aparente del suelo

(definido como masa de suelo/unidad de volumen), así como una resistencia a la penetración de la capa arable (Lenardón, 2010).

La justificación para adoptar el sistema de labranza cero es entonces remover lo menos posible el suelo, disminuyendo los ciclos de oxigenación intensa de la materia orgánica y evitando la destrucción de la misma. Al dejar el rastrojo para su descomposición, se incrementa a largo plazo la cantidad de materia orgánica disponible como alimento para los microorganismos del suelo (Baker *et al.*, 2008), al contrario de lo que ocurre con la repetida oxidación de la materia orgánica durante la labranza tradicional. El sistema de labranza cero preservaría entonces la estructura del suelo, disminuyendo su erosión en un 90% respecto de los métodos tradicionales (Pognante, *et al.*, 2011). Además preservaría la integridad de las lombrices de tierra y otra fauna presente, mejorando así la aireación e incrementando el nitrógeno del suelo, dado que reduce su mineralización. Además, la tecnología de labranza cero es elegida en ciertas zonas húmedas porque permite acceder a los suelos anegados poco después de las lluvias, suelos que de haber sido arados resultarían lodozales, en los cuáles las maquinarias no podrían desplazarse (Lenardón, 2010). No obstante, los métodos de labranza tradicional permiten la eliminación mecánica de malezas o plantas indeseables, método que es incompatible con la labranza cero. En este último sistema, las malezas deben ser eliminadas por métodos

químicos, que requieren el uso masivo de herbicidas, necesitándose además un aporte extra de nitrógeno, en forma de fertilizantes.

El aumento del uso de la siembra directa, en América Latina y el resto del mundo se debe a ciertas ventajas para el proceso de producción (Baker *et al.* 2008), como la disminución de la necesidad de riego, la preservación de la estructura del suelo, el incremento de la materia orgánica, la reducción del crecimiento de malezas, el ahorro de combustible, la menor capacitación del personal, la menor frecuencia de reemplazo de maquinarias, y la reducción de mano de obra (puesto que son necesarias hasta un 60% menos de horas de trabajo por hombre y por Ha, respecto de la labranza tradicional).

En Argentina, la superficie agrícola bajo siembra directa ha crecido aceleradamente en el transcurso de los años (Figura 1), pasando de ser de un 44,3% en la campaña 2000/01, a 91% en la campaña 2016/17, representando más de 33 millones de Ha, siendo los principales cultivos soja, trigo y maíz (Nocelli Pac, 2017). Este sistema de labranza trae aparejado el uso de distintos tipos de agroquímicos (Paruelo *et al.*, 2005), entre los que se encuentran herbicidas, fertilizantes y fungicidas, que se aplican en forma de diferentes formulados, a saber: líquidos, aerosoles, granulados, polvos. De hecho, el éxito que en principio logró este sistema se debe fundamentalmente al uso de estos productos (Schaaf, 2013). Este punto requiere especial atención, puesto que para

que dicho sistema de labranza sea sustentable, uno de los aspectos a considerarse es la toxicidad de los agroquímicos sobre organismos no blanco, así como también la contaminación de los sistemas acuáticos y los efectos de resistencia en poblaciones plaga (Schaaf, 2013).

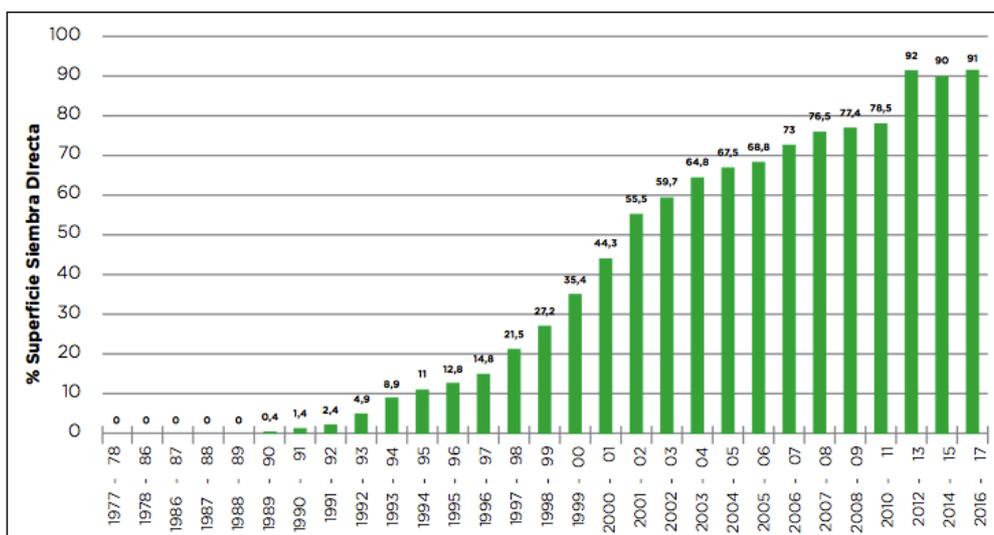


Figura 1. Porcentaje de superficie agrícola bajo siembra directa en Argentina, desde el año 1997 hasta 2017. Reproducido de Nocelli Pac (2017)

Herbicidas, toxicidad potencial y problemática asociada a su uso

Un herbicida es un compuesto químico, generalmente sintético, destinado a inhibir o interrumpir procesos vitales de las plantas, tales como la fotosíntesis, la síntesis de aminoácidos o de ácidos grasos. Su aplicación suele ser mediante formulados comerciales, que además del principio activo contienen coadyuvantes que mejoran la penetración al tejido, y las propiedades fisicoquímicas del compuesto, reduciendo por ejemplo la tensión superficial, y

la evaporación, y mejorando la adherencia, lo que pretende reducir la cantidad de producto aplicado y las pérdidas por deriva.

Los herbicidas son aplicados en los suelos mediante fumigaciones puntuales o aéreas, lo que implica una contaminación directa del suelo que sostiene al cultivo (Suárez *et al.*, 2005). Esto a su vez puede ocasionar la contaminación de los sistemas acuáticos; los factores más importantes que producen la dispersión de herbicidas hacia los cuerpos de agua naturales son los vientos, la volatilización y la escorrentía asociada al arrastre por agua de lluvia y riego, pudiendo así quedar biodisponibles para los organismos acuáticos (Bozzo de Brum, 2010). La acción tóxica de los herbicidas en los sistemas acuáticos está principalmente relacionada con su concentración y con el tiempo que permanecen sin ser degradados por procesos orgánicos o inorgánicos. Más aún, los riesgos del uso de los herbicidas no sólo dependen de la toxicidad intrínseca del compuesto, de su concentración y del tiempo y frecuencia de exposición, sino también de las características del área fumigada y de las condiciones de aplicación (Bozzo de Brum, 2010). La interacción de estos factores es difícilmente predecible; sin embargo, cuando los herbicidas son suficientemente resistentes a la degradación y son adecuadamente solubles como para ser transportados en el agua, pueden impactar significativamente sobre la flora y fauna que habita la zona (Bozzo de Brum, 2010).

La movilización de herbicidas por escorrentía, desde el suelo de los campos donde se aplica el formulado comercial hacia las aguas superficiales, depende de varios factores tales como las características del suelo, topografía, climatología y prácticas agrícolas, así como de las propiedades químicas y ambientales de cada herbicida (Bozzo de Brum, 2010). Éstos pueden encontrarse en la fracción soluble, o bien o adheridos a materia orgánica, sedimentos o minerales. Tras su aplicación, las partículas en suspensión que quedan en el aire pueden precipitar sobre aguas superficiales. Además, no solo pueden tener alcance a este nivel, sino que también pueden ingresar por lixiviación a aguas subterráneas, alcanzando incluso pozos de agua destinados al consumo humano (Suárez *et al.*, 2005).

Las plantas y los animales pueden ser expuestos al glifosato y al Roundup de muchas maneras. La población humana, ya se trate de habitantes urbanos, agricultores u operadores, pueden estar expuestos durante su aplicación por deriva desde el área donde el formulado está siendo fumigado. La aplicación aérea es utilizada en algunos cultivos extensivos, tales como los vastos monocultivos de soja transgénica en América, lo que aumenta considerablemente las posibilidades de exposición accidental de poblaciones o hábitats cercanos. La exposición al glifosato y al Roundup también ocurre a través de sus residuos, frecuentemente encontrados en los alimentos y el medio ambiente. Los límites máximos residuales (LMR) de glifosato y sus metabolitos

en alimento fueron acordados por la Comisión del Codex Alimentarius de las Naciones Unidas en 2006, pero parecen estar más relacionados con el tipo de prácticas agrícolas propias de cada cultivo alimentario que con los umbrales de seguridad para la salud humana (Raley *et al.*, 2011).

Resulta importante una correcta capacitación de los productores agropecuarios para intentar reducir el ingreso de estos agroquímicos hacia los cuerpos de agua, por ejemplo, estableciendo márgenes de vegetación natural al rededor de los cuerpos de agua, que funcionen como barreras o filtros a la deriva (Suárez *et al.*, 2005), además de la concientización sobre las cantidades que realmente deben aplicarse en cada caso. Asimismo, el lavado de envases en arroyos y su disposición cerca o directamente sobre los cuerpos de agua es una práctica no adecuada que genera impacto sobre las comunidades acuáticas (Suárez *et al.*, 2005).

El glifosato y sus formulados

El glifosato (N-[fosfometil]glicina) es un aminofosfonato formado por un residuo de glicina y un radical aminofosfonato unido como sustituyente de uno de los hidrógenos del grupo α -amino:

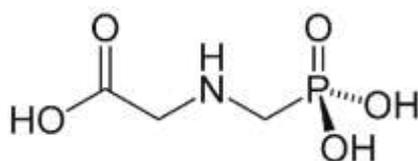


Figura 2. Estructura química del glifosato.

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, inhibiendo la vía del ácido shikímico, particularmente a la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintasa (EPSP sintasa). En la Figura 3 se observa un esquema de la vía del ácido shikímico, así como la reacción que cataliza la enzima EPSP sintasa. El bloqueo de esta enzima resulta en una acumulación excesiva de shikimato en la planta, causando su muerte.

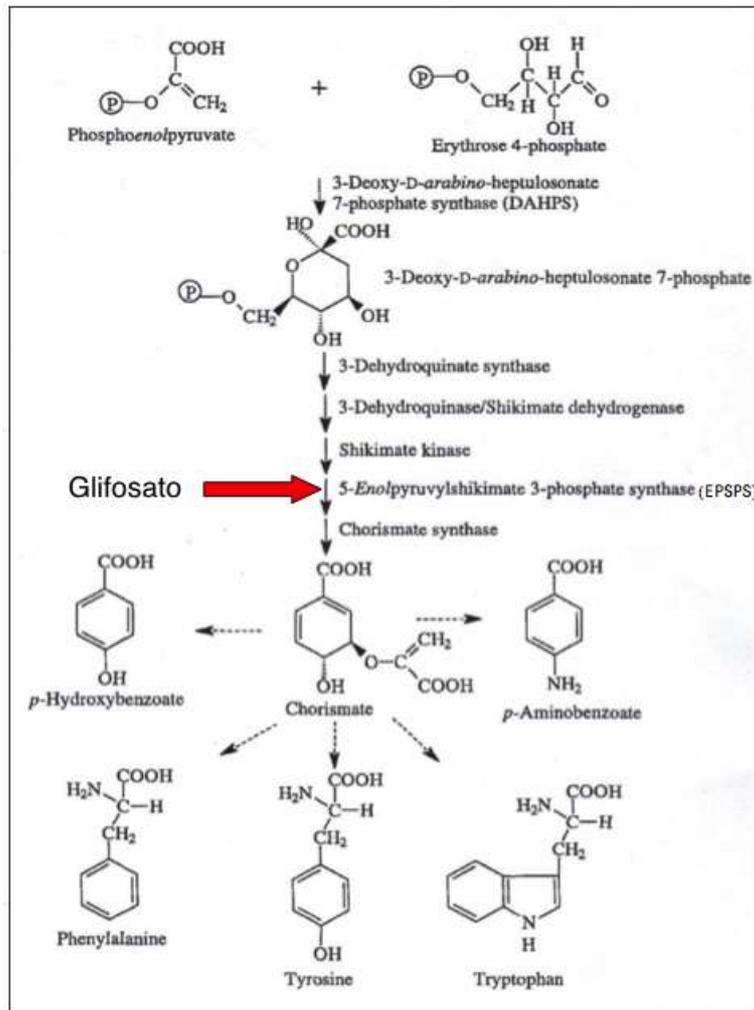


Figura 3. Vía de ácido shikímico. En el recuadro, se indica la reacción que cataliza la enzima EPSP sintasa, cuya inhibición es producida por el glifosato. Modificado de Mensah (2014).

El glifosato se utiliza como principio activo de numerosos formulados comerciales, para el control postemergente de malezas anuales perennes, principalmente en cultivos de soja, maíz y algodón, trigo y caña de azúcar. Su acción sistémica se produce a partir de su absorción a través de hojas y tallos verdes, de allí se transloca a las raíces y órganos vegetativos subterráneos, ocasionando la muerte de las malezas. Los efectos son graduales, sobre todo en las especies perennes; a partir de los 4 o 5 días de la aplicación las hojas comienzan a marchitarse (Koger *et al.*, 2005).

El glifosato fue descrito por primera vez como herbicida en 1971. En 1987, Cheminova desarrolló un proceso propio para producirlo, generando en paralelo la documentación necesaria para registrarlo. La comercialización comenzó 6 años después con el lanzamiento de Glyfos®, marca principal de la formulación basada en la sal isopropilamina. Desde entonces Glyfos® ha sido introducido en más de 50 países y sigue siendo uno de los productos de Cheminova más vendidos. El glifosato, desde su introducción en la década del '70, ha sido considerado como uno de los plaguicidas con mayor tasa de incremento en su producción y uso (Giesy *et. al.*, 2000).

Los formulados de glifosato desarrollados por la empresa Monsanto (Roundup® y sus variaciones) suelen ser gránulos altamente solubles en agua, cuyo principio activo se encuentra en forma de sal (isopropilamina, amónica, sódica

ó potásica). Su formulación incluye coadyuvantes que son surfactantes, y que en consecuencia permiten de la penetración del producto a la planta de una manera más eficiente. Entre los coadyuvantes e “ingredientes inertes” que pueden contener las distintas formulaciones del glifosato se encuentran la glicerina, el propilenglicol, el sulfito de sodio, la polioxietilenamina (POEA), la sal sódica de fenilfenol, y derivados del destilado de petróleo, de la tiazolona y del benzoato (Cox, 2004). Cabe destacar que las empresas de agroquímicos pueden abstenerse de declarar la identidad de los coadyuvantes utilizados en las formulaciones comerciales de glifosato y otros plaguicidas.

Organismos genéticamente modificados

El incremento del uso de herbicidas ha traído aparejado el uso de organismos genéticamente modificados -OGM- (Figura 4), es decir, aquellos cuyo contenido genético ha sido modificado mediante técnicas de ingeniería genética, ya sea por supresión génica o por introducción de material genético de un organismo distinto, lo cual les confiere una ventaja respecto del organismo no modificado (Fuentes, 2015). Las variedades de OGM resistentes a herbicidas permiten la aplicación de éstos sin que el cultivo de interés se vea afectado, mientras que por el contrario, las malezas o cultivos indeseables son eliminados. Este avance de la tecnología agrícola propició el éxito del uso de herbicidas de la mano de la siembra directa.

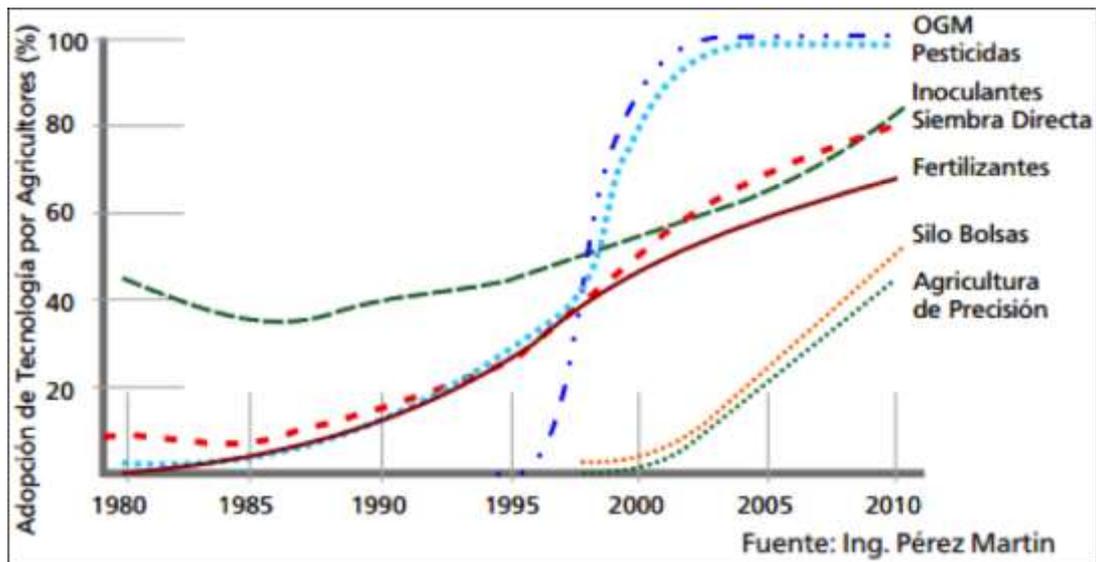


Figura 4. Adopción de tecnologías por parte de agricultores en Argentina, entre el año 1980 y 2010. Se puede ver como el uso de plaguicidas aumenta con el aumento de la siembra directa. Reproducido de (Pognante *et al.*, 2011) .

En el caso de los organismos vegetales, en 1982 la empresa Monsanto fue la primera en producir una planta transgénica. En 1996, la misma empresa introduce en el mercado la soja genéticamente modificada para ser resistente al glifosato (*Roundup Ready*), generando así un combo cuya venta se extendió a más de 160 países, y que posteriormente comprendió también la modificación genética de otros cultivos para convertirlos en resistentes al glifosato. Después de Estados Unidos y Brasil, Argentina es el tercer productor mundial de cultivos genéticamente modificados, que implicaron 24,9 millones de hectáreas en 2016 (ArgenBio, 2017).

La utilización de OGMs en agricultura es un tema muy controvertido. Los adeptos a esta práctica sostienen que es crucial para la expansión global de la producción alimentaria, aumentando los rendimientos a menores costos. Los

que se oponen, argumentan que los riesgos para el ambiente y la salud humana son altos, debido a que conllevan el uso de agroquímicos, que no tendrían efecto exclusivamente en los organismos blanco, sino que causarían también efectos adversos sobre la biota y los seres humanos (Beckrich, 2013).

Uso del glifosato en la agricultura argentina

Los herbicidas constituyen el principal grupo de plaguicidas utilizados en la agricultura; en Argentina ocupan el primer lugar en comercialización (Figura 5)

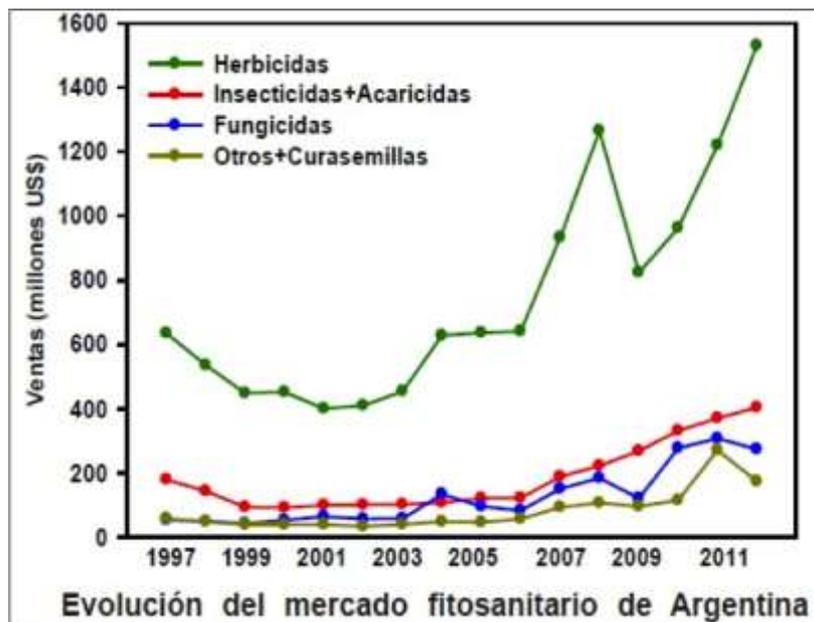


Figura 5. Comercialización de plaguicidas en Argentina, en el período 1997-2011. Reproducido de March (2014).

Por otra parte, en las últimas dos décadas, Argentina ha aumentado exponencialmente la producción de soja transgénica resistente al glifosato (Aparicio *et. al.*, 2013; Arancibia, 2013), siendo actualmente el tercer productor mundial de soja. La superficie cultivada en todo el país creció casi un 50% en

los últimos 30 años, pasando de ser un cultivo casi inexistente en la década del '70 a ocupar el 55% del área sembrada, en 2016 (Ybran y Lacelli, 2017) . Durante el período 1996-2003, el número de Ha dedicadas a la siembra directa (principalmente de soja) creció en más del 600 % (Figura 6); en 2016, la cantidad de Ha sembradas exclusivamente con soja superó los 20 millones (Figura 7).

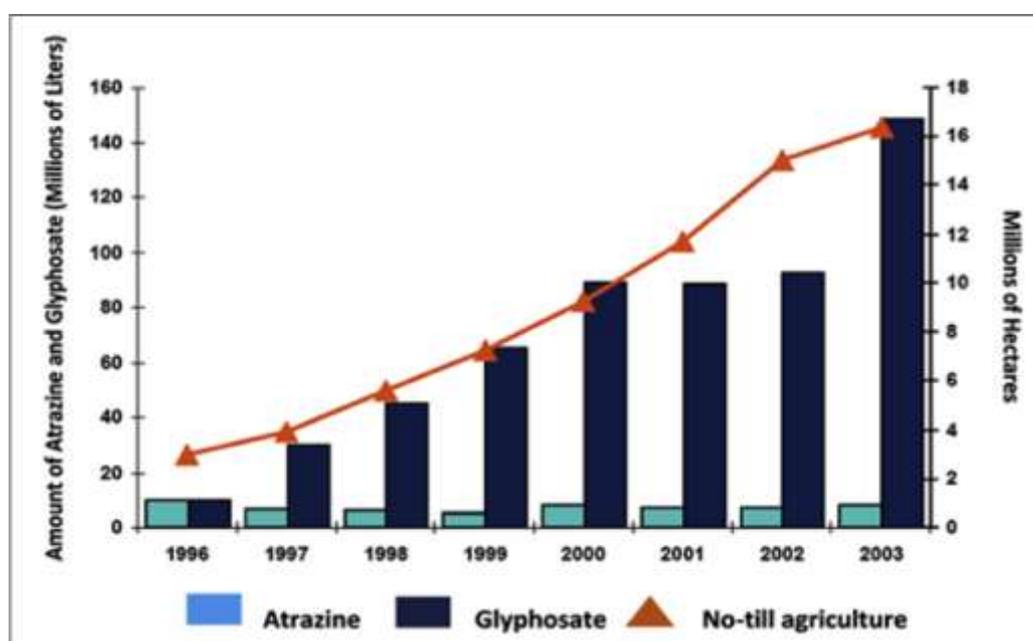


Figura 6. Área dedicada a la siembra directa o labranza cero (“no-till agriculture”), en correlación con el incremento en el uso de glifosato durante el período 1996-2003. Obsérvese la enorme diferencia entre el uso del glifosato y el uso de atrazina, el segundo herbicida en orden importancia en la comercialización dentro de Argentina. Reproducido de Arancibia (2013).



Figura 7. Producción de soja en el período 2000-2016. Reproducido de FyO (2017).

En la Argentina, año a año la soja genéticamente modificada le gana superficie a la ganadería, a los cultivos extensivos como el trigo, a las hortalizas como la papa, y se extiende también a zonas de ecosistemas frágiles como el monte seco y la estepa Patagónica (Souza Casadinho, 2009). El alto costo de la tierra, tanto para la venta como en el arrendamiento, ha impuesto un manejo acotado y minucioso de los cultivos, obligando a intensificar el uso del suelo, disminuyendo las rotaciones e implantando más cultivos por unidad de superficie y de tiempo. En este contexto, la soja puede convertirse tanto en el único cultivo de la explotación como en un cultivo que se implante poco tiempo después, o aún antes, de la cosecha de arveja, trigo, colza o cebada (todos ellos cultivos de invierno). Incluso se da el caso de siembra de doble cultivo con soja, en zonas con prolongado períodos libres de heladas y de déficits hídricos (Souza Casadinho, 2009).

Los monocultivos y la aplicación premanente de las mismas formulaciones de plaguicidas llevan a que surjan resistencias a nivel poblacional en los organismos que se pretende controlar. De esta manera los productores, en ausencia de un plan estratégico, suelen incrementar tanto la frecuencia como las dosis de aplicación. Este es precisamente el caso del glifosato, para el cual se ha documentado que, de una sola aplicación de 3 litros por Ha, llevada a cabo a fines de los años '90, se haya pasado a mediados de la década del 2000 a más de 3 aplicaciones que totalizaron más de 12 litros por Ha y por año (Arias, 2006).

Niveles ambientales de glifosato

El glifosato es susceptible de sufrir biodegradación microbiana en el suelo, en sedimentos acuáticos y en el agua. Al ser polar y anfotérico es afín al sedimento y los suelos, pero también es altamente soluble en agua (solubilidad > 10 g/L, a 25 °C). El glifosato, como compuesto parental, posee una vida media que varía entre 2 a 91 días en agua, y entre 2 a 215 días en suelo, dependiendo de factores tales como la temperatura y la densidad de microorganismos degradadores (Giesy *et al.*, 2000; Vera *et al.*, 2010; Battaglin *et al.*, 2014). El principal metabolito del glifosato es el ácidometilfosfónico (AMPA), que es soluble y químicamente estable en el agua, no sufriendo degradación fotoquímica; en suelo su vida media oscila entre 60 y 240 días, mientras que en agua su vida media es similar a la del glifosato (Giesy *et al.*, 2000; Battaglin *et al.*, 2014).

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 niveles 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 concentraciones máximas de 1,8 a 1,9 mg/L, encontrándose que entre el 27 y 55 % de la muestras de agua superficial contenían glifosato en concentraciones detectables (Primost *et al.*, 2017). De igual manera, en un trabajo de relevamiento llevado a cabo recientemente en una zona de Balcarce, de intensiva explotación agrícola, se reportó que más del 90 % de las muestras de suelo contenían glifosato y AMPA, observándose un pico en el mes de junio, en correspondencia con el período de aplicación de glifosato sobre el barbecho (Okada *et al.*, 2017).

Antecedentes de la toxicidad del glifosato en organismos no blanco

El uso del glifosato que demanda la agricultura contemporánea, como se ha visto, causa que el glifosato se detecte en distintos tipos de ecosistemas, en niveles suficientes como para que puedan ser dosados. Esto ha abierto nuevas preguntas acerca del posible impacto ecotoxicológico que se podría generar. Los efectos sobre organismos no blanco que se encuentran reportados en la literatura abarcan desde organismos unicelulares a pluricelulares (Gill *et al.*, 2017), tanto frente a exposiciones agudas como crónicas. El glifosato ha afectado

a comunidades de perifiton, por ejemplo produciendo cambios estructurales en comunidades de diatomeas que habitan en sistemas lóticos (Sullivan *et al.*, 1981). Diversas especies de algas han sido perturbadas por la presencia del herbicida, como *Ulva intestinalis*, *Pterocladia capillacea*, *Myriophyllum aquaticum* (Gill *et al.*, 2017). Se han observado efectos adversos sobre una amplia variedad de invertebrados, tanto terrestres como acuáticos. En anélidos, la exposición a glifosato disminuyó el peso fresco, siendo los juveniles más sensibles que los adultos (Domínguez *et al.*, 2016). En caracoles, el glifosato ha causado alteraciones en el metabolismo enzimático (Christian *et al.*, 1993). La especie de abejas *Apis mellifera* ha exhibido menor sensibilidad al néctar y menor desempeño en el aprendizaje (Herbert *et al.*, 2014). Una amplia variedad de estudios se han realizado en vertebrados, sobre todo en peces, anfibios y mamíferos. Entre los efectos toxicológicos que se han observado frente a la exposición al glifosato se cuentan los de genotoxicidad, citotoxicidad, estrés oxidativo, alteraciones metabólicas, anomalías en estadios tempranos del desarrollo y desorganización endocrina, entre otros.

La especie modelo de estudio: *Neohelice granulata*. Distribución. Importancia ecológica. Aspectos biológicos generales y reproductivos

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. Se distribuye desde el Golfo de San

José (42° 25'S, 64° 36'W), norte de la Patagonia argentina; a través del Río Uruguay hasta Río de Janeiro (22° 57'S, 52° 32'W), Brasil (Spivak, 2010).

Esta especie es considerada una de las más abundantes en los ambientes intermareales del Atlántico suboccidental, y dada su gran actividad cavadora tiene un rol clave como “ingeniero ecosistémico”, ya que es considerado un organismo bioturbador en planicies de marea y marismas (Angeletti, 2017). Construye cuevas elaboradas y estables en el intermareal durante las mareas bajas, otorgando una especial fisionomía a las regiones donde se encuentra, denominadas “cangrejales” en Argentina y Uruguay, y “carangueijais” en Brasil (Spivak, 1997).

Este cangrejo es particularmente abundante en la costa de la Bahía Samborombón, bañada por las aguas del sector externo del estuario del Plata. Esta bahía recibe además el aporte de los ríos Salado y Samborombón, que reciben a su vez la escorrentía de una extensa área de cultivo tratada con herbicidas (Figura 8).



Figura 8. Mapa hidrológico de la provincia de Buenos Aires. Se observa la desembocadura del río Salado (S.R.C.) en la Bahía Samborombón, ubicada en el sector externo del estuario del Plata. El río Salado atraviesa la provincia de Buenos Aires en diagonal, desde la localidad de Junín, atravesando una extensa área dedicada a la agricultura. Al sur del Salado, desemboca el río Samborombón y varios canales artificiales. Punta Rasa, el extremo sur de la Bahía (indicada por la línea llena) es una zona abierta al mar y relativamente libre de contaminación. Reproducido de Montes y Martorelli (2017).

En la Bahía Samborombón, *N. granulata* habita en la zona intermareal, cavando cuevas poco profundas que quedan al descubierto durante la marea baja (Figura 9), momento en el cuál los cangrejos se alimentan del detrito formado por restos de plantas halófitas que son colonizados por diversos microorganismos; a su vez, los adultos y juveniles de *N. granulata* son predados por diversas especies de peces y aves migratorias, constituyendo así un importante eslabón trófico (Boschi *et al.*, 1964; Botto e Irigoyen, 1979; D’Incao *et al.*, 1990; Martinetto *et al.*, 2007). Las hembras ovígeras se adentran en el mar, donde la salinidad elevada es óptima para la eclosión de las larvas (López

Greco y Rodríguez, 1999), sirviendo estas últimas de alimento a los alevines de varias especies de peces que desovan en la Bahía Samborombón (Menni, 1983; Sánchez *et al.*, 1991).



Figura 9. Macho de *N. granulata* fuera de su cueva, durante la marea baja. Durante los períodos de bajamar, los cangrejos aprovechan para alimentarse del detrito que se forma a partir de la descomposición de plantas halófitas de la costa (*Salicornia sp.* y *Spartina sp.*). Hacia el fondo, se observa uno de los canales de marea típicos del extremo sur de la Bahía de Samborombón.

Fotografía: Camila Mac Loughlin.

En la especie en estudio, el dimorfismo sexual más notable está dado por la presencia de pinzas más robustas y coloridas en los machos, en comparación con las hembras. Estas últimas, en cambio, poseen un pleon más ancho que el de los machos, el cual utilizan para incubar los huevos desovados hasta el momento de la eclosión larval (Figura 10); los gonoporos son pares y se abren, como en la mayoría de las hembras de Brachyura, en el esterno del sexto segmento torácico (López Greco, 1997). En los machos el pleon es más angosto

(Figura 11), sirviendo los dos primeros pares de pleópodos como estructuras copuladoras.



Figura 10. (A) vista ventral de una hembra no ovígera de *N. granulata*. El ancho del pleon abarca todo el espacio comprendido entre las articulaciones de las patas caminadoras.(B) hembra ovígera, portando los huevos adheridos a los pleopodos del pleon. Fotografías: Enrique Rodríguez.

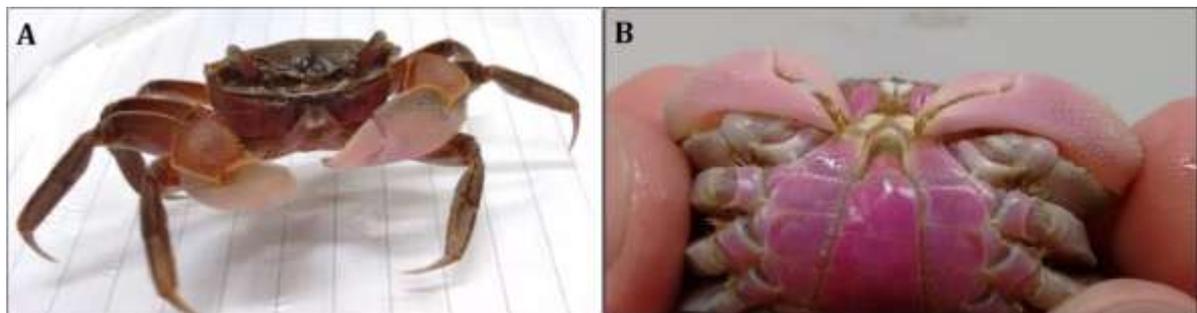


Figura 11. (A) Vista frontal de un macho de *N. granulata*, del cual que se observa en (B) la vista ventral. El ancho del pleon es menor que en las hembras, los primeros dos pares de pleopodos constituyen las estructuras copuladoras. Fotografías: Marina Zanitti.

En zonas templadas tales como Bahía Samborombón y Mar Chiquita, el ciclo reproductivo de los adultos de *N. granulata* comprende tres periodos (López Greco y Rodríguez, 1999): **pre-reproductivo** (invierno), durante el cual el ovario

crece y madura; **reproductivo** (primavera y verano), cuando ocurren tanto el desove como la eclosión de los huevos, y durante el cual el ovario puede remadurar para generar nuevas puestas; y finalmente el período **post-reproductivo** (otoño), durante el cual el ovario de post-puesta comienza lentamente a reorganizarse, concentrándose la inversión energética principalmente en mudar y crecer en tamaño.

Desde el punto de vista histológico, en el ovario inmaduro pueden reconocerse cúmulos de oogonias, rodeados por oocitos en vitelogénesis primaria o endógena, que comienzan a sintetizar vitelogenina, precursor de las vitelinas que constituirán la sustancia de reserva para el desarrollo embrionario que ocurre luego del desove. Durante esta fase de vitelogénesis endógena, el citoplasma es de aspecto homogéneo y adquiere una marcada basofilia (López Greco, 1997). A esta primera etapa del crecimiento oocitario le sigue la vitelogénesis exógena o secundaria (Charniaux-Cotton y Payen, 1988), durante la cual los oocitos continúan con la síntesis endógena de vitelogenina, pero incorporan además una cantidad muy importante de vitelogenina sintetizada en, y exportada por, el hepatopáncreas. Al inicio de la vitelogénesis exógena, el citoplasma se torna eosinófilo, y las células foliculares se disponen en número variable rodeando a cada oocito (Figura 12); estas células foliculares constituyen un tejido permanente dentro del ovario, reutilizándose luego de cada desove

para acompañar el desarrollo de una nueva cohorte de oocitos en vitelogénesis exógena (Rodríguez, 1991).

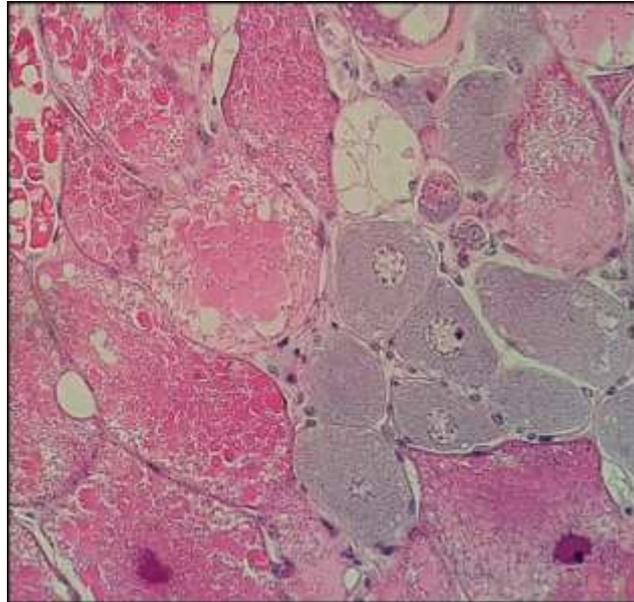


Figura 12. Ovario de hembra adulta de *N. granulata*, durante el período pre-reproductivo. Se observan los oocitos pre-vitelogénicos (en vitelogénesis primaria o endógena), basófilos y de menor tamaño, y los oocitos vitelogénicos (en vitelogénesis secundario o exógena), eosinófilos y de mayor tamaño. Rodeando ordenadamente a los oocitos, se observan las células foliculares.

Fotografía: Ivana Canosa.

En los cangrejos macho, la anatomía interna del sistema reproductor comprende testículo, vaso deferente (proximal, medio y distal) y ducto eyaculador (que desemboca en la papila peneana); todas estructuras bilaterales. El inicio de la actividad reproductiva suele ocurrir luego de la “muda puberal”, asociada por varios autores a un cambio en el crecimiento relativo de ciertos apéndices con valor reproductivo (Legrand y Juchault, 1994). En *N. granulata*, mientras los testículos alcanzan la madurez a partir de los 10,5 mm de ancho del caparazón, solo a partir de los 16,5 mm se puede detectar un cambio en el crecimiento relativo del primer pleópodo -que utiliza para la transferencia

de esperma- (López Greco *et al.*, 1997). Así como ocurre en otras especies de cangrejos (Pérez, 1990), los machos de *N. granulata* presentan espermatozoides en testículo y vaso deferente a lo largo de todo el año, lo cual indica que el proceso de espermatógenesis no posee una estacionalidad marcada.

Durante el período reproductivo, las hembras de *N. granulata* pueden tener hasta 3 o 4 puestas; cada puesta puede contener hasta 30000 huevos (López Greco y Rodríguez, 1999). La incubación dura unos 30 días; hacia el final de la incubación, las hembras ovígeras se internan en el estuario buscando aguas de salinidad elevada, más profundas y propicias para la supervivencia larval. Las larvas son pelágicas, de vida libre y planctónicas. Esta especie posee 4 zoeas y una megalopa, que finalmente regresa a la costa para muda al primer estadio juvenil (Boschi *et al.*, 1967). La madurez sexual funcional se alcanza entre los 22 y 23 mm de ancho de caparazón, para las hembras; y entre los 18 y 20 mm de ancho de caparazón, para los machos (López Greco y Rodríguez, 1998). Estos tamaños se alcanzan en el ambiente natural al segundo ó tercer año de vida, siendo el tiempo de vida medio de la especie de entre 3 y 4 años (López Greco, 1997; Petriella y Boschi, 1997).

Control hormonal de la reproducción en crustáceos

- **Hembras**

El crecimiento del ovario y/o hepatopáncreas se encuentra bajo el control de varias hormonas, entre las cuáles se cuentan neuropéptidos, esteroides y juvenoides. Varios de los neuropéptidos involucrados en el control del crecimiento ovárico son sintetizados en el órgano X y secretados en la glándula del seno, ambos ubicados en los pedúnculos oculares de los crustáceos decápodos (Fingerman, 1997; Figura 13). La glándula del seno es el principal órgano neurohemal, y entre otras neurohormonas secreta la denominada “hormona inhibidora de la gónada” - GIH, por sus siglas en inglés- (Fingerman y Rodríguez, 2009). Esta hormona impide el avance de la vitelogénesis exógena en las hembras, al inhibir la expresión de los transportadores para vitelogenina, ubicados en la membrana de los oocitos (Charniaux-Cotton y Payen, 1988). Además, se ha descrito otra neurohormona, la “hormona estimulante de la gónada” (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). La GSH podría ser una isoforma particular de la “hormona hiperglucemiante de crustáceos” (CHH), de acuerdo a evidencias que indican su posible expresión en ganglio torácico (DeKleijn, *et al.*, 1998, Fanjul-Moles, 2006). La GIH estaría ausente en algunos crustáceos decápodos como camarones peneidos, y una isoforma particular de la CHH cumpliría roles comparables (Webster *et al.*, 2012). La relación entre GIH y GSH

con el control de la maduración gonadal requiere aún de estudios más profundos, la evidencia actual sugiere que GIH probablemente actúe directamente sobre los oocitos, inhibiendo la captación y/o la síntesis de vitelogenina (Jugan y Soyez, 1985; Derelle *et al.*, 1986), si bien sería importante medir los niveles de esta hormona a lo largo de los estadios del ciclo reproductivo, y esclarecer si GIH podría inhibir además la secreción de GSH desde el ganglio torácico.

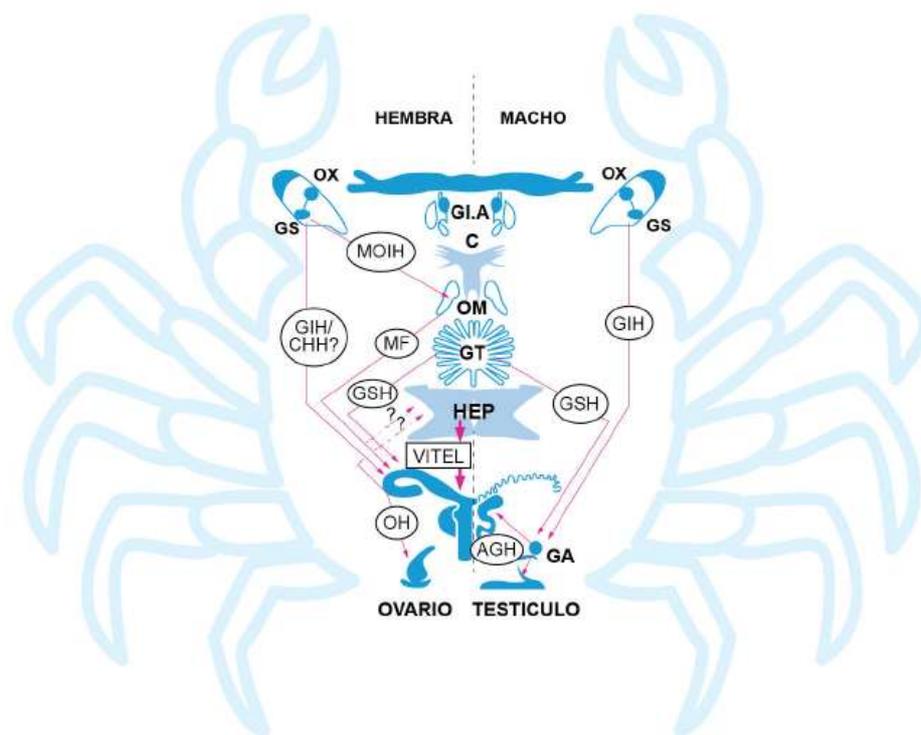


Figura 13. Control endocrino de la reproducción de crustáceos. OX: órgano X, GS: glándula del seno, OM: órgano mandibular, C: cerebro, GT: ganglio torácico, HEP: hepatopáncreas, OV: ovario, T: testículo, GA: glándula androgénica, Gl. A: glándula antenal, GIH: hormona inhibidora de gónadas, GSH: hormona estimulante de gónadas, MOIH: hormona inhibidora del órgano mandibular, CHH: hormona hiperglucemiante de crustáceos, MF: metil farnesoato, OH: hormona ovárica (esteroidea), AGH: hormona de la glándula androgénica y VITEL: vitelogenina. Reproducido de Avigliano (2018); fuente original: Rodríguez *et al.* (2007).

La CHH, es una larga familia de hormonas a la que pertenecen varios neuropéptidos. El primer reporte relacionado con su función fue en 1944 por

Abramowitz *et al.*, que observaron una respuesta hiperglucemiante en crustáceos luego de la inyección de extracto de pedúnculo ocular. Esta familia de neuropéptidos además incluye péptidos relacionados como la GIH, la “hormona inhibidora de la muda” (MIH, por sus siglas en inglés) y la “hormona inhibidora del órgano mandibular” -MOIH, por sus siglas en inglés- (Fanjul-Moles, 2006). En decápodos, la CHH tendría un rol importante en la respuesta a estrés como un efector del sistema de mantenimiento de la homeostasis (Fanjul-Moles, 2006), cuya relación con otros procesos adaptativos continúa siendo tema de investigación. Además del rol central en el metabolismo de carbohidratos, las distintas isoformas de la CHH estarían implicadas además en procesos relacionados con la muda y reproducción, y también con la osmorregulación (Fanjul-Moles, 2016). Más aún, en langostas de agua dulce y salada, la isoforma CHH-A y CHH-B poseen efecto estimulador sobre los oocitos y su actividad endocítica (De Kleijn *et al.*, 1998).

Dentro del grupo de los esteroides, se encuentran los denominados “esteroides tipo vertebrados”, habiéndose identificado en crustáceos al estradiol (17β -estradiol) y a la progesterona (PG), principalmente como 17α -hidroxiprogesterona. Por otra parte, se han observado correlaciones positivas entre los niveles de vitelogenina en hemolinfa y los niveles de progesterona y estradiol circulantes, tanto en camarones como en cangrejos (Quinitio *et al.*, 1994; Shih, 1997). En el ovario de crustáceos, se ha reportado la codificación y

expresión de receptores de progesterona (Preechaphol *et. al.*, 2010). Estudios *in vivo* realizados en *Cherax albidus* por Coccia *et al.* (2010) revelan que tanto el 17 β -estradiol como la PG causan un incremento de la expresión y concentración de vitelogenina en función de la fase del ciclo reproductivo en que se encuentren las hembras. Si bien no se ha identificado en crustáceos la presencia de aromatasa, sí se han identificado otras enzimas de la vía esteroidogénica (Swevers *et. al.*, 1991; Thongbuakaew *et al.*, 2016). En ensayos *in vitro* realizados en *Neohelice granulata*, se pudo observar un efecto estimulante directo de 17-hidroxiprogesterona sobre el ovario (Zapata *et. al.*, 2003; Figura 14).

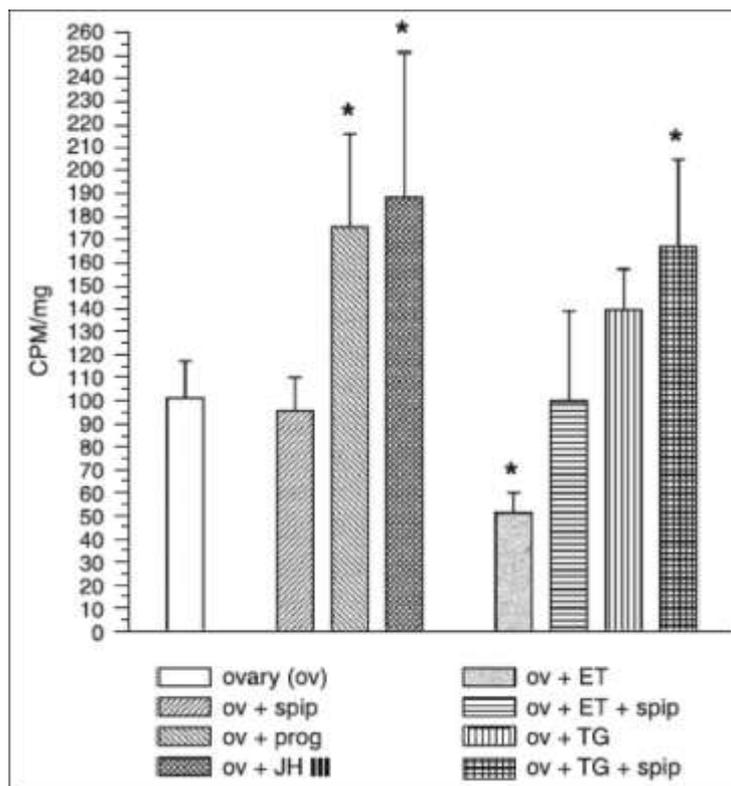


Figura 14. Efecto *in vitro* de la progesterona (prog) y de la hormona juvenil III de insectos (JHIII) sobre la síntesis proteica (e.g., vitelinas), en el ovario (ov) de *N. granulata*. Abreviaturas: spip: espiperona (antagonista de dopamina, un neurotransmisor que ejerce efecto inhibitorio sobre la reproducción); prog: progesterona; ET: pedúnculo ocular; TG: ganglio torácico. En la figura se observa cómo progesterona es capaz de estimular la síntesis proteica sobre el ovario, y cómo el pedúnculo ocular la inhibe. Además, la desinhibición de dopamina causada por la spiperona sobre el ganglio torácico, incrementa la síntesis proteica. Reproducido de Zapata *et al.* (2003).

Se tienen evidencias de que los ecdiesteroides (cetoesteroides polihidroxilados, hormonas de naturaleza esteroidea producidas por el órgano Y), además de desencadenar el proceso de muda, también pueden estimular la reproducción; en hembras de crustáceos decápodos esta función estaría relacionada, en la mayoría de especies, con la proliferación gonial que se verifica durante la premuda (Charmantier *et. al.*, 1997). Estudios en el microcrustáceo *Daphnia magna* han observado que la disminución de ecdiesteroides debido a causas ambientales causaron anomalías en los embriones (Mu y LeBlanc, 2000). Por otro lado, habría indicios de que el ovario sería capaz de captar ecdiesteroides, como lo sugieren las determinaciones por RIA (radioinmunoensayo) y HPLC (cromatografía líquida de alta resolución) realizadas en el ovario de distintas especies de crustáceos, como *Carcinus maenas*, *Panaeus vanamei* y *Macrobrachium rosenbergii*, no descartándose que el mismo ovario pueda sintetizar ecdiesteroides, que actuarían localmente (Subramoniam, 2000). Sin embargo, sería necesario contar con más reportes en la literatura, que indaguen sobre el papel de estas hormonas en el control de la reproducción.

Las hormonas juvenoides de crustáceos son sesquiterpenoides representados principalmente por el metil farnesoato (MF). El MF es secretado por el órgano mandibular, y además de regular la reproducción y la maduración gonadal en machos y hembras, participa en los procesos de muda, desarrollo larval y

morfogénesis (Homola y Chang, 1997). El MF es estructural y funcionalmente similar a la hormona juvenil III de insectos, habiéndose reportado su efecto estimulante sobre la síntesis y/o captación de vitelogenina durante la vitelogénesis secundaria (Huberman, 2000; Nagaraju, 2007).

Se han publicado varios estudios acerca del papel de las prostaglandinas en la reproducción de crustáceos, si bien la bibliografía es más acotada que la relacionada con otras hormonas, como los esteroides. Spaziani *et al.* (1993) han observado que durante la vitelogénesis de la langosta de agua dulce *Peneus paeninsulanus* las prostaglandinas E₂ y F₂ aumentaron gradualmente. En el camarón *Macrobrachium rosenbergii* la forma E₂ ha estimulado la síntesis de AMPc (adenosinmonofosfato cíclico) en el tejido ovárico (Sagi *et al.*, 1995). Otros autores observaron una mayor maduración ovárica luego de incorporar prostaglandinas en el alimento de camarones (Yano *et al.*, 2000). 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 F₂ y E₂, si bien la forma D₂ no mostró el mismo efecto (Reddy *et al.*, 2004).

Vitelogénesis y su control endocrino

En las hembras de crustáceos decápodos, la vitelogénesis es un proceso clave de la reproducción, que involucra la síntesis y acumulación de vitelinas por parte del oocito; éstas son proteínas componentes del vitelo y esenciales para el desarrollo del embrión. Las vitelinas derivan de la vitelogenina como precursor (Huberman, 2000). Ambas son proteínas complejas, de alto peso molecular, asociadas a lípidos, glúcidos y carotenoides, por lo que son llamadas lipoglicocarotenoproteínas. En los crustáceos, la estructura primaria completa de la vitelogenina (Vg) fue dilucidada por primera vez en el camarón *Marsupenaeus japonicus* por Tsutsui *et al.* (2000). Los estudios que determinan las características estructurales y bioquímicas de la Vg en especies de decápodos se basan en técnicas eletroforéticas y/o inmunológicas, tales como ELISA y Western Blot (Chen, *et al.*, 2004; Tahara *et al.*, 2005; Wilder *et al.*, 2010). El peso molecular de las vitelinas y las vitelogeninas en condiciones nativas varía en las distintas especies, dentro de un intervalo que va desde los 263 kDa, encontrado en *Penaeus monodon* (Chang *et al.*, 1993) a 700- 800 kDa en *Macrobrachium rosenbergii* (Chang *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1997; Okumura, 2004). En los crustáceos decápodos, la Vg está compuesta por al menos tres subunidades, cuyos pesos moleculares son aproximadamente 200, 100 y 90 kDa (Wilder *et al.*, 2010).

Tal como se mencionara más arriba en relación al ciclo reproductivo de *N. granulata*, la síntesis de vitelogenina puede ser exclusivamente endógena, es decir, llevarse a cabo en el mismo oocito en todo momento de su desarrollo, o

puede además importarse desde la hemolinfa, durante la vitelogénesis exógena, a partir de la producción que se verifica en el hepatopáncreas. El control hormonal de la síntesis de vitelogenina, se resume en la Figura 15, complementando la información ya suministrada en la Figura 8.

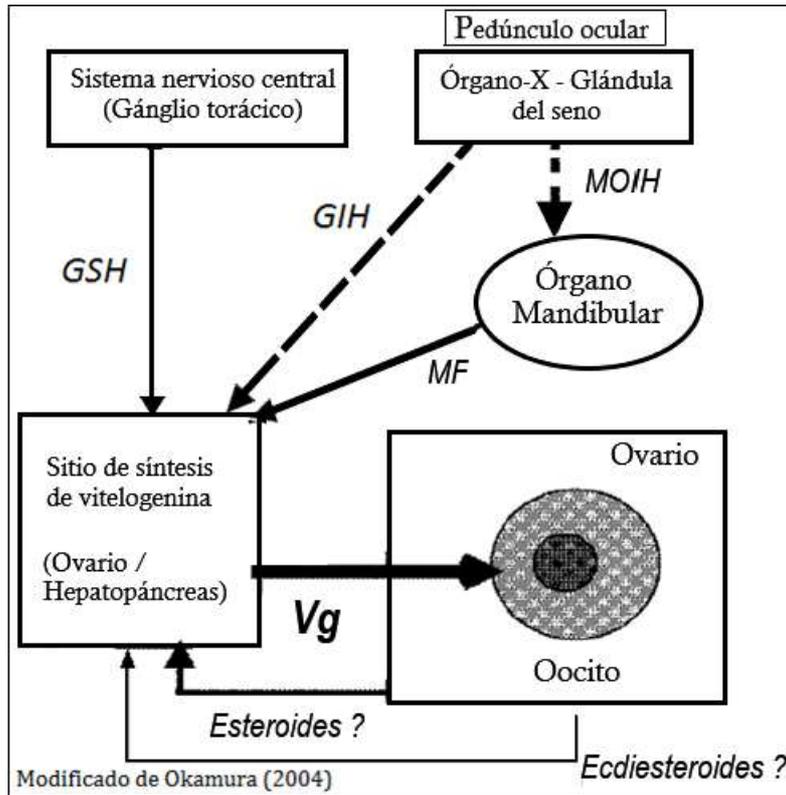


Figura 15. Control hormonal de la síntesis de vitelogenina. Se observa la participación de neurohormonas (GSH, GIH), esteroides (producidos por el ovario) y metil farnesoato (MF). Modificado de Okamura(2004).

- **Machos**

Se sabe que, en los crustáceos decápodos, el complejo órgano X-glándula del seno ubicado en los pedúnculos oculares, produce neurohormonas que regulan varios procesos fisiológicos, si bien la participación de estas hormonas en el proceso reproductivo de los machos no es tan claro como en el caso de las hembras (Khalaila *et al.*, 2002; Figura 16). Aún así, es bien sabido que en machos

de crustáceos, las funciones endocrinas y gametogénicas se llevan a cabo, respectivamente, en dos órganos diferentes (Sagi *et al.*, 2005): el testículo (función gametogénica) y la glándula androgénica (función regulatoria). La funcionalidad del sistema reproductor está controlada por la AG, un órgano bilateral ubicado en la región distal del vaso deferente, que secreta la hormona de la glándula androgénica (AGH, perteneciente a la familia de la insulina), cuyos niveles circulantes regulan la iniciación, terminación e intensidad de la actividad espermatogénica, regulando además negativamente la síntesis de vitelogenina (Khalaila *et al.*, 2002). La AGH es la hormona responsable del desarrollo de los caracteres sexuales primarios y secundarios en los machos de crustáceos (Nagaraju *et al.*, 2010). Más aún, la ablación de la AG inhibe la espermatogénesis en crustáceos (Charniaux-Cotton *et al.*, 1964; Nagamine *et al.*, 1980), lo que incluso ha conducido a una estimulación de la vitelogénesis (Barki *et al.*, 2006), y a la presencia de una gonada con características de intersexo, en la cual se observa una parte ovárica y una parte testicular (LeBlanc, 2007). A su vez, la implantación de la glándula androgénica en hembras ha revertido la gonada hacia el desarrollo de estructuras propias del macho, demostrando así que es clave en la determinación del sexo (Suzuki y Yamazaki, 1998; Cui *et al.*, 2005).

Sagi *et al.* (1991) reportaron que los ecdiesteroides (20-hidroxiccdisona) estimulan *in vitro* la síntesis de ADN en el testículo de *Macrobrachium*

rosenbergii, sugiriendo que estarían involucrados directa o indirectamente en la regulación de la espermatogénesis. Brody y Chang (1989) reportaron que esta hormona induce la espermatogénesis en la langosta *Homarus americanus*. Por otro lado, se encontró en el cangrejo *Pachygrapsus crassipes* que el testículo es el tejido que posee mayor actividad hidroxilante de la prohormona ecdisona hacia su forma activa, 20-hidroxiecdisona (Chang, *et. al.*, 1976). Se ha detectado también, en machos de crustáceos, un cociente de testosterona/estradiol mucho mayor que en las hembras, sugiriendo que la testosterona (posiblemente producida por el testículo), podría jugar también un rol importante en la viabilidad gonadal (Figura 10), y también en estimular la secreción de la hormona de la glándula androgénica (Nagaraju, 2011, Mac Loughlin *et al.*, 2016; Silveyra *et al.*, 2018).

Con respecto a las hormonas juvenoides, el metilfarnesoato ejerce funciones regulatorias en la reproducción los machos, tanto sobre el desarrollo gonadal como para la conducta de apareamiento (Nagaraju *et. al.*, 2010). La administración de MF estimula el desarrollo testicular en varias especies de crustáceos, y se ha sugerido que podría hacerlo de manera directa, o bien indirecta estimulando la secreción de la hormona de la glándula androgénica y/o de la neurohormona GSH, estimulante del desarrollo gonadal (Nagaraju *et. al.*, 2007; Nagaraju y Borst, 2008; Nagaraju *et al.*, 2004; Nagaraju *et al.*, 2003). La Figura 16 resume estas posibles vías de acción.

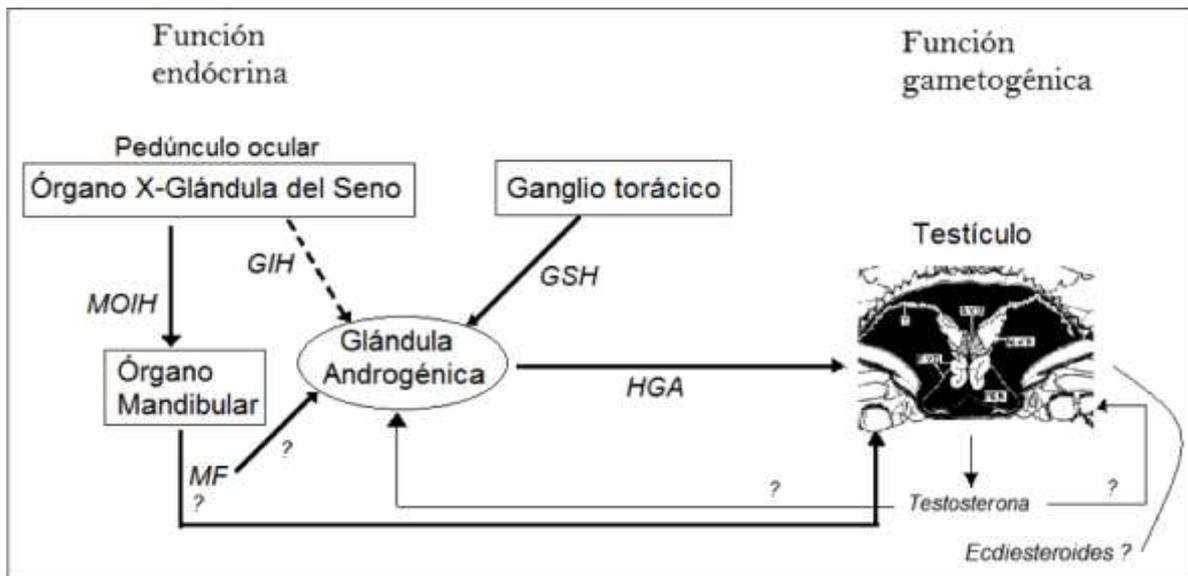


Figura 16. Esquema de la posible regulación endocrina de la función gonadal, en machos de cangrejos. MOIH: hormona inhibidora del órgano mandibular; GIH: hormona inhibidora de las gonadas; GSH: hormona estimulante de las gonadas, MF: metilfarnesoato; HGA: hormona de la glándula androgénica.

Espermatozoides y calidad espermática

En los crustáceos, la morfología de los espermatozoides presenta una notable diversidad, en comparación con otros grupos de animales. En lugar de poseer un verdadero flagelo, los espermatozoides de los decápodos poseen una o múltiples espinas, o bien carencia de apéndices; además, son inmóviles (Braga, 2013). En general, se clasifican en multi-estrellados y uni-estrellados. Los multi-estrellados son típicos de cangrejos y langostas (Felgenhauer y Abel, 1991), y contienen múltiples apéndices que se extienden desde el citoplasma y/o núcleo, conteniendo cromatina y/o microtúbulos (Jamieson, 1991). En los braquiuros, se han perdido los microtúbulos de los brazos laterales del espermatozoide (Jamieson, 2000).

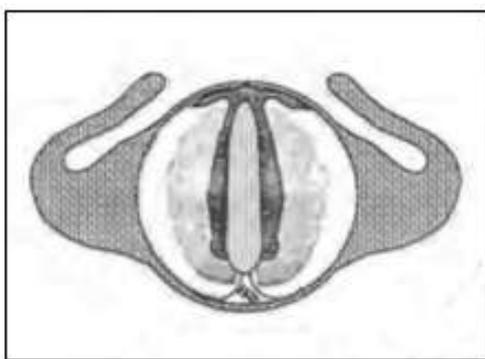


Figura 17. Esquema de un típico espermatozoide de Brachiura, a partir de una micrografía electrónica. La región gris clara central representa el perforatorium (región con pérdida de material fibroso), alrededor del cual se encuentra el acrosoma (gris oscuro). El núcleo adopta forma de copa (gris claro). Reproducido de Jamieson (1991).

En el vaso deferente, los espermatozoides se encuentran típicamente en estructuras de empaquetamiento llamadas espermatóforos, que es la unidad de transferencia espermática. Se forman a partir de una sustancia subcelular que secreta el epitelio del vaso deferente. En las especies que poseen fecundación interna (e.g. braquiuros), el espermatóforo protege los espermatozoides, facilitando su transferencia hacia la hembra (Harhoglu *et al.*, 2018).

La calidad espermática es uno de los principales factores que afectan la eficiencia reproductiva en machos de crustáceos (Wickins y Lee, 2002), y es afectado por diversos factores como la alimentación, hormonas y condiciones ambientales, por ejemplo, la presencia de contaminantes (Pérez-Vazquez *et al.*, 2002; Alfaro *et al.*, 2008, Lewis y Ford, 2012). Se determina analizando diferentes variables (Harhoglu *et al.*, 2018) tales como la cantidad de espermatozoides en el espermatóforo y/o el vaso deferente, la viabilidad espermática, la reacción

acrosómica, el tamaño de los espermatozoides, la melanización y otras patologías de los espermátóforos, y variables metabólicas.

Desorganización endocrina en crustáceos. Posible efecto de glifosato

Son relativamente escasos los trabajos que han evaluado efectos deletéreos de plaguicidas sobre el control endocrino de la reproducción de crustáceos (Rodríguez *et. al.*, 2007; LeBlanc, 2007). Existen, sin embargo, antecedentes sobre la capacidad del glifosato como desorganizador endocrino. Así, se ha demostrado en células hepáticas de humanos que el glifosato produce, a concentraciones ambientales, tanto efectos anti-androgénicos como anti-estrogénicos, actuando en consecuencia como un desorganizador endocrino de la señalización hormonal de la reproducción (Gasnier *et. al.*, 2009). Se han reportado también efectos deletéreos del glifosato sobre el proceso de síntesis de tales esteroides (Quasinti *et. al.*, 2009; Richard *et. al.*, 2005). Particularmente, se ha observado que el Roundup disminuyó la síntesis de progesterona en cultivos de células del cuerpo lúteo de ovario de vaca (Wrobel, 2018). Sin embargo, Armiliato *et al.* (2014) observó en ovarios de *zebrafish* (*Danio rerio*) expuestos por 15 días a glifosato, un aumento en el diámetro de los oocitos, acompañado de la presencia de gránulos de vitelogenina, observados a nivel ultraestructural, así como una expresión aumentada del factor esteroideogénico-1 (SF-1), lo que sugiere una relación entre la expresión de éste y el crecimiento ovárico. En la misma especie, Webster *et al.* (2014) observó en el ovario de peces

expuestos *in vivo* a mediano término, el aumento de la expresión del mensajero del receptor de estrógenos y del mensajero de la enzima aromatasa. Utilizando como modelo una línea celular de cáncer de mama hormono-dependiente, Thongprakaisang *et al.* (2013) reportaron que el glifosato puro indujo la proliferación celular acompañada de una inducción de la actividad transcripcional del ERE (*estrogen response element*), demostrando que esta actividad del glifosato estuvo mediada por el receptor de estrógenos. La actividad esteroidogénica de plaguicidas ya ha sido reportada en otros casos, por ejemplo, el metabolito HPTE del metoxiclor, y el endosulfán, ambos insecticidas organoclorados, aumentaron la expresión del receptor de progesterona y del ERE en ratas (Hodges *et al.*, 2000); y el 2-4' DDT aumentó *in vitro* los niveles de progesterona basal en células de la granulosa de rata (Nejati *et al.*, 2001).

Estudios realizados en hembras del camarón *Neocaridina denticulata* expuestas a insecticidas clorados, mostraron un aumento tanto de estrógenos como de vitelogenina (Huang *et al.*, 2006). En relación al glifosato, la exposición de hembras ovígeras de *N. granulata* a este herbicida produjo una remaduración acelerada del ovario de post-puesta (Avigliano *et al.*, 2014), sugiriendo que el glifosato podría, en la especie en estudio, actuar como xenoestrógeno, o como agonista de alguna otra hormona estimulante del crecimiento gonadal. Por otra parte, se han encontrado efectos sobre el metabolismo energético de anfípodos

expuestos a concentraciones bajas de Roundup, tales como una disminución significativa de los niveles de lípidos, glucógeno y proteínas, y en la actividad de la bomba Na/K ATPasa, así como un aumento significativo en los niveles de peroxidación lipídica (Dutra *et al.*, 2011). También se ha reportado una reducción en el crecimiento del camarón *Caridina nilotica* expuesto a Roundup (Mensah *et al.*, 2012). En juveniles avanzados de la langosta de agua dulce *Cherax quadricarinatus* se ha reportado un descenso tanto de la tasa de crecimiento como de las reservas proteicas, por efecto de glifosato (Frontera *et al.*, 2011). En crustáceos adultos, la disminución de las reservas energéticas podría afectar también el crecimiento del ovario, especialmente durante el período pre-reproductivo, durante el cual se verifica un crecimiento ovárico sostenido.

Moreira-Lopes *et al.* (2014) encontraron en machos de *zebrafish* que el glifosato produjo una disminución de la motilidad y del metabolismo espermático; a su vez, en ensayos de toxicidad subcrónica en gasterópodos, se encontró una disminución los niveles de testosterona, 17- β estradiol y proteínas totales por exposición al herbicida (Omran y Salama, 2016). En machos del camarón *N. denticulata*, se ha reportado un aumento de estrógenos circulantes junto con un descenso de testosterona, en correlación con la inducción de vitelogenina y modificaciones en los apéndices copuladores (Huang *et al.*, 2004); estos resultados muestran que una alteración en la proporción normal de esteroides

sexuales estaría asociada con modificaciones en la expresión de los caracteres sexuales de los machos de crustáceos.

HIPÓTESIS

- 1) El glifosato altera el crecimiento ovárico de *Neohelice granulata*, al disminuir el contenido de vitelogenina en el ovario de las hembras.

De corroborar esta hipótesis se pondrán a prueba las siguientes:

- 2) El glifosato produce efectos histopatológicos tales como reabsorciones oocitarias.
- 3) El glifosato produce una disminución de las reservas energéticas (carbohidratos, lípidos y proteínas) en el músculo de las hembras.
- 4) El glifosato interfiere con la señalización de neurohormonas de origen peduncular y del ganglio torácico, alterando así en las hembras la síntesis de vitelogenina en el ovario.
- 5) El glifosato interfiere con la señalización de hormonas esteroideas, alterando así en las hembras la síntesis de vitelogenina en el ovario.
- 6) El glifosato interfiere con el control endocrino ejercido por las prostaglandinas sobre el crecimiento ovárico.
- 7) El glifosato produce en los machos una alteración de la espermatogénesis, afectando además la viabilidad espermática y/o produciendo efectos histopatológicos en el vaso deferente.
- 8) El glifosato disminuye la producción espermática y/o la viabilidad de los espermatozoides debido a una interferencia en el control endocrino ejercido por la hormona de la glándula androgénica sobre la maduración testicular.

OBJETIVOS GENERALES

- Evaluar el efecto del glifosato, a concentraciones subletales, sobre el crecimiento ovárico mediante ensayos *in vivo* en hembras adultas de *N. granulata*.
- Evaluar la posible interferencia del glifosato sobre el control endocrino de la maduración ovárica mediante ensayo *in vitro*.
- Evaluar si la exposición *in vivo* de machos adultos de *N. granulata* a glifosato causa alteraciones en la morfología funcional del sistema reproductor.
- Evaluar, mediante ensayos *in vitro*, si tales alteraciones en los machos se deben a la interferencia del glifosato con hormonas reproductivas.

CAPÍTULO I:

Evaluación *in vivo* del efecto del herbicida glifosato sobre la maduración ovárica, en hembras adultas de *N. granulata*

OBJETIVO PARTICULAR

Determinar, mediante ensayo *sin vivo* en hembras adultas de *Neohelice granulata*, si la exposición crónica a concentraciones subletales de glifosato se traduce en una alteración del crecimiento ovárico durante el período prereproductivo, en términos del contenido de vitelogenina y de posibles atresias o reabsorciones oocitarias.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.1 Animales

Al comienzo del período pre-reproductivo (invierno), se recolectaron ejemplares de hembras adultas de la especie *Neohelice granulata*, de 12 g de peso corporal promedio, 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. Esta zona es un ambiente estuarial, ya que se encuentra dentro del sector externo del estuario del Plata (donde se mezclan las aguas del Río de la Plata con las del Océano Atlántico). Dado que Punta Rasa se ubica en la región más abierta del estuario, es decir en su desembocadura hacia el mar, es considerada como una zona relativamente libre de contaminación. Los animales fueron transportados al laboratorio 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 de clorada), y mantenidos en condiciones controladas de fotoperiodo (14 L : 10 O), aireación, y temperatura (22 °C), permitiendo así un período de aclimatación de dos semanas previo 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, suplementada con hojas frescas de *Elodea* sp.

1.2 Herbicidas

El formulado comercial utilizado en todos los ensayos 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). Se utilizó agua destilada como solvente para preparar todas las soluciones stock, ajustando el pH a 7. 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.

1.3 Ensayo *in vivo*: Evaluación de la alteración del crecimiento ovárico frente a concentraciones subletales de Roundup

1.3.1 Ensayo *in vivo* de tres meses de duración

Con el objetivo de evaluar si el Roundup Ultramax (RUP) altera el crecimiento ovárico a concentraciones subletales, se realizó un ensayo *in vivo* durante el período pre-reproductivo (fecha de inicio: 18 de julio de 2014, fecha de finalización: 10 de octubre de 2014) en el cual se expusieron hembras adultas de *N. granulata* al herbicida formulado. Para ello, los animales fueron individualizados en recipientes de vidrio de 1 litro de capacidad, conteniendo 400 mL de agua salina, en condiciones controladas de temperatura, fotoperiodo, aireación y alimentación (tal como se describe en 1.1). Previo al inicio del

experimento, se registró el peso de cada uno en una balanza digital de precisión (Ohaus Adventure Pro, precisión $\pm 0,01$ g), y se les extrajo hemolinfa (0,1-0,2 mL) desde el seno hemolinfático pre-branquial, ingresando a través de la coxa de la cuarta pata izquierda, con una jeringa de 29G. La hemolinfa fue almacenada a -80 °C con 10 μ L de anticoagulante ($K_2C_2O_4$ 10% : PMSF 0,01 M, 3:1). A continuación, cada ejemplar se asignó al azar a cada uno de los siguientes tratamientos (n= 15): Control (agua de exposición), Roundup Roundup 0,01 mg/L, y Roundup 0,2 mg/L. Cada 72 hs se recambió completamente el agua de exposición de todos los recipientes del ensayo, y se agregaron las alícuotas de herbicida correspondientes (diseño semi-estático). Se tomaron muestras de agua a fin de validar las concentraciones nominales por HPLC-MS (sección 1.4). Durante todo el experimento se registraron los eventos de muda, muertes, y puesta de huevos (hembras ovígeras).

Al término de los tres meses de ensayo, se pesaron a los animales en balanza de precisión ($\pm 0,01$ g) y se tomaron muestras de hemolinfa de cada uno, tal como se detalló anteriormente, para determinar los niveles de glucemia (sección 1.5.4) y de vitelogenina (sección 1.6). Luego los ejemplares se sacrificaron mediante crioanestesia, y se realizaron las disecciones del ovario, hepatopáncreas, y músculo de las quelas, a fin de realizar las determinaciones que permitieron estimar el contenido de vitelogenina, grado de desarrollo ovárico, y las determinaciones de las reservas energéticas. Tanto el ovario como el

hepatopáncreas se pesaron en balanza analítica ($\pm 0,0001$ g) y se calcularon los índices gonadosomático (IGS) y hepatosomático (IHS), de acuerdo con las siguientes fórmulas:

$$\text{IGS} = (\text{peso ovario (g)}/\text{peso animal (g)}) \times 100$$

$$\text{IHS} = (\text{peso hepatopáncreas (g)}/\text{peso animal (g)}) \times 100$$

Además se calculó la ganancia en peso (GP) de cada hembra al finalizar el ensayo, aplicando la fórmula:

$$\text{GP} = [(\text{peso final (g)} - \text{peso inicial (g)})/\text{peso inicial (g)}] \times 100$$

El hepatopáncreas, una porción del ovario, y una porción del músculo de las que se almacenaron a -80 °C en *buffer* PBS 1X (NaCl 0,14 M; KCl 2,7 mM; KH_2PO_4 1,5 mM; Na_2HPO_4 8,1 mM; pH= 7,4), para la posterior determinación de los niveles de reservas energéticas y vitelogenina (secciones 1.5 y 1.6, respectivamente). La otra porción del ovario de cada animal se fijó en solución de Bouin, con el objeto de proceder a su análisis histológico (sección 1.7).

Para el análisis de datos, se excluyeron aquellas hembras que quedaron ovígeras y/o mudaron durante el ensayo *in vivo*, a fin de reducir la variabilidad asociada a una condición ovárica diferente o a la inversión energética en el crecimiento somático.

1.3.2 Ensayo *in vivo* de un mes de duración

Se realizó en paralelo y bajo las mismas condiciones, un segundo ensayo *in vivo*, que comenzó al mismo tiempo que el ensayo *in vivo* de tres meses, pero que sólo comprendió un mes de duración. Este ensayo incluyó un grupo control y un grupo tratado con Roundup 0,2 mg/L (n=15 por grupo), y fue diseñado con el objetivo específico de evaluar una posible respuesta temprana sobre los niveles de vitelogenina ovárica y proporciones oocitarias, para poder comparar con el efecto sobre los ovarios expuestos durante tres meses. Al término del mes, una porción del ovario de cada hembra se almacenó a -80 °C en *buffer* PBS 1X para posteriormente realizar la determinación del contenido de Vg (sección 1.6.4), y otra porción fue fijada en solución de Bouin para su análisis histológico (sección 1.7).

1.4 Validación de las concentraciones nominales

Con el fin de validar las concentraciones nominales de herbicida en las muestras de agua del ensayo *in vivo*, se tomaron alícuotas con pipeta de vidrio (precisión $\pm 0,1$ mL) a tiempo 0 hs (justo después de alicuotar las soluciones stock durante el recambio), y a tiempo 72 hs (justo antes de realizar el recambio completo de las soluciones). Las muestras se evaporaron a alta presión y se derivatizaron a pH= 9 con 9-fluorenilmetilcloroformato (FMOC-CL), para luego determinar la concentración del principio activo glifosato mediante cromatografía de alta resolución con columna cromatográfica X-SELECT C₁₈,

acoplado a un espectrómetro de masas Agilent, con un detector modelo VL. La elución se realizó a un flujo de 0,5 mL/min, con solvente de elución MeOH/NH₄ (5mM) 9 mM. Estas determinaciones se realizaron el Centro de Investigaciones del Medio Ambiente (CIMA), Unversidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.

1.5 Determinación de los niveles de reservas energéticas

1.5.1 Determinación de los niveles de lípidos

El músculo fue desprovisto del exoesqueleto circundante con la ayuda de una pinza y tijera de disección. Se pesó el tejido en la balanza analítica ($\pm 0,0001$ g) y se dividió en dos porciones iguales, una de ellas se utilizó para determinar los niveles de lípidos por el método de Folch *et. al.* (1967); mientras que la otra porción se almacenó a -80 °C para luego medir los niveles de proteínas y glucógeno.

La muestra de músculo proveniente de cada animal fue aislada en un tubo de ensayo debidamente rotulado, al cual se le agregaron 20 mL por gramo de tejido (V1) de una solución 2:1 de CHCl₃ : MeOH, luego se homogenizó en hielo mediante un émbolo de teflón. El tiempo de extracción fue 24 hs a 4 °C. Posteriormente, se filtró el solvente de cada tubo mediante un embudo con papel de filtro, hacia un tubo de vidrio con graduación ($\pm 0,1$ mL) y se registró el volumen (V2). Se extrajo cada tubo con (V2 x 0,2 mL) de NaCl 0,9%, se agitó

en un agitador vortex, se centrifugó 10 min a 2000 rpm y se descartó la fase acuosa (superior). Se registró el nuevo volumen (V3) y se repitió la extracción. Posteriormente, se tomaron alícuotas por triplicado de 100 µL de cada extracto orgánico, en tubos de ensayos de vidrio. Por otro lado, se preparó la solución stock patrón a partir de aceite de oliva extra virgen a una concentración de 5 mg de lípidos totales/mL de etanol absoluto. Se realizaron cuatro diluciones de la solución stock, a fin de construir una curva de calibración de 5 puntos, por triplicado. Para el blanco se utilizó etanol absoluto.

A las alícuotas de las muestras y a la diluciones de la solución patrón se les agregó 1 mL de ácido sulfúrico puro (Merck). Se agitó suavemente y se dejó reaccionar a 100 °C en un baño termostático durante 10 min, dando lugar a la hidrólisis ácida de los lípidos. Se dejó enfriar y se agregaron a todos los tubos 2,5 mL de reactivo colorimétrico vainillina (NaH₂PO₄ 0,04 M; vainillina 0,016 M) y se agitó suavemente (puesto que la reacción es exotérmica). Los dobles enlaces de los lípidos reaccionan con el ácido sulfúrico dando sulfonatos, que se acomplejan con la vainillina formando grupos sulfofosfovainillina, que dan color rosado, lo que permitió medir la absorbancia en un espectrofotómetro (Zeiss MQII) a 530 nm.

El contenido de lípidos, en mg lípidos/g músculo se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de lípidos} = \frac{[(\text{AbsP}-\text{Bco})-\text{Ord}] * V1}{\text{Peso músculo}} \times \text{Fdil}$$

Donde: AbsP= absorbancia promedio; Bco= absorbancia del blanco; Ord= ordenada al origen de la curva de calibración; Pte= pendiente de la curva de calibración; V1= volumen de solvente de extracción; peso músculo= peso de la porción de músculo; Fdil= factor de dilución.

1.5.2 Determinación de los niveles de glucógeno

Los niveles de glucógeno en el músculo se determinaron por el método de Van Handel (1965). La porción de músculo restante de cada animal, que ya había sido previamente reservada, se colocó en un tubo de ensayo de vidrio y se le agregó un volumen de KOH 30% (0,4 mL para tejidos de 40 a 80 mg; 1 mL para tejidos de 80 a 150 mg, y 2 mL para los que pesaron más de 150 mg). Se realizó la digestión en medio básico, en baño termostático a 100 °C durante 2 hs. Las muestras se dejaron enfriar, y antes de continuar con el protocolo se retiró por duplicado una alícuota 50 µL de cada tubo, almacenando estas nuevas alícuotas a -80 °C para posteriormente realizar la medición de proteínas.

Se prosiguió con el protocolo, agregando gotas de una solución saturada de Na₂SO₄ (2; 4 o 5 gotas según el peso del tejido), y se agitó vigorosamente en un agitador vortex, de manera que precipitara el glucógeno. Se agregó a cada tubo un volumen de etanol 96% según el peso (0,9 mL; 2,5 mL o 4,5 mL) y se centrifugó a 3500 rpm por 10 min. El sobrenadante se descartó y se dejó escurrir cada tubo. El precipitado se redisolvió con agua destilada a 70 °C (0,4 mL; 1 mL

o 2 mL según el peso) y se agitó en el vortex, para repetir el lavado con etanol dos veces más. El precipitado resultante se redisolvió en 0,3 mL de agua destilada a 70 °C y se tomó una alícuota de 100 µL de cada tubo por duplicado, a la cual se le agregaron 100 µL de HCl 4 N. Se preparó la solución patrón en concentración 5 mg/mL, utilizando glucógeno puro (Sigma) y agua destilada como solvente. Para la curva de calibración, se realizaron cuatro diluciones de la solución patrón, por triplicado, en HCl 4N. El blanco fue una dilución de HCl 4N en agua destilada.

Se realizó la reacción de hidrólisis ácida de todas las muestras, a 100 °C en baño termostático durante 1 h. Se agregó luego a cada tubo Na₂CO₃ 2 M, y se agitó vigorosamente en vórtex. Se repitió este paso hasta que todo el CO₂ fue liberado (hasta que no se observaron burbujas durante la agitación).

A continuación se realizó el dosaje de glucosa mediante el kit de Glicemia enzimática (WeinerLab., Rosario, Argentina): tanto a las muestras como a las diluciones del estándar de glucosa (incluido en el kit) se les agregó un volumen de 2 mL de reactivo (el blanco se preparó solo con reactivo), y se dejó reaccionar 10 min a 37 °C, en baño termostático. Se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 505 nm.

El contenido de glucógeno, en mg glucógeno/g músculo, se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de glucógeno} = \frac{[(\text{AbsP}-\text{Bco})-\text{Ord}]}{\text{Peso músculo}} \times \text{Fdil}$$

Donde: AbsP= absorbancia promedio; Bco= absorbancia del blanco; Ord= ordenada al origen de la curva de calibración; Pte= pendiente de la curva de calibración; peso músculo= peso del fragmento de músculo utilizado; Fdil= factor de dilución.

1.5.3 Determinación de los niveles de proteínas totales

Para la determinación de proteínas por el método de Lowry *et al.* (1951) se utilizaron las alícuotas almacenadas a -80 °C, resultantes de la digestión en medio básico detallada en la sección 1.5.2. A cada alícuota se le agregaron 360 µL NaOH 0,5 N y agua destilada hasta un volumen final de 400 µL, de manera proveer un medio alcalino que solublice las proteínas. Por otro lado, se preparó una solución patrón de albúmina pura (Sigma) en agua destilada, a una concentración 1 mg/mL. Se realizaron diluciones por triplicado de la solución patrón en NaOH 1N, de manera de obtener las concentraciones conocidas para armar la curva de calibración. Como blanco se utilizó NaOH 0,5 N.

A todas las muestras y a los patrones se les agregaron 2 mL de reactivo (Na₂CO₃ 0,2 M en NaOH 0,1 N; CuSO₄ 0,001%; NaKC₄H₄O₆ 0,002%), y se dejó reaccionar 10 min a temperatura ambiente para dar lugar a que el tartrato de sodio y potasio se una a las proteínas. A continuación se agregaron 2 mL de reactivo colorimétrico Folin (Merck) a cada tubo, y se dejó reaccionar 10 min a 37 °C en baño termostático. La reacción, que da un producto azul, es estable durante 1 h.

En el caso de que se observara un residuo blanquecino en los tubos, se centrifugó durante 10 min a 3500 rpm, para lograr que precipite. Se midió la absorbancia a 650 nm en el espectrofotómetro.

El contenido de proteínas totales, en mg proteínas/g músculo, se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de proteínas} = \frac{[(\text{AbsP}-\text{Bco})-\text{Ord}]}{\text{Peso músculo}} \times \text{Fdil}$$

Donde: AbsP= absorbancia promedio; Bco= absorbancia del blanco; Ord= ordenada al origen de la curva de calibración; Pte= pendiente de la curva de calibración; peso músculo= peso del fragmento de músculo utilizado; Fdil= factor de dilución.

1.5.4 Determinación de la glucemia

El nivel de glucosa circulante en hemolinfa se determinó mediante el kit de Glicemia enzimática de Weiner Lab.(Rosario, Argentina). Se tomó por duplicado una alícuota de 20 µL de las muestras de hemolinfa extraídas al finalizar el ensayo, (sección 1.3). Por otro lado, se prepararon las diluciones crecientes de estándar de glucosa para la curva de calibración. A todas las muestras se les agregaron 2 mL de reactivo (el blanco contuvo sólo reactivo), y se dejó reaccionar 10 min a 37 °C en baño termostático. La reacción colorimétrica es estable durante media hora, en ese lapso de tiempo se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a 505 nm.

Para el cálculo de la glucemia, en mg glucosa/100 mL hemolinfa se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{Glucemia} = \frac{[(\text{AbsP}-\text{Bco})-\text{Ord}]}{\text{alícuota}} * 100$$

Donde: AbsP= absorbancia promedio; Bco= absorbancia del blanco; Ord= ordenada al origen de la curva de calibración; alícuota= 20 µL.

1.6 Determinación de los niveles de vitelogenina

1.6.1 Purificación de la vitelogenina de *N. granulata*

Con el fin de obtener el anticuerpo primario homólogo anti-vitelogenina de *N. granulata*, se purificó la vitelogenina, a partir de huevos tomados de hembras ovígeras. El protocolo de purificación se realizó con el asesoramiento del Dr. Carlos Fernando García, en el Laboratorio de Bioquímica y Fisiología de Arácnidos (Universidad Nacional de La Plata), según Ferré *at al.* (2012). La concentración de vitelogenina en la solución resultante de la purificación fue 11,28 µg/µL. Esta misma solución se utilizó como inmunógeno para inocular al hospedador y obtener el anticuerpo correspondiente.

1.6.2 Obtención del antisuero

La obtención del antisuero, que contiene los anticuerpos policlonales anti-vitelogenina, fue realizado por la Dra. Hebe Pérez Goldman. Se inocularon

conejos para la obtención del antisuero, al cual se le evaluó la especificidad para la vitelogenina.

1.6.3 Evaluación de la especificidad por Western Blot

Se realizó un Western Blot para evaluar la especificidad del anticuerpo para la vitelogenina pura (estándar de la técnica de ELISA), y para esta proteína en el ovario, hepatopáncreas y hemolinfa. Para esto, en primer lugar se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Lowry *et al.* (1951). En el ovario se estimó una concentración de 100 mg/mL, en el hepatopáncreas de 10 mg/mL, y en la hemolinfa de 1,28 mg/mL.

Condiciones del gel: Se utilizó un gel de poliacrilamida 5% -gel concentrador- (8% v/v Solución 30% p/v acrilamida – 0,8% p/v bisacrilamida; 25% v/v *buffer* separador TrisHCl 4X; 33,3 μ L persulfato de amonio 10%; 3,3 μ L trimetiletilendiamina), y un gel separador de poliacrilamida al 8% (2,5 % v/v Solución 30% p/v acrilamida – 0,8% p/v bisacrilamida; 50% v/v *buffer stacking* TrisHCl 2X; 37,5 μ L persulfato de amonio; 3,8 μ L trimetiletilendiamina).

Preparación de las muestras y siembra: Las muestras de ovario y hepatopáncreas se homogenizaron en *buffer* fosfato de sodio 50 mM, en relación 3:1. Estos homogenatos y la hemolinfa se centrifugaron a 10000 g durante 25 min y se recuperaron los sobrenadantes, que posteriormente se ultracentrifugaron a 100000 g en PBS 1X durante 50 min. Se tomó luego una alícuota de cada muestra, de manera que en la misma quedaran 30 μ g de proteína para el caso

del ovario, 45 µg para el heptopáncreas y la hemolinfa, y 20 µg para caso del extracto purificado (patrón de la técnica de ELISA). A cada una se le agregó 12 µL de buffer de siembra 5X (Tris base 0,3 M; dodecilsulfato sódico 10% p/v; glicerina 10% v/v; β-mercaptoetanol 10% v/v; azul de bromofenol –el equivalente a la punta de una espátula-; pH= 6,8; agua destilada hasta llevar a volumen). Se completó con agua hasta llegar a un volumen final de 60 µL, y se realizó la desnaturalización de las proteínas a 100 °C durante 5 minutos. Se sembró luego una alícuota de 20 µL en cada calle. Se realizaron los controles de omisión correspondientes (ausencia de la siembra de las muestras).

Condiciones de la electroforesis: Se utilizó una rampa de voltaje, comenzando con un voltaje de 40 V durante 30 min, y se prosiguió con 100 V durante 2 hs. El *buffer* de análisis fue Tris en SDS (3% p/v Tris base; 2% v/V dodecilsulfato de sodio 10%; pH= 6,8; agua bidestilada hasta llevar a volumen).

Transferencia a membrana de nitrocelulosa: La transferencia de las bandas proteicas hacia una membrana de nitrocelulosa (0,45 µm de tamaño del poro), se realizó utilizando un voltaje de 100 V, durante 1,5 hs; en buffer de transferencia Tris-glicina en SDS (Tris base 0,3% p/v; glicina 0,14% p/v; metanol 20% v/v y; agua destilada hasta llevar a volumen). Una vez transcurrido el tiempo de transferencia, se retiró la membrana de nitrocelulosa del soporte, y se realizó una coloración con Rojo Ponceau (2% p/v Ponceau S en ácido tricloroacético 30% : ácido tricloroacético, proporción 1:9) a fin de verificar que la transferencia haya ocurrido exitosamente. Luego de la misma, se realizaron varios lavados

rápidos con agua destilada para retirar la coloración y luego varios lavados con *buffer* TTBS (0,9% p/v NaCl; 0,1% v/v Tween 20; Tris base 100 mM; pH= 7,5).

Condiciones de bloqueo: El bloqueo de los sitios de unión inespecíficos se realizó con una solución de leche descremada Sancor 0% : BSA, proporción 3% v/v : 3% v/v, *overnight* a 4 °C. Finalizado el bloqueo se realizaron 3 lavados con *buffer* TTBS 1X.

Incubación del anticuerpo primario: se incubó el anticuerpo primario homólogo anti-vitelogenina, a una dilución 1/30000, a temperatura ambiente con agitación leve durante 2 hs. Posteriormente se realizaron 5 lavados con TTBS 1X.

Incubación del anticuerpo secundario: se incubó el anticuerpo secundario (HRP cabra anti-conejo, BioRad) durante 2 hs a temperatura ambiente con agitación leve. Las diluciones de anticuerpo utilizadas fueron 1/3000 para las muestras de ovario, de hemolinfa y de vitelogenina pura, y 1/2000 para las muestras de hepatopáncreas. Posteriormente, se realizaron 5 lavados con TTBS 1X.

Revelado: se utilizó diaminobencidina (DAB) como cromógeno, el cual se aplicó sobre la membrana, y luego se lavó el exceso con agua destilada.

1.6.4 Protocolo de ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

- *Procesamiento de las muestras:* Los ovarios y hepatopáncreas disecados, tanto en los ensayos *in vivo* como en los *in vitro*, 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 g 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 g) 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 °C hasta que se realizó la medición por la técnica de ELISA.

- *Adherencia del antígeno:* Se realizaron diluciones en *buffer coating* tanto de las muestras como de la Vg pura (para la curva de calibración). Las diluciones empleadas fueron 1/10 para las muestras de hemolinfa, y 1/5 para las de ovario. Se sembró en placas de 96 pocillos con fondo plano (Corning®) un volumen final de 50 µL de cada muestra y de cada concentración de Vg pura. Se incubó en cámara húmeda durante 90 min en estufa a 37 °C. Posteriormente, se descartó el contenido acuoso y se realizó un lavado con PBS 1X.
- *Bloqueo:* Se bloquearon los sitios inespecíficos con leche en polvo descremada (Sancor) al 6% en PBS 1X, en un volumen en exceso, *overnight* a 4 °C en cámara húmeda. Al término de la incubación se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 0,05%.
- *Reconocimiento con el anticuerpo primario:* Se sembró en cada pocillo un volumen final de 50 µL de una dilución 1/4000 de anticuerpo primario anti-Vg, y se incubó durante 2 hs en cámara húmeda a 37 °C. Al finalizar la incubación, se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 0,05%.

- *Reconocimiento con el anticuerpo secundario:* Se sembró en cada pocillo un volumen final de 50 μL de anticuerpo secundario (cabra HRP anti-conejo, BioRad), a una dilución de 1/3000 y de 1/2000 para las muestras de ovario y hepatopáncreas, respectivamente. Se incubó durante 2 hs en cámara húmeda a 37 °C, y posteriormente se realizaron 4 lavados con PBS-Tween 0,05%.
- *Revelado:* se sembraron en cada pocillo 100 μL de solución reveladora. Se dejó reaccionar durante 15 min a temperatura ambiente en oscuridad, y se detuvo la reacción agregando a cada pocillo 50 μL de ácido oxálico 2%. La reacción es estable 30 min, en ese lapso de tiempo se midió la absorbancia en espectrofotómetro Optima Fluostar, con lector de ELISA integrado, a 420 nm.

Soluciones y buffers utilizados:

- *Buffer coating:* Na_2CO_3 15 mM; NaHCO_3 35 mM; pH= 9,6
- PBS 1X: NaCl 0,14 M; KCl 2,7 M; KH_2PO_4 1,5 mM; Na_2HPO_4 8,1 mM; pH= 7,4
- PBS-Tween 0,05%: 0,05% Tween (Biopack, Argentina) en PBS 1X.
- Solución reveladora: ácido cítrico 0,1 M; Na_2HPO_4 0,2 M; ABTS 0,3 mg/mL; pH= 5

Curva de calibración: Para armar la curva de calibración se preparó una solución stock 1/1000 de Vg en *buffer coating*, a partir de la cual se obtuvieron las concentraciones que se indican en la Tabla 1.1:

Masa de Vg (ng)	Concentración de Vg en <i>buffer coating</i> (ng/ μ L)
0 (blanco)	0
15	0,3
30	0,6
60	1,2
90	1,8
120	2,4
180	3,6
240	4,8

Tabla 1.1 Curva de calibración de Vg para el ELISA.

Cálculos: La concentración de Vg en las muestras se calculó aplicando las siguientes fórmulas:

✓ En el ovario:

$$\text{Concentración de Vg } (\mu\text{g/g ovario}) = \frac{[(\text{AbsP}-\text{Bco})-\text{Ord}]}{\text{Peso ovario}} \times \text{Fd}_1 \times \text{Fd}_2 \times 1000$$

✓ En la hemolinfa:

$$\text{Concentración de Vg } (\mu\text{g/mL hemolinfa}) = \left[\frac{(\text{AbsP}-\text{Bco})-\text{Ord}}{\text{Pte}} \right] \times \text{Fd}_1 \times \text{Fd}_2$$

Donde AbsP= absorbancia promedio; Bco= absorbancia del blanco; Ord= ordenada al origen de la curva de calibración; Pte= pendiente de la curva de calibración; peso ovario= peso de la porción de ovario; Fd₁= factor de dilución en PBS 1X; Fd₂= factor de dilución en *buffer coating*. El factor 1000 se utilizó para corregir las unidades.

1.7 Análisis histológico

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.

La deshidratación se realizó con la siguiente sucesión creciente de alcoholes:

EtOH 70% v/v (nuevo), durante 20 min.

EtOH 90% v/v, durante 20 min.

EtOH 96% v/v, durante 20 min.

EtOH 96% v/v : xilol, proporción 1 : 1 v/v, durante 20 min.

Xilol durante 30 min.

Luego de la deshidratación, las piezas se embebieron en xilol : parafina (1:1) durante 15 min a 80 °C en estufa. La inclusión se realizó con Paraplast (Leica Biosystems), en estufa a 80 °C durante 4 hs, con un recambio de la parafina a las 2 hs.

Posteriormente, se tallaron los tacos y se realizaron cortes de 7 µm de espesor en micrótopo rotacional (Leica RM2125 RTS). Se procedió con la hidratación de los cortes mediante una sucesión decreciente de alcoholes, para luego realizar la coloración de hematoxilina-eosina.

Los cortes de los ovarios fueron observados al microscopio óptico bajo aumento 100X, y se estimó la proporción relativa de cada tipo de oocito ($P(x)$), contando en 3 campos independientes de un mismo corte la cantidad de oocitos pre-vitelogénicos, intermedios, vitelogénicos, y en reabsorción, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$P(x) = \frac{(N1 + N2 + N3)}{N^{\circ} \text{ oocitos}} * 100$$

Donde: N1, N2 y N3= n° oocitos en determinado estadio registrados en el campo 1, 2 y 3, respectivamente; N° oocitos= número de oocitos totales, correspondiente a todos los campos y estadios observados.

El área oocitaria de los oocitos pre-vitelogénicos y vitelogénicos, se estimó midiendo con un ocular micrométrico los diámetros mayor (DM) y menor (Dm) en 30 oocitos de cada tipo, cuyo núcleo fuera visible. Se calibró la regla micrométrica del ocular, mediante una placa de calibración Leitz-Wetzlar. Se calculó el área (μm^2) de cada oocito como $(\pi/4) \times DM \times Dm$.

1.8 Análisis estadístico

La comparación estadística entre grupos experimentales para las proporciones de sobrevivida, mudas, y hembras ovígeras se realizó mediante el test exacto de Fisher (Sokal and Rohlf, 1981). Las variables continuas fueron analizadas por

ANOVA de un factor, utilizando contrastes LSD para comparaciones *a posteriori* (Sokal and Rohlf, 1981). En el caso de que no se cumpliera el supuesto de homogeneidad de varianzas, la heterogeneidad fue contemplada en el conjunto de datos a través del modelado de varianzas, utilizando el programa R Studio 3.3.1 (Zuur *et al.*, 2009).

RESULTADOS

- **Evaluación *in vivo* de la alteración del crecimiento ovárico frente a concentraciones subletales de Roundup**

Validación de las concentraciones nominales

En la Tabla 1.2 se muestra el resultado de las determinaciones de la concentración de Roundup en cada tratamiento del experimento *in vivo*:

Concentración nominal de glifosato (mg/L)	Concentración medida (mg/L)		
	0 hs	72 hs	Media total
0 (Control)	0,0000	0,0000	0,0000
	0,0000	0,0000	
RUP 0,01	0,0136	0,0090	0,0105
	0,0111	0,0083	
RUP 0,2	0,1886	0,1564	0,1762
	0,2075	0,1523	

Tabla 1.2. Validación de las concentraciones nominales de glifosato utilizadas en el ensayo *in vivo*, mediante HPLC-Masa.

El decaimiento promedio de la concentración del herbicida formulado en el agua de ensayo a las 72 hs, fue del 28%.

Ensayo *in vivo* de 90 días de duración

Muda, sobrevivida, ganancia en peso e índices

Las frecuencias de mudas, muertes y ovígeras registradas durante el ensayo de 90 días de duración se encuentran indicadas en la Tabla 1.3. En ningún caso se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) con respecto al control.

Concentración de glifosato (mg/l)	N inicial	% mortalidad	% mudas	%ovígeras	N final
0 (Control)	15	0,00	0	20	12
0,01	15	6,67	0	13,33	12
0,2	15	13,33	6,67	20	9

Tabla 1.3. Número de hembras (N) al iniciar y finalizar el ensayo *in vivo*, y porcentajes de muertes, mudas y ovígeras para cada tratamiento, al término del ensayo *in vivo* de 90 días de duración.

Al finalizar el ensayo la ganancia en peso (GP) y el índice gonadosomático (IGS) no mostraron diferencias entre los grupos experimentales (Tabla 1.4 y Figura 1.1, respectivamente).

Índices (media ± ee)	Control	RUP 0,01	RUP 0,2
GP	1,73 ± 0,93	2,24 ± 0,57	2,06 ± 1,17
IGS	2,32 ± 0,43	2,36 ± 0,44	1,96 ± 0,36

Tabla 1.4. Ganancia en peso (GP) e índice gonadosomático (IGS) de los grupos experimentales del ensayo *in vivo* de 3 meses de duración. Los valores se expresan como la media ± error estándar (ee).

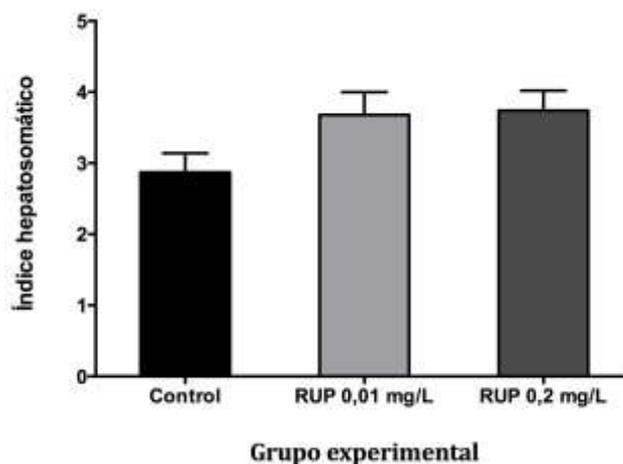


Figura 1.1. Índice hepatosomático de los grupos experimentales al término del ensayo *in vivo* de 90 días de duración. RUP: Roundup

Determinación de los niveles de reservas energéticas

En cuanto a los niveles de reservas energéticas medidos a los 90 días de ensayo, la glucemia fue significativamente mayor ($p < 0,05$) en ambos tratamientos (Roundup 0,01 y 0,2 mg/L) respecto del control. Correspondientemente, el nivel de glucógeno en músculo mostró una tendencia de disminución en comparación con el control que, sin embargo, no llegó a ser significativa ($p > 0,05$). Estos resultados se observan en la Figura 1.2.

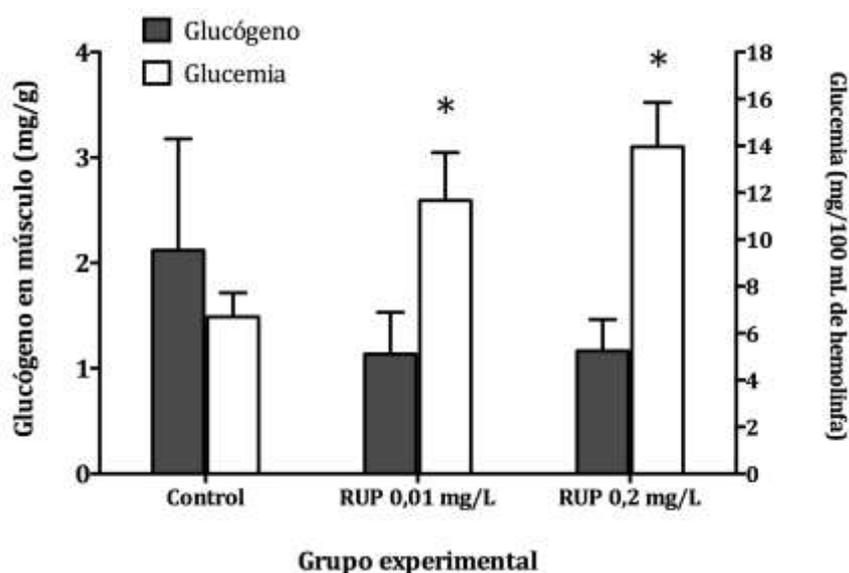


Figura 1.2. Niveles de glucógeno en el músculo ($\mu\text{g/g}$ tejido) y de glucosa en hemolinfa ($\text{mg}/100$ mL hemolinfa) en los animales control, y expuestos a Roundup (RUP) a 0,01 y 0,2 mg/, al término del ensayo *in vivo* (90 días). Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto del control.

En cuanto al nivel de proteínas en el músculo (Figura 1.3), no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre el control y los tratamientos, mientras que en el nivel de lípidos (Figura 1.4) se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) en el tratamiento con Roundup 0,2 mg/L.

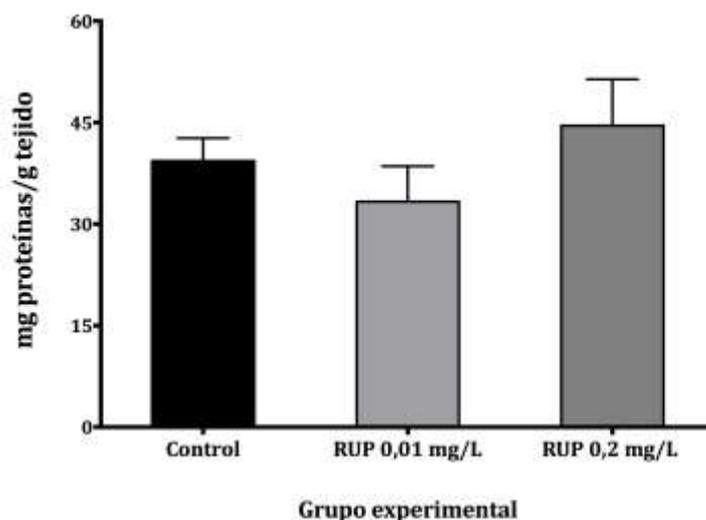


Figura 1.3. Nivel de proteínas (mg/mg tejido) en el músculo de los animales control, y expuestos a Roundup (RUP) 0,01 y 0,2 mg/L, al término del ensayo *in vivo* (90 días).

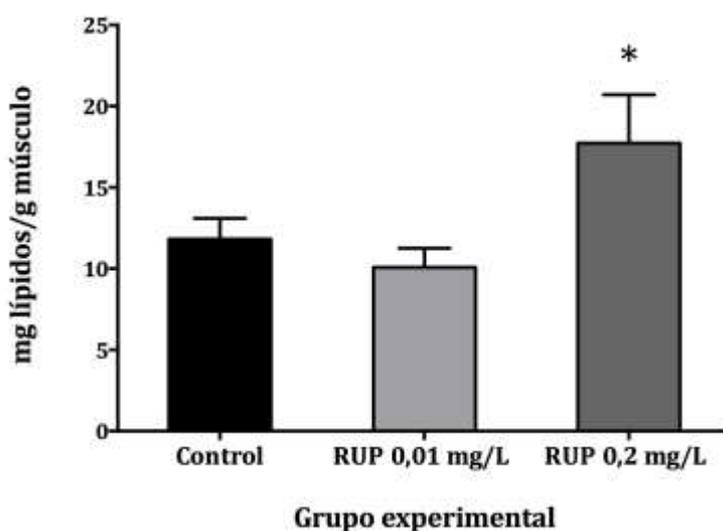


Figura 1.4. Nivel de lípidos totales (mg/g tejido) en el músculo de los animales control, y expuestos a Roundup, al término del ensayo *in vivo* (90 días).

Determinación de los niveles de vitelogenina

El nivel de vitelogenina en el ovario tratado durante 90 días con Roundup 0,2 mg/L fue significativamente menor ($p < 0,05$) con respecto al control, mientras que los niveles de vitelogenina en hemolinfa no mostraron diferencias significativas. En cambio, en el hepatopáncreas, el contenido de vitelogenina

disminuyó significativamente ($p < 0,05$) con respecto al control, a ambas concentraciones de Roundup (Figura 1.5).

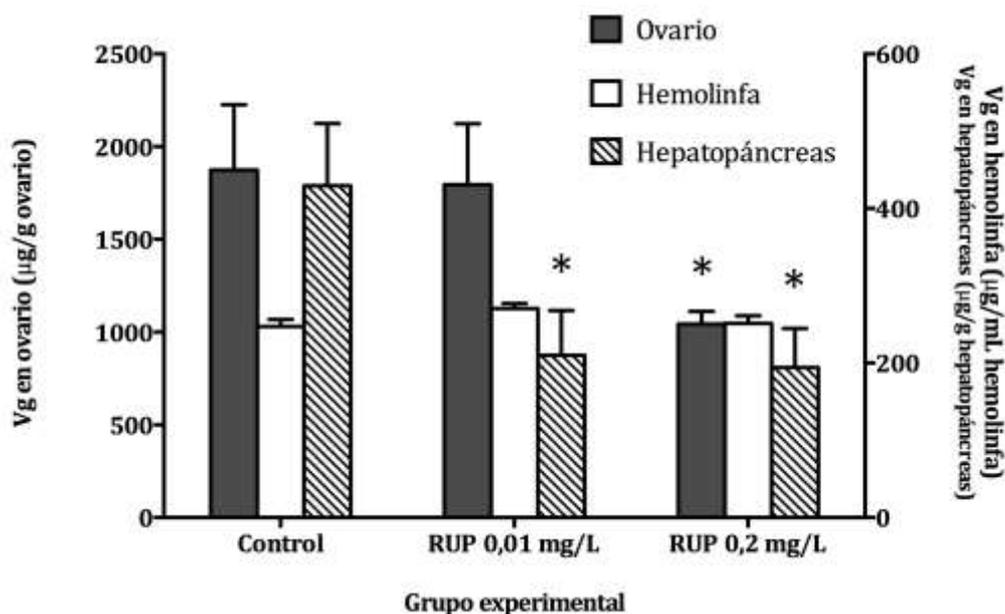


Figura 1.5. Niveles de vitelogenina en el ovario, hemolinfa y hepatopáncreas de las hembras control y expuestas a Roundup 0,01 mg/L y 0,2 mg/L, al término del ensayo *in vivo* (90 días). Los asteriscos indica diferencias significativas con respecto al control ($p < 0,05$).

La evaluación de la especificidad del anticuerpo primario anti-vitelogenina de *N. granulata* se encuentra al final de los resultados del presente capítulo, en un apartado suplementario.

Análisis histológico

La proporción relativa de cada tipo de oocitos en el ovario a la mayor concentración del herbicida (0,2 mg/L) se muestra en la Figura 1.6. Se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) de reabsorciones a esta concentración de Roundup, en comparación con el control, mientras que las proporciones

relativas de oocitos previtelogénicos, vitelogénicos e intermedios no mostraron diferencias significativas respecto al control. En cuanto al área de los oocitos previtelogénicos y vitelogénicos (Figura 1.7), no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) entre los grupos control y tratado para ningún tipo de oocito.

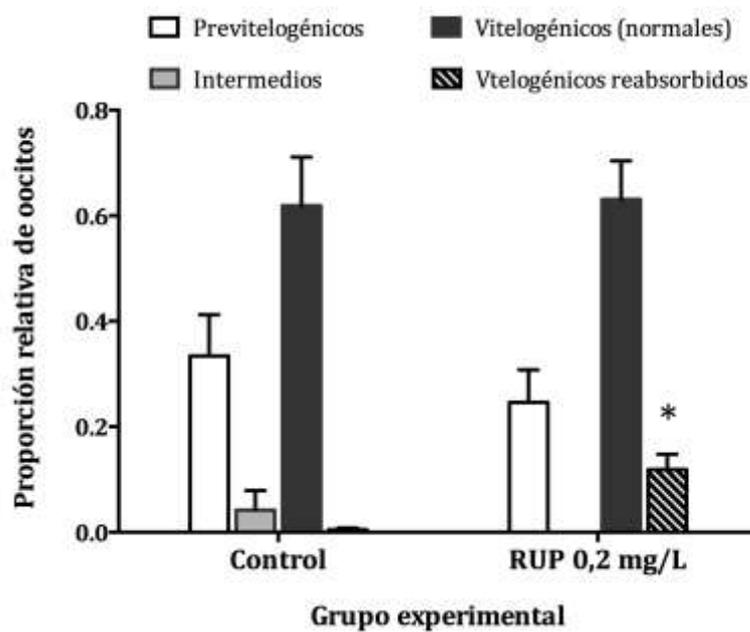


Figura 1.6. Proporción relativa de oocitos previtelogénicos, intermedios, vitelogénicos normales y vitelogénicos en reabsorción, para los animales Control y expuestos a Roundup 0,2 mg/L, al término del ensayo *in vivo* (90 días). El asterisco indica diferencias significativas respecto del control ($p < 0,05$).

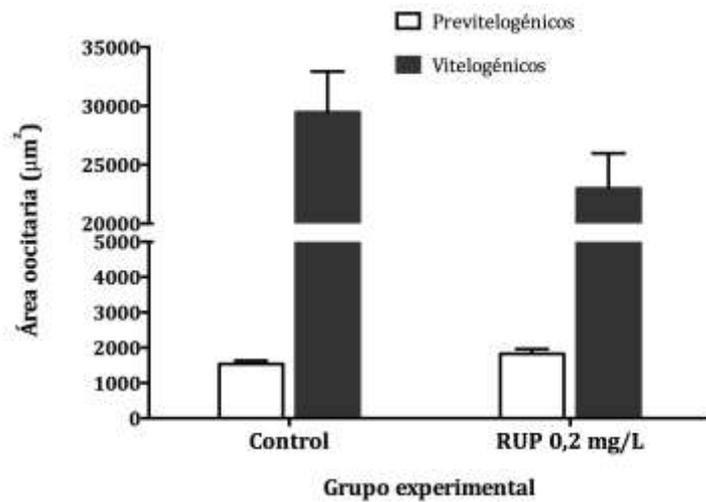


Figura 1.7. Área de los oocitos previtelogénicos y vitelogénicos para los tratamientos Control y Roundup (RUP) 0,2 mg/L, al término del ensayo *in vivo* (90 días).

En la Figura 1.8 se muestran cortes de ovario correspondientes al control y al grupo Roundup 0,2 mg/L; en el panel B (tratados) se puede observar la presencia (indicada con flechas) de oocitos vitelogénicos en reabsorción.

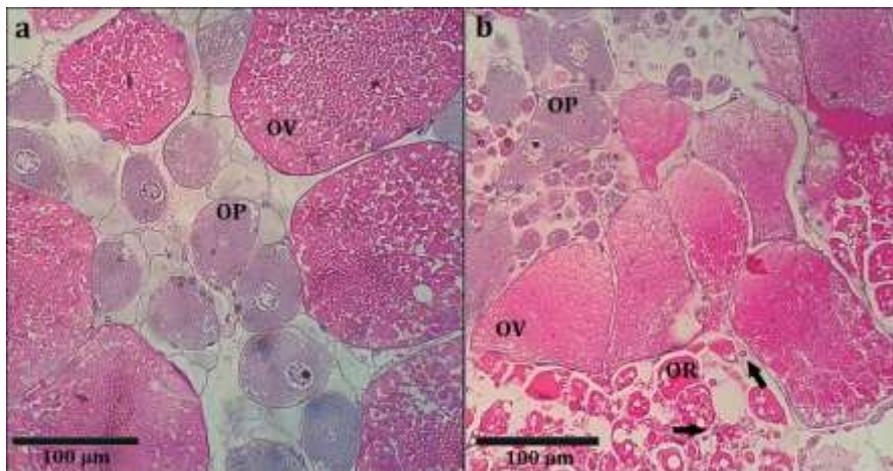


Figura 1.8. Cortes histológicos de ovario Control (a) y tratado con Roundup 0,2 mg/L (b), al cabo de de los 90 días de exposición que comprendió el ensayo *in vivo*. OP: oocito previtelogénico, OV: oocito previtelogénico, OR: oocito en reabsorción. Las flechas señalan células foliculares invadiendo el oocito en reabsorción.

Ensayo in vivo de 30 días de duración

Al mes de transcurrido este ensayo adicional, el nivel de vitelogenina (Figura 1.9) y la proporción relativa de oocitos vitelogénicos (Figura 1.10) aumentaron

significativamente en el grupo tratado con Roundup 0,2 mg/L, respecto del control.

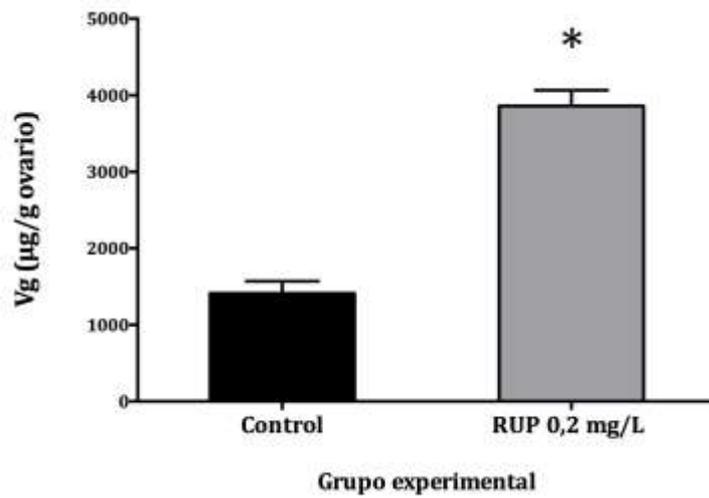


Figura 1.9. Nivel de vitelogenina ($\mu\text{g/g}$ ovario) para los grupos experimentales Control y Roundup 0,2 mg/L, expuestos durante 1 mes. El asterisco indica diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control.

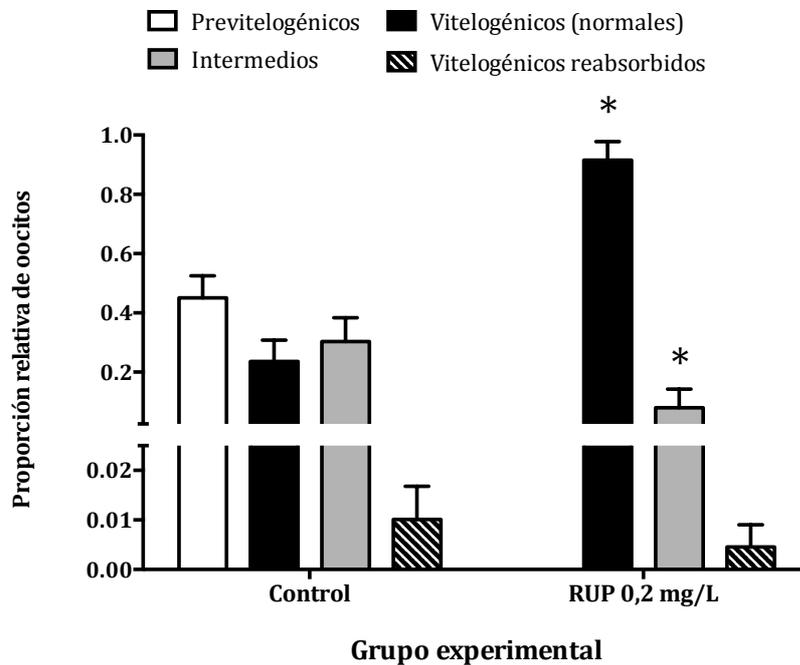


Figura 1.10. Proporción relativa de oocitos pre-vitelogénicos, intermedios, vitelogénicos normales y vitelogénicos en reabsorción, para los animales Control y expuestos durante 1 mes a Roundup (RUP) 0,2 mg/L. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a su control.

Apartado suplementario: Evaluación de la especificidad del anticuerpo primario anti-vitelogenina de N. granulata

La vitelogenina de *N. granulata* fue aislada exitosamente. Se evaluó la especificidad del anticuerpo policlonal generado, para los distintos tejidos en estudio, mediante un gel de policrilamida en condiciones desnaturalizantes. Si bien no se utilizó un gel de alta definición, se pueden reconocer bandas en el ovario, hemolinfa y hepatopáncreas, que coinciden con ciertas bandas observadas en el perfil de la Vg purificada (Figura suplementaria).

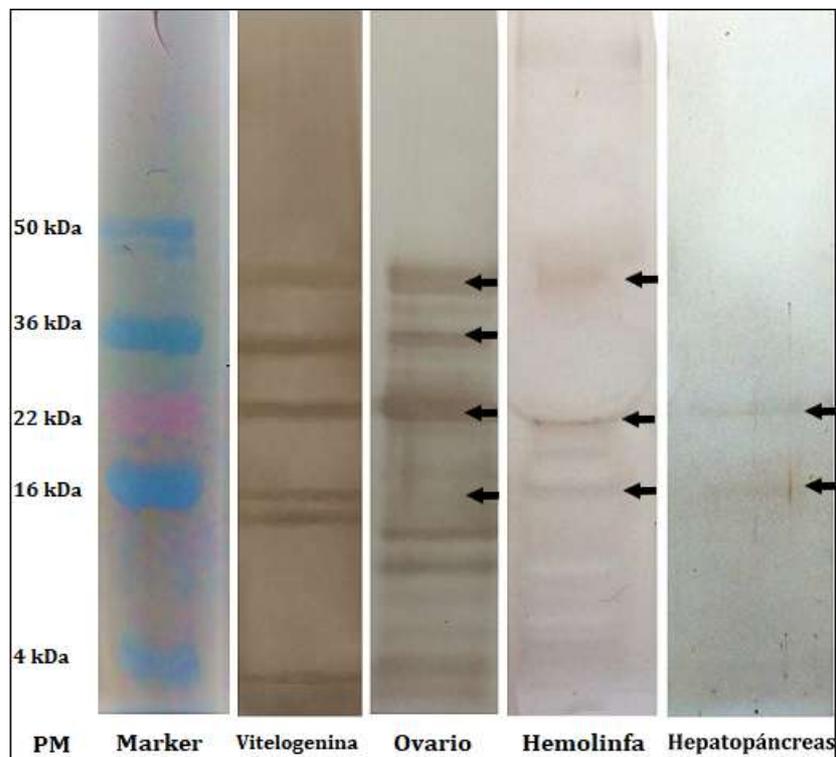


Figura suplementaria. Western Blot de la vitelogenina pura (columna 2), de homogenatos de ovario y hepatopáncreas (columnas 3 y 5, respectivamente) y de hemolinfa (columna 4). El *marker* fue SeeBlue Plus2. En la primer columna se indican los pesos moleculares (PM) en kilodaltons (kDa). Las flechas señalan coincidencia de bandas con la vitelogenina purificada.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo de tesis, se utilizaron dos concentraciones del herbicida formulado Roundup (0,01mg/L y 0,2 mg/L), que se encuentran comprendidas dentro del intervalo de concentraciones reportado para numerosos cuerpos de agua de Argentina (Aparicio et al., 2013). Peruzzo *et al.* (2008) hallaron en aguas superficiales del norte de la Región Pampeana concentraciones de 0,1 a 0,7 mg/L; niveles que son similares e incluso más altos que los reportados en cuerpos de agua en otros países (Screpanti *et al.*, 2005; Struger *et al.*, 2008; Hanke *et al.*, 2010). En nuestro país, la aplicación de glifosato en sus diversas formulaciones fue aumentando consistentemente durante los últimos años (Arancibia, 2013). En comparación con las cantidades aplicadas en 1996, en 2009 el incremento fue de 1400% (Mónaco, 2016), alcanzando un volumen de aproximadamente 200 millones de litros, sobre más de 20 millones de hectáreas, siendo la mayor parte áreas de cultivo de soja transgénica (Aparicio *et al.*, 2013). En los años 2007-2008 se alcanzaron niveles récord de producción, con 47,5 millones de toneladas de soja genéticamente modificada, (Sasal *et al.* 2010). A su vez, en la última década los estudios sobre los efectos crónicos y acumulativos de glifosato sobre la fauna acuática han cobrado mayor relevancia, ya que este herbicida no ha mostrado una elevada toxicidad aguda en especies modelo no blanco (Langiano *et al.*, 2007).

Uno de los objetivos de la investigación desarrollada en la presente tesis fue el estudio de la toxicidad crónica sobre el control endocrino de la reproducción,

durante el período de crecimiento ovárico, en el cangrejo de estuario *Neohelice granulata*. Las concentraciones de Roundup utilizadas en este estudio fueron subletales, como lo avala la ausencia de diferencias en la mortalidad entre el control y los tratamientos con el herbicida.

En el experimento *in vivo* en el que se expusieron hembras a Roundup durante 90 días, se midieron los niveles de reservas energéticas como indicadores generales de estrés. El aumento de la glucemia a ambas concentraciones de Roundup ensayadas fue indicativo de estrés inespecífico, como se ha reportado en el caso de otras especies de invertebrados acuáticos (Sokolova *et al.*, 2012). En cambio, el descenso en el nivel de glucógeno en el músculo no llegó a ser significativo, al mismo tiempo que el nivel de proteínas no mostró diferencias con el control. Esto indicaría que los animales sufrieron un nivel de estrés moderado, que pudo haber implicado una utilización discreta de las reservas energéticas, a los efectos de mantener el costo energético adicional relacionado a la reparación del daño tisular, reduciendo así levemente la energía disponible para procesos de crecimiento y reproducción (Sokolova *et al.*, 2012).

Las hormonas del estrés median la utilización de diversas fuentes de energía durante el estadio de resistencia al estrés ambiental (Meyer *et al.*, 1992). La hormona hiperglucemiante de crustáceos (CHH) ha sido propuesta como la hormona mediadora del estrés en los crustáceos (Chang *et al.*, 1999; Elwood *et*

al., 2009), con un rol multifuncional, ya que ha sido reportada su participación en múltiples vías de señalización, incluso en el ovario de varias especies de crustáceos (De Kleijn and Van Herp, 1998; Fanjul-Moles 2006). En el presente trabajo, el aumento crónico de la glucemia podría deberse a niveles aumentados y sostenidos de CHH, en respuesta al estrés causado por la exposición al xenobiótico, tal como se encuentra reportado en la bibliografía para otras especies de crustáceos (como por ejemplo *Homarus americanus*, *Callinectes sapidus*, *Macrobrachium rosenbergii*, *Palaemon elegans*, *Nephrops norvegicus*), en trabajos en los cuales han medido los niveles de CHH frente a distintas situaciones de estrés, ya sea ambiental o por contaminantes (Webster *et al.*, 2012).

Como reserva energética a mediano y largo plazo, se midió además el nivel de lípidos en músculo, el cual aumentó en el tratamiento con la mayor concentración de Roundup (0,2 mg/L). Esto podría deberse a que el aumento de los niveles de glucosa circulante en hemolinfa haya propiciado el metabolismo hacia la síntesis y almacenamiento de lípidos en ciertos tejidos. De hecho, se encuentran reportados en la literatura antecedentes de la relación entre CHH y el metabolismo de la glucosa y de los lípidos (Santos *et al.*, 1997; Webster *et al.*, 2012). Santos *et al.* (2012), a partir de experimentos en *N. granulata* y *Carcinus maenas* propone que un aumento en los niveles de CHH provocaría un aumento de la glucosa circulante en hemolinfa; que podría redirigir el metabolismo hacia

la síntesis de lípidos, estimulando su almacenamiento en tejidos de reserva (Kurcharski y Da Silva, 1991).

Considerando el conjunto de estos resultados, no se puede afirmar entonces que se haya producido una reducción significativa de las reservas energéticas en los tejidos somáticos, que pudiera haber reducido la energía disponible para procesos relacionados con la reproducción. El hecho de que la ganancia en peso de los animales tratados no haya sido diferente a la del control se encuentra en línea con estos resultados. Sin embargo, trabajos previos realizados con glifosato en crustáceos, han reportado que, en juveniles de *Cherax quadricarinatus* expuestos durante aproximadamente 60 días a concentraciones mayores a 10 mg/L, la ganancia en peso disminuye significativamente, (Avigliano *et al.*, 2014a; Frontera *et al.*, 2011). Es evidente que los estadios más tempranos del desarrollo son más sensibles al estrés, en especial cuando las concentraciones de glifosato son relativamente elevadas.

Luego de 90 días de exposición, se observó un decremento significativo de vitelogenina en el ovario, en los animales tratados con Roundup 0,2 mg/L, que no se observó a la concentración de 0,01 mg/L. A vez, el contenido de vitelogenina en el hepatopáncreas disminuyó a ambas concentraciones del herbicida. Esta disminución en el ovario, estuvo en correspondencia con dos variables derivadas del análisis histológico: 1) la disminución en el área (y por

lo tanto en el tamaño) de los oocitos vitelogénicos, y 2) el aumento significativo de la proporción relativa de oocitos vitelogénicos en reabsorción, a la mayor concentración de herbicida. Se observó además, como tendencia, una menor proporción relativa de oocitos pre-vitelogénicos e intermedios; y si bien la proporción de oocitos vitelogénicos normales en el grupo tratado fue similar a la del control, contabilizando el total de oocitos vitelogénicos (normales + en reabsorción), se observa una mayor proporción de oocitos vitelogénicos (totales) en el tratamiento con Roundup 0,2 mg/L, respecto del control. Estos resultados son coherentes con los reportados por Avigliano *et al.* (2014b), en hembras remadurantes de *N. granulata* (es decir, hembras cuyo ovario comienza con un nuevo ciclo de maduración luego de una puesta en el período reproductivo). Estos autores observaron que el glifosato puro a 2,5 mg/L fue capaz de producir una mayor proporción de oocitos vitelogénicos normales en el ovario, sin que se haya detectado una mayor incidencia de reabsorciones oocitarias en comparación con el control, ya que el período de exposición fue de tan sólo 30 días (Avigliano *et al.*, 2014b).

Si bien se ha descrito que algunas isoformas de la CHH han estimulado el crecimiento ovárico en determinados estadios de la maduración ovárica (De Kleijn and Van Herp, 1998; Gu *et al.*, 2000), otras isoformas han mostrado un efecto inhibitorio (Sook Chung *et al.*, 2010). De hecho, no se descarta la posibilidad de que una secreción crónica y sostenida de CHH desde los

pedúnculos oculares, en tanto actúe como hormona del estrés, provoque que los oocitos en el ovario entren en reabsorción. Las reabsorciones observadas por efecto del Roundup en el presente trabajo de tesis, en una fracción significativa de oocitos vitelogénicos, pueden considerarse como una atresia de tipo reaccional. Este tipo de atresia, contraria a la autolítica, involucra la participación de células foliculares en el proceso de reabsorción (que invaden el interior del oocito vitelogénico), y ha sido descrita previamente en hembras de *N. granulata* expuestas al herbicida 2,4-D (Rodríguez *et al.*, 1994). Más aún, las reabsorciones de oocitos maduros han sido reportadas en varias especies de crustáceos debido al efecto de distintos tipos de contaminantes, incluidos plaguicidas y metales pesados (Rodríguez *et al.*, 2007). El antecedente más relacionado con el presente trabajo es sin embargo el trabajo de Avigliano *et al.* (2018), en el cual se reporta que el glifosato puro fue capaz de producir, a 1 mg/L y luego de 90 días de exposición, un aumento significativo de reabsorciones de oocitos vitelogénicos en hembras adultas de *N. granulata*. En la presente tesis, se ha encontrado una incidencia significativa de reabsorciones a una concentración menor del formulado Roundup (0,2 mg/L), que la utilizada en el mencionado antecedente, lo que sugiere fuertemente una participación importante de los excipientes o coadyuvantes presentes en este formulado, en la generación de reabsorciones oocitarias.

La exposición subcrónica del gasterópodo *Biomphalaria alexandrina* a un formulado a base de glifosato causó atresias y oocitos deformados, al mismo tiempo que se observó un aumento en los niveles de citocromo P50 y una disminución de los niveles de estradiol en las gónadas. Otros autores han reportado, en vertebrados, la presencia de atresias debido al glifosato y sus formulados. Las reabsorciones de oocitos primarios ha sido reportada en renacuajos de varias especies, expuestos crónicamente al Roundup (Howe *et al.*, 2004), en los cuales aumentó la expresión del mensajero para el receptor de hormona tiroidea. Webster *et al.* (2014) observaron un aumento en la incidencia de reabsorciones en zebrafish (*Danio rerio*), sin observar un aumento en la expresión de genes marcadores de apoptosis; por el contrario, sí observó una alteración en la expresión de genes que codifican para enzimas de la vía esteroidogénica, como por ejemplo un aumento en la expresión de aromatasa ovárica. Sin embargo, Mackenzie *et al.* (2003) describieron en estudios con renacuajos de *Rana pipiens* y *Rana sylvatica* expuestos a compuestos antiestrogénicos (flavonas), un aumento en la expresión de aromatasa, cuando teóricamente tales compuestos deberían haber inhibido la expresión de la enzima. Esto indica que aún no están claramente comprendidos los mecanismos que subyacen a la alteración de vías hormonales debido a contaminantes, o incluso sugiere que no hay una única vía que podría estar afectada. En ratones hembra preñados, Ren *et al.* (2018) observaron también un aumento de las reabsorciones oocitarias y fibrosis intersticial en respuesta al glifosato

administrado de manera subcrónica, produciéndose además un aumento de los niveles de estrógenos circulantes y una disminución de los de progesterona. Hamdaoui *et al.* (2017) expusieron a ratas Wistar durante 60 días a un formulado de glifosato, luego de los cuales observaron un incremento de atresias, oocitos presentando vacuolaciones, y disociación de los oocitos de las células de la granulosa, en conjunto con una disminución en los niveles de estrógenos.

Podemos entonces concluir que la reabsorción oocitaria es un proceso que puede ser disparado por factores ambientales (incluyendo la eventual presencia de contaminantes), que a su vez podría dar cuenta de cambios en los niveles hormonales del animal, si bien los mecanismos precisos no están del todo comprendidos, particularmente en invertebrados. En los estudios que forman parte de este trabajo, el glifosato podría estar aumentando a la concentración ensayada, la secreción de alguna hormona tal como la CHH; si bien no puede descartarse el estrés oxidativo o algún otro mecanismo independiente de la acción hormonal. Como consecuencia, el ovario contaría con una menor cantidad disponible de oocitos viables.

Los resultados obtenidos en el ensayo *in vivo* de un mes de duración, a la concentración de 0,2 mg/L, aportan una valiosa información sobre la importancia del tiempo de exposición al Roundup. Al contrario de lo observado

en el ensayo de 90 días, en este ensayo de un mes el nivel de vitelogenina aumentó significativamente con respecto al control, en correspondencia con el aumento en la proporción relativa de los oocitos vitelogénicos (y una concomitante disminución en la proporción de oocitos pre-vitelogénicos e intermedios). La inducción de la maduración ovárica al cabo de un mes de exposición podría estar vinculada a la estimulación producida por hormona/s que induzcan el desarrollo ovárico (e.g. esteroides), o por el contrario, una inhibición de aquella/s que mantengan arrestado su crecimiento (como, por ejemplo, la GIH de origen peduncular). Un efecto de inducción del crecimiento gonadal también se observó cuando se expusieron hembras adultas de *N. granulata* al insecticida organofosforado paratión, ya que aumentó el área de los oocitos, aunque resultó alterada su forma (Rodríguez *et al.*, 1994).

Evalutando en conjunto los resultados de ambos ensayos *in vivo*, el glifosato formulado estaría induciendo, a la concentración de 0,2 mg/L, la maduración ovárica a un tiempo de exposición subcrónica (en particular, en este trabajo, al mes de comenzada la exposición); tal inducción se visualizó en términos del aumento de los niveles de Vg en el ovario, y de las proporciones oocitarias en ese órgano (aumento de oocitos vitelogénicos y disminución de pre-vitelogénicos e intermedios). Posteriormente, a tiempos de exposición crónicos (en particular a los 3 meses), el aumento de las reabsorciones oocitarias jugaría un rol relevante en la disminución de los niveles de Vg en el ovario de *N.*

granulata, aunque no pueden descartarse otros efectos del Roundup relacionados con la producción de vitelogenina, como lo sugiere el menor nivel de esta proteína observado en el hepatopáncreas, que es el principal sitio extraovárico de producción y exportación de vitelogenina hacia la hemolinfa, que posteriormente es captada por los oocitos vitelogénicos (Charmantier *et al.*, 1997; Nagaraju *et al.*, 2010).

Tanto la estimulación inicial del crecimiento oocitario, observado a los 30 días de exposición, como la posterior inhibición del mismo, observada a los 90 días, podrían estar relacionados con desbalances a nivel de la secreción o transducción hormonal, sin que *a priori* puedan descartarse otros procesos no relacionados con una desorganización endocrina. Los ensayos *in vitro* que reportan en el Capítulo II de la presente tesis estuvieron destinados precisamente a aportar evidencias que sirvan para apoyar o descartar los posibles mecanismos de acción del glifosato sobre el ovario.

Finalmente, un aspecto a destacar es que los efectos *in vivo* reportados en este trabajo se produjeron a concentraciones que se encuentran dentro del intervalo de las concentraciones ambientales, con el consiguiente valor ecotoxicológico que esto supone.

CAPÍTULO II:

Evaluación *in vitro* de la interferencia del herbicida glifosato en la vía de señalización de neurohormonas y hormonas esteroideas y prostanoideas, en hembras adultas de *N. granulata*

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar, mediante ensayos *in vitro*, si la exposición a corto término del ovario de hembras de *Neohelice granulata* a concentraciones subletales de glifosato, se traduce en una alteración del crecimiento ovárico, en términos del contenido de vitelogenina y de la proporción de tipos oocitarios.
- Evaluar, mediante su exposición *in vitro*, la relación entre el crecimiento del ovario y el posible efecto desorganizador del glifosato sobre el control endocrino de la vitelogénesis, ejercido tanto por neurohormonas de origen peduncular y torácico, como por hormonas esteroideas y prostanoides.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Animales

La recolección de las hembras en el período pre-reproductivo, las condiciones de mantenimiento y aclimatación se llevaron a cabo tal como se describió previamente en la sección 1.1.

2.2 Herbicidas

Las soluciones de Roundup Ultramax y de glifosato puro utilizadas para los ensayos detallados en el presente capítulo se prepararon tal como de describió en la sección 1.2. Para preparar las soluciones *stock* de glifosato puro se utilizó glifosato ácido en polvo (pureza 99,8%; Sigma).

2.3 Ensayos *in vitro*

2.3.1 Evaluación del contenido de vitelogenina luego de la exposición del ovario a glifosato puro y formulado

2.3.1.1 Exposición a Roundup

Se realizaron ensayos *in vitro* que permitieron evaluar el crecimiento del ovario aislado en presencia del herbicida, durante el período pre-reproductivo. A tal efecto, 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). Se realizaron dos experimentos

independientes, en uno de ellos los tratamientos fueron Control (vehículo) y Roundup 0,01 mg/L, y en el otro, Control (vehículo) y Roundup 0,2 mg/L.

Las porciones de ovario se colocaron en placas de 12 pocillos (Corning®) conteniendo cada uno 2 mL de medio de cultivo M199 (Sigma) liofilizado y enriquecido con L-glutamina y sales de Earle, según Sarojini *et al.* (1995): M199 9,9 g/L; NaHCO₃ 2,2 g/L; penicilina-G 60 mg/L; estreptomicina 60 mg/L; EDTA 1mM; SFB 10 mL/L; PMSF 0,1 mM; pH= 7,4. Este medio de cultivo fue 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: NaCl 486 mM; CaCl₂ 25 mM; KCl 18 mM; MgCl₂.6H₂O 8 mM; MgSO₄ 9mM; H₃BO₃ 9 mM. Se agregó a cada pocillo una alícuota de 20 µL 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 CO₂ 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 para la medición de vitelogenina (Vg) por ELISA (detallado en la sección 1.6.4).

2.3.1.2 Exposición a glifosato puro

Siguiendo la misma metodología descrita para el ítem anterior, se sacrificaron 12 hembras, a las cuáles se les disecó el ovario, que se dividió en dos porciones de peso similar, una de ellas fue asignada al Control (vehículo), y el otro al

tratamiento con glifosato puro 0,2 mg/L (GF 0,2 mg/L), a fin de evaluar el efecto del principio activo y poder compararlo con el del formulado. Se utilizaron placas de 12 pocillos, cada uno de los cuales conteniendo 2 mL de medio de cultivo M199 en salina de Cooke, y se incubaron los ovarios durante 24 hs en estufa, a 28 °C. Al finalizar la incubación, se siguieron los protocolos correspondientes para determinar la concentración de Vg por la técnica inmunoenzimática ELISA (sección 1.6.4).

2.3.2 Evaluación de la síntesis proteica luego de la exposición del ovario a Roundup

Por otro lado, se llevó a cabo otro ensayo *in vitro* con la misma metodología y bajo las mismas condiciones ya mencionadas, a fin de evaluar si el Roundup en el ovario afectaba la síntesis de proteínas. Cada porción de un mismo ovario se asignó a uno de los siguientes tratamientos (n= 12): Control (vehículo), Roundup 0,01 mg/L, Roundup 0,2 mg/L. Al medio de cultivo de cada pocillo se le agregó un volumen de 30 µL de solución de leucina tritiada (³H-Leu 1 mCi/mL, diluída 1/10; NEN LifeScience). Finalizada la incubación, se procedió con el protocolo para la medición de la incorporación de leucina marcada a las proteínas sintetizadas *de novo* (sección 2.3.2.1).

2.3.2.1 Protocolo de medición de la incorporación de leucina marcada a las proteínas sintetizadas *de novo*

Cada pieza de ovario que fue incubada durante 24 hs, se homogenizó en TCA 10% en frío, a fin de precipitar las proteínas, centrifugando posteriormente a 5000 g durante 10 min en una centrífuga Eppendorf 5415D, a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 2 mL de TCA 10% en frío. Se repitió la centrifugación anterior, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en un nuevo volumen de TCA. Se filtró cada muestra mediante una bomba de vacío, utilizando una membrana de nitrocelulosa (Watmann®). Cada membrana conteniendo las proteínas filtradas se colocó en un vial, y luego de su secado a temperatura ambiente se le agregaron a cada una 2 mL de solución de flúor centelleadora (Optiphase Hi Safe 2, PerkinElmer). La radioactividad se midió en contador de centelleo líquido (Beckman), y los resultados se expresaron en CPM/mg de ovario.

2.3.3 Evaluación histológica luego de la exposición del ovario a Roundup

Para verificar si en el ovario aislado se modificaron variables histológicas relacionadas con el desarrollo oocitario, se realizó un ensayo *in vitro* bajo las mismas condiciones arriba descriptas, es decir, dividiendo al ovario de cada hembra (n= 12) en dos porciones y asignando al azar una de ellas a la concentración más alta de Roundup (0,2 mg/L), y la otra al vehículo (Control).

Al finalizar la incubación, se procesaron los ovarios para estimar la proporción relativa y el área de los distintos tipos oocitarios (sección 1.7).

2.3.4 Evaluación de la interferencia del Roundup en la vía de señalización de neurohormonas pedunculares y del ganglio torácico

Con el objetivo de evaluar si el efecto del Roundup sobre el crecimiento ovárico se relaciona con una desorganización del control endocrino de la vitelogénesis mediado por las hormonas secretadas por el pedúnculo ocular y/o ganglio torácico, se llevaron a cabo dos ensayos *in vitro* independientes. La metodología y condiciones de estos ensayos fueron las mismas que se detallaran en la sección 2.3.1.

Para tal fin, se prepararon extractos, tanto de pedúnculo ocular como de ganglio torácico. Para esto, 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 que los recubrían), y los ganglios torácicos, fueron homogenizados separadamente en frío, en un volumen de solución salina de Cooke para crustáceos (Cooke *et al.*, 1979), y luego centrifugados a 10000g 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.

El ovario de cada hembra (n= 12) se pesó en balanza analítica ($\pm 0,0001$ g), y se dividió en cuatro porciones de igual peso. Cada porción fue asignada a uno de los siguientes tratamientos (diseño de bloques al azar): Control (vehículo: solución salina de Cooke); Roundup 0,2 mg/L; Extracto hormonal; Roundup 0,2 mg/L + Extracto hormonal. El extracto hormonal fue de pedúnculo ocular (PO), o bien de ganglio torácico (GT) (Figura 2.1).

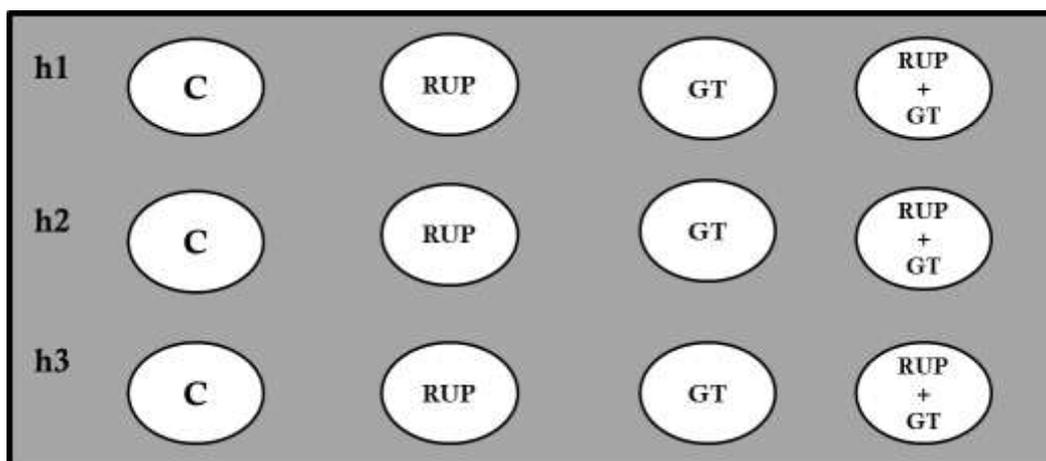


Figura 2.1. Asignación de tratamientos para el ensayo *in vitro* con extracto de ganglio torácico (ejemplo para una placa de 12 pocillos). Cada hembra (h1, h2, h3,...,h12) proporcionó una porción de ovario a cada tratamiento (diseño de bloques al azar). C: control; RUP: Roundup 0,2 mg/L; GT= extracto de ganglio torácico. El ensayo con extracto de pedúnculo ocular también se realizó con este diseño.

Las placas se incubaron en estufa a 27 °C, durante 24 hs. Al término de la incubación, los ovarios se fijaron en solución de Bouin y se procedió a realizar el protocolo histológico de rutina para luego analizar las variables de proporción

relativa y área de cada tipo de oocitos, siguiendo el protocolo detallado en la sección 1.7.

2.3.5 Evaluación de la interferencia del Roundup en la vía de señalización de hormonas esteroideas

2.3.5.1 Determinación de las concentraciones efectivas

En primer lugar, para determinar cuáles hormonas estimulaban el crecimiento ovárico durante el período en estudio, se llevaron a cabo 3 ensayos *in vitro* independientes, en los cuales se trataron los ovarios con concentraciones crecientes (0 μM –vehículo: etanol- 1,5 μM ; 5 μM y 15 μM) de hormona 17α -hidroxiprogesterona (PG, PM= 314,46) o 17β -estradiol (E2, PM= 272,38), o 20-hidroxiecdisona (ECD, PM= 464,63). Las soluciones stock de las hormonas se prepararon a partir del polvo seco (Sigma), utilizando como vehículo etanol absoluto (Biopack, Argentina).

En cada ensayo, el ovario de cada hembra (n= 12) se pesó en balanza analítica (\pm 0,0001 g) y se dividió en cuatro porciones de igual peso. Cada porción se asignó al azar a una de las 4 concentraciones de hormona arriba mencionadas (Figura 2.2, ejemplificado para progesterona). Las condiciones de los ensayos fueron las mismas que se describieron en la sección 2.3.1. Al finalizar la incubación, se

determinaron los niveles de vitelogenina mediante la técnica inmunoenzimática ELISA (sección 1.6.4).

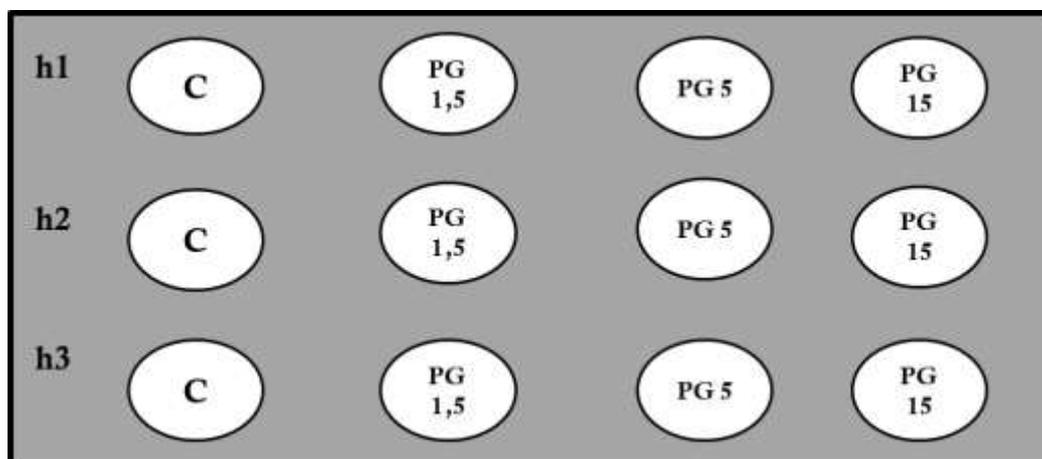


Figura 2.2. Asignación de tratamientos para el ensayo preliminar con la hormona progesterona (PG), a las concentraciones 1,5 μM ; 5 μM y 15 μM , ejemplificado para una placa de 12 pocillos. Cada hembra (h1, h2, h3,...,h12) proporcionó una porción de ovario a cada tratamiento (diseño de bloques al azar). Este mismo esquema se utilizó para las otras hormonas ensayadas.

2.3.5.2 Posible interferencia del Roundup con hormonas esteroideas

A continuación, se evaluó el posible efecto desorganizador del Roundup sobre aquellas hormonas que a una dada concentración fueron capaces de estimular la vitelogénesis en el ovario. Para esto, se realizaron dos ensayos *in vitro* independientes, uno de ellos con PG 1,5 μM , y el otro con ECD 1,5 μM ; dado que tales hormonas, a esa concentración, fueron las que estimularon el crecimiento ovárico. En cada experimento, el ovario de cada hembra se dividió en 4 porciones (mismo diseño de bloques ya mencionado) y se asignó cada porción a uno de los siguientes tratamientos, tal como se esquematiza en la Figura 2.3: Control (vehículo); Roundup 0,2 mg/L; Hormona 1,5 μM ; Roundup

0,2 mg/L + Hormona 1,5 μ M (siendo la hormona PG o ECD, según corresponda).

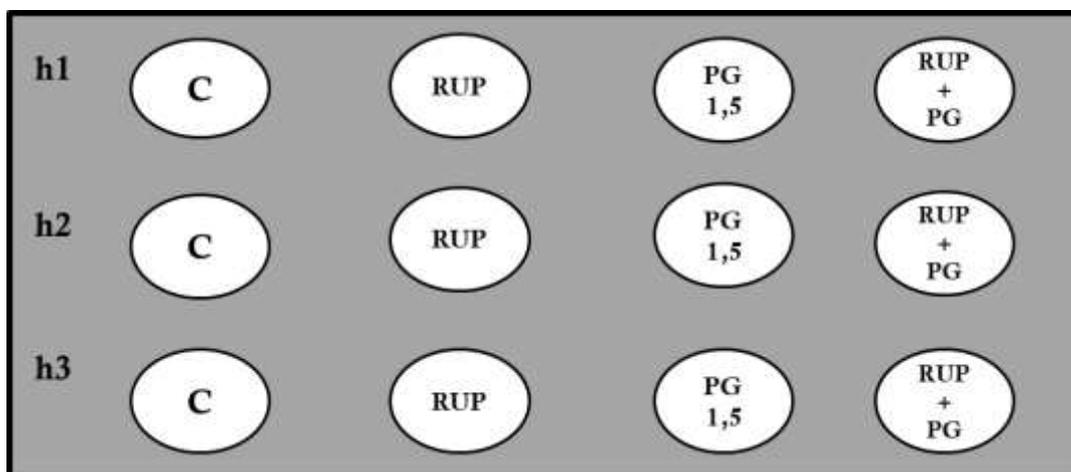


Figura 2.3. Asignación de tratamientos para el ensayo con Roundup (RUP), progesterona (PG - 1,5 μ M-), o la combinación de ambos (ejemplificado para una placa de 12 pocillos). Cada hembra (h1, h2, h3,...h,12) proporcionó una porción de ovario a cada tratamiento (diseño en bloques al azar). C: control. El mismo diseño se utilizó en el caso del ensayo con ecdisona.

Finalizada la incubación a las 24 hs, los órganos fueron retirados de la estufa y almacenados a -80 °C en PBS 1X, para su posterior procesamiento según los protocolos descritos en la sección 1.6.4, a partir de los cuales se determinó la concentración de vitelogenina mediante la técnica inmunoenzimática ELISA.

2.3.5.3 Posible interferencia del Roundup con el receptor de progesterona

Con el objetivo de dilucidar si los efectos sobre los niveles de vitelogenina en el ovario causados por el herbicida formulado están mediados por los receptores de esteroides, se realizaron dos ensayos *in vitro*, cuyo diseño y metodología fueron los mismos que para los otros ensayos *in vitro* detallados en este capítulo.

En el primer ensayo, se utilizó Mifepristona (PM: 429,6; Sigma) como antagonista de los receptores de progesterona, vehiculizada en etanol absoluto. Los tratamientos fueron: Control (vehículo), Roundup 0,2 mg/L, Mifepristona 10 μ M, y Roundup 0,2 mg/L en presencia de Mifepristona 10 μ M. Al finalizar la incubación de 24 hs, en uno de ellos los órganos se procesaron para posteriormente medir el nivel de vitelogenina mediante ELISA. En el segundo ensayo, se siguió el mismo diseño experimental y finalmente los ovarios se procesaron histológicamente a fin de realizar el recuento de los tipos de oocitos presentes.

2.3.6 Evaluación de la interferencia del Roundup en el control endocrino del crecimiento ovárico ejercido por prostanglandinas

Por otro lado, con el fin de evaluar si el efecto del Roundup sobre los ovarios aislados está relacionado con la vía enzimática de las prostanglandinas, se realizó un ensayo *in vitro* en idénticas condiciones al anterior, utilizando ibuprofeno (PM: 206,29; Sigma) como inhibidor de la vía enzimática de síntesis y liberación de prostanglandinas, dado que este fármaco inhibe la enzima ciclooxigenasa. La concentración utilizada fue determinada a partir de estudios previos desarrollados por el grupo de investigación bajo el que se realizó la presente tesis. Los tratamientos fueron: Control (vehículo), Roundup 0,2 mg/L, Ibuprofeno 10 mg/L (vehiculizado en agua destilada), y Roundup 0,2 mg/L en

presencia de Ibuprofeno 10 mg/L. Al término del ensayo se siguió el procedimiento ya descrito para determinar el nivel de vitelogenina.

2.4 Análisis estadístico

La comparación de diferencias entre grupos fue realizado según se detalla en la sección 1.8. 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).

RESULTADOS

- **Evaluación *in vitro* del contenido de vitelogenina a concentraciones subletales de Roundup y glifosato puro**

Con respecto a los ensayos *in vitro* con Roundup, se observó que el nivel de vitelogenina (Figura 2.1) en ambos tratamientos (Roundup 0,01 y 0,2 mg/l) fue significativamente menor ($p < 0,05$) con respecto al control, mientras que al exponer los ovarios al principio activo puro, el nivel de vitelogenina fue significativamente menor que el control ($p < 0,05$), pero sólo a la mayor concentración (Figura 2.2).

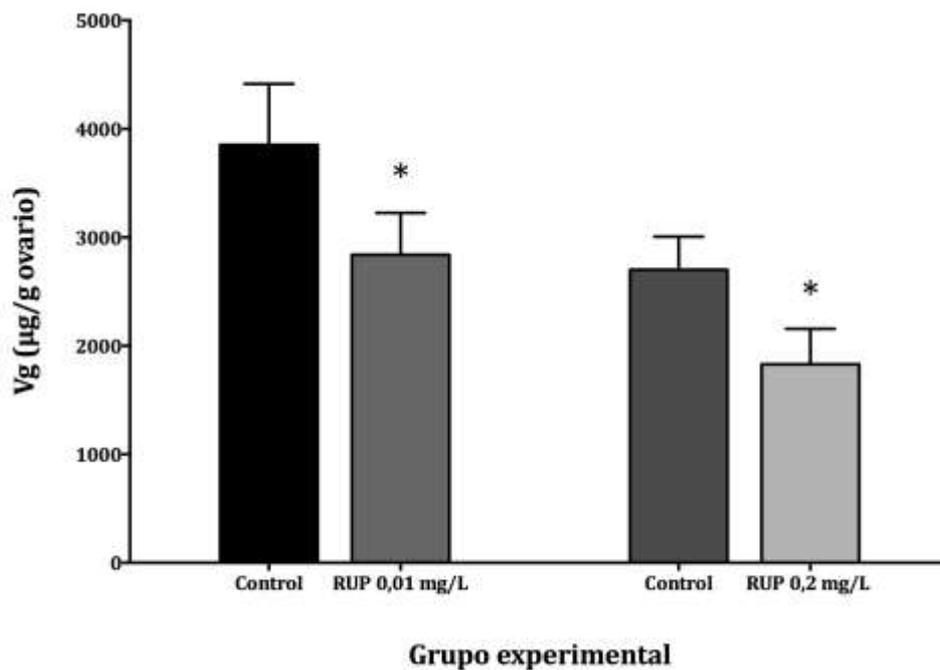


Figura 2.1. Nivel de vitelogenina ($\mu\text{g/g}$ de ovario) en ovarios control y expuestos *in vitro* a Roundup (RUP) 0,01 y 0,2 mg/l . Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de cada tratamiento con respecto a su control.

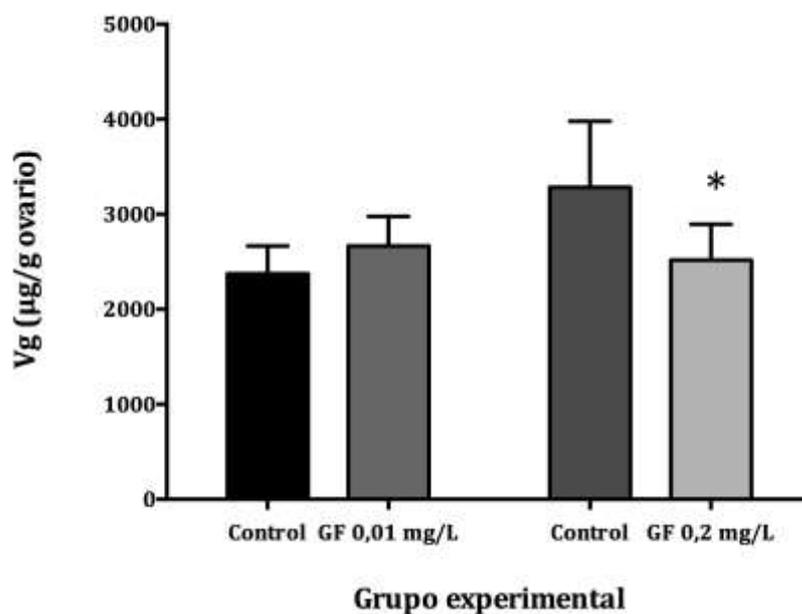


Figura 2.2. Nivel de vitelogenina en los ovarios control y tratados con glifosato puro (GF) 0,01 mg/L y 0,2 mg/L en el ensayo *in vitro*. El asterisco indica diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a su control.

- **Evaluación de la síntesis proteica por exposición a Roundup**

La incorporación de leucina marcada a las proteínas sintetizadas *de novo* fue menor ($p < 0,05$) a la mayor concentración de Roundup (Figura 2.3).

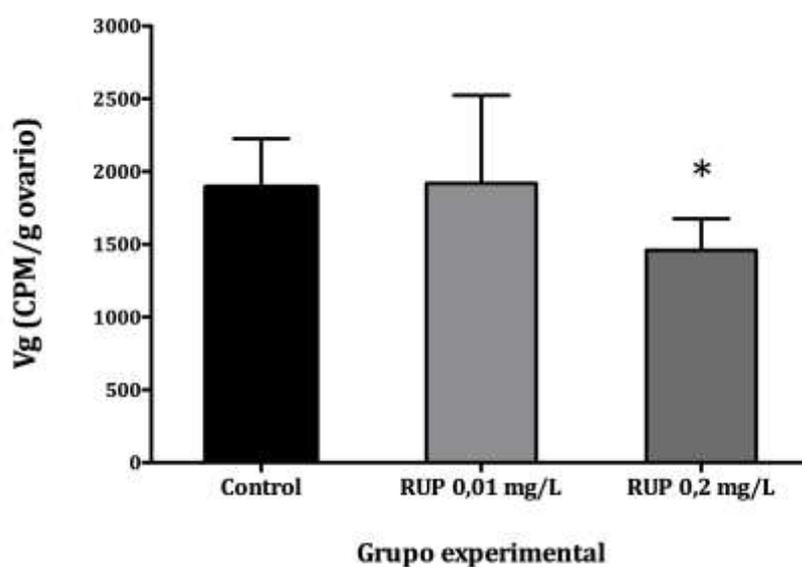


Figura 2.3. Incorporación de leucina marcada a proteínas (CPM/g ovario) en ovarios control, y tratados con Roundup (RUP) 0,01 mg/l y Roundup 0,2 mg/l *in vitro*. El asterisco indica diferencias significativas respecto al control.

- **Evaluación histológica de los ovarios expuestos a Roundup**

En el ensayo *in vitro* en el cual se expusieron los ovarios al herbicida formulado para su posterior análisis histológico, no se obtuvieron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la proporción relativa de cada tipo de oocito con respecto al control (Figura 2.4), si bien se observó una marcada tendencia de aumento de las reabsorciones en el tratamiento con Roundup 0,2 mg/l ($p = 0,09$). En cuanto al área (Figura 2.5), se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) en los oocitos pre-vitelogénicos y vitelogénicos de los ovarios tratados, respecto de los controles.

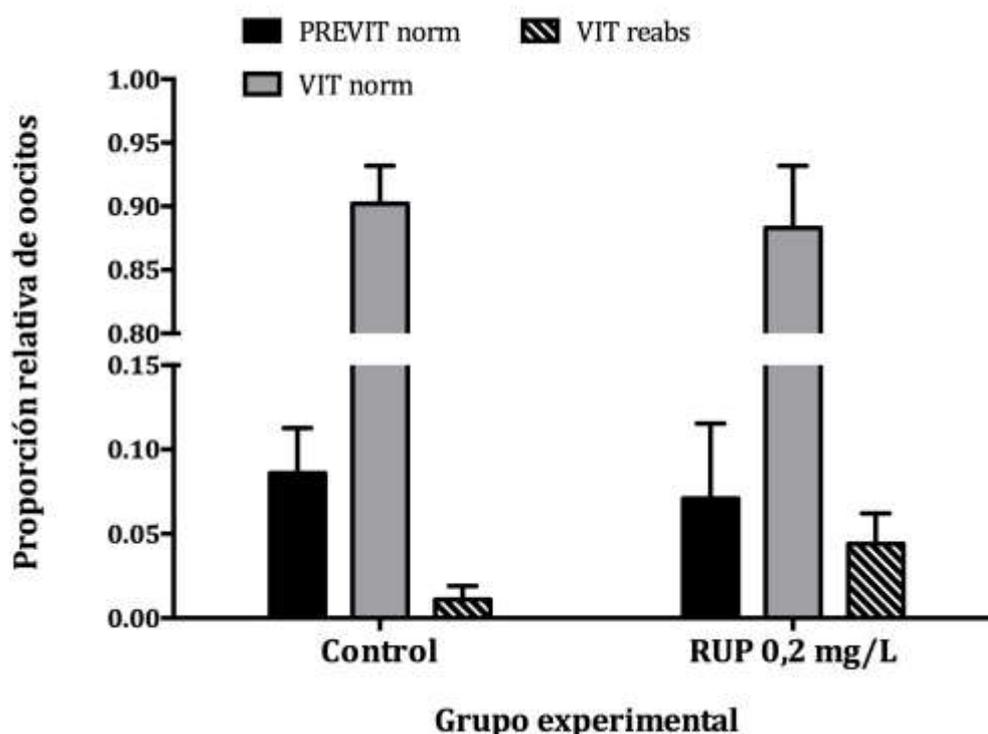


Figura 2.4. Proporción relativa de cada tipo de oocitos (previtelogénicos, vitelogénicos, intermedios, pre-vitelogénicos en reabsorción, vitelogénicos en reabsorción), en los ovarios control y expuestos a Roundup (RUP) 0,2 mg/l en el ensayo *in vitro*. No se encuentra graficada la proporción de oocitos intermedios por no hallarse la presencia de éstos en las secciones de los cortes histológicos considerados para realizar el recuento.

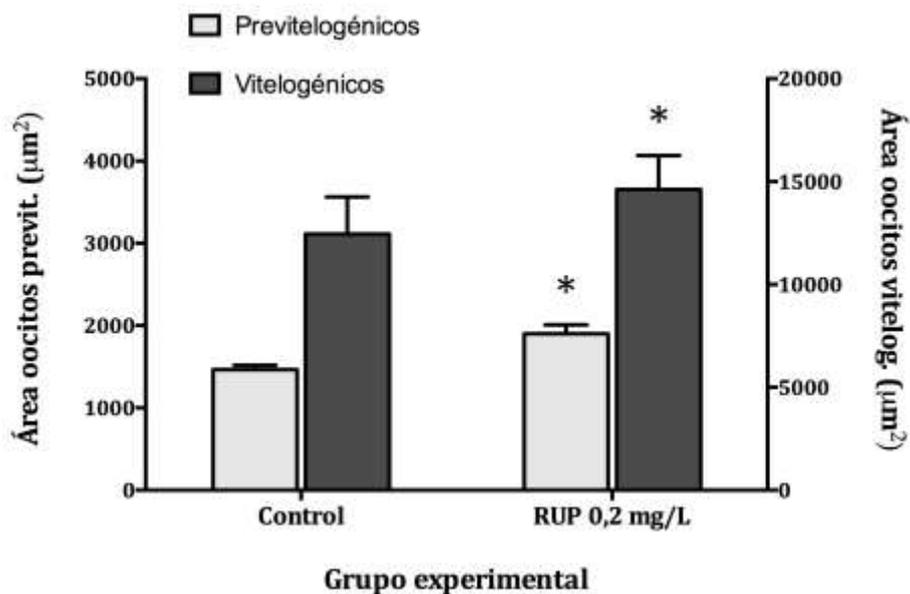


Figura 2.5. Área de oocitos pre-vitelogénicos y vitelogénicos de los controles y tratados con Roundup (RUP) 0,2 mg/l *in vitro*. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control.

- **Evaluación de la interferencia del Roundup en la vía de señalización de hormonas pedunculares y de ganglio torácico**

En el ensayo *in vitro* en el cual se incubaron los ovarios con extracto de ganglio torácico, sólo o en presencia del herbicida, aumentó la proporción relativa ($p < 0,05$) de oocitos vitelogénicos con respecto al control, tanto en el grupo tratado con Roundup, como en el tratado con extracto de ganglio torácico, como también en el tratado con Roundup + extracto de ganglio torácico (Figura 2.6). Concomitantemente, en todos estos tratamientos disminuyó significativamente ($p < 0,05$) la proporción relativa de oocitos pre-vitelogénicos, respecto del control.

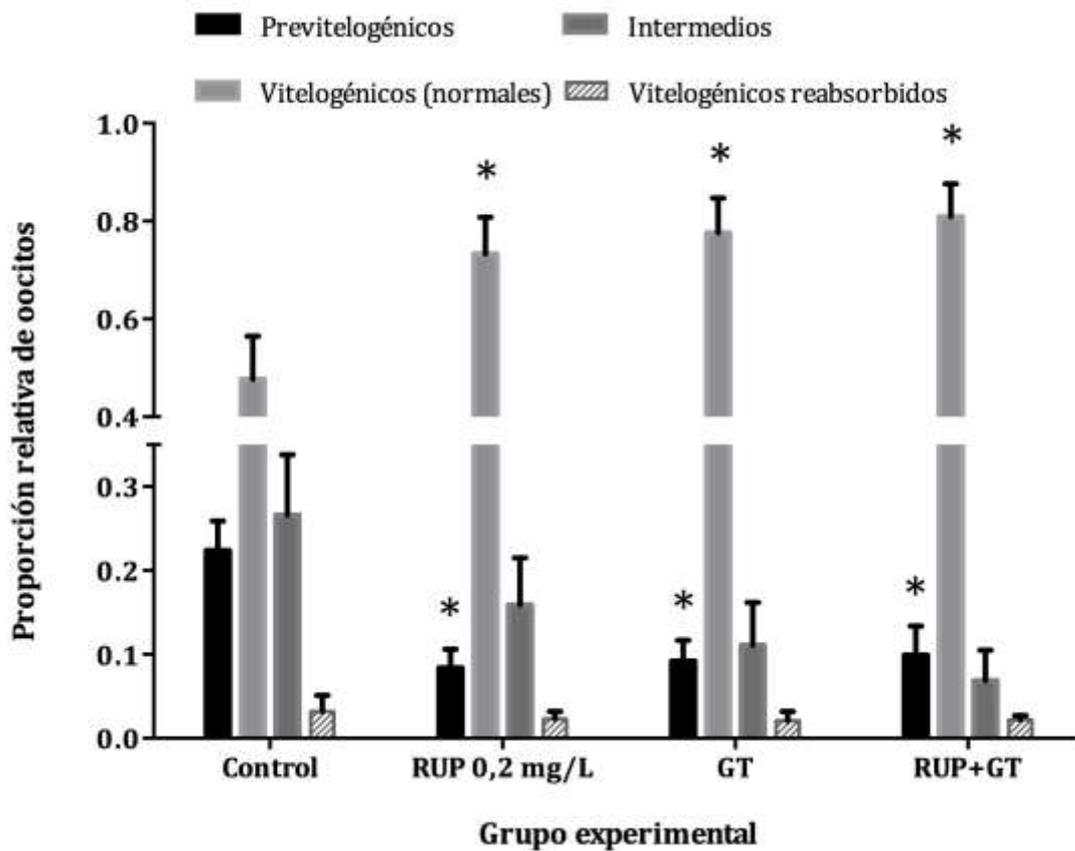


Figura 2.6. Proporción relativa de cada tipo de oocitos (pre-vitelogénicos, vitelogénicos, intermedios, y en reabsorción) en el ensayo *in vitro* en presencia de Roundup (RUP) 0,2 mg/L, extracto de ganglio torácico (GT), o una combinación de ambos. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de los tratamientos con respecto a su control.

Si se observa la Figura 2.7, el área de los oocitos pre-vitelogénicos y vitelogénicos tratados con Roundup fue significativamente mayor ($p < 0,05$) que la del control. En los tratamientos con el extracto de ganglio torácico, y con el extracto y el herbicida juntos, sólo se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) del área de los oocitos pre-vitelogénicos, con respecto al control.

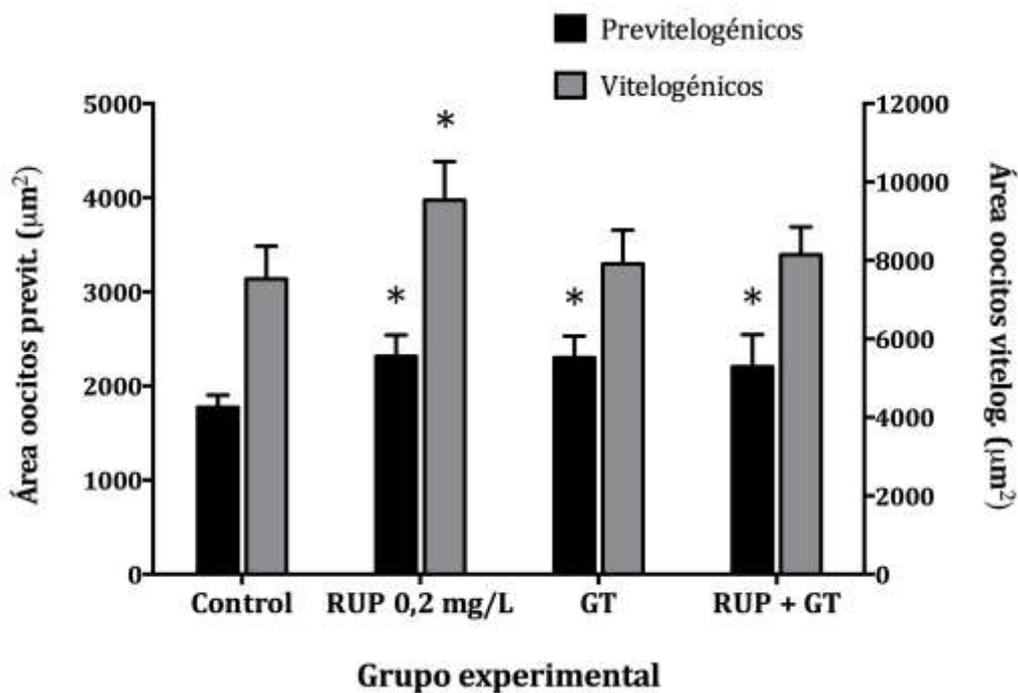


Figura 2.7. Área de los oocitos pre-vitelogénicos y vitelogénicos, en el ensayo *in vitro* en presencia de Roundup (RUP) 0,2 mg/L, extracto de ganglio torácico (GT), o una combinación de ambos. El asterisco indica diferencias significativas ($p < 0,05$) del tratamiento respecto a su control.

En el ensayo *in vitro* realizado con ovarios en presencia de Roundup 0,2 mg/L, pedúnculo ocular, o una combinación de ambos, la proporción relativa de oocitos vitelogénicos en el tratamiento con extracto de pedúnculo fue significativamente menor ($p < 0,05$) que la de su control; a su vez, la proporción relativa de los oocitos pre-vitelogénicos y de las reabsorciones fue significativamente mayor ($p < 0,05$) con respecto al control. En el tratamiento con Roundup se observó un aumento y una disminución significativos ($p < 0,05$) de la proporción relativa de oocitos vitelogénicos y pre-vitelogénicos, respectivamente, en comparación al control. Cuando se expuso a los ovarios con el extracto de pedúnculo ocular en presencia del herbicida, las variables fueron similares al 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, observándose además una tendencia de aumento en las reabsorciones. (Figura 2.8).

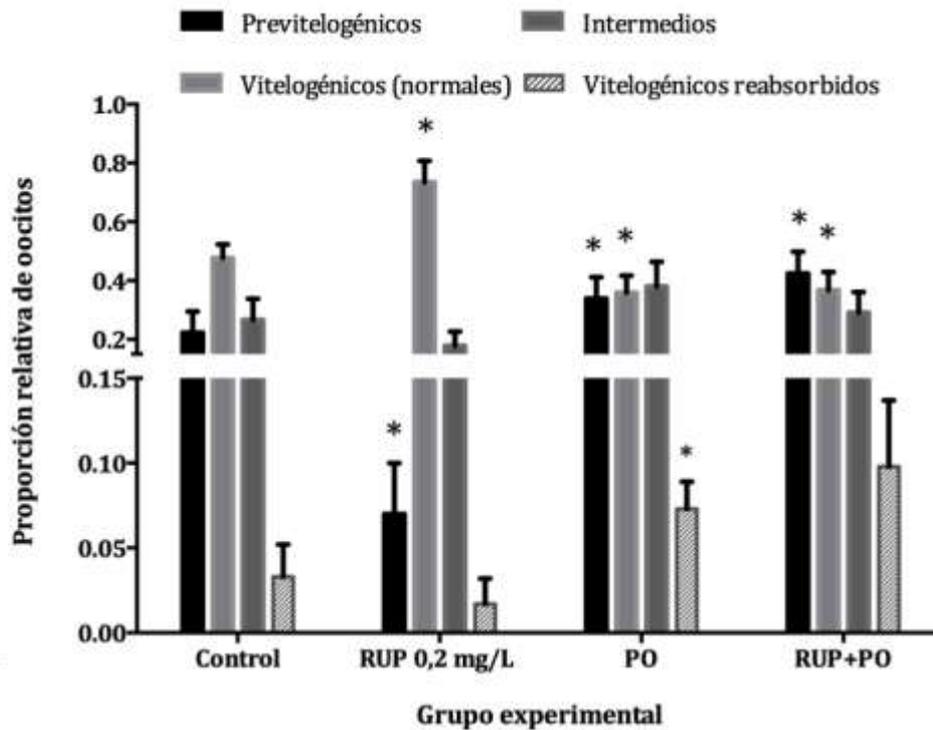


Figura 2.8. Proporción relativa de cada tipo de oocitos (pre-vitelogénicos, vitelogénicos, intermedios, y en reabsorción) en el ensayo *in vitro* en presencia de Roundup (RUP) 0,2 mg/L, extracto de pedúnculo ocular (PO), o una combinación de ambos. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) de los tratamientos con respecto a su control.

En los tratamientos con extracto de pedúnculo ocular, y con extracto de pedúnculo en presencia del herbicida, el área tanto de los oocitos previtelogénicos como vitelogénicos (Figura 2.9), no mostró diferencias significativas con respecto a su control ($p > 0,05$). Por el contrario, en el

tratamiento con Roundup se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) del área de los oocitos pre-vitelogénicos y vitelogénicos con respecto al control.

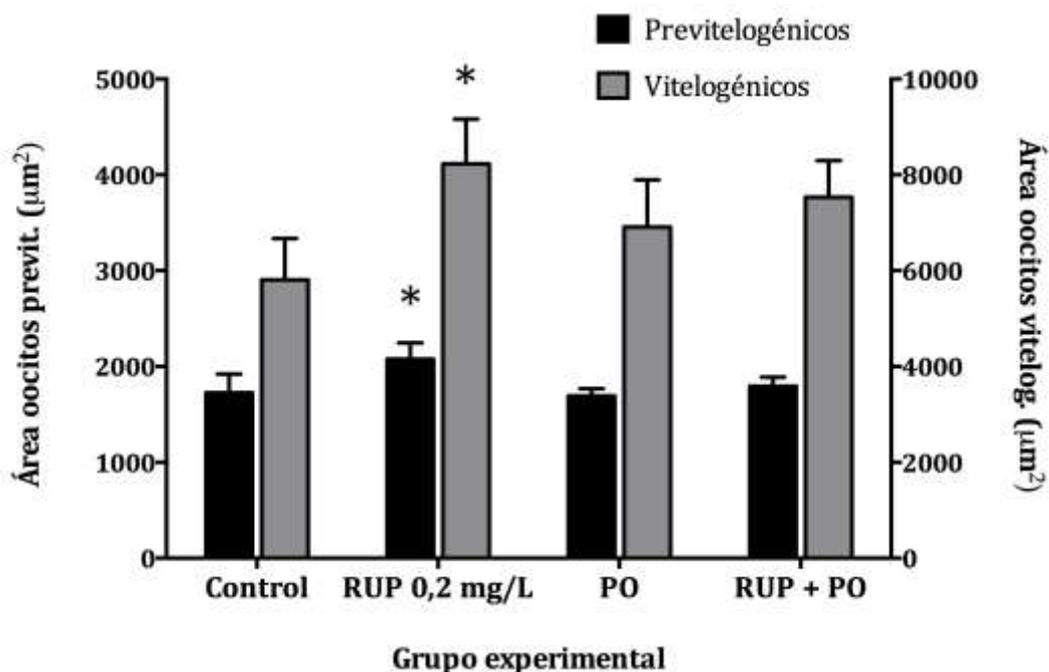


Figura 2.9. Área de los oocitos pre-vitelogénicos y vitelogénicos, en el ensayo *in vitro* en presencia de Roundup (RUP) 0,2 mg/L, extracto de pedúnculo ocular (PO), o una combinación de ambos. El asterisco indica diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto del control.

- **Evaluación de la interferencia del Roundup en la vía de señalización de hormonas esteroideas**

Determinación de las concentraciones efectivas y evaluación de la interferencia del Roundup con hormonas esteroideas

En el ensayo preliminar para evaluar si los esteroides estimulan el aumento de vitelogenina en el ovario, se observó que, de las 3 hormonas ensayadas, la progesterona y la ecdisona, a una concentración de 1,5 µM, produjeron un

aumento significativo ($p < 0,05$) del nivel de vitelogenina en el ovario (Figura 2.10).

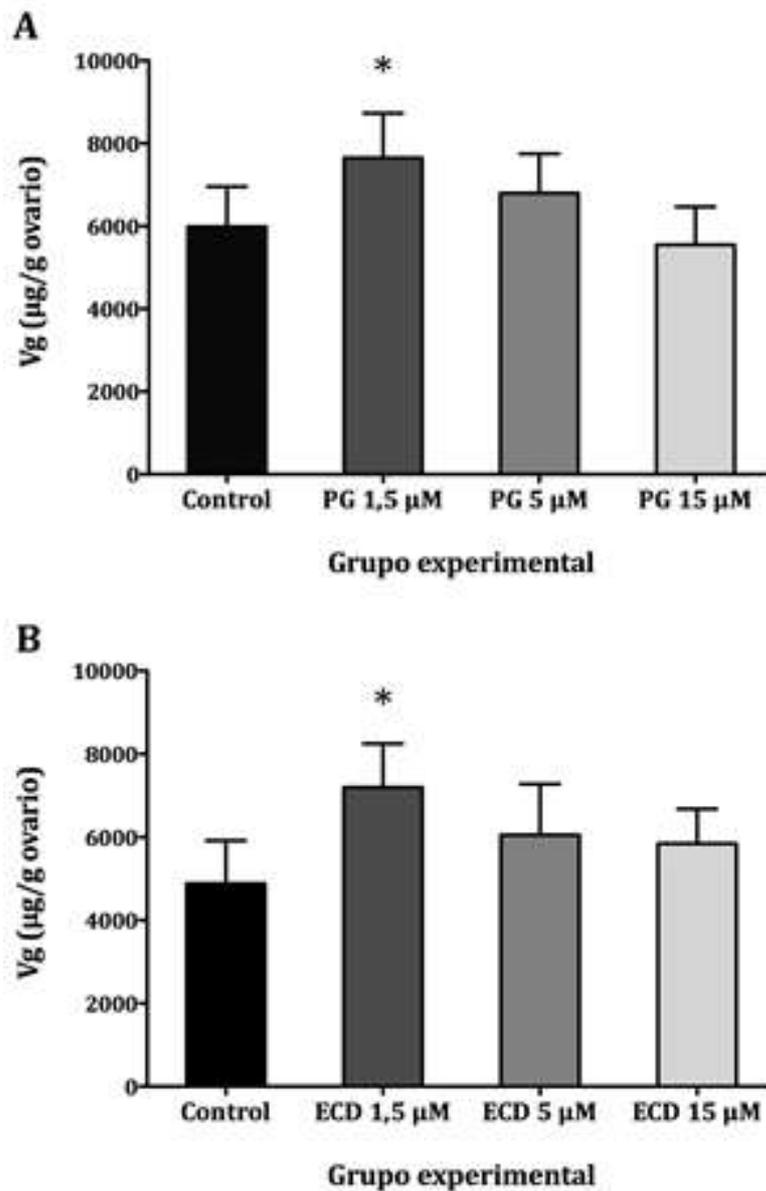


Figura 2.10. Nivel de vitelogenina ($\mu\text{g/g}$ ovario) en los ovarios tratados con diferentes concentraciones de (A) progesterona (PG), o (B) ecdisona (ECD). Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) respecto del control.

En los siguientes ensayos se evaluó entonces la posible interferencia del glifosato en la vía de señalización de la progesterona y de la ecdisona, a sus concentraciones efectivas. En la Figura 2.11 se observa que el solo agregado de

Roundup disminuye ($p < 0,05$) el contenido de vitelogenina, mientras que el solo agregado de progesterona lo aumenta significativamente ($p < 0,05$). Sin embargo, al agregar Roundup en presencia de la hormona, se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) en el nivel de vitelogenina, tanto con respecto al control, como con respecto al tratamiento con progesterona sola.

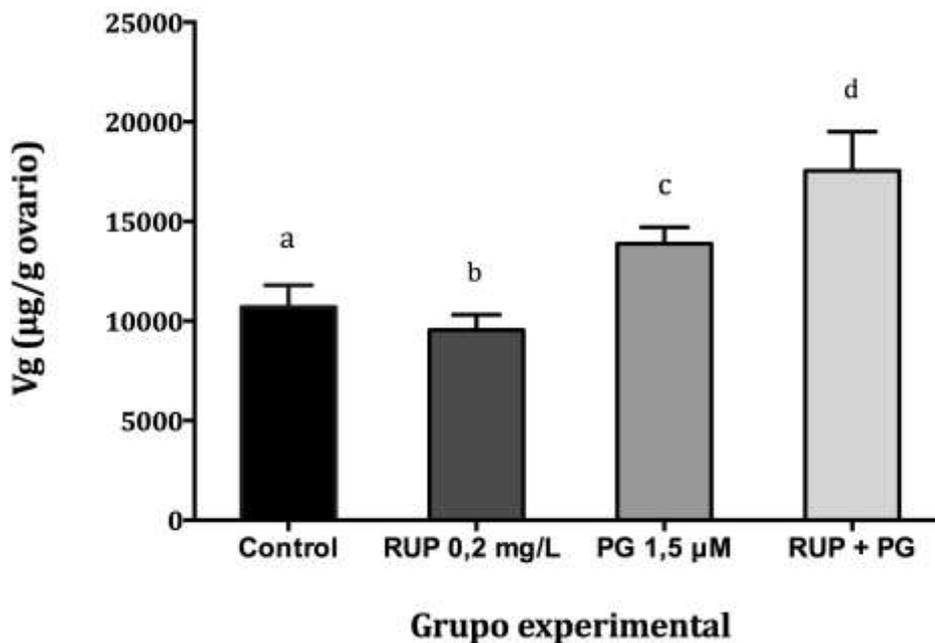


Figura 2.11. Nivel de vitelogenina ($\mu\text{g/g}$ ovario) en el ensayo *in vitro* con ovarios incubados en presencia de Roundup, progesterona, o una combinación de ambos.

En cuanto al ensayo con ecdisona (Figura 2.12), esta hormona aumentó significativamente ($p < 0,05$) los niveles de vitelogenina, tanto sola como en presencia del Roundup, no produciendo este último un incremento adicional significativo respecto al tratamiento con ecdisona ($p > 0,05$).

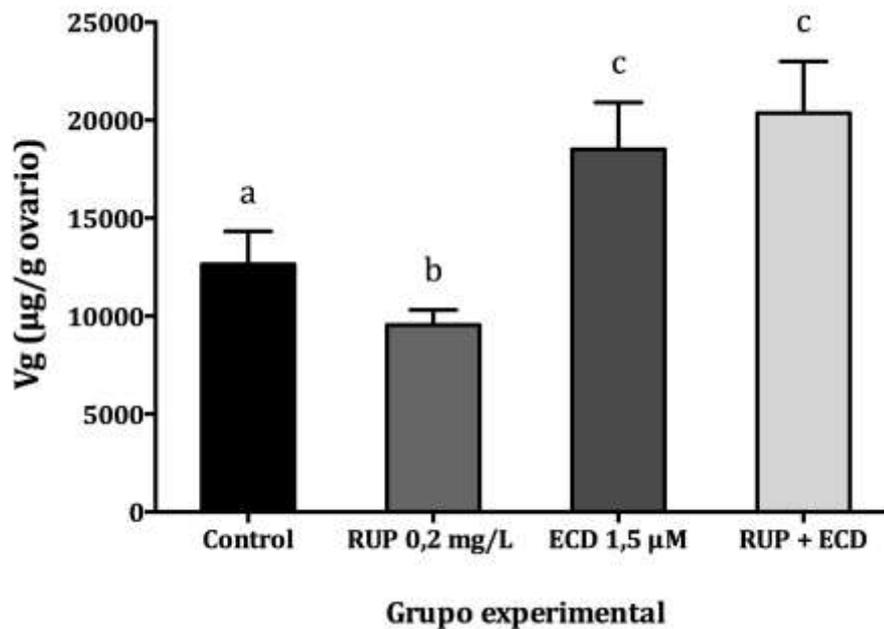


Figura 2.12. Nivel de vitelogenina ($\mu\text{g/g}$ ovario) en el ensayo *in vitro* con ovarios incubados en presencia de Roundup, ecdisona, o una combinación de ambos. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto del control.

Interferencia del Roundup con receptores de progesterona

Al antagonizar los receptores de progesterona con mifepristona $10 \mu\text{M}$, se observó un nivel significativamente menor ($p < 0,05$) de vitelogenina en el ovario, respecto del control. El Roundup, por su parte, también produjo un descenso significativo ($p < 0,05$) en el contenido de vitelogenina. Este descenso también se observó cuando el herbicida se coincubó con mifepristona (Figura 2.13)

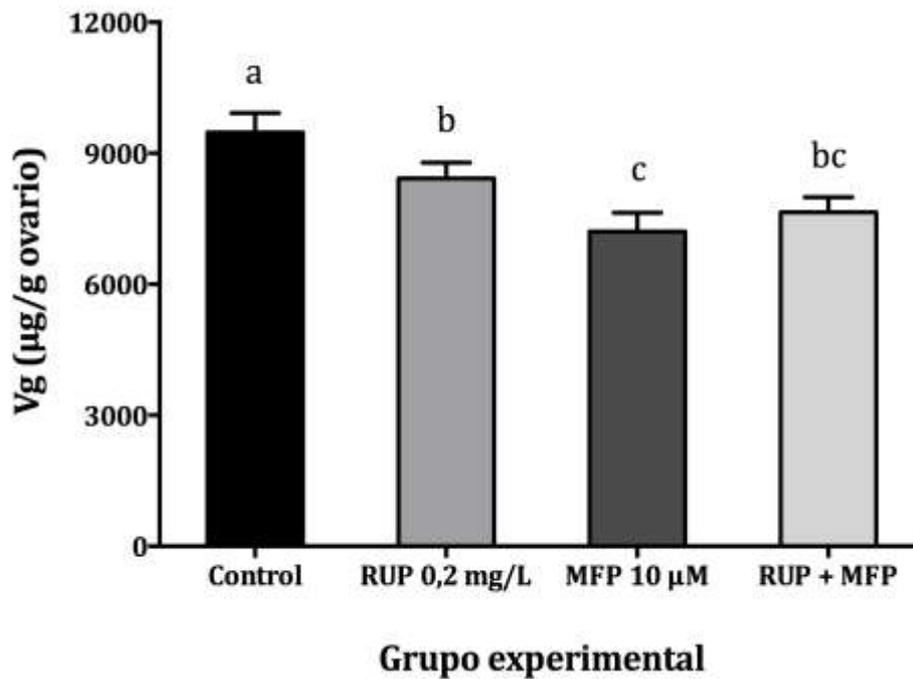


Figura 2.13. Nivel de vitelogenina en el ovario ($\mu\text{g/g}$ ovario) para los grupos Control, Roundup 0,2 mg/L (RUP), Mifepristona 10 μM (MFP) y Roundup 0,2 mg/L en presencia de Mifepristona 10 μM (RUP+MFP), en el ensayo *in vitro*. Letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos experimentales, con un nivel de significancia de 0,05.

El análisis histológico correspondiente al ensayo independiente con los mismos tratamientos, indicó una proporción de oocitos vitelogénicos significativamente menor ($p < 0,05$) con respecto al control, y a la vez una proporción de oocitos intermedios significativamente mayor ($p < 0,05$) en ambos tratamientos con mifepristona, respecto del control (Figura 2.14). En el tratamiento con Roundup solo, se registró un aumento ($p < 0,05$) en la proporción de oocitos vitelogénicos, así como una tendencia de aumento de reabsorciones.

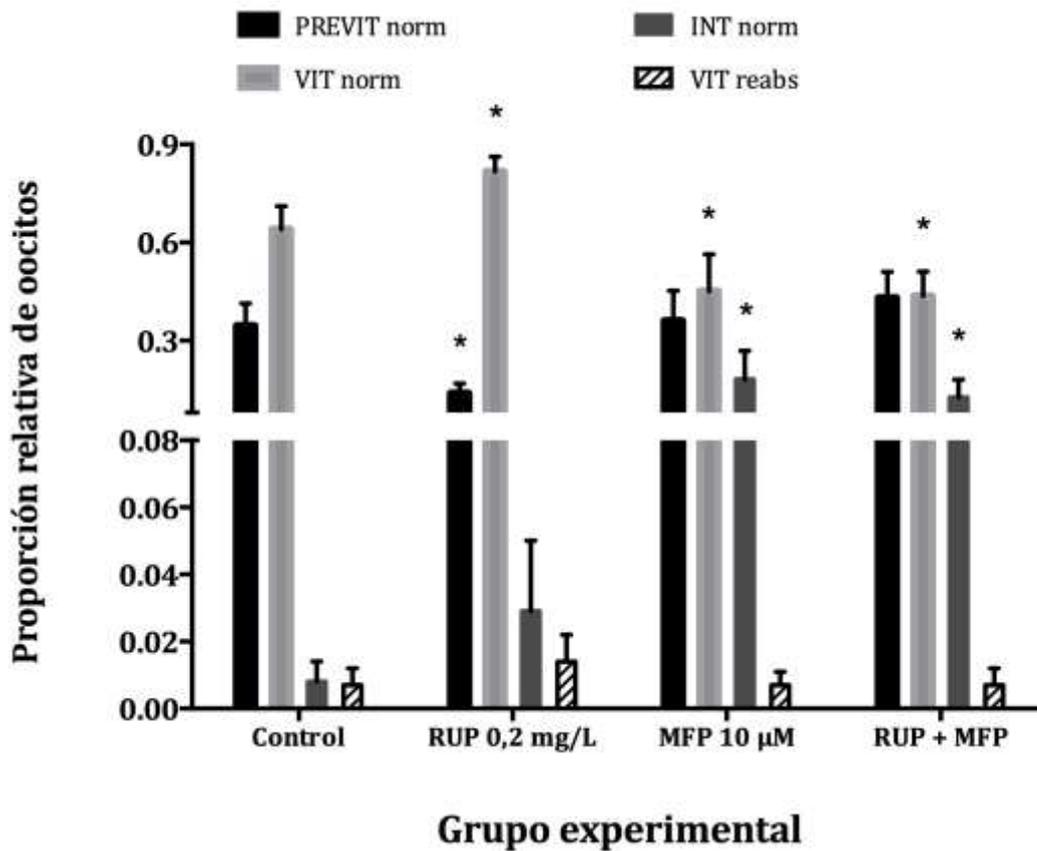


Figura 2.14. Proporción de oocitos para los grupos Control, Roundup 0,2 mg/L (RUP), Mifepristona 10 µM (MFP) y Roundup 0,2 mg/L en presencia de Mifepristona 10 µM (RUP+MFP), en el ensayo *in vitro*. Letras distintas indican diferencias significativas entre los grupos experimentales con un nivel de significancia de 0,05.

- **Evaluación de la interferencia del Roundup en el control endocrino del crecimiento ovárico ejercido por prostaglandinas**

En cuanto al ensayo *in vitro* en el cual se utilizó ibuprofeno para inhibir la síntesis de prostaglandinas, el nivel de vitelogenina en el tratamiento con Roundup 0,2 mg/L en presencia de Ibuprofeno 10 mg/L fue significativamente menor ($p < 0,05$) que el de los grupos Control, Roundup 0,2 mg/L, e Ibuprofeno 10 mg/L. Si bien el Roundup *per se* produjo (nuevamente) 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 2.15).

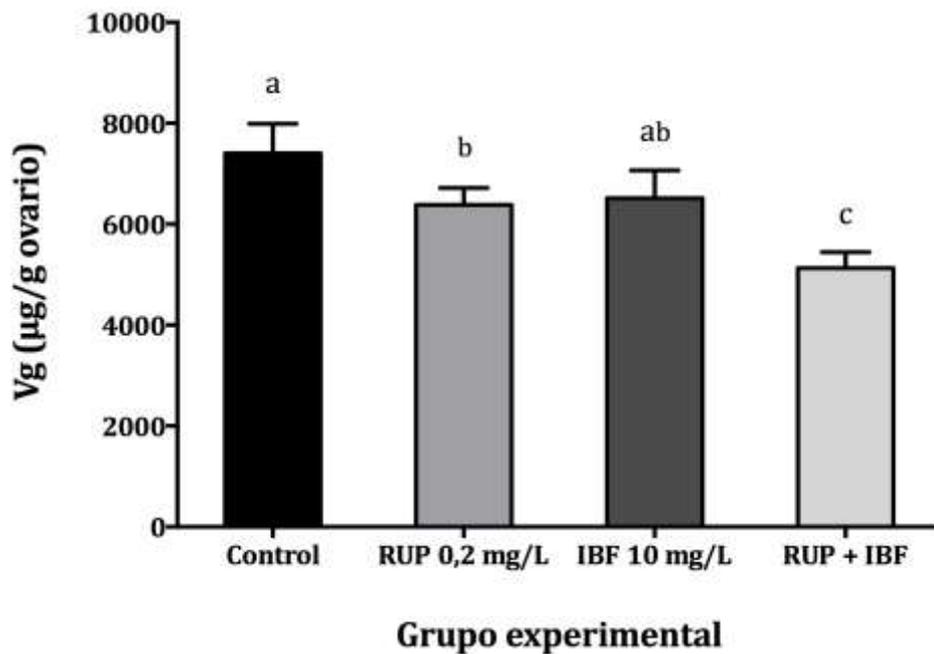


Figura 2.15. Nivel de vitelogenina ($\mu\text{g/g}$ ovario) para el ensayo *in vitro* en el que se expusieron los ovarios de las hembras a Roundup, o Ibuprofeno, o a una combinación de ambos. C: Control, IBF: Ibuprofeno 10 mg/L, RUP: Roundup 0,2 mg/L, RUP+IBF: Roundup 0,2 mg/L con la adición de Ibuprofeno 10 mg/L. Letras indican diferencias significativas entre los grupos ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

Como parte del trabajo de tesis, se evaluó la posible interferencia del glifosato sobre el control del crecimiento ovárico mediado por hormonas, utilizando un modelo *in vitro*, lo que permitiría sumar evidencias sobre su posible rol como desorganizador endocrino.

En estos ensayos *in vitro* se expusieron los ovarios de las hembras a las mismas concentraciones utilizadas *in vivo*. Si bien la concentración de herbicida en el medio de incubación, en contacto directo con el ovario, fue seguramente mayor que la concentración efectiva en la hemolinfa durante el ensayo *in vivo*, se debe considerar que el tiempo de exposición de los animales durante éste último (3 meses) fue mucho mayor que el tiempo de exposición *in vitro* de los ovarios (24 hs). Sin embargo, cabe destacar que en ese corto tiempo tiene lugar la síntesis de proteínas *de novo*, como lo han verificado varios autores en relación a la síntesis de vitelogenina en crustáceos, frente a distintas condiciones de incubación de los ovarios, entre las que se incluye la exposición a xenobióticos (Eastman-Reks y Fingerman, 1984; Rodríguez *et al.*, 2000, 2002; Zapata *et al.*, 2001; Cahansky *et al.*, 2011). De hecho, se ha visto la expresión temprana del ARN mensajero de vitelogenina a las 3 horas de incubación del hepatopáncreas de crustáceos (Reddy Buchi *et al.*, 2016).

El nivel de vitelogenina en el ovario fue menor a las dos concentraciones de Roundup ensayadas (0,01 y 0,2 mg/L), mientras que cuando se expusieron los

ovarios al glifosato puro, esta disminución fue significativa solamente a la mayor concentración (0,2 mg/L). Por un lado, este resultado estaría indicando que la disminución del contenido de vitelogenina puede asociarse directamente al principio activo, y por otro lado, que el efecto del glifosato se vería exacerbado por la presencia de los coadyuvantes en el formulado, que estarían facilitando la entrada del principio activo a los tejidos. No es posible sin embargo descartar que los coadyuvantes presentes en el Roundup Ultramax puedan contribuir, *per se*, en el efecto de reducción del contenido de vitelogenina. Varios autores han reportado efectos deletéreos del glifosato (puro y formulado) sobre el proceso reproductivo de vertebrados e invertebrados, tanto *in vivo* como *in vitro* (Mesnage *et al.*, 2015).

El ensayo *in vitro* cuyo objetivo fue la evaluación del efecto del Roundup sobre la síntesis proteica, permite afirmar que la disminución del contenido de vitelogenina en el ovario se debe, al menos en parte, a una inhibición de la síntesis *de novo* de la vitelogenina, considerando que durante la vitelogénesis, las principales proteínas que se sintetizan en el ovario son precisamente las vitelogeninas (Liu *et al.*, 1974). Se podría entonces afirmar que a 0,2 mg/l de Roundup estaría ocurriendo una menor síntesis de vitelogenina en el ovario.

Sin embargo, el análisis histológico muestra un efecto del Roundup que *a priori* parece no concordar con su efecto sobre el contenido de vitelogenina. Si bien no se observaron diferencias significativas entre los ovarios control y los tratados

con 0,2 mg/L de Roundup, la proporción de oocitos pre-vitelogénicos mostró una leve tendencia de disminución, mientras que no hubo cambios en la proporción de vitelogénicos normales; sin embargo, si se considera el total de oocitos vitelogénicos (normales más aquellos en reabsorción) se puede observar que es mayor que la cantidad de vitelogénicos en el grupo control, es decir, que se puede inferir que las reabsorciones (que muestran una marcada tendencia de aumento en los tratados con Roundup) están ocurriendo en un ovario que recientemente estuvo un poco más avanzado en su crecimiento que el ovario control. Esto concuerda, en principio, con los resultados del tamaño de los oocitos, ya que en promedio tanto los pre-vitelogénicos como los vitelogénicos tuvieron un área mayor que los pertenecientes al control.

En consecuencia, parece haber un efecto dual del glifosato sobre el ovario: por un lado la disminución del contenido de vitelogenina mediante diversos mecanismos, no excluyentes entre sí: a) la inhibición de la síntesis de vitelogenina (de manera directa y/o inhibiendo el efecto de alguna hormona ovárica, estimulante de esa síntesis); b) el aumento en el número de reabsorciones oocitarias, ya sea produciendo una necrosis de los oocitos de manera directa o alterando algún proceso regulatorio intrínseco del ovario, que eventualmente podría estar regulado hormonalmente. Por otro lado, al mismo tiempo el glifosato parece estar produciendo una cierta estimulación en el avance madurativo del ovario, tendiendo a aumentar la proporción de oocitos

vitelogénicos y causando, al menos en cierta proporción de ellos, un cierto incremento de tamaño. La maduración del ovario no sólo está relacionada con la síntesis de vitelogenina, sino que depende fundamentalmente de numerosos cambios citológicos y ultraestructurales en los oocitos y en las células foliculares que los rodean, que se encuentran bajo regulación hormonal (Krol *et al.*, 1992). En consecuencia, la hipótesis más plausible para explicar el avance madurativo producido por el glifosato guarda relación con un posible efecto de desorganización endocrina ejercido por el herbicida. De hecho, la hipótesis del glifosato como desorganizador endocrino en el ovario es el otro aspecto que se abordó en este capítulo.

La mayor evidencia sobre el glifosato como posible desorganizador endocrino ha sido obtenida en vertebrados. Podemos mencionar que en mamíferos, se ha reportado una posible interferencia del herbicida con la síntesis y/o señalización de esteroides (Richard *et al.*, 2005; Gasnier *et al.*, 2009). Por otro lado, también se ha reportado, en peces expuestos durante 40 días a Roundup, una disminución en los niveles de 17β -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) estudiaron en ratones la expresión del ARN mensajero de las hormonas GnRH (*gonadotrophinreleasing hormone*), LH (*luteinizing hormone*) y FSH (*follicle-stimulating hormone*), y de sus receptores, hallando que la expresión de GnRH disminuyó en el hipotálamo, y la de LH

aumentó en la glándula pituitaria, junto con la de los receptores de LH en el ovario; mientras que la expresión del receptor de FSH disminuyó en éste último. En la línea celular humana corioplacentaria JAr, se encontró que, cuando el glifosato no fue citotóxico, disminuyó los niveles de progesterona, (Young *et al.*, 2015).

Para testear la hipótesis de la desorganización endocrina en hembras de *N. granulata*, se evaluó en primer lugar una posible interferencia del glifosato con la vía de señalización de las neurohormonas secretadas por el ganglio torácico (GT). Se sabe que el ganglio torácico (junto con el ganglio cerebral) es el lugar de síntesis y secreción de la hormona GSH (*gonad inhibiting hormone*), que se ha demostrado que estimula la vitelogénesis directamente sobre el ovario, en varias especies de crustáceos, incluyendo cangrejos (Fingerman, 1997, Cahansky *et al.*, 2002). 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*. Es importante aclarar que hasta el momento, no se ha reportado en la literatura la presencia de factores inhibitorios del crecimiento ovárico secretados por el GT (Nagaraju *et al.*, 2010). Como antecedente más directo, podemos mencionar el trabajo de Avigliano *et al.* (2018), quienes mediante ensayos *in vitro* con ovarios de *N. granulata* expuestos a glifosato puro, observaron un aumento del área de los

oocitos pre-vitelogénicos (efecto que también se observó *in vivo*), sugiriendo que el herbicida podría estar actuando como agonista de alguna hormona estimulante del desarrollo ovárico, como por ejemplo GSH o algún esteroide. En el ensayo de exposición a ganglio torácico realizado en la presente tesis, las variables consideradas fueron tamaño y proporción relativa de los tipos oocitarios, a fin de observar directamente el proceso madurativo en el ovario. En cuanto al efecto del Roundup *per se*, se observó la presencia de una mayor proporción de oocitos vitelogénicos y de mayor tamaño oocitario, tanto de los previtelogénicos como de los vitelogénicos, en concordancia con los resultados de los ensayos *in vitro* discutidos más arriba. El tratamiento que solo recibió extracto de ganglio torácico, mostró un comportamiento similar al que exhibió el glifosato en términos histológicos (si bien no se observó un aumento del tamaño de los oocitos pre-vitelogénicos), es decir, una aparente inducción del crecimiento ovárico, lo cual era de esperarse, debido a la presencia de GSH en el ganglio torácico. Al exponer a los ovarios al herbicida y al extracto de ganglio torácico, las proporciones oocitarias tuvieron valores similares a cada uno de estos tratamientos por separado. Lo mismo se observó con respecto al área (tamaño) de los oocitos pre-vitelogénicos. Estos resultados sugieren que el herbicida no estaría interactuando con las hormonas del ganglio torácico (principalmente GSH).

En segundo lugar, se evaluó la posible interferencia del herbicida con la vía de las hormonas pedunculares. Son varias las neurohormonas presentes en el pedúnculo ocular de los crustáceos (Nagaraju, 2011; Fingerman, 1997). Si bien se encuentra reportada la presencia de cromatoforinas, éstas no ejercen un rol sobre la maduración ovárica de manera directa (Huberman, 2000; Swetha *et al.*, 2011). Por otro lado, la hormona inhibidora del órgano mandibular (MOIH) no tendría efecto directo sobre el ovario, como han demostrado varios autores (Chung *et al.*, 2010); y en cuanto a la hormona inhibidora de muda (MIH), su efecto directo sobre el ovario se encuentra discutido aún, habiéndose encontrado, por ejemplo, como uno de sus órganos blanco al hepatopáncreas, en la especie *Callinectes sapidus* (Zmora *et al.*, 2009). La hormona hiperglucemiante de crustáceos (CHH), secretada también por los pedúnculos oculares, posee efectos sobre el crecimiento gonadal que aún no se encuentran completamente dilucidados, algunos de ellos han sido reportados como inhibitorios (Khayat *et al.*, 1998), mientras otros fueron estimulatorios (Franjul-Moles, 2006; Chung *et al.*, 2010), dependiendo básicamente de la isoforma de CHH considerada. Una neurohormona que claramente ejerce un efecto inhibitorio directo sobre el ovario es la hormona GIH –*gonad inhibiting hormone*– (Bomirsky y Klęc, 1974; Charniaux-Cotton, 1985; Fingerman, 1997; Nagaraju, 2011), habiéndose observado previamente *in vitro* el efecto inhibitorio sobre el ovario de extractos semipurificados de pedúnculo ocular que contenían esta hormona (Zapata *et al.*, 2003; Medesani *et al.*, 2004). Es esperable que los

pedúnculos oculares utilizados en la presente tesis para preparar el extracto, contengan una cantidad relativamente elevada de GIH, dado que se extrajeron de animales que se encontraban al principio del período prereproductivo, cuando todavía el ovario se encuentra arrestado por GIH (Charmantier, 1997). En el ensayo *in vitro* realizado en presencia pedúnculo ocular, el efecto del Roundup solo, sobre la proporción y tamaño de los oocitos, fue similar al observado en el ensayo de exposición con ganglio torácico. Por su parte, el tratamiento con extracto de pedúnculo ocular (PO) aumentó la cantidad de oocitos pre-vitelogénicos y disminuyó la de vitelogénicos, en comparación con el control, mientras que no ocurrieron cambios en el tamaño de los oocitos. El mismo resultado se observó al administrar extracto de pedúnculo y Roundup, lo que no permite concluir que haya existido algún tipo de interacción entre el herbicida y la GIH.

Otro resultado a destacar del ensayo con pedúnculo ocular, es el elevado y significativo porcentaje de oocitos en reabsorción, por efecto del tratamiento con el extracto. Debido a que en éste está presente el contenido total de neurohormonas almacenado en los pedúnculos, es esperable encontrar una elevada concentración de las mismas en el medio de cultivo en el cual se agrega el extracto. Una elevada concentración de GIH, por encima de los niveles fisiológicos normales, e incluso de CHH (en tanto hormona del estrés), podría ser la causa de la elevada incidencia de reabsorciones en los tratamientos que

recibieron extracto de pedúnculo ocular, en concordancia con resultados previos obtenidos en la especie en estudio (Avigliano *et al.*, 2018). En un contexto *in vivo*, la secreción aumentada de alguna de estas neurohormonas podría ser un mecanismo inducible por glifosato (y posiblemente por otros contaminantes que eleve la incidencia de reabsorciones), tal como se observó en los ensayos *in vivo* reportados en el Capítulo I de la presente tesis.

En tercer lugar, se evaluó la posible interferencia del Roundup con hormonas esteroideas. Diversos estudios realizados en crustáceos y otros invertebrados han logrado identificar la presencia de esteroides sexuales similares a vertebrados (denominados *vertebrate-like steroids*) mediante distintas técnicas (Janer y Porte, 2007). Más aún, en el camarón *Macrobrachium rosenbergii* (una especie modelo para diversos estudios fisiológicos) se ha reportado la expresión de diversas enzimas de la vía esteroidogénica que conduce a la síntesis de esteroides sexuales (Thongbuakaew *et al.*, 2016). Existe una fuerte evidencia que indica que el ovario (probablemente las células foliculares) es el sitio principal de secreción de esteroides (Quackenbush, 1994; Shih y Liao, 1998; Yano, 2000).

De las tres hormonas ensayadas, solo la progesterona y la ecdisona estimularon la síntesis de vitelogenina en el ovario, ambas a una concentración de 1,5 μM . Es sabido que la concentración efectiva de una hormona, tanto en organismos

vivos como en órganos *in vitro*, puede variar entre especies, y que no siempre las hormonas desencadenan efectos dosis-dependientes en todos los estadios de un proceso hormonalmente regulado (Liu *et al.*, 2018).

En cuanto al estradiol, se ha reportado que estimuló el aumento del índice gonadosomático en la langosta *Procambarus clarkii*, pero no ocasionó un aumento del tamaño de los oocitos, como lo hizo la progesterona. Similarmente, Shih (1997) reportó la presencia de una hormona estradiol-like en el ovario del cangrejo *Mictyris brevidctylus*, que alcanzó su máximo nivel en los meses de noviembre y diciembre, dos meses después del máximo nivel alcanzado en el hepatopáncreas. Asimismo, Warriar *et al.* (2001) encontraron que los niveles de estradiol aumentan con la progresión de la vitelogénesis en *Scylla serrata*, siendo la acumulación de esta hormona máxima en hepatopáncreas (al contrario de progesterona, que ese acumula principalmente en el ovario). En *N. granulata* sería posible incluso que no se expresen receptores de estradiol en el ovario, como ocurre en la langosta *Austropotamobius pillipes*, en la cual los receptores de esta hormona sólo se inmunomarcaron en el hepatopáncreas (Paolucci *et al.*, 2002). Por otro lado, si bien en algunos crustáceos se ha reportado actividad tipo aromatasa (por ejemplo, en el hepatopáncreas del camarón *Marsupenaeus japonicus*, Summavielle *et al.*, 2003) no existen al presente evidencias firmes sobre la presencia de esta enzima en los crustáceos (Swevers, 1991; Subramoniam, 2017).

La estimulación del crecimiento ovárico por acción directa de la progesterona ha sido reportada en la literatura por varios autores, mediante ensayos *in vitro* (Swetha *et al.*, 2011, Medesani *et al.*, 2004; Zapata *et al.*, 2003); Más aún, el receptor de progesterona ha sido aislado y caracterizado en el ovario de varias especies de crustáceos, tales como el camarón *Penaeus monodon* (Preechaphol *et al.*, 2010) y el cangrejo *Scylla paramamosain*, en las cuales este receptor fue identificado en el núcleo de los oocitos y en las células foliculares (Ye *et al.*, 2010).

Con respecto al ensayo realizado para evaluar la posible interacción de Roundup con progesterona (PG), el herbicida *per se* causó una disminución en los niveles de vitelogenina, lo cual estuvo en concordancia con lo observado en los demás resultados *in vitro* del presente trabajo de tesis. Por el contrario, el tratamiento con PG sola causó (a 1,5 μ M) un incremento significativo de Vg, de acuerdo a lo esperado. Sin embargo, al coincubar la hormona con el herbicida, el aumento de Vg observado fue significativamente mayor al aumento observado con la hormona sola. Estos resultados sugieren que el Roundup estaría favoreciendo de algún modo el efecto estimulante de la progesterona. Este resultado contribuiría además a explicar la estimulación de los niveles de Vg ocurrida al mes de la exposición *in vivo*. En la literatura se encuentran reportes acerca del efecto del glifosato como inhibidor de la síntesis de esteroides, en algunos modelos, y como agente esteroideogénico en otros.

Particularmente, se ha observado que el Roundup disminuyó la síntesis de progesterona en cultivos de células del cuerpo lúteo de ovario de vaca (Wrobel, 2018). Sin embargo, Armiliato *et al.* (2014) observaron en ovarios de *zebrafish* (*Dario rerio*) expuestos por 15 días a glifosato, una expresión aumentada del factor esteroideogénico-1 (SF-1), en concordancia con un aumento en el diámetro de los oocitos, y en la cantidad de gránulos de vitelogenina, observados a nivel ultraestructural. La actividad esteroideogénica de plaguicidas ya ha sido reportada en otros casos, por ejemplo, el metabolito HPTE del metoxiclor, y el endosulfán, ambos insecticidas organoclorados, aumentaron la expresión del receptor de progesterona y del ERE en ratas (Hodges *et al.*, 2000); el 2-4' DDT (otro organoclorado) por su parte, aumentó *in vitro* los niveles de progesterona basal en células de la granulosa de rata (Nejati *et al.*, 2001).

La mifepristona es un antagonista de los receptores de progesterona. Al exponer los ovarios a este compuesto, a la concentración 10 μ M, el nivel de vitelogenina disminuyó, un resultado esperado de acuerdo a lo discutido precedentemente sobre los efectos estimulantes de la progesterona. Más aún, este resultado es una evidencia a favor de la existencia de progesterona endógena en el ovario de *N. granulata*. Cuando se trató a los ovarios con mifepristona en presencia de Roundup, el nivel de vitelogenina fue similar al del tratamiento con mifepristona sola. Un resultado similar se observó en el análisis histológico, en el cuál se observa además (al igual que los ensayos *in*

vitro previos) un efecto estimulante del avance madurativo por parte del Roundup *per se*, que se anula cuando se coincuba con mifepristona. Evaluados en su conjunto, los resultados de los ensayos *in vitro* realizados con PG y mifepristona, permiten concluir que: 1) El Roundup favorece o facilita de alguna manera el efecto de progesterona, y 2) Para que tal efecto se manifieste, el receptor de PG no debería estar inhibido. Resta aún elucidar mediante qué mecanismos precisos se daría tal facilitación, si bien los resultados obtenidos sugieren que el Roundup actuaría como inductor de la vía de transducción de la hormona, siempre que pueda darse una unión eficiente de la PG con su receptor. Otra opción a considerar es la posibilidad de que el Roundup se una al receptor de PG, actuando como un “xenoprogéstágeno”. Esta posibilidad está sustentada por el efecto inductor del Roundup sobre la maduración del ovario, en términos del aumento en la proporción de oocitos vitelogénicos; sin embargo, el descenso del contenido de Vg causado por el Roundup *per se* contradice esta posibilidad, si bien también es factible (como se discutió oportunamente para los ensayos *in vivo* en el Capítulo I) que tal descenso en el contenido de Vg pueda estar relacionado con otros modos de acción tóxicos del glifosato, no vinculados al control hormonal, tales como la inhibición de la síntesis proteica y/o la reabsorción de cierta fracción de oocitos en el ovario. Aunque requiere confirmación, por primera vez se brindan evidencias que sugieren que el glifosato podría actuar como progestágeno en el ovario de crustáceos.

El papel de los ecdiesteroides, caracterizados como reguladores del proceso de muda, se ha investigado además en relación a la reproducción, particularmente su vinculación con la maduración ovárica. Varios estudios realizados en crustáceos proponen que los ecdiesteroides podrían mediar la captación de vitelogenina por los oocitos en los braquiuros y otros crustáceos decápodos, ya que se encuentra reportada la localización de receptores de ecdiesteroides en el ovario. Dado que durante la intermuda (que es el período durante el cual madura el ovario en los braquiuros) los niveles de ecdiesteroides son muy bajos, se ha propuesto que aquellos que estimulan la maduración ovárica son sintetizados por el propio ovario, actuando localmente (Subramoniam, 2017). Existen algunos reportes en la bibliografía acerca del efecto de ciertos contaminantes sobre los ecdiesteroides, como por ejemplo del fungicida feraniol (Mu y LeBlanc, 2002) y de benzotriazolas (Giraudó *et al.*, 2017) en *Daphnia magna*; y de heptaclor en larvas de *Homarus americanus* (Snyder y Mulder *et al.*, 2001). En cuanto al ensayo con ecdisona, el aumento de la síntesis de Vg que se observa con la hormona en presencia del herbicida, no fue diferente del que se observó con la hormona sola, por lo cual se podría concluir que el Roundup no interfiere con la vía de señalización de la ecdisona.

La maduración ovárica de los crustáceos depende también de prostaglandinas, cuyos niveles en ovario cambian en función de la maduración oocitaria (Tahara y Yano, 2004, 2003; Yano, 1985). Si bien la bibliografía al respecto es escasa, se

sabe que las prostaglandinas están involucradas en la síntesis de esteroides sexuales (Han *et al.*, 2010) y, dada su naturaleza autócrina y/o parácrina, podrían ser mediadores, en el ovario de crustáceos, del efecto estimulante de progesterona y otros esteroides. En el cangrejo *Oziotelphusa senex senex* se ha observado *in vivo* que el ovario captó mayor cantidad de ácido araquidónico marcado (precursor de prostaglandinas) que cualquier otro tejido. En el mismo estudio, el ovario *in vitro* fue capaz de sintetizar principalmente prostaglandina F_{2α} y E₂, las cuales aumentaron hacia el final de la maduración ovárica; y en menor cantidad prostaglandina D₂, cuyo nivel no se alteró durante la maduración (Reddy *et al.*, 2004). Además, los autores han encontrado que en el ovario de la misma especie, aumentó *in vitro* la actividad de la enzima prostaglandina-H sintasa a mayor nivel que en los tejidos somáticos, sobre todo a medida que avanzó la maduración ovárica, mientras que el tratamiento con prostaglandinas *in vivo* aumentó el índice gonadosomático y el tamaño de los oocitos (Reddy *et al.*, 2004). Además de los aquí mencionados, existen otros reportes en la literatura sobre el efecto estimulante de prostaglandinas en el ovario de crustáceos, y de evidencias sobre la síntesis de esta hormona por él (Nagaraju, 2010).

Para poner a prueba la hipótesis de que el Roundup podría interferir en la vía de las prostaglandinas, se expuso a los ovarios a Roundup, en ausencia o presencia de ibuprofeno. El ibuprofeno inhibe la enzima ciclooxigenasa,

responsable de la conversión del ácido araquidónico a prostaglandina H₂. Se sabe que los eicosanoides sintetizados en los organismos actúan a nivel local, tisular o celular, cumpliendo un rol importante en la regulación de la reproducción de los animales (Swetha *et al.*, 2011). La evidencia que aporta la bibliografía muestra que en los crustáceos, las drogas antiinflamatorias no-esteroides interrumpen la biosíntesis de eicosanoides (como las prostaglandinas), reduciendo así la fecundidad, como se observó en *Daphnia magna* (Heckmann *et al.*, 2008), 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 de tesis, el ibuprofeno *per se* causó una leve pero significativa reducción de los niveles de vitelogenina en el ovario, pero con el agregado del herbicida al medio de incubación, tales niveles disminuyeron de manera estadísticamente significativa respecto del control y también respecto del tratamiento con Roundup solo. A partir de estos resultados, podemos concluir que el herbicida estaría inhibiendo el efecto de las prostaglandinas endógena (producidas por el propio ovario). Dada la aditividad de efectos inhibitorios observada entre el ibuprofeno y el Roundup, es plausible proponer que el Roundup podría unirse al receptor de prostaglandinas, desencadenando un efecto inhibitorio sobre la hormona, o bien que el herbicida inhiba algún paso en la vía de transducción hormonal de las prostaglandinas. Más aún, los

efectos inhibitorios observados por exposición a glifosato, tales como el descenso del nivel Vg y de la síntesis proteica observada *in vitro*, y el menor crecimiento gonadal observado *in vivo* a los 90 días, podrían deberse, al menos en parte, al efecto inhibitorio del Roundup sobre la acción de las prostaglandinas.

La literatura que indaga acerca de los posibles efectos del glifosato y sus formulados sobre la vía de las prostaglandinas es relativamente reciente y acotada respecto de la que se encuentra para otras hormonas, como por ejemplo las esteroideas. Astiz *et al.* (2012) observaron a mediano término, en ratas macho inyectadas por vía intraperitoneal con una mezcla de glifosato en conjunto con el insecticida orgnofosforado dimetoato y con el fungicida zineb, que aumentó el nivel de prostaglandinas en homogenato de cerebro. Sin embargo, en líneas celulares de endometrio de vaca se observó a las 48 hs de exposición, que tanto el glifosato como el Roundup disminuyeron la secreción de prostaglandinas (Wrobel, 2018).

CAPÍTULO III:

Evaluación *in vivo* e *in vitro* del efecto del herbicida glifosato sobre la maduración testicular y el control endocrino de la espermatogénesis en machos adultos de *N. granulata*

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar, mediante ensayos *in vivo*, si la exposición a glifosato de machos adultos de *N. granulata* causa alteraciones sobre la producción y/o la viabilidad espermática, o sobre la morfología y/o la funcionalidad del vaso deferente.
- Determinar, mediante ensayos *in vitro*, si los cambios en la funcionalidad y/o morfología gonadal se deben a la interferencia en la señalización de la hormona de la glándula androgénica.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Animales

Se utilizaron ejemplares macho de *N. granulata*, de 15 g de peso promedio, recolectados en el cangrejal ubicado en Punta Rasa, Bahía de Samborombón (Buenos Aires, Argentina). La aclimatación, alimentación y mantenimiento de los animales en el laboratorio se realizó conforme a los procedimientos descriptos en la sección 1.1.

3.2 Herbicidas

Las soluciones de Roundup Ultramax® y de glifosato puro utilizadas en los ensayos se prepararon tal como se describe en la sección 1.2.

3.3 Reconocimiento histológico de los órganos del sistema reproductor

3.3.1 Testículos y vasos deferentes

Para poder determinar las variables que permitieron evaluar el efecto del herbicida sobre la funcionalidad y morfología del sistema reproductor, se observó en primer lugar la anatomía interna e histología gonadal. Para ello, se sacrificaron por crioanestesia animales a los que se les separó cuidadosamente el caparazón con ayuda de una tijera de disección. Meticulosamente, se separó primero el hepatopáncreas y demás componentes del sistema digestivo, para finalmente ubicar los testículos, con cuidado de no desgarrarlos. Éstos poseen una apariencia de tubos blanquecinos muy delgados y enrollados. Con ayuda de una pinza de disección, se fue abriendo camino hacia los vasos deferentes,

estructuras más conspicuas y blanquecinas, con mayor contenido. Una vez que se llegó a la coxa, se cortó el extremo del deferente con tijera de disección y tanto los testículos como los vasos deferentes fueron fijados en solución de Bouin (sección 1.7), durante 4 hs. Luego de ese tiempo, se descartó el fijador y se reemplazó con etanol 70%. Posteriormente, se realizó el protocolo histológico (sección 3.4) adecuado para las muestras, con el fin de obtener un seriado que permitiera identificar y diferenciar histológicamente el testículo, y las porciones proximal y media del vaso deferente. Las coloraciones utilizadas fueron Tricrómico de Masson, tinción de ácido periódico de Schiff (PAS), o tinción de Alcian Blue. Los preparados se observaron al microscopio óptico.

3.3.2 Glándula androgénica

La glándula androgénica de *N. granulata* fue localizada bajo lupa, mediante una observación detallada de los vasos deferentes. Para esto, se sacrificaron machos por crioanestesia y se cortó por la línea media ventral con la ayuda de pinzas de disección, cortando luego el exoesqueleto ubicado alrededor de la coxa del quinto par de patas. Con la ayuda de agujas de disección se fue retirando con sumo cuidado el exoesqueleto y los tejidos muscular y grasa circundantes. Una vez que se visualizó el vaso deferente distal, se continuó el recorrido del mismo en dirección a la coxa, hasta ubicar la glándula androgénica. La última porción del vaso deferente conteniendo la glándula se fijó en solución de Bouin, para

realizar posteriormente el procesamiento histológico de rutina (sección 3.4), con el fin de obtener un seriado y confirmar la presencia de la misma.

3.4 Protocolos histológicos

3.4.1 Protocolo de inclusión en parafina

Los vasos deferentes fijados en solución de Bouin se deshidrataron con etanol (EtOH) en graduación creciente:

EtOH 70%, 40 min.

EtOH 90%, 40 min.

EtOH 96%, 40 min.

EtOH absoluto, 20 min.

Xilol, dos cambios de 5 min.

Para los testículos, se siguió la misma sucesión de alcoholes, pero con un tiempo de 10 minutos para cada etanol (una sola vez cada graduación), y de 1 minuto para el xilol.

Luego se procedió con la inclusión de los vasos deferentes en parafina Paraplast (Leica Biosystems), durante 6 hs, a 80 °C en estufa, realizando un cambio de parafina a las 3 hs. En el caso del testículo, el tiempo de inclusión fue de 1 hora.

Una vez solidificada la parafina, se tallaron los tacos y se cortaron secciones transversales de 7 µm de espesor en un micrótopo rotacional (Leica RM2125 RTS). Los cortes se colocaron en portaobjetos con albúmina para mejorar la

adherencia a los mismos. Luego se realizó la desparafinación e hidratación de los cortes, y posteriormente la coloración correspondiente.

3.4.2 Coloración Tricrómico de Masson

Se efectuó el siguiente protocolo:

Hematoxilina, 8 min.

Lavado con agua corriente, 1 min.

Lavado con agua destilada, 1 min.

Fucsina Ponceau de xilidina, 45 seg.

Lavado con agua destilada, 1 min.

Ácido fosfomolibdico, 5 min.

Azul de anilina, 5 min.

3.4.3 Coloración de ácido periódico de Schiff (PAS)

Ácido periódico 0,5%, 8 min

Lavado con agua destilada

Reactivo de Schiff, 7 min

Lavado con agua tibia

Hematoxilina de Carazzi, 2 min

Viraje en agua destilada

3.4.4 Coloración Alcian Blue

Azul de Alcian pH= 3,5; 15 seg

Lavado con agua destilada

Hematoxilina de Carazzi, 5 min

Lavado con agua corriente

3.4.5 Coloración PAS/Alcian Blue

Azul de Alcian pH=3,5; 15 seg

Lavado con agua destilada, 1:30 min, dos veces.

Oxidación con ácido periódico, 8 min

Lavado con agua destilada, 3 min

Reactivo de Schiff, 7 min

Lavado con agua destilada, 1:30 min, dos veces.

3.5 Ensayo *in vivo* para la evaluación del posible efecto del Roundup y su principio activo sobre la maduración testicular

Con el objetivo de evaluar si el Roundup y su principio activo causan alteraciones sobre la función del testículo y de los vasos deferentes, se realizó un ensayo *in vivo* durante el período pre-reproductivo, en el cual se expusieron machos (n= 15) a los siguientes tratamientos: Control (agua de dilución), glifosato puro 1 mg/L, y Roundup 1 mg/L. A tal efecto, los animales fueron aislados en recipientes de vidrio con agua salina (12 g/L), y se aplicó la misma metodología que en el ensayo *in vivo* con hembras (sección 1.3). Previo al comienzo del ensayo, los animales fueron pesados en una balanza de precisión ($\pm 0,01$), se les extrajo hemolinfa, y se los asignó al azar a uno de los tratamientos. Durante los 30 días que comprendió el experimento, se registraron las eventuales mudas y muertes, se alimentó a los animales *ad libitum* con alimento balanceado suplementando con *Elodea* sp., y el agua de

todos los recipientes fue recambiada cada 72 hs (diseño semi-estático). Al término de ensayo se registró nuevamente el peso de los animales, se les extrajo hemolinfa, se los sacrificó mediante crioanestesia, y se disecó el hepatopáncreas, que al igual que la hemolinfa, fue almacenado a -80 ° C en PBS 1X para la posterior determinación de los niveles de Vg, según el protocolo descrito en la sección 1.6.4. Los músculos de las quelas se almacenaron en PBS 1X a -80 °C para luego realizar los protocolos de medición de los niveles de reservas energéticas (lípidos, proteínas, glucógeno), en conjunto con la medición de la glucemia (sección 1.6). Se calculó la ganancia en peso (GP), como:

$$GP = [(peso\ final - inicial) / peso\ inicial] * 100$$

Posteriormente, se disecaron los testículos y los vasos deferentes, que fueron fijados en solución de Bouin, y luego procesados mediante el protocolo histológico de rutina (sección 3.4), utilizando como coloración hematoxilina-eosina. Se estimaron las siguientes variables: proporción de espermátóforos anormales, número (nº) de espermatozoides por espermátóforo y diámetro de los espermátóforos. La metodología para la estimación de estas variables se detalla en la siguiente sección (3.6).

3.6 Medición de las variables histológicas

Para realizar el conteo de los espermatozoides se utilizó el programa Image J 1.51h (Wayne Resband, National Institutes of Health, USA). Las fotografías se tomaron con una cámara digital de 8 megapíxeles (Apple Inc.), se convirtieron a

8 bits, y se ajustó el color de fondo. Luego se utilizó la herramienta *Adjust Threshold* para ajustar los parámetros de la imagen de manera de lograr la mejor resolución de las partículas. Se contaron los espermatozoides contenidos en los espermátóforos presentes en 3 campos al azar. Para realizar la medición del área de los espermátóforos, se configuró la escala para convertir los píxeles a micrómetros, y luego se procedió a marcar el perímetro de cada espermátóforo para que puedan ser analizados por el programa. Se midieron un total de 30 por individuo.

En el caso de la proporción relativa de espermátóforos anormales, se realizó el recuento al microscopio óptico (Olympus CX31), en 3 campos independientes para cada individuo.

3.7 Ensayo *in vivo* para la determinación de la viabilidad espermática

Con el objetivo de determinar si el Roundup causa una mortalidad significativa en los espermatozoides, respecto de los animales no tratados, se realizó un segundo ensayo *in vivo* de un mes de duración, durante el período reproductivo (a fin de garantizar el contenido espermático suficiente para realizar la determinación). Previo al inicio del experimento, se pesaron los animales en una balanza de precisión ($\pm 0,01$), y se asignaron al azar 10 animales a cada tratamiento: Control (agua salina 12 g/L), Roundup 1 mg/L (en agua salina de dilución). Durante el ensayo se siguió el protocolo de condiciones de mantenimiento de los animales (recambio de agua, alimentación, condiciones

ambientales) detallado en la sección 1.3. Al finalizar el ensayo, se registró el peso de los machos y se sacrificaron por crioadestesia. Rápidamente, se realizó la disección de los vasos deferentes cortando con tijera de punta fina alrededor del caparazón, y levantándolo suavemente; se retiró el aparato mandibular y el hepatopáncreas, a fin de localizar los vasos deferentes y preservarlos de la acción de las enzimas hepatopancreáticas. El testículo y vaso deferente derechos se destinaron a la determinación de viabilidad espermática por fluorescencia mediante la tinción con las sondas Sybr®/ioduro de propidio (sección 3.8). El testículo y vaso deferente (proximal y medio) izquierdos se retiraron y se pesaron para determinar el índice vasosomático izquierdo (IVSI):

$$\text{IVSI} = [(\text{peso testículo} + \text{VD}) / \text{peso del animal}] * 100.$$

Una vez registrado el peso, este material se fijó en solución de Boiun para posteriormente observar cualitativamente las secreciones por medio de la tinción PAS/Alcian Blue (sección 3.4.5).

3.8 Determinación de la viabilidad espermática por fluorescencia

Del lado derecho del animal, se disecó el testículo y una porción del vaso deferente (VD) de 5 mm (medida con calibre, precisión $\pm 0,02$ mm), a fin de estandarizar dicha porción, incluyendo de esta manera para la determinación, el VD proximal y una porción del VD medio. Se cortó el vaso deferente con la ayuda de una tijera de disección y una pinza de punta fina, y se lo colocó en un tubo *ependorf* con 200 μL de *buffer* PBS 1X a temperatura ambiente. Se dio

tiempo (máximo 4 min) a que el vaso deferente descargara su contenido en el *buffer* por diferencia de presión, y se retiró con una pinza lo que quedara de la pared del vaso, a fin de evitar la presencia de restos de tejido en la solución espermática.

El contenido espermático se homogenizó en el tubo, utilizando un émbolo de teflón, para favorecer que se desarmara la pared de los espermátóforos (con cuidado de no excederse en la presión para no disgregar los espermatozoides). Inmediatamente, se procedió con el protocolo adaptado de Wolcott *et al.* (2005), para tinción doble con las sondas fluorescentes Sybr/ioduro de propidio. Se agregó a cada tubo 1 μL de una solución de Sybr diluída 1:10 en dimetilsulfóxido anhidro (Anedra) y se dejó reaccionar en oscuridad por 5 min. A continuación, se agregó al mismo tubo 1 μL de una solución de ioduro de propidio diluída 1:20 en PBS 1X, y nuevamente se dejó reaccionar por 5 min en oscuridad. Una vez transcurrido ese tiempo se diluyó la solución espermática al doble con PBS 1X, y en condiciones de oscuridad se realizó un *squash* sobre portaobjetos de vidrio.

El Sybr (Sybr Safe DNA Gel Stain, concentración 10000X, Invitrogen, ThermoFisher Scientific) tiene asociada una longitud de onda máxima de excitación de 502 nm, y una de emisión a 530 nm; y posee la capacidad de atravesar las membranas celulares íntegras. El ioduro de propidio

(concentración 1 mg/mL, ThermoFisher Scientific) posee una longitud de onda máxima de excitación a 535 nm, y una de emisión a 617 nm, y desplaza al Sybr de las células muertas, ya que es permeable sólo a través de membranas que perdieron su integridad. Debido a esto, se observaron las células muertas fluorescer en rojo, y las vivas en verde.

Se realizó el conteo de espermatozoides vivos y muertos sobre 500 totales, observando en un microscopio de fluorescencia (Axioplan Zeiss), en campo oscuro. Se calculó la proporción de espermatozoides (spz) muertos sobre el total:

$$\text{Proporción spz muertos} = (\text{spz muertos} / \text{total spz}) \times 100$$

3.9 Ensayo *in vitro* para la evaluación del posible efecto del Roundup como desorganizador endocrino sobre la vía de señalización de la hormona de la glándula androgénica

Para evaluar el posible efecto del Roundup sobre el control de la maduración gonadal ejercido por la hormona de la glándula androgénica, se realizó un ensayo *in vitro*, durante el período reproductivo. Para ello, se pesaron machos de *N. granulata* en una balanza analítica ($\pm 0,01$), y se sacrificaron por crioplanesia. Siguiendo la metodología descrita en la sección 3.5, se disecaron de cada animal (n= 12) ambos testículos (T) y vasos deferentes (proximal y medio), los cuales se expusieron a los siguientes tratamientos: Control; Roundup 1 mg/L; Glándula androgénica; Roundup 1 mg/L en presencia de la glándula androgénica. Debido a la fragilidad del tejido y a la facilidad del vaso

deferente disecado de perder el contenido espermático (lo cual fue observado en ensayos preliminares), la asignación del material biológico (Figura 3.1) se diseñó de la siguiente manera: de un mismo animal elegido al azar, un testículo y su vaso deferente se asignaron al control, y los contralaterales al tratamiento con Roundup; y de otro animal elegido al azar, un testículo y su VD fueron asignados al tratamiento con glándula androgénica, y los contralaterales al tratamiento con Roundup + glándula androgénica (diseño de bloques incompletos balanceados). Cada uno de estos últimos dos tratamientos recibió, de parte de los mismos animales donantes, la porción terminal del VD distal conteniendo una glándula androgénica, acompañado de una pequeña porción del tejido muscular circundante y del exoesqueleto de la coxa, a fin de mantener la integridad funcional y estructural de la glándula. Una porción similar de estos tejidos, pero sin glándula androgénica, se agregó al grupo control y Roundup (a modo de mantener las mismas condiciones para todos los tratamientos). El vehículo utilizado para administrar Roundup (20 μ L agua destilada) también estuvo presente en todos los tratamientos.

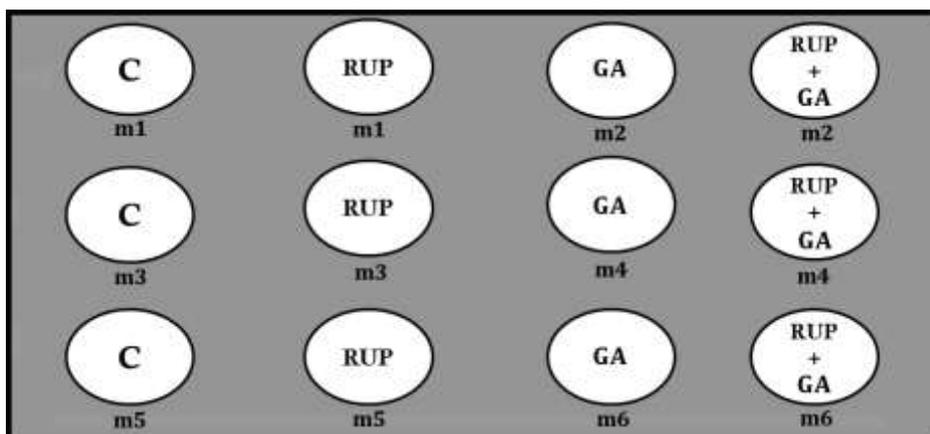


Figura 3.1. Asignación de los tratamientos del ensayo *in vitro*, ejemplificado para una placa de 12 pocillos. Cada tratamiento (n= 12) recibió un testículo y su vaso deferente, con o sin glándula androgénica, según correspondiese. C: control, RUP: Roundup 1 mg/L, GA: glándula androgénica, m: macho.

Los órganos y tejidos se incubaron durante 18 hs a 27 °C en estufa con atmósfera de CO₂ al 5% (según se encuentra detallado en la sección 2.3.1), utilizando placas de 12 pocillos conteniendo medio de cultivo M199. Además, los órganos fueron ubicados sobre pequeñas redcillas estériles que se incorporaron dentro de cada pocillo, a fin de que los mismos tuvieran cierta contención durante la incubación, y pudieran recuperarse fácilmente al finalizar el ensayo. Al término del mismo, los testículos y VD se fijaron en solución de Bouin y se procedió con el protocolo histológico de rutina para realizar la coloración con hematoxilina-eosina (sección 3.4), con el fin de analizar las variables histológicas (sección 3.6).

3.10 Análisis estadístico

El estudio de las comparaciones entre medias de cada tratamiento fue realizado como se indica en la sección 1.8 en el caso de los ensayos *in vivo*, y en la sección 2.4 en el caso del ensayo *in vitro*.

RESULTADOS

- **Histología del sistema reproductor**

Vaso deferente y testículo

El vaso deferente proximal (Figura 3.2) posee una pared gruesa con células secretoras. En esta zona del VD se comienzan a formar los espermátóforos, por lo cual se observan aún espermatozoides libres en varias zonas del mismo.

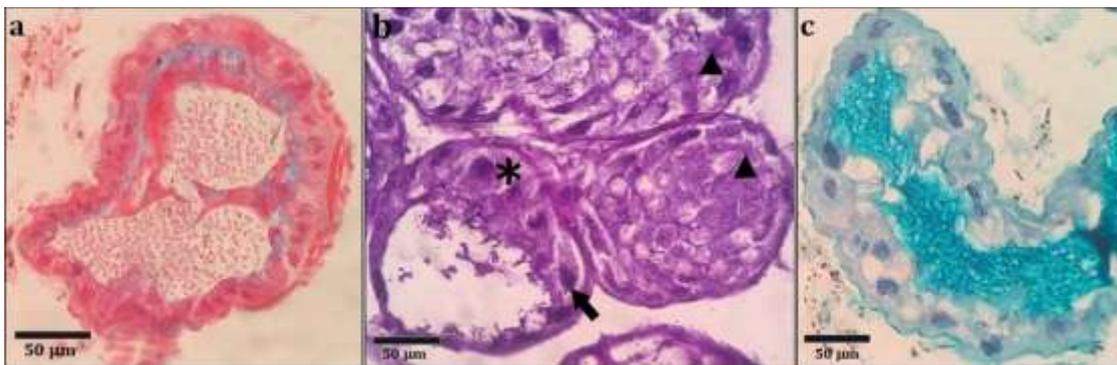


Figura 3.2. Vasos deferentes de *N. granulata*, vistos al microscopio óptico. (a) Corte transversal en el que se observa la pared del vaso con células secretoras con núcleos grandes. En la luz del vaso se encuentran espermátóforos conteniendo espermatozoides. Coloración: tricrómico de Masson. (b) Corte transversal (marcado con asterisco), en el que se observan algunos espermatozoides aún no empaquetados en espermátóforos. La flecha indica el núcleo de una célula secretora. Los triángulos indican cortes longitudinales de la pared, en los cuales se pueden observar abundantes células secretoras. Coloración: hematoxilina-eosina. (c) Corte longitudinal, en que se puede observar en el interior del vaso espermatozoides inmersos en secreciones. Coloración: Alcian Blue con contraste de hematoxilina.

El vaso deferente medio presentó un contenido abundante de espermátóforos, que se aprecian como estructuras de forma elipsoide, y llenas de espermatozoides. Esta porción posee una pared más delgada que la del vaso deferente proximal, como se observa en la Figura 3.3:

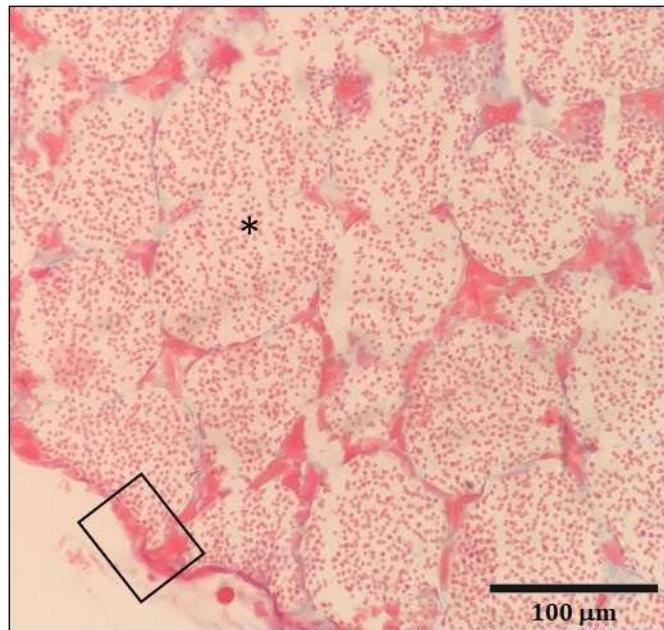


Figura 3.3. Vaso deferente medio de *N. granulata*, visto al microscopio óptico. Con un rectángulo se encuentra resaltada una zona de la pared, la cual es considerablemente más delgada que la del vaso deferente proximal. Con un asterisco se encuentra indicado un espermatóforo, que abundan en esta zona del vaso, los cuales encierran a los espermatozoides (que se observan como pequeños puntos en la imagen). Coloración: tricrómico de Masson.

El vaso deferente distal presentó varios ciegos, cuya pared está formada por un epitelio cúbico simple, rodeado de conectivo y fibras musculares. En el corte histológico mostrado en la Figura 3.4, se observan dos ciegos en corte transversal, y uno en corte longitudinal:

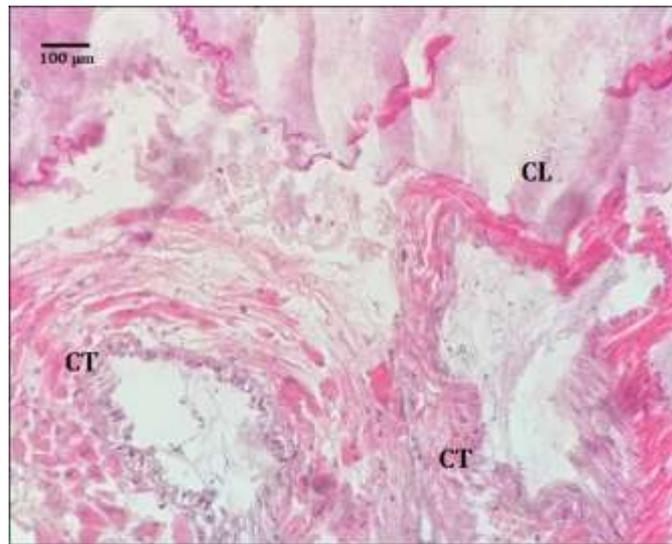


Figura 3.4. Fotografía de un vaso deferente distal de *N. granulata*, visto al microscopio óptico. Se observan dos ciegos en corte transversal (CT) y un ciego en corte longitudinal (CL). Coloración: hematoxilina-eosina.

En la siguiente figura, se observan tres secciones de un seriado de testículo, en el que se puede apreciar, de anterior a posterior, cómo la pared con células secretoras de núcleos grandes se vuelve más delgada, y a la vez va aumentando el diámetro del testículo. En las tres secciones se observan espermatozoides:

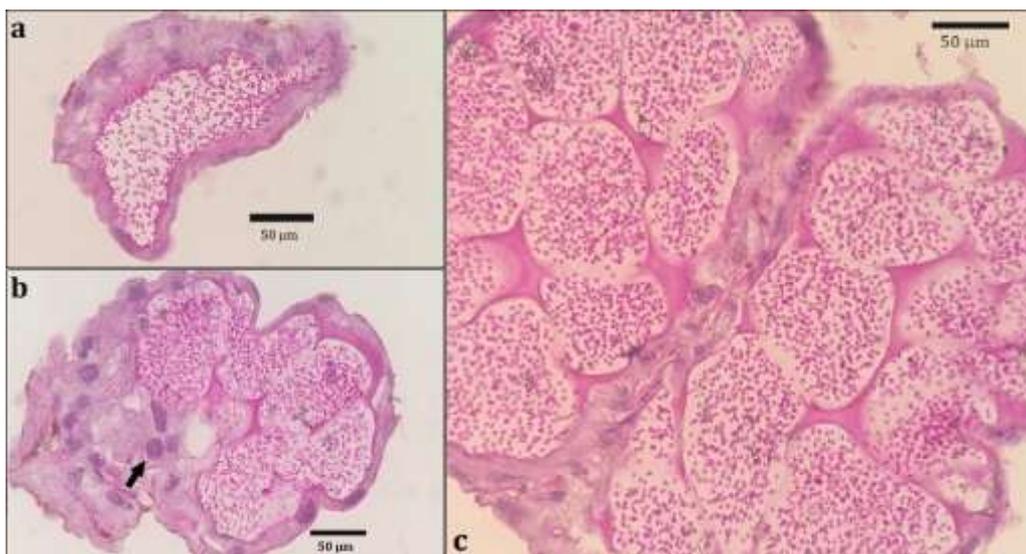


Figura 3.5. Testículo de *N. granulata* visto al microscopio óptico. Las secciones a, b y c corresponden a la progresión en un seriado de anterior a posterior. Se observan espermatozoides dentro del testículo. La flecha indica el núcleo de una célula secretora. Coloración: PAS con contraste de hematoxilina.

Glándula androgénica

La glándula androgénica, un órgano par, se observó como una estructura difusa alargada, cada una conectada frágilmente a la porción terminal del vaso deferente distal, entre los ciegos y la coxa (Figura 3.6). En la Figura 3.7 se muestra un corte histológico al microscopio óptico de la glándula androgénica, donde se observan células que presentan un núcleo grande, típico de una estructura secretora.

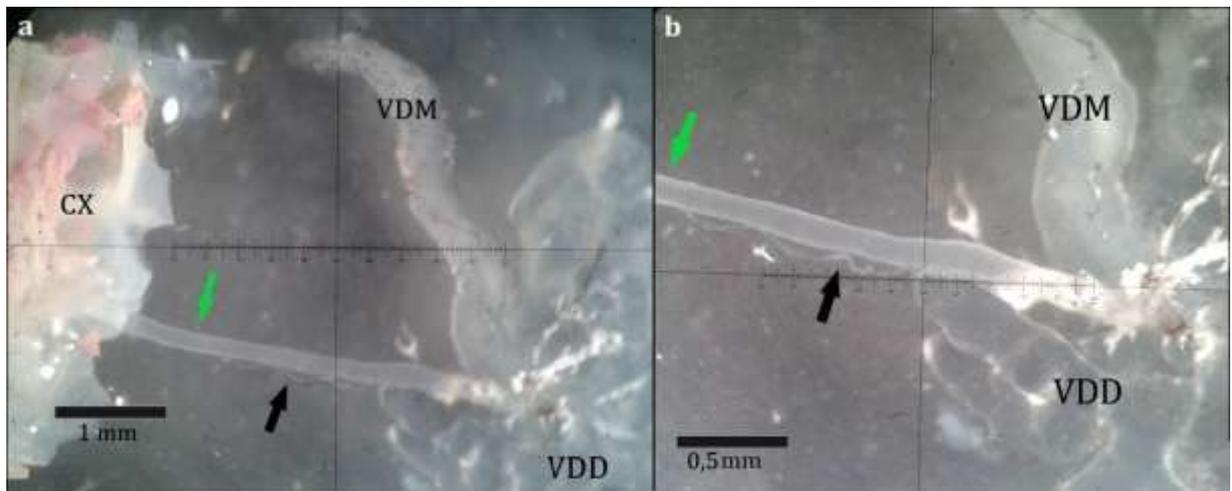


Figura 3.6. Ubicación de la glándula androgénica de *N. granulata* vista a la lupa. La flecha negra indica la glándula androgénica, que se observa como una estructura difusa alargada. La flecha verde indica la porción sub-terminal del ducto espermático. CX: exoesqueleto y músculo que rodean la coxa, VDM: vaso deferente medio, VDD: ciegos del vaso deferente distal.



Figura 3.7. Glándula androgénica (GA) de *N. granulata* vista al microscopio óptico. VDD: vaso deferente distal. Coloración: hematoxilina-eosina.

- **Ensayo *in vivo* para la evaluación del posible efecto del Roundup y su principio activo sobre la maduración gonadal**

Sobrevida, muda y reservas energéticas

El porcentaje de muda y la mortalidad no mostraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre el control y los tratados. La ganancia en peso fue significativamente menor ($p < 0,05$) tanto con Roundup 1 mg/L, como con glifosato 1 mg/L, respecto del control (Figura 3.8)

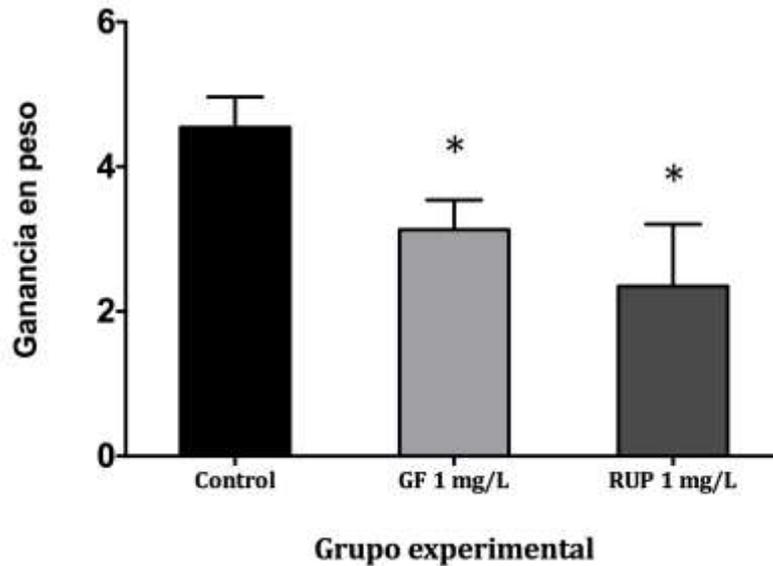


Figura 3.8. Ganancia en peso de los animales control, y de los expuestos *in vivo* a glifosato puro (GF) 1 mg/L y a Roundup (RUP) 1 mg/L. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al control.

El índice hepatosomático de ambos grupos tratados con herbicida no fue diferente del control ($p > 0,05$), como se observa en la Figura 3.9:

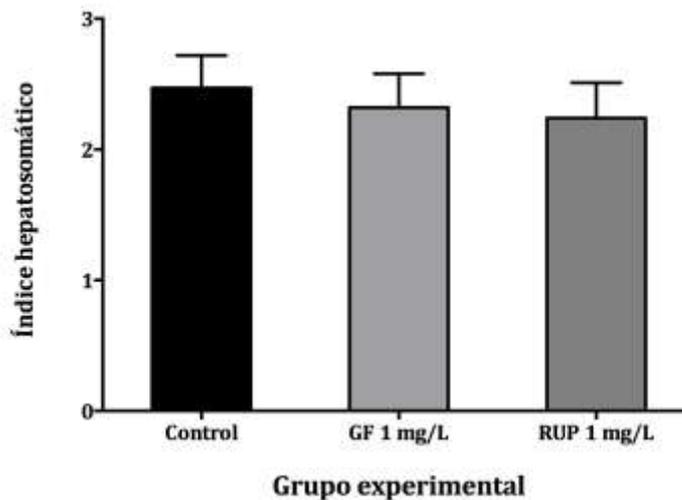


Figura 3.9. Índice hepatosomático del control y de los tratamientos glifosato puro (GF) 1mg/L y Roundup (RUP) 1 mg/L, en el ensayo *in vivo*.

En cuanto al nivel de glucosa en hemolinfa, si bien no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$), en ambos tratamientos la glucemia tendió a aumentar, con respecto al control (Figura 3.10).

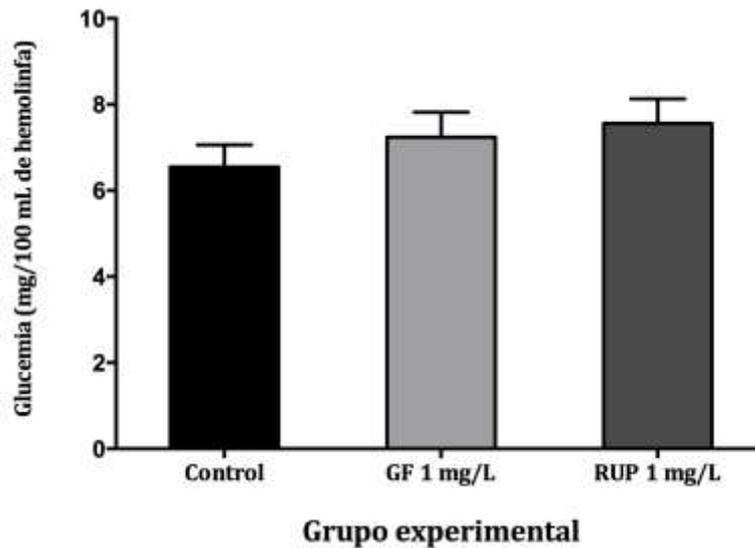


Figura 3.10. Glucemia (mg glucosa/100 mL hemolinfa), de los animales control, y de los expuestos *in vivo* a glifosato puro (GF) 1 mg/L, o Roundup (RUP) 1 mg/L.

El nivel de lípidos en el músculo (Figura 3.11) de los grupos tratados no fue estadísticamente diferente del nivel control ($p > 0,05$).

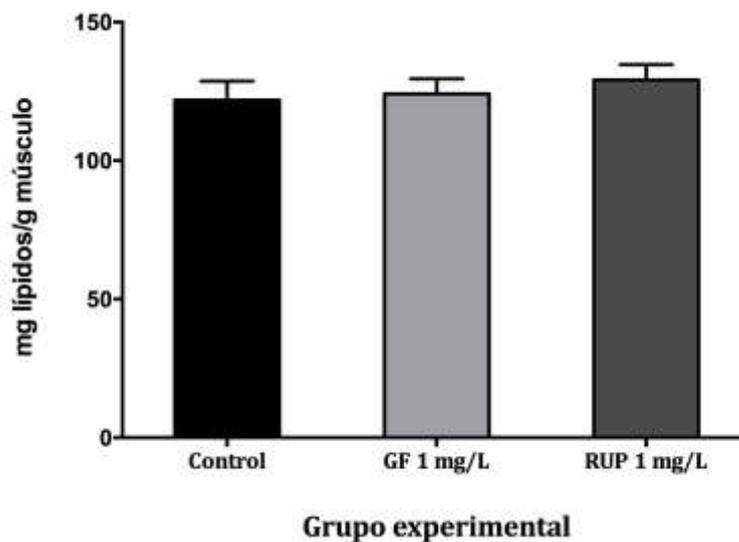


Figura 3.11. Nivel de lípidos en músculo (mg lípidos/g músculo), de los animales control, y de los expuestos *in vivo* a glifosato puro (GF) 1 mg/L o Roundup (RUP) 1 mg/L.

En ambos tratamientos, sin embargo, el nivel de glucógeno en el músculo (Figura 3.12) aumentó significativamente ($p < 0,05$) con respecto al grupo control, mientras que, tanto con el herbicida formulado como con el principio activo, el

nivel de proteínas en el músculo disminuyó significativamente ($p < 0,05$) con respecto al control (Figura 3.13).

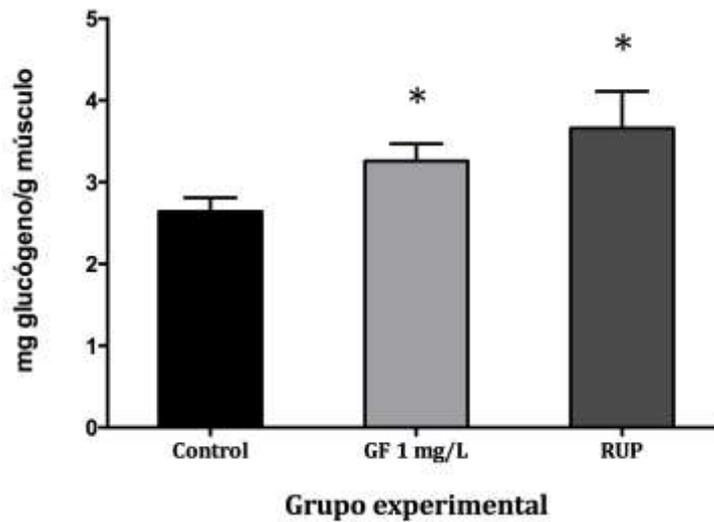


Figura 3.12. Nivel de glucógeno en músculo (mg glucógeno/g músculo), de los animales control, y de los expuestos *in vivo* a glifosato puro (GF) 1 mg/L o Roundup (RUP) 1 mg/L. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al grupo control.

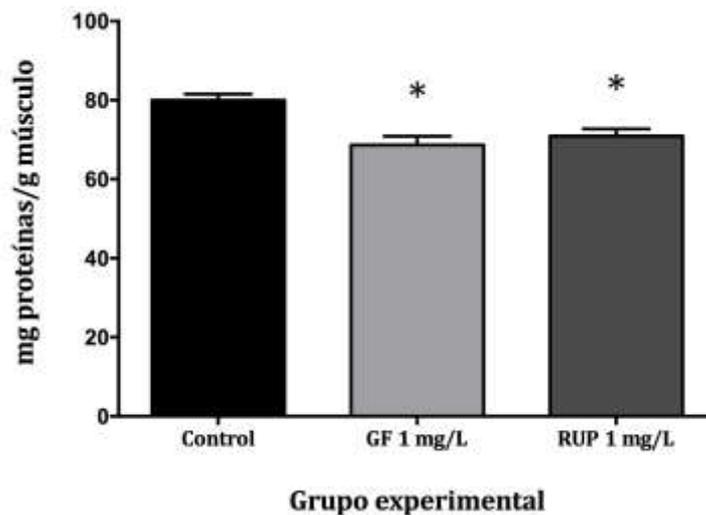


Figura 3.13. Nivel de proteínas en músculo (mg proteínas/g músculo), de los animales control, y de los expuestos *in vivo* a glifosato puro (GF) 1 mg/L o Roundup (RUP) 1 mg/L. Los asteriscos indican diferencias significativas ($p < 0,05$), con respecto al grupo control.

Contenido de vitelogenina

El contenido de vitelogenina, tanto en el hepatopáncreas (Figura 3.14) como en la hemolinfa (Figura 3.15) de los machos, fue detectable mediante la técnica de

ELISA. Si bien no se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) en comparación al control, ni en el tratamiento con Roundup, ni con glifosato puro, se observó en el hepatopáncreas una tendencia de aumento del nivel de Vg.

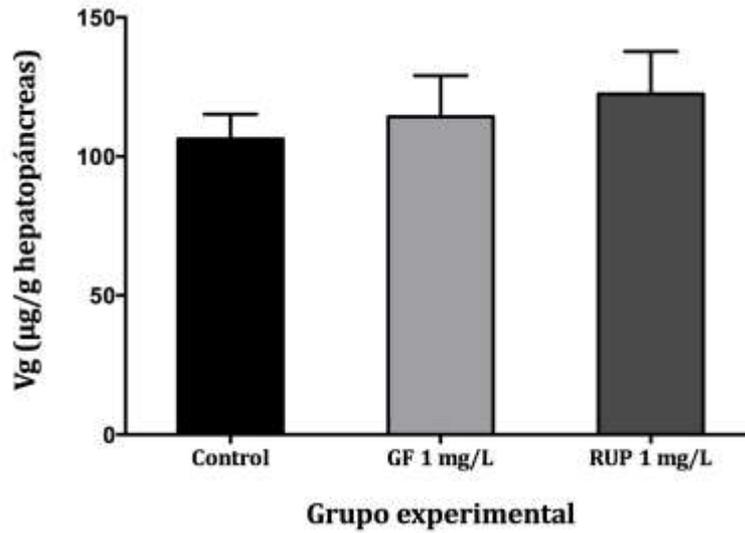


Figura 3.14. Nivel de vitelogenina en el hepatopáncreas ($\mu\text{g/g}$ hepatopáncreas) de los animales control, y de los expuestos *in vivo* a glifosato puro (GF) 1 mg/L o Roundup (RUP) 1 mg/L.

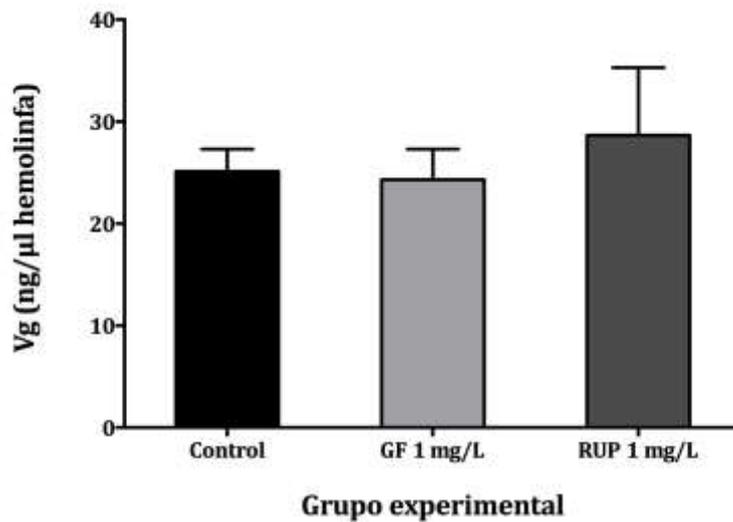


Figura 3.15. Nivel vitelogenina en la hemolinfia ($\text{ng}/\mu\text{l}$ hemolinfia) de los animales control, y de los expuestos *in vivo* a glifosato puro (GF) 1 mg/L o a Roundup (RUP) 1 mg/L.

Evaluación de la maduración gonadal y la presencia de patologías

La proporción relativa de espermátóforos anormales fue significativamente mayor en ambos tratamientos con respecto al control ($p < 0,05$), como se observa en la Figura 3.16.

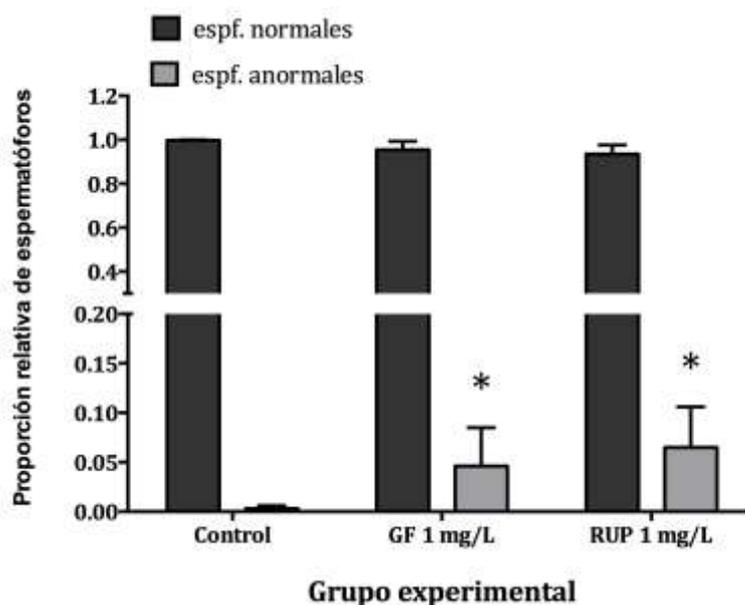


Figura 3.16. Proporción relativa de espermátóforos (espf.) normales y anormales en los grupos control, glifosato puro (GF) 1 mg/L, o Roundup (RUP) 1 mg/L, expuestos *in vivo*. Los asteriscos indican diferencias significativas con respecto al control ($p < 0,05$).

En la Figura 3.17(a) se muestra un vaso deferente perteneciente a un animal control, y en la Figura 3.17(b), un vaso deferente correspondiente a un animal expuesto, en éste último se observan espermátóforos con áreas concéntricas definidas desprovistas de espermatozoides.

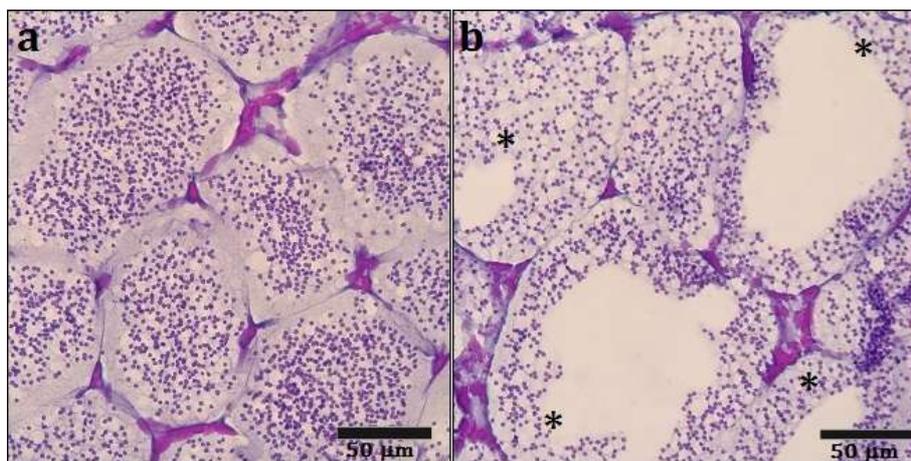


Figura 3.17. Fotografía de espermátóforos de vaso deferente medio de un animal control (a) y de otro tratado con Roundup 1 mg/L (b), en el ensayo *in vivo*. Los asteriscos indican los espermátóforos anormales.

En cuanto a la estimación del nº de espermatozoides por espermátóforo, se observa una disminución significativa ($p < 0,05$) en el grupo tratado con Roundup 1 mg/L respecto del control, como se observa en la Figura 3.18.

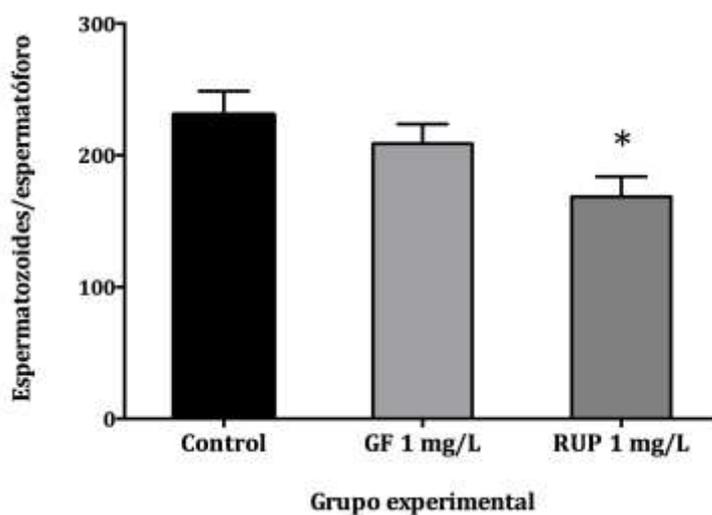


Figura 3.18. Número de espermatozoides por espermátóforo para los grupos Control, Glifosato puro (GF) 1 mg/L, Roundup (RUP) 1 mg/L, al finalizar el ensayo *in vivo*.

Por su parte, el área de los espermátóforos (Figura 3.19) fue similar entre los tratamientos y el control ($p > 0,05$).

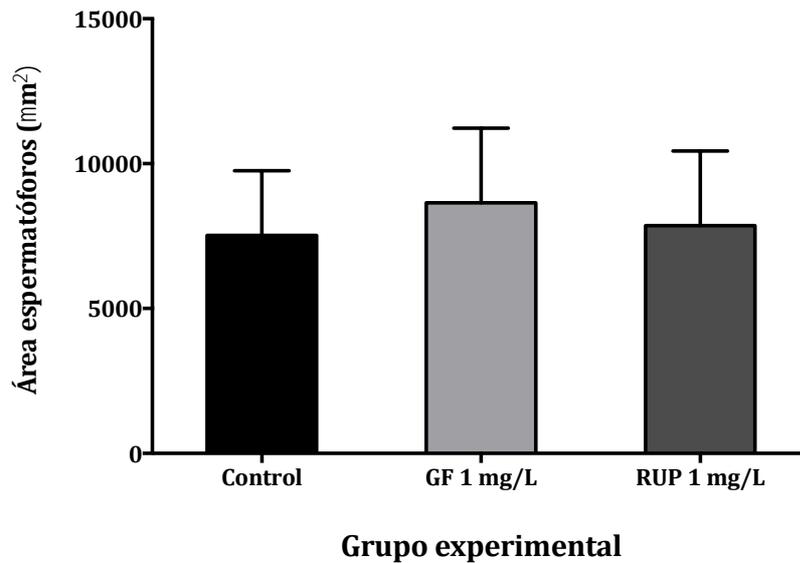


Figura 3.19. Área de los espermatozoides (μm^2) en los grupos control, glifosato puro (GF) 1 mg/L, y Roundup (RUP) 1 mg/L, expuestos *in vivo*.

- **Ensayo *in vivo* para la estimación de la viabilidad espermática**

Con el objetivo de evaluar si el menor número de espermatozoides por espermatozoides observado en el tratamiento con Roundup se debió a que el herbicida causaba una mayor mortalidad de espermatozoides, se determinó la viabilidad espermática (Figura 3.20). Si bien en el tratamiento con Roundup se observa una mayor mortalidad de los espermatozoides, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p > 0,05$). En la Figura 3.21(a) se observa un campo de un preparado con espermatozoides vivos perteneciente a un macho control, visto mediante el cubo de fluorescencia que excita la sonda Sybr; y en la Figura 3.21(b) se muestra el mismo campo con espermatozoides muertos, visto mediante el cubo de fluorescencia que permite excitar al yoduro de propidio. En la Figura 3.22 (a y b) se muestra lo mismo para un preparado perteneciente a un macho tratado con Roundup 1 mg/L.

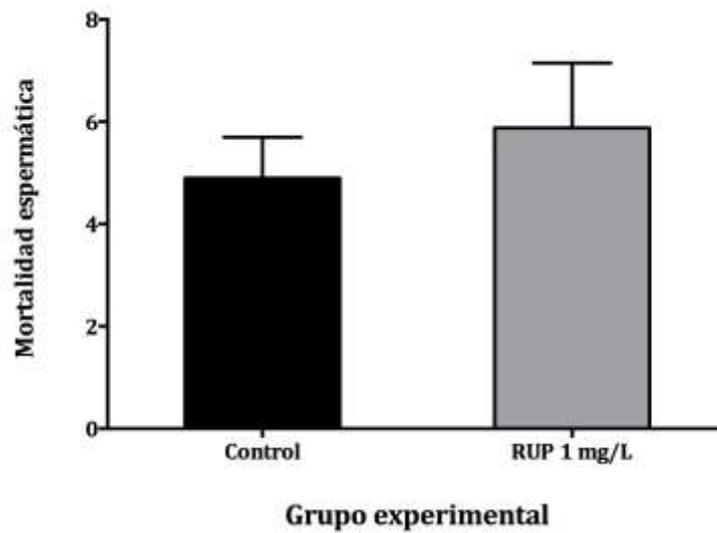


Figura 3.20. Mortalidad de espermatozoides (% espermatozoides muertos/total espermatozoides) en el grupo Control y tratado con Roundup (RUP) 1 mg/L, expuestos *in vivo* para la determinación de la viabilidad espermática.

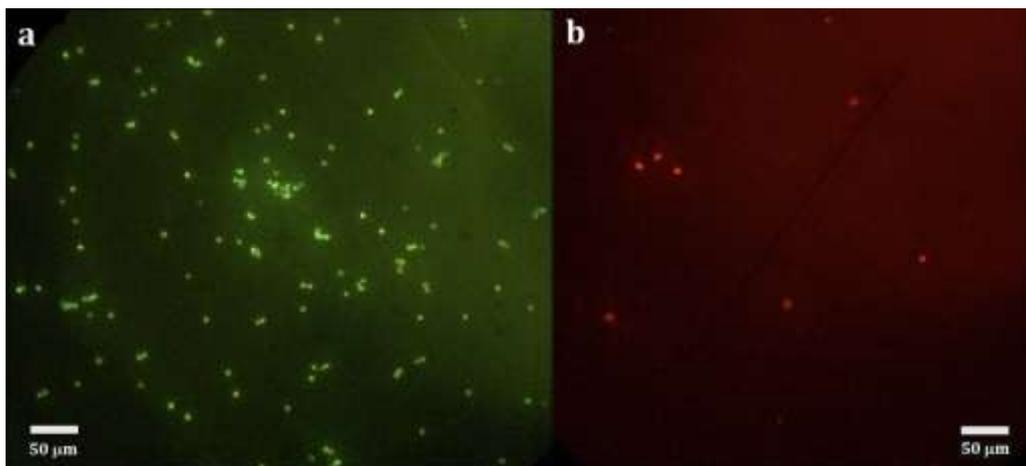


Figura 3.21. Fotografías de los espermatozoides de un macho control perteneciente al ensayo *in vivo* para la determinación de viabilidad espermática, vistos al microscopio de fluorescencia. (a) campo con espermatozoides vivos, coloreados con la sonda Sybr; (b) mismo campo que en "a", con espermatozoides muertos, coloreados con ioduro de propidio.

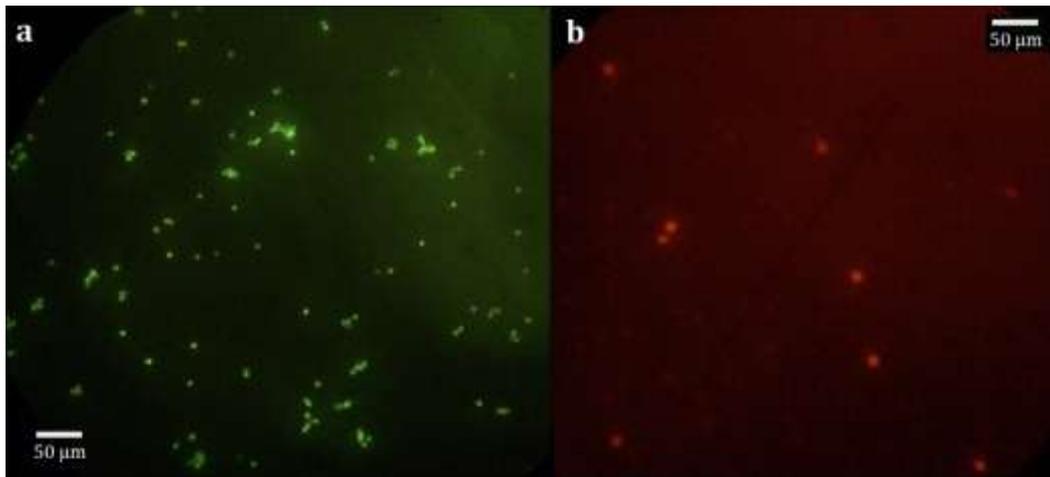


Figura 3.22. Fotografías de los espermatozoides de un macho expuesto a Roundup *in vivo* para la determinación de viabilidad espermática, vistos al microscopio de fluorescencia. (a) campo con espermatozoides vivos, coloreados con la sonda Sybr; (b) mismo campo que en "a", con espermatozoides muertos, coloreados con yoduro de propidio.

El índice vasosomático izquierdo (IVSI), no mostró diferencias significativas entre el grupo tratado y control ($p > 0,05$), como se observa en la Figura 3.23.

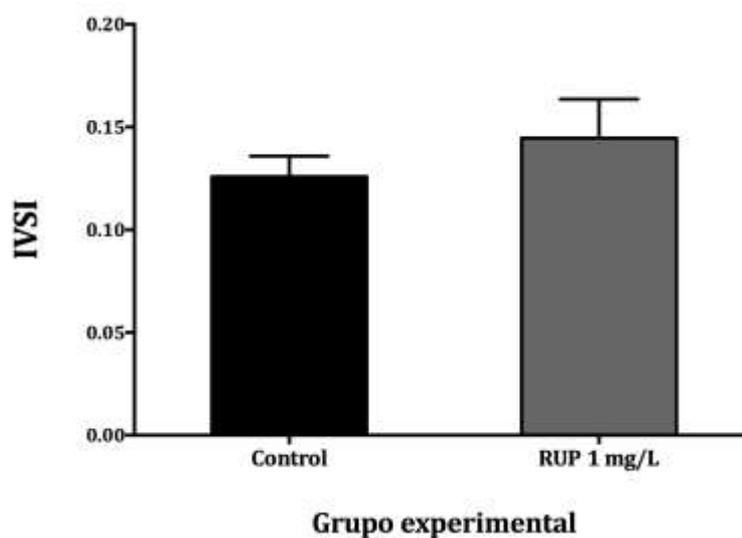


Figura 3.23. Índice vasosomático izquierdo (IVSI) del control y del grupo Roundup (RUP) 1 mg/L del ensayo *in vivo* para la determinación de viabilidad espermática.

En cuanto a la histología del vaso deferente medio, los espermatozoides fueron PAS positivos, así como la pared del vaso. Las secreciones fueron principalmente Alcian Blue positivas, lo cual indica la presencia de glicoconjugados ácidos. No se observaron cambios en esta coloración entre los

cortes histológicos de los animales que fueron expuestos al herbicida y los controles (Figura 3.24, a y b).

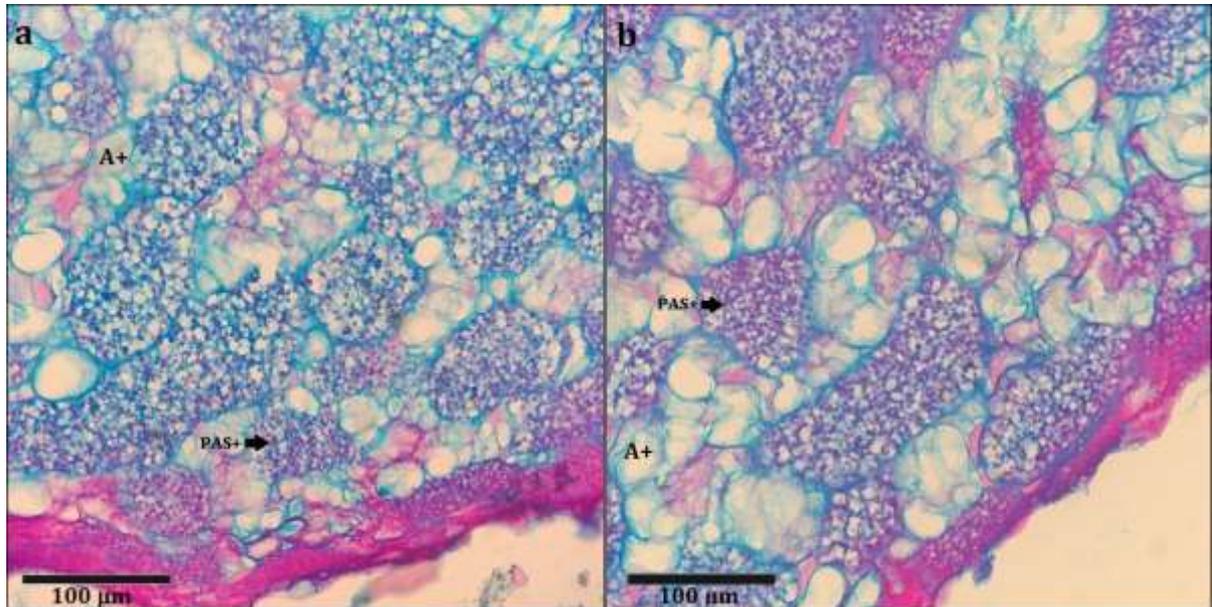


Figura 3.24. Vasos deferentes medios de *N. granulata* vistos al microscopio óptico. (a) Corte histológico correspondiente a un animal control. (b) Corte histológico correspondiente a un animal tratado con Roundup 1 mg/L. Coloración: PAS/Alcian Blue. Se encuentran indicados con una flecha los espermatozoides PAS positivos (PAS+). Las secreciones Alcian Blue positivas se encuentran indicadas con A+.

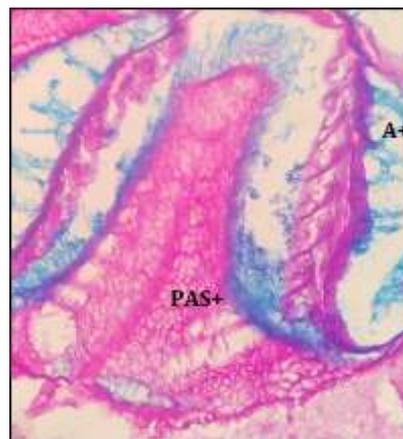


Figura 3.25. Control de la coloración Alcian/PAS. La fotografía corresponde a un corte de hepatopáncreas del camarón *Neocaridina davidi* (el tejido para la coloración fue cedido por la Lic. Ana Laura Tomas). Se encuentra indicada la zona del tejido PAS positiva (PAS+) correspondiente a la presencia de glicoconjugados neutros, y la Alcian Blue positiva (A+), correspondiente a glicoconjugados ácidos.

- Evaluación *in vitro* para la evaluación de la posible interferencia del Roundup y su principio activo sobre el control de la maduración gonadal ejercido por la hormona de la glándula androgénica

En el ensayo *in vitro* en el cual se expusieron los vasos deferentes a Roundup 1 mg/L, o a glándula androgénica, o a una combinación de ambos (Figura 3.26), se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) con respecto al control, en el nº espermatozoides/espermatóforo, en el tratamiento que sólo recibió Roundup 1 mg/L. A su vez, en el tratamiento que sólo recibió glándula androgénica, se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) de esta variable con respecto al control. Sin embargo, en el tratamiento con el herbicida formulado en presencia de la glándula androgénica, el nº espermatozoides/espermatóforo fue similar al control ($p > 0,05$).

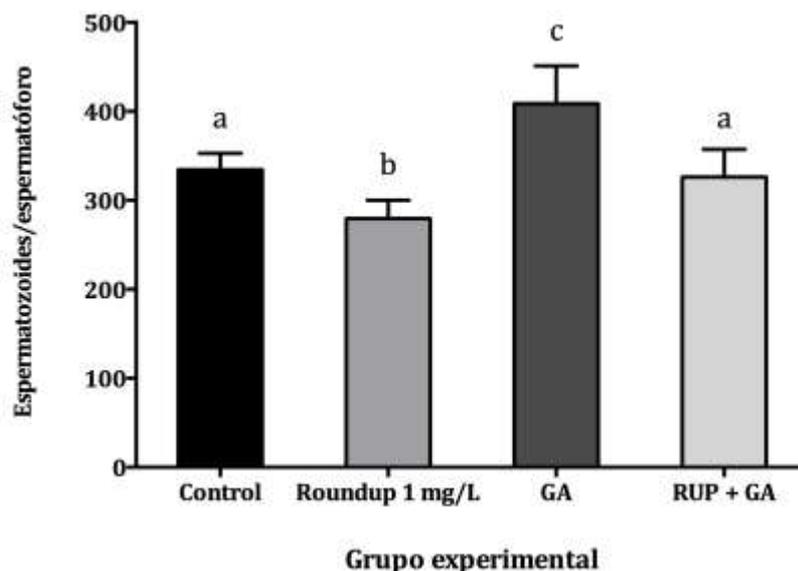


Figura 3.26. Número de espermatozoides totales/espermatóforo en los tratamientos Control, Roundup 1 mg/L, Glándula androgénica (GA), y Roundup 1 mg/L + glándula androgénica (RUP + GA), del ensayo *in vitro*. Letras distintas indican diferencias entre los grupos experimentales.

En este ensayo, al contrario de lo observado *in vivo*, no se registró la presencia de espermatozoides con anomalías. En cuanto al diámetro de los espermatozoides, no se observaron diferencias ($p > 0,05$) entre los tratamientos y el control (Control= $903,44 \pm 50,11 \mu\text{m}^2$; RUP= $1035,52 \pm 96,93 \mu\text{m}^2$; GA= $1270,16 \pm 152,89 \mu\text{m}^2$; RUP+AG= $1196,46 \pm 112,44 \mu\text{m}^2$). Tampoco se apreciaron cambios de coloración entre controles y expuestos a Roundup, en las secreciones del vaso deferente.

DISCUSIÓN

El sistema reproductor de los machos de crustáceos decápodos posee variaciones considerables en la anatomía general, histología y fisiología. Sin embargo, aspectos como la localización de los órganos, de la naturaleza de los espermátóforos, y la presencia de fecundación interna o externa son relativamente consistentes dentro de cada grupo, lo que podría ser indicativo de una especialización divergente (Cronin, 1947).

En *N. granulata*, los testículos no poseen la típica forma de "H" debida a la comisura que une ambos testículos, que en cambio sí se observa en otras especies de cangrejos, como en *Ucides cordatus* (Castilho *et al.*, 2008) y *Callinectes sapidus* (Nagaraju *et al.*, 2010). Los espermatozoides de *N. granulata* no poseen espinas (estructura que es muy útil para el investigador a la hora de evaluar anomalías en los espermatozoides por exposición a xenobióticos) a diferencia de otros grupos, como por ejemplo Caridea (camarones) y Astacidae (langostas). La pared del testículo está formada por un epitelio columnar alto, que suele ser característico de crustáceos (García y Silva, 2006). Un aspecto a destacar de especie en estudio, es la fragilidad y delgadez del testículo, a diferencia de otras especies (e.g. *Eriphia verrucosa* –Erkan *et al.*, 2009-; *Ranina ranina* –Minagawa *et al.*, 1994-) lo cual ha merecido un especial cuidado al momento de realizar las disecciones.

El vaso deferente de *N. granulata* presentó diferencias histológicas de la pared que permitieron reconocer fácilmente cada porción. El deferente proximal está compuesto por un epitelio columnar con abundantes células secretoras, lo que también es observado en otras especies de cangrejos (*Hinsch, 1988*). El deferente medio (VDM) está compuesto de un epitelio simple mucho más delgado, lo cual es observado en general en distintas especies, si bien hay casos en los que la pared del VDM es un poco más gruesa, como por ejemplo en *Ucides cordatus* (*Castilho et al., 2008*). El vaso deferente distal de la especie en estudio es fácilmente reconocible por los abundantes ciegos que forman parte de él, lo que facilitó la exclusión de los mismos al momento de realizar la disección para los ensayos. Histológicamente se pudo corroborar que posee una pared compuesta de un epitelio cúbico simple, rodeado de fibras musculares y tejido conectivo, como suele observarse típicamente en crustáceos (*Tropea et al., 2011*)

Hace 70 años, Cronin (1947) reportó por primera vez en la literatura una glándula específica de machos de crustáceos: describió la glándula androgénica (GA) en el cangrejo *Callinectes sapidus*. A partir de ese momento, fue descubierta en otras especies de crustáceos, incluyendo isópodos y decápodos (*Chung et al., 2011*). Las técnicas histológicas estándar han revelado que la glándula androgénica consiste en uno o varios cordones de células epiteliales unidos al vaso deferente posterior por medio de tejido conectivo, tales cordones pueden estar asociados a otras masas celulares, dependiendo de la especie (*Fowler y*

Leonard, 1999). En el cangrejo *Portunus pelagicus* la glándula androgénica se encuentra dispuesta en parches amarillentos compactos, adosados a la parte distal del ducto espermático y al conducto eyaculatorio, localizado a su vez entre el tejido muscular que acompaña al quinto par de patas (Sroyraya *et al.*, 2010). En el cangrejo *Scylla paramamosian*, perteneciente a la Familia Portunidae al igual que *P. pelagicus*, la GA también se presenta como una estructura compacta de más de 100 μm de diámetro, unida a la porción posterior del ducto espermático (Huang *et al.*, 2014). En cambio, en *N. granulata*, esta glándula se observó como una estructura difusa, delgada y alargada, de un poco más 50 μm de ancho en algunas secciones y débilmente unida a la porción subterminal del vaso deferente posterior. Esta anatomía de la GA, que no se presenta como la estructura conspicua que se observa en los portunidos y otros crustáceos, es similar a la del cangrejo *Pachygrapsus crassipes*, otra especie perteneciente a la superfamilia Grapsoidea. King (1964) la describió como un hilo largo y entrelazado, de 35-50 μm de diámetro, ubicada en la porción sub-terminal del ducto espermático, entre los músculos del coxopodito del quinto par de patas.

En la literatura se encuentran reportado que el glifosato ha causado alteraciones reproductivas en machos de distintas especies. En gasterópodos, se ha observado histológicamente la falta de estadios de la espermatogénesis y la disminución de testosterona en testículo (Omran y Salama, 2013). En *zebrafish*, Webster *et al.* (2014) encontraron cambios en la expresión de varias enzimas en

el testículo. En vertebrados, se ha observado en ratas la disminución de producción espermática (Dellagrave *et al.*, 2007) y la alteración de la progresión hacia la pubertad (Romano *et al.*, 2010).

Sin embargo, es relativamente escasa la bibliografía acerca del efecto del glifosato y otros contaminantes sobre la reproducción de machos de crustáceos, cuyo objetivo sea indagar sobre el efecto de éstos en la reproducción (Yang *et al.*, 2008), esto posiblemente esté relacionado con que el control hormonal de la espermatogénesis en crustáceos no está claramente dilucidado (Nagaraju *et al.*, 2010).

Debido a la falta de antecedentes previos de exposición de machos de *N. granulata* al glifosato, se comenzó con la exposición *in vivo* de un mes de duración, para obtener los primeros indicios de un posible efecto del herbicida sobre la reproducción y otras variables relevantes. La concentración de 1 mg/L tanto de glifosato puro como de Roundup, puede considerarse que sigue siendo de relevancia ambiental, ya que está cercana al nivel máximo (0,7 mg/L) reportado por Peruzzo *et al.* (2003) en cursos de agua de La Pampa (Argentina), tal como se ha discutido en el Capítulo I. Además, la mencionada concentración fue subletal, como lo demuestra la ausencia de mortalidad aumentada en los tratamientos, respecto del control.

Al finalizar el ensayo, la ganancia en peso disminuyó significativamente, tanto en los machos tratados con glifosato puro, como con Roundup. La glucemia mostró una tendencia de aumento en ambos grupos, si bien no fue significativa. Sin embargo, se observó un aumento del nivel de glucógeno en el músculo con ambos tratamientos, lo que podría sugerir que el aumento de glucosa circulante estaría favoreciendo el metabolismo hacia el almacenamiento de hidratos de carbono (e.g. glucógeno) en tejidos como el músculo. Otros autores han reportado la capacidad glucogenogénica de los tejidos de reserva *N. granulata*, frente al aumento de la glucemia (Kurchaski y Da Silva, 1991). En cambio, el nivel de lípidos no se vio afectado por la exposición, ni a glifosato puro ni a Roundup; mientras que el nivel de proteínas en el músculo sí presentó una disminución en ambos grupos tratados, lo que sugeriría que el descenso en la ganancia en peso que sufrieron los animales expuestos estaría vinculado a este decremento, posiblemente relacionado con la utilización de las reservas proteicas debido a un cierto grado de estrés causado por el herbicida. Estos resultados sugieren que se puede hablar de un posible estrés moderado causado por el glifosato (tanto puro como formulado) a la concentración de 1 mg/L. Si bien el tiempo de exposición fue menor a los 3 meses que comprendió el ensayo *in vivo* en hembras (Capítulo I), la concentración fue 5 veces más alta que la mayor concentración utilizada en hembras, por lo cual es esperable haber observado en los machos una disminución de la ganancia en peso y el nivel de proteínas muscular.

En cuanto a las variables vinculadas con la reproducción, se midió el nivel de vitelogenina mediante la técnica de ELISA. En el presente trabajo, se registraron niveles detectables de Vg en machos de la especie en estudio. Los niveles circulantes en los animales tratados fueron similares al control, mientras que en el hepatopáncreas se observó una tendencia de aumento en los animales expuestos al herbicida puro y formulado (siendo esa tendencia más pronunciada con Roundup). Si bien no se detectó una significancia estadística, cabe mencionar que en el Capítulo I se ha discutido acerca del aumento de vitelogenina observado en las hembras expuestas a Roundup 0,2 mg/L durante 1 mes. Por otra parte, los niveles de vitelogenina en el hepatopáncreas de las hembras de *N. granulata*, alcanzaron valores de hasta 500 µg/g, mientras que en los machos no superaron los 150 µg/g. En la hemolinfa, el contenido de Vg en hembras se encuentra promedia los 200 µg/mL, mientras que en los machos, los niveles circulantes detectados en el presente trabajo resultaron un orden de magnitud menor (alrededor de 25 µg/mL).

En relación a la presencia de vitelogenina en machos de crustáceos, la mayoría de los reportes que se encuentran en la literatura dan cuenta de su presencia en crustáceos intersexo, que se han utilizado como modelo para estudiar el rol de distintas hormonas en la determinación del sexo (Aizen *et al.*, 2016). Particularmente en los últimos años se ha demostrado que la hormona de la glándula androgénica juega un rol central en la masculinización de crustáceos,

inhibiendo el crecimiento ovárico y la expresión de vitelogenina en el ovario (Rosen *et al.* (2010) en la langosta *Cherax quadricarinatus*; Huang *et al.* (2014) en el cangrejo *Scylla paramamosian*; Katayama *et al.* (2014) en el camarón *Marsupenaeus japonicus*).

Con el objetivo de evaluar si el glifosato causa un efecto en la maduración gonadal y/o la calidad espermática en los machos, se determinaron variables histológicas. Los espermátóforos anormales, cuya proporción fue mayor tanto en el tratamiento con glifosato como con Roundup, presentaron un área concéntrica bien definida carente de espermatozoides. Hasta el momento, no se encuentran reportes en la bibliografía de este tipo de anomalía, si bien sí se encuentran descritas otros tipo de patologías. La que se encuentra más caracterizada por distintos autores es la melanización del espermátóforo, llamada así por la coloración amarronada que presentan. Se postula que dicha coloración se debe a la activación de mecanismos de oxidación que generan melanina como producto (Diamond *et al.*, 2008). Esta anomalía, que da origen a lo que se denomina “síndrome de melanización del tracto reproductivo masculino”, estaría relacionada con distintos factores externos como la temperatura (Sánchez *et al.*, 2001), infecciones por bacterias (Alfaro-Montoya, 1993), la falta de una hembra receptiva (Parnes *et al.*, 2006), o incluso una dieta inapropiada (Goimier *et al.*, 2006), causando que el espermátóforo comience a degradarse. Braga *et al.* (2018) reportó la ocurrencia del síndrome de

melanización en espermatóforos de camarones, que presentaron infiltración de hemocitos en el tejido conectivo, así como un menor número de espermatozoides, debido al estrés que causaron los métodos de extrusión espermática. Burgot y López Greco (2009) han observado en *Cherax quadricarnatus*, la melanización de espermatóforos y vaso deferente, con la presencia de hemocitos granulares y la desorganización de los espermatóforos, debido al estrés térmico.

En correspondencia con el tipo de patología encontrada, el número de espermatozoides por espermatóforo fue significativamente menor en el grupo tratado con Roundup, respecto del control, lo cual no ocurrió frente a la exposición con glifosato puro, si bien se observó una tendencia similar. Evidentemente entonces, los coadyuvantes estarían de alguna manera favoreciendo esta patología en particular, ya sea facilitando la entrada de glifosato a los tejidos y/o debido a su toxicidad intrínseca. A su vez, el área de los espermatóforos no fue diferente en los grupos tratados con herbicida respecto del control, lo cual descarta que hubiera un efecto deletéreo sobre la formación del espermatóforo *per se*, en términos de que encapsule menor cantidad de espermatozoides debido por ejemplo, una menor síntesis de los componentes que conforman la pared del mismo.

Como consecuencia, surgió la pregunta de si la menor cantidad de espermatozoides por espermatóforo se debía a un efecto citotóxico del Roundup sobre los espermatozoides, o bien si tendría relación con una inhibición de la espermatogénesis. Debido a esto, se realizó un segundo ensayo *in vivo* de un mes de duración, en el cual se expusieron machos a la misma concentración de Roundup que en el ensayo *in vivo* anterior. Se observó que la mortalidad de espermatozoides no fue estadísticamente mayor que el control, por lo cual esto estaría sugiriendo que la disminución del número de espermatozoides se debería a una alteración de la espermatogénesis por efecto del Roundup.

Por otra parte, el herbicida no parece haber causado, a la concentración ensayada, una alteración en el contenido secretor del vaso deferente, puesto que no se registró una diferencia del índice vasosomático izquierdo entre el grupo control y el tratado, así como tampoco se observaron cambios en la coloración de los cortes histológicos, que aportan información acerca de la naturaleza y disposición de los gliconjugados que conforman las secreciones.

Tanto la diferenciación sexual como el mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios en los machos de crustáceos están regulados por la glándula androgénica (Ventura *et al.*, 2011), que constituye realmente una glándula endócrina macho-específica (Chung *et al.*, 2011). El hecho de que en crustáceos

el órgano gametogénico (testículo) esté separado del órgano regulatorio de la diferenciación sexual (glándula androgénica), hace posible el poder realizar experimentos de manipulación endocrina con relativa facilidad (Ventura *et al.*, 2011). Tales experimentos, que han incluido, por ejemplo, la extirpación de la GA en machos y su implantación en hembras, han permitido atribuirle a la GA un rol regulatorio clave en la diferenciación sexual y la espermatogénesis. La implantación de la glándula o la inyección de extractos de la misma en hembras indujo la masculinización (e.g. el desarrollo de caracteres sexuales masculinos), la inhibición de la síntesis de vitelogenina y la regresión del desarrollo ovárico, en distintas especies (Nagamine *et al.*, 1980; Nagamine y Knight, 1987; Lee *et al.*, 1993; Khalaila *et al.*, 2001; Cui *et al.*, 2005). Más aún, Khalaila *et al.* (2002) sugirieron la presencia de un eje regulatorio glándula del seno–glándula androgénica–testículo, habiéndose aportado evidencias concluyentes del efecto directo de la HGA (hormona de la glándula androgénica, perteneciente a la familia de insulina) sobre el testículo. Estudios más recientes han aislado transcritos de la glándula androgénica, que permitieron armar bibliotecas de *cDNA*, y por secuenciación se ha confirmado la presencia de genes GA-específicos, en particular de los llamados “*insuline-like AG*” (cuyos transcritos muestran similitudes entre especies), lo que a su vez permitió realizar experimentos de localización, expresión y silenciamiento del gen (Ventura *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2014).

Particularmente, son escasos los reportes en la bibliografía acerca del efecto de contaminantes antropogénicos sobre el control del desarrollo y diferenciación gonadal de machos de crustáceos. Ford *et al.* (2004) observaron en anfípodos recolectados de aguas cercanas a sitios de vertido de efluentes industriales, que la proporción de intersexos aumentó, mientras que la de machos disminuyó, sugiriendo que tal des-masculinización podría haber sido causada por una interferencia sobre la glándula androgénica. Además, se ha visto que en general la ocurrencia de intersexos puede ser inducida por desorganizadores endocrinos (Ford *et al.*, 2008). En juveniles tempranos de la langosta de agua dulce *C. quadricarinatus*, se ha observado un aumento en la proporción de hembras por exposición a atrazina, efecto que ocurrió sin que el herbicida produjera patologías sobre las gonadas (MacLoughlin *et al.*, 2016), sugiriendo que el mencionado herbicida podría estar causando un efecto sobre la glándula androgénica. Otros autores, han observado que el aditivo industrial nonilfenol inhibió el crecimiento y desarrollo de la gonada masculina en larvas zoeas del camarón *M. Rosembergii* (Zhu *et al.*, 2011).

En cuanto al ensayo *in vitro* realizado, cuyo objetivo fue evaluar si la reducción en el número de espermatozoides causada por el Roundup se debió a una interferencia del herbicida sobre la secreción y/o mecanismo de acción de la HGA, se observó que en el tratamiento solo con Roundup el número de espermatozoides por espermatóforo fue menor que el control, efecto que

también se observó *in vivo*. Por el contrario, en el tratamiento con la glándula androgénica, el número de espermatozoides aumentó, debido al efecto de inducción del crecimiento gonadal ejercido por esta hormona, de acuerdo a lo esperado. Sin embargo, al exponer el testículo y el vaso deferente a Roundup en presencia de la glándula androgénica, este efecto estimulante se revirtió, y el conteo de espermatozoides fue similar al del grupo control. Este resultado podría sugerir cierto efecto desorganizador del Roundup sobre la vía de la hormona de la glándula androgénica, si bien el Roundup *per se* causó una disminución del recuento de espermatozoides, que podría deberse a otros mecanismos implicados. Para clarificar este punto, sin embargo, se debería continuar sumando estudios que aporten evidencias confirmatorias.

CONCLUSIONES

- El Roundup Ultramax® causa, al cabo de tres meses de exposición a concentraciones ambientales, un evidente efecto inhibitorio sobre el crecimiento ovárico de *N. granulata*, en términos de un menor contenido de vitelogenina en ovario y hepatopáncreas, un menor tamaño oocitario y un aumento en la proporción de oocitos vitelogénicos en reabsorción.
- Sin embargo, el aumento de vitelogenina ovárica y la mayor proporción de oocitos vitelogénicos al cabo de un mes de exposición a Roundup, sugiere una posible interferencia del herbicida con el control hormonal de la maduración ovárica.
- El herbicida formulado es capaz de afectar la síntesis de vitelogenina en el ovario *in vitro*, efecto que, junto con el aumento de reabsorciones oocitarias, podría explicar los efectos de inhibición del crecimiento ovárico observado *in vivo*.
- Al mismo tiempo, sin embargo, el herbicida en estudio es capaz de acelerar la maduración ovárica *in vitro*, de acuerdo al diagnóstico histológico, sugiriendo que es capaz de afectar cierto mecanismo endocrino implicado en la maduración ovárica.
- El herbicida no interferiría con la vías de señalización de GSH, GIH o ecdiesteroides en el ovario.
- El Roundup estaría facilitando la estimulación de la maduración ovárica causada por la progesterona endógena, siempre que los receptores para esta última no se encuentren inhibidos, actuando en consecuencia como un posible desorganizador endocrino y pudiendo explicar, al menos en parte, el crecimiento ovárico observado luego de un mes de exposición *in vivo*.

- El Roundup podría inhibir la vía de señalización de prostaglandinas, lo que además de aportar más evidencia sobre el glifosato como desorganizador endocrino, podría explicar, al menos en parte, el efecto inhibitorio del herbicida sobre el crecimiento ovárico, a los tres meses de exposición.
- El glifosato y su formulación son capaces de producir un estrés moderado en machos de *N. granulata* al cabo de 1 mes de exposición, a concentraciones que son cercanas a la máxima reportada en cursos de agua de nuestro país.
- El herbicida afecta la cantidad de espermatozoides que se encuentran en el interior de los espermatóforos del vaso deferente, y es capaz de ocasionar la presencia de espermatóforos anormales.
- La disminución en la calidad espermática observada por exposición al formulado no se debería a una citotoxicidad sobre los espermatozoides, sino principalmente a una inhibición de la espermatogénesis, regulada por la hormona de la glándula androgénica.
- La reversión del efecto estimulador de la glándula androgénica sobre el número de espermatozoides en los espermatóforos, producida *in vitro* por Roundup, podría indicar una interferencia del herbicida con la secreción y/o el mecanismo de transducción de la hormona de la glándula androgénica, aún cuando el Roundup *per se* fue capaz de disminuir la producción de espermatozoides.

BIBLIOGRAFÍA

Abramowitz, A. A., Hisaw, F. Z., Papandrea, D. V. (1944). The occurrence of diabetogenic factor in the eyestalks of crustaceans. *Biol. Bull.*, 86, 1-4.

Aizen, J.; Chandler, J. C.; Fitzgibbon, Q. P.; Sagi, A.; Battaglione, S. A.; Elizur, A.; Ventura, T. (2016). Production of recombinant insulin-like androgenic gland hormones from three decapod species: In vitro testicular phosphorylation and activation of a newly identified tyrosine kinase receptor from the Eastern spiny lobster, *Sagmariasus verreauxi*. *General and Comparative Endocrinology*, 229, 8-18.

Alfaro, J. (1993). Reproductive Quality Evaluation of Male *Penaeus stylirostris* from a Grow-Out Pond. *Journal of the World Aquaculture Society*, Vol. 24, No. 1, 6-11.

Alfaro, J., Zúñiga, G., García, A., Rojas, E. (2008). Preliminary evaluation of the effect of juvenile hormone III and methyl farnesoate on spermatophore quality of the white shrimp, *Litopenaeus vannamei* Boone, 1931 (Decapoda: Penaeidae). *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 43, 167-171.

Angeletti Sabrina (2017). Efectos bioturbadores del cangrejo *Neohelice granulata* sobre la distribución y el transporte de sedimento en ambientes intermareales próximos al límite sur de su distribución geográfica: un estudio poblacional comparado. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca. Argentina.

Aparicio, V. C.; De Gerónimo, E.; Marino, D.; Primost, J.; Carriquiriborde, P.; Costa, J. L. (2013). Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere*, 93, 1866-1873.

ArgenBio. (2017). Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. www.argenbio.org

Arancibia, F. (2013). Challenging the bioeconomy: The dynamics of collective action in Argentina. *Technology in Society*, Vol. 35 Issue 2, 79-92.

Armiliato, N.; Ammar, D.; Nezzi, L.; Stralio, M.; Muller, Y. M. R.; Nazari, E. M. (2014). Changes in ultrastructure and expression of steroidogenic factor-1 in ovaries of zebrafish *Danio rerio* exposed to glyphosate. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 77:405-414.

Astiz, M.; de Alaniz, M. J. T.; Marra, C. A. (2012). The oxidative damage and inflammation caused by pesticides are reverted by lipoic acid in rat brain. *Neurochemistry International*, 61, 1231-1241.

Avigliano, L. (2018). Efecto de glifosato sobre el crecimiento y la reproducción de crustáceos superiores. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.

Avigliano, L.; Fassiano, A. V.; Medesani, D. A.; Rios de Molina, M. C.; Rodriguez, E.M. (2014a). Effects of Glyphosate on Growth Rate, Metabolic Rate and Energy Reserves of Early Juvenile Crayfish, *Cherax quadricarinatus* M. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 92: 631-635.

Avigliano, L.; Álvarez, N. B.; Mac Loughlin, C.; Rodriguez, E. M. (2014b). 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.

Avigliano, L.; Canosa, I. S.; Medesani, D. A.; Rodriguez, E. M. (2018). Effects of Glyphosate on Somatic and Ovarian Growth in the Estuarine Crab *Neohelice granulata*, During the Pre-Reproductive Period. Water Air Soil Pollut, 229:44, 1-9.

Baker, C. J.; Saxton, K. E.; Ritchie, W. R.; Chamen, W. C. T.; Reicosky, D. C.; Ribeiro, M. F. S.; Justice, S. E.; Hobbs, P. R. (2008). Siembra con labranza cero en la agricultura de conservacion. FAO, Editorial Acribia S.A.

Battaglin, W. A.; Meyer, M. T.; Kuivila, K. M.; Dietze, J. E. (2014). Glyphosate and its degradation product AMPA occur frequently and widely in U.S. soils, surface water, groundwater, and precipitation. Journal of the American Water Resources Association, 50: 275-290.

Bellon-Humbert, C.; Van-Herp, F. (1988). Localization of Serotonin-Like Immunoreactivity in the Eyestalk of the Prawn *Palaemon serratus* (Crustacea, Decapoda, Natantia). Journal of Morphology, 196:307-320.

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 Jundiá (*Rhamdia quelen*). Environmental Toxicology and Pharmacology, 23, 308-313.

Bomirsky, A.; Klek, E. (1974). Action of Eyestalks on the Ovary in *Rhithropanopeus harrisi* and *Crangon crangon* (Crustacea : Decapoda). Marine Biology, 24, 329–337.

Boschi, E. E. (1964). Los crustáceos decápodos Brachyura del litoral bonaerense (Rep. Arg.)- Bol. Inst. Biol. Mar. (Mar del Plata), 6: 1-76.

Charniaux-Cotton, H.; Payen, G. (1988). Crustacean reproduction. En: Endocrinology of Selected Invertebrate Types. H. Laufer and R. G. H. Downer, Eds., A. R. Liss, New York., 2, 279-303.

Bozzo de Brum, M. A. (2010). Persistencia del glifosato y efecto de sucesivas aplicaciones en el cultivo de soja en agricultura continua en siembra directa sobre parametros biologicos del suelo. Tesis Magister en Ciencias Ambientales, Universidad de la Republica, Uruguay.

Braga, A.; Nakayama, C. L.; Poersch, L.; Wasielesky Jr, W. (2013). Unistellate spermatozoa of decapods: comparative evaluation and evolution of the morphology. *Zoomorphology*, 132:261-284.

Braga, A.; Lopes, D.; Magalhaes, V.; Klosterhoff, M. C.; Romano, L. A.; Poersch, L.; Wasielesky, W. (2018). Hemocytic melanization in shrimp spermatophores. *Aquaculture*, 486, 64-67.

Bugnot, A. B.; Lopez Greco, L. S. (2009). Structural alterations in the male reproductive system of the freshwater crayfish, *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 102, 160-166.

Cahanski, A. V.; Medesani, D. A.; Chaullet, A.; Rodríguez, E. M. (2011). In vitro effects of both dopaminergic and enkephalinergic antagonists on the ovarian growth of *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae), at different periods of the reproductive cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 158:126-131.

Castilho, G. G.; Ostrensky, A.; Pie, M. R.; Boeger, W. A. (2008). Morphology and histology of the male reproductive system of the mangrove land crab *Ucides cordatus* (L.) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae). *Acta Zoologica (Stockholm)*, 89:157-161.

Charmantier, G.; Charmantier, D. M.; Van Herp, F. (1997). Hormonal regulation of growth and reproduction in crustaceans. In: Fingerman, M.; Nagabhushanam, R.; Thompson, M. F (Eds.), *Recent advances in marine biotechnology*, 1, 109-161.

Chaullet, A.; Medesani, D. A.; Freitas, J.; Cervino, A.; Cervino, N.; Rodríguez, 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*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 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.
- Cox, C. (2004). Glyphosate. *Journal of Pesticide Reform*, Vol. 24 No. 4, 10-15.
- Cronin, L. E. (1947). Anatomy and histology of the male reproductive system of *Callinectes sapidus* Rathbun, J. *Morphol.* 81 (1947) 209-239.
- Cui, Z.; Lie, H.; Lo, T. S.; Chu, K. H. (2005). Inhibitory effects of the androgenic gland on ovarian development in the mud crab *Scylla paramamosain*, *Comp. Biochem. Physiol. A*, 140, 343-348.
- Dallegrave, E.; Mantese, F. D.; Oliveira, R. T.; Andrade, A. J.; Dalsenter, P. R.; Langeloh, A. (2007) Pre-and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. *Arch. Toxicol.*, 81(9):665-673
- De Kleijn, D. P.; Janssen, K. P.; Waddy, S. L.; Hegeman, R.; Lai, W. Y.; Martens, G. J.; Van Herp, F. (1998). Expression of the crustacean hyperglycaemic hormones and the gonad-inhibiting hormone during the reproductive cycle of the female American lobster *Homarus americanus*. *J. Endocrinol.*, 156, 291-298.
- Derelle, E.; Grosclaude, J.; Meusy, J.; Junera, H.; Martin, M. (1986). ELISA titration of vitellogenin and vitellin in the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, with monoclonal antibody. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, 85B, 1-4.
- Diamond, S.; Powell, A.; Shields, R. J.; Rowley, A. F. (2008). Is spermatophore melanisation in captive shrimp (*Litopenaeus vannamei*) a result of an autoimmune response? *Aquaculture*, 285, 14-18.
- D'Incao, F.; Da Silva, K. G.; Rufino, M. L.; Da Costa Braga, A. (1990). Habito alimentar de caranguejo *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851) na barra de Rio Grande, RS (Decapoda, Grapsidae). *Atlantica (Rio Grande)*, 12: 85-93.
- Fanjul-Moles, M.L. (2006). Biochemical and functional aspects of crustacean hyperglycemic hormone in decapod crustaceans: Review and update. *Comp Biochem Physiol*, 142C: 390-400.

Domínguez, A.; Brown, G. G.; Sautter, K. D.; de Oliveira, C. M. R.; de Vasconcelos, E. C.; Niva, C. C.; Bedano, J. C. (2016). Toxicity of AMPA to the earthworm *Eisenia andrei* Bouché, 1972 in tropical artificial soil. *Sci. Rep.*, 6, 1-8.

Dutra, B. K.; Fernandes, F. A.; Failace, D. M.; Oliveira, G. T. (2011). Effect of Roundup®(glyphosate formulation) in the energy metabolism and reproductive traits of *Hyaella castroi* (Crustacea, Amphipoda, Dogielinotidae). *Ecotoxicology*, 20(1), 255-263.

Eastman-Reks, S.; Fingerman, M. (1984). Effects of neuroendocrine tissue and cyclic AMP on ovarian growth in vivo and in vitro in the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comp. Biochem. Physiol. A Physiol.*, 79, 679-684.

Felgenhauer, B. E.; Abele, L. G. (1991). Morphological diversity of decapod spermatozoa. En: Bauer RT, Martin JW (eds) *Crustacean sexual biology*. Columbia University Press, New York, 322-341.

Ferré, L. E.; Medesani, D. A.; García, C. F.; Grodzielski, M.; Rodríguez, E. M. (2012). Vitellogenin levels in hemolymph, ovary and hepatopancreas of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda: Parastacidae) during the reproductive cycle. *Revista de biología tropical*, 60(1), 253-261.

Fingerman, M.; Nagabhushanam, R.; Sarojini, R.; Reddy, P. S. (1994). Biogenic amines in crustaceans: identification, localization, and roles. *Journal of Crustacean Biology*, 14(3):413-437.

Folch, J.; Lees, M.; Stanley, G. H. S. (1957). A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226:497-509.

Ford, A. T. (2008). Can you feminise a crustacean? *Aquat. Toxicol.*, 88, 316-321.

Ford, A. T.; Fernandes, T. F.; Rider, S. A.; Read, P. A.; Robinson, C. D.; Davies, I. M. (2004). Endocrine disruption in a marine amphipod? Field observations of inter-sexuality and de-masculinisation. *Mar. Environ. Res.* 58, 169-173.

Fowler, R. J.; Leonard, B. V. (1999). The structure and function of the androgenic gland in *Cherax destructor* (Decapoda: Parastacidae). *Aquaculture*, 171, 135-148.

Frontera, J. L.; Vatnick, I.; Chaulet, A.; Rodríguez, E. M. (2011). Effects of Glyphosate and Polyoxyethylenamine on Growth and Energetic Reserves in the Freshwater Crayfish *Cherax quadricarinatus* (Decapoda, Parastacidae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 61: 590-598.

FyO - Futuros y Opciones S.A (2017).
<https://news.agrofy.com.ar/especiales/soja15-16/siembra-soja>
<http://www.fyo.com/>

Gasnier, C.; Dumont, C.; Benachour, N.; Clair, E.; Chagnon, M. C.; Séralini, G. E. (2009). Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology*, 262, 184-191.

Giraudou, M.; Douville, M.; Cottin, G.; Houde, M. (2017). Transcriptomic, cellular and life-history responses of *Daphnia magna* chronically exposed to benzotriazoles: Endocrine-disrupting potential and molting effects. *PLoS ONE*, 12(2):e0171763.

Goimier, Y.; Pascual, C.; Sánchez, A.; Gaxiola, G.; Sánchez, A.; Rosas, C. (2006). Relationship between reproductive, physiological, and immunological condition of *Litopenaeus setiferus* pre-adult males fed different dietary protein levels (Crustacea; Penaeidae). *Anim. Reprod. Sci.*, 92, 193-208.

Hamdaoui, L.; Naifar, M.; Rahmouni, F.; Harrabi, B.; Ayadi, F.; Sahnoun, Z.; Rebak, T. (2017). Subchronic exposure to kalach 360 SL-induced endocrine disruption and ovary damage in female rats. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 1-8.

Hanke, I.; Wittmer, I.; Bischofberger, S.; Stamm, C.; Singer, H. (2010). Relevance of urban glyphosate use for surface water quality. *Chemosphere*, 81, 422-429.

Heckmann, L. H.; Sibly, R. M.; Connon, R.; Hooper, H. L.; Hutchinson, T. H. (2008). Systems biology meets stress ecology: linking molecular and organismal stress responses in *Daphnia magna*. *Genome Biol.*, 9: 40.

Herbert, L. T.; Vazquez, D. E.; Arenas, A.; Farina, W. M. (2014). Effects of field-realistic doses of glyphosate on honeybee appetitive behaviour. *J. Exp. Biol.*, 217, (19):3457-3464.

Hinsch, G. W. (1988). Morphology of the Reproductive Tract and Seasonality of Reproduction in the Golden Crab *Geryon fenneri* from the Eastern Gulf of Mexico. *Journal of Crustacean Biology*, Vol. 8 No. 2, 254-261.

Hodges, L.C.; Bergerson, J. S.; Hunter, D. S.; Walker, C. L. (2000) Estrogenic effects of organochlorine pesticides on uterine leiomyoma cells *in vitro*. *Toxicol. Sci.*, 54: 355-364.

- Huang, X.; Ye, H.; Huang, H.; Yang, Y.; Gong, J. (2014). An insulin-like androgenic gland hormone gene in the mud crab, *Scylla paramamosain*, extensively expressed and involved in the processes of growth and female reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 204, 229-238.
- Huberman, A. (2000). Shrimp endocrinology. A review. *Aquaculture*, 191, 191-208.
- Jamieson, B. G. M. (1991). Ultrastructure and phylogeny of crustacean spermatozoa. *Memoirs of the Queensland Museum*, 31:109-142.
- Jamieson, B. G. M. (2000). Crustacea-Decapoda. En: *Reproductive Biology of Invertebrates*, Ser. Ed: Adiyodi, K. G. and Adiyodi R. G. Vol. Ed: Jamieson, B. G. M. Volume IX, Part C: Progress in Male Gamete Ultrastructure and Phylogeny.
- Janer, G.; Porte, C. (2007). Sex steroids and potential mechanisms of non-genomic endocrine disruption in invertebrates. *Ecotoxicology Volume*, 16:1, 145-160.
- Jugan, P.; Soyez, D. (1985). In vitro inhibitory effect of a sinus gland extract on oocyte endocytosis in the prawn *Macrobrachium rosenbergii*. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie 3 Sciences de la Vie (France)*, 300, 705-709.
- Katayama, H.; Kubota, N.; Hojo, H.; Okada, A.; Kotaka, S.; Tsutsui, N.; Ohira, T. (2014). Direct evidence for the function of crustacean insulin-like androgenic gland factor (IAG): total chemical synthesis of IAG. *Bioorg. Med. Chem.*, 22, 5783- 5789.
- Khalaila, I.; Katz, T.; Abdu, U.; Yehezkel, G.; Sagi, A. (2001). Effects of implantation of hypertrophied androgenic glands on sexual characters and physiology of the reproductive system in the female red claw crayfish, *Cherax quadricarinatus*, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 121, 242-249.
- Khayat, M.; Yang, W. J.; Aida, K.; Nagasawa, H.; Tietz, A.; Funkenstein, B.; Lubzens, E. (1998). Hyperglycaemic Hormones Inhibit Protein and mRNA Synthesis in in Vitro-Incubated Ovarian Fragments of the Marine Shrimp *Penaeus semisulcatus*. *General and Comparative Endocrinology*, 110, 307-318.
- King, D. S. (1964). Fine Structure of the Androgenic Gland of the Crab, *Pachygrapsus crassipes*. *General and Comparative Endocrinology*, 4, 533-544.

- Koger, C. H.; Reddy, K. N. (2005). Role of absorption and translocation in the mechanism of glyphosate resistance in horseweed (*Conyza canadiensis*). *Weed Science* 53, 84-89.
- Krol, R. M.; Hawkins, W. E.; Overstreet, R. M. (1992). Reproductive Components. En: *Microscopic Anatomy of Invertebrates*, Vol. 10: Decapod Crustaceans (Harrison, F. W.; Humes, A. G., Eds.) Wiley-Liss, NY, 459 pp.
- Kucharski, L. C. R.; Da Silva, R. S. M. (1991). Effect of diet composition on the carbohydrate and lipid metabolism in an estuarine crab, *Chasmagnathus granulata* (Dana, 1851). *Comp. Biochem. Physiol.* Vol 99A, No. 1/2, 215-218.
- Langiano, V.; Martinez, C. B. R. (2007). Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 147, 222-231.
- LeBlanc, G. A. (2007). Crustacean endocrine toxicology: a review. *Ecotoxicology*, 16:61-81.
- Lee, T. H.; Shigesawa, R.; Yamasaki, F. (1993). Partial masculinization of female *Eriocheir japonicus* (Brachyura, Grapsidae) by androgenic gland implantation. *Suisan Zoshoku*, 4, 311-319.
- Legrand, J. J.; Juchault, P. (1994). Les caracteres sexuales secondaires. En: *Traité de Zoologie. Anatomie, Systématique, Biologie*, VII, I: Crustacés. Morphologie, Physiologie, Reproduction, Systématique. Grassé PP, ed. Masson Paris, 716-726
- Lenardón, Argelia (2010). *Revista Ciencia y Naturaleza* N° 22.
- Lewis, C.; Ford, A. T. (2012). Infertility in male aquatic invertebrates: a review. *Aquat. Toxicol.*, 120, 79-89.
- Liu, M.; Pan, J.; Liu, Z.; Cheng, Y.; Gong, J.; Wu, X. (2018). Effect of estradiol on vitellogenesis and oocyte development of female swimming crab, *Portunus trituberculatus*. *Aquaculture*, 486, 240-245.
- López Greco, L. S. (1997). Adquisición de la madurez sexual y caracterización del patrón de crecimiento y reproducción en *Chasmagnathus granulata* de Bahía Samborombón, Buenos Aires, Argentina. Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires.
- López Greco, L. S.; Stella, V. S.; Rodriguez, E. M. (1997). Size at onset of sexual maturity in *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). *NAUPLIUS*, Rio Grande, 5(2), 65-75.

López Greco, L. S.; Rodríguez, E. M. (1999). Size at the onset of sexual maturity in *Chasmagnathus granulata* (Grapsidae, Sesarminae). A critical overall view about the usual criteria for its determination. En: Crustaceans and the Biodiversity Crisis, editado por F.R. Schram y J.C. von Vaupel Klein. Brill editores, Leiden, Holanda, Vol. I, pp. 675-689.

Lowry, O. H.; Rosenbrough, N. J.; Randal, R. J. (1951). Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 183:265-275.

Lui, C. W.; Sage, B. A.; O'Connor, J. D. (1974). Biosynthesis of lipovitellin by the crustacean ovary. *Journal of Experimental Zoology*, 188(3), 289-296.

Mackenzie, C. A.; Berrill, M.; Metcalfe, C.; Pauli, B. D. (2003). Gonadal differentiation in frogs exposed to estrogenic and antiestrogenic compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 22 No. 10, 2466-2475.

Mac Loughlin, C.; Canosa, I. S.; Silveyra, G. R.; López Greco, L. S.; Rodríguez, E. M. (2016). Effects of atrazine on growth and sex differentiation: in juveniles of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 131: 96-103.

March, J.G. (2014). Agricultura y plaguicidas: un análisis global, 1ra. ed. Fundación Agropecuaria para el Desarrollo de Argentina, Rio Cuarto, 294 pp.

Martinetto, P.; Valiñas, M.; Palomo, G.; Iribarne, O. (2007). Negative interactions between two SW Atlantic intertidal crabs in soft-bottom habitats. *Marine Biology*, 151 (4): 1479-1490.

Martins Garcia, T. M.; Feitosa Silva, J. R. (2006). Testis and Vas Deferens Morphology of the Red-clawed Mangrove Tree Crab (*Goniopsis cruentata*) (Latreille, 1803). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Vol. 49 No. 2, 339-345.

Menni, R. (1983). Los Peces en el Medio Marino. Estudio Sigma SRL, Buenos Aires, Argentina.

Mensah, P. K.; Palmer, C. G.; Muller, W. J. (2014). Lethal and Sublethal Effects on Pesticides on Aquatic Organisms: The Case of a Freshwater Shrimp Exposure to Roundup. Chapter 7. En: Pesticides - Toxic Aspects, 163-185.

Mesnage, R.; Defarge, N.; Spiroux de Vend^omois, J.; Séralini, G. E. (2015). Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food and Chemical Toxicology*, 84, 133-153.

Mónaco, C. G. (2016). El avance de la frontera agrícola y su impacto: 9 de Julio, Chaco. 1990-2010. Revista del Departamento de Ciencias Sociales, Vol. 3 Nro. 1:117-138.

Montes, M.; Martorelli, S.R. (2017). A Bayesian analysis of the parasitic ecology in *Jenynsia multidentata* (Pisces: Anablepidae). *Iheringia, Série Zoologia*, 107: e2017024.

Mu, X.; LeBlanc, G.A. (2002). Environmental antiandrogens alter embryo development in the crustacean *Daphnia magna*. *Journal of Experimental Zoology*, 292, 287-292.

Nagamine, C.; Knight, A. W. (1987) Masculinization of female crayfish, *Procambarus clarkii* (Girard), *Invert Reprod. Develop.*, 11, 77-87.

Nagamine, C.; Knight, A. W.; Maggenti, A.; Paxman, G. (1980). Masculinization of female *Machrobrachium rosenbergii* (de Man) (Decapoda, Palaemonidae) by androgenic gland implantation, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 41, 442-457.

Nagaraju, G. P. C. (2010). Reproductive regulators in decapod crustaceans: an overview. *The Journal of Experimental Biology*, 214, 3-16.

Nejati, H.; Lacey, M.; Whitehead, S. A. (2001). Differing Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on Basal and FSH-Stimulated Progesterone Production in Rat Granulosa-Luteal Cells. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood), 570:576.

Nocelli Pac, S. (2017). Evolución de Siembra Directa en Argentina, Campaña 2016-2017. Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa (Aapresid).

Okada, E.; Perez, D.; De Geronimo, E.; Aparicio, V.; Costa, J. L. (2017). Agricultural nonpoint source pollution of glyphosate and AMPA at a catchment scale. En: EGU General Assembly Conference Abstracts. Ed. EGU, (19): 1946.

Olivier, S. R.; Escofet, A. M.; Penchazadeh, P.; Orensanz, J. M. (1972). Estudios ecológicos de la región estuarial de Mar Chiquita (Buenos Aires, Argentina). II. Relaciones tróficas interespecíficas. *Anales de la Sociedad Científica Argentina*, 194: 89-104.

Omran, N. E.; Salama, W. E. (2013). The endocrine disruptor effect of the herbicides atrazine and glyphosate on *Biomphalaria alexandrina* snails. *Toxicology and Industrial Health*, 1-10.

Paolucci, M.; Di Cristo, C.; Di Cosmo, A. (2002). Immunological Evidence for Progesterone and Estradiol Receptors in the Freshwater Crayfish *Austropotamobius pallipes*. *Molecular Reproduction and Development*, 63:55-62.

Parnes, S.; Raviv, S.; Shechter, A.; Sagi, A. (2006). Males also have their time of the month! Cyclic disposal of old spermatophores, timed by the molt cycle, in a marine shrimp. *J. Exp. Biol.* 209, 4974-4983.

Perez-Velazquez, M.; Bray, W. A.; Lawrence, A. L.; Gatlin, D. M.; Gonzalez-Felix, M. L. (2001). Effect of temperature on sperm quality of captive *Litopenaeus vannamei* broodstock. *Aquaculture*, 198, 209–218.

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.

Pognante, J.; Bragachini, M.; Casini, C. (2011) - Actualización N 58 – I.N.T.A.

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.

Quackenbush, L. S. (1994). Lobster reproduction: a review. *Crustaceana*, 67, 82-94.

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.

Reddy Buchi, S.; Vaadala, S.; Hosamani, N.; Reddy Pamuru, R.; Reddy Pamanji, S. (2016). Regulation of vitellogenesis by selected endocrine modulators in crab *Oziotelphusa senex senex*, with special reference to methyl farnesoate. *Aquacult. Rep.*, 3:24-30.

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.; Séralini, G. E. (2005). Differential Effects of Glyphosate and Roundup on Human Placental Cells and Aromatase. *Environmental Health Perspectives*, Vol. 113 No. 6, 716-720.

Rodríguez; E.M. (1991). Efectos letales y subletales de dos plaguicidas sobre las especies *Uca uruguayensis* y *Chasmagnathus granulata* (Cangrejal Bonaerense). Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires.

Rodríguez, E. M.; López Greco, L. S.; Fingerman, M. (2000). Inhibition of ovarian growth by cadmium, in the fiddler crab *Uca pugilator* (Decapoda, Ocypodidae). *Ecotox. Environ. Saf.*, 46:202-206.

Rodríguez, E. M.; Medesani, D. A.; Fingerman, M. (2007). Endocrine disruption in crustaceans due to pollutants: A review. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 146A: 661-671.

Rodríguez, E. M.; Medesani, D. A.; Lopez Greco, L. S.; Fingerman, M. (2002). Effects of Some Steroids and Other Compounds on Ovarian Growth of the Red Swamp Crayfish, *Procambarus clarkii*, During Early Vitellogenesis. *Journal of Experimental Zoology*, 292:82-87.

Rodríguez, E. M.; Schuldt, M.; Romano, L. (1994). Chronic histopathological effects of Parathion and 2,4-D on female gonads of *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). *Ed. Chem. Toxic.*, Vol. 32 No. 9, 811-818.

Romano, R. M.; Romano, M. A.; Bernardi, M. M.; Furtado, P. V.; Oliveira, C. A. D. (2010). Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. *Arch. Toxicol.*, 84(4), 309-317.

Rosen, O.; Manor, R.; Weil, S.; Gafni, O.; Linial, A.; Aflalo, E.D.; Ventura, T.; Sagi, A. (2010). A sexual shift induced by silencing of a single insulin-like gene in crayfish: ovarian upregulation and testicular degeneration. *PLoS ONE* 5, e15281.

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. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 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.

Sánchez, A.; Pascual, C.; Sánchez, A.; Vargas-Albores, F.; Le Moullac, G.; Rosas, C. (2001). Hemolymph metabolic variables and immune response in *Litopenaeus setiferus* adult males: the effect of acclimation. *Aquaculture*, 198, 13-28.

Santos, E. A.; Maia Nery, L. E.; Keller, R.; Goncalves, A. A. (1997). Evidence for the Involvement of the Crustacean Hyperglycemic Hormone in the Regulation of Lipid Metabolism. *Physiological Zoology*, 70(4), 415-420.

Sarojini, R.; Nagabhushanam, R.; Fingerman, M. (1997). An in vitro study of the inhibitory action of methionine enkephalin on ovarian maturation in the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 117C, 207-210.

Sasal, M. C.; Andriulo, A. E.; Wilson, M. G.; Portela, S. I. (2010). Paraná, martes 28 de diciembre de 2010. Pérdidas de glifosato por drenaje y escurrimiento y riesgo de contaminación de aguas. Informe de I.N.T.A.

Schaaf, A. A. (2013). Uso de pesticidas y toxicidad: relevamiento en la zona agrícola de San Vicente, Santa Fe, Argentina. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, Vol. 4 Núm. 2, 323-331.

Screpanti, C.; Accinelli, C.; Vicari, A.; Catizone, P. (2005). Glyphosate and glufosinate- ammonium runoff from a corn-growing area in Italy. *Agronomy for Sustainable Development*, 25(3), 407-412.

Shih, J. T. (1997). Sex Steroid-like Substances in the Ovaries, Hepatopancreases, and Body Fluid of Female *Mictyris brevidactylus*. *Zoological Studies*, 36(2), 136-145.

Shih, J. T.; Liao, C. F. (1998). Conversion of cholesterol to sex steroid-like substances by tissues of *Mictyris brevidactylus* in vitro. *Zool. Stud.*, 37, 102-110.

Silveyra, G. R.; Silveyra, P.; Vatnick, I.; Medesani, D. A.; Rodríguez, 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.

Snyder, M. J.; Mulder, E. P. (2001). Environmental endocrine disruption in decapod crustacean larvae: hormone titers, cytochrome P450, and stress protein responses to heptachlor exposure. *Aquat. Toxicol.*, 55, 177-190.

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

- Sokolova, I. M.; Frederich, M.; Bagwe, R.; Lannig, G.; Sukhotin, A. A. (2012). Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Marine Environmental Research*, 79, 1-15.
- Sook Chung, J.; Zmora, N.; Katayama, H.; Tsutsui, N. (2010). Crustacean hyperglycemic hormone (CHH) neuropeptides family: Functions, titer, and binding to target tissues. *General and Comparative Endocrinology*, 166, 447-454.
- Sook Chung, J.; Manor, R.; Sagi, A. (2011). Cloning of an insulin-like androgenic gland factor (IAG) from the blue crab, *Callinectes sapidus*: Implications for eyestalk regulation of IAG expression. *General and Comparative Endocrinology*, 173, 4-10.
- Spaziani, E.; Hinsch, G.; Edwards, S. (1993). Changes in prostaglandin E2 and F2 during vitellogenesis in the florida crayfish *Procambarus paeninsulanus*. *J. Comp. Physiol.*, 163B, 541-545.
- Spivak, E. D. (1997). Cangrejos estuariales del Atlántico sudoccidental (25o-41oS) (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Investigaciones marinas*, 25, 105-120.
- Spivak, E. D. (2010). The crab *Neohelice* (= *Chasmagnathus*) *granulata*: an emergent animal model from emergent countries. *Helgoland Marine Research*, 64(3), 149-154.
- Sroyraya, M.; Chotwiwatthanakun, C.; Stewart, M. J.; Soonklang, N.; Kornthong, N.; Phoungpetchara, I.; Hanna, P. J.; Sobhon, P. (2010). Bilateral eyestalk ablation of the blue swimmer crab, *Portunus pelagicus*, produces hypertrophy of the androgenic gland and an increase of cells producing insulin-like androgenic gland hormone. *Tissue and Cell*, 42, 293-300.
- Struger, J.; Thompson, D.; Staznik, B.; Martin, P.; McDaniel, T.; Marvin, C. (2008). Occurrence of Glyphosate in Surface Waters of Southern Ontario. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 80:378-384.
- Suárez, R. P.; Brodeur, J. C.; Zaccagnini, M. E. (2005). Los agroquímicos y el ambiente . Modulo 6.
- Subramoniam, T. (2000). Crustacean ecdysteroids in reproduction and embryogenesis. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 125, 135-156.

Subramoniam, T. (2017). Steroidal control of vitellogenesis in Crustacea: a new understanding for improving shrimp hatchery production. Proceedings of Indian Natural Science Academy, 1-25.

Sullivan, D. S.; Sullivan, T. P.; Bisalputra, T. (1981). Effects of Roundup herbicide on diatom populations in the aquatic environment of a coastal forest. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 26(1), 91-96.

Summavielle T, Riberiro Rocha Monteiro P, Reis-Henriques M A and Coimbra J (2003). In vitro metabolism of steroid hormones by ovary and hepatopancreas of the crustacean Penaeid shrimp *Marsupenaeus japonicus*. Scientia Marina, 67, 299-306.

Suzuki, S.; Yamasaki, K. (1998). Sex reversal by implantations of ethanol-treated androgenic glands of female isopods, *Armadillidium vulgare* (Malacostraca, Crustacea). Gen. Comp. Endocrinol., 111, 367-375.

Swetha, C. H.; Sainath, S. B.; Reddy, P. R.; Reddy, P. S. (2011). Reproductive Endocrinology of Female Crustaceans: Perspective and Prospective. J. Marine Sci. Res. Development, 5:3.

Swevers, L.; Lambert, J. G. D.; De Loof, A. (1991). Metabolism of vertebrate-like steroids by tissues of three crustacean species. Comp. Biochem. Physiol. 99B, 35-41.

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.

Thongprakaisang, S.; Thiantanawat, A.; Rangkadilok, N.; Suriyo, T.; Satayavivad, J. (2013). Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. Food and Chemical Toxicology, 59, 129-136.

Tropea, C.; Hermida, G. N.; López Greco, L. S. (2011). Effects of androgenic gland ablation on growth and reproductive parameters of *Cherax quadricarinatus* males (Parastacidae, Decapoda). General and Comparative Endocrinology, 174, 211-218.

Van Handel, E. (1965). Estimation of glycogen in small amount soft tissue. Anal. Biochem., 1:256-265

Vera, M.S., Lagomarsino, L., Sylvester, M., Perez, G.L., Rodríguez, P., Mugni, H., Sinistro, R., Ferraro, M., Bonetto, C., Zagarese, H. y Pizarro, H. (2010). New evidences of Roundup (Glyphosate Formulation): impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology*, 19: 710-721.

Ventura, T.; Rosen, O.; Sagi, A. (2011). From the discovery of the crustacean androgenic gland to the insulin-like hormone in six decades. *General and Comparative Endocrinology*, 173, 381-388.

Warrier, S. R.; Tirumalai, R.; Subramoniam, T. (2001). Occurrence of vertebrate steroids, estradiol 17 β and progesterone in the reproducing females of the mud crab *Scylla serrata*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 283-294.

Webster, S. G.; Keller, R.; Dirksen, H. (2012). The CHH-superfamily of multifunctional peptide hormones controlling crustacean metabolism, osmoregulation, moulting, and reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 175, 217-233.

Webster, T. M. U.; Laing, L. V.; Florance, H.; Santos, E. M. (2014). Effects of Glyphosate and its Formulation, Roundup, on Reproduction in Zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Sci. Technol.*, 48, 1271-1279.

Webster, S. (1993). High-affinity binding of putative moult-inhibiting hormone (MIH) and crustacean hyperglycaemic hormone (CHH) to membrane-bound receptors on the Y-organ of the shore crab *Carcinus maenus*. *Proc. Biol. Sci.*, 251, 53-59.

Wickins, J. F.; Lee, D. O. C. (2002). *Crustacean Farming Ranching and Culture*. Blackwell Science, Oxford, 446.

Wolcott, D. L.; Wynne Bost Hopkins, C.; Wolcott, T. G. (2005) Early events in seminal fluid and sperm storage in the female blue crab *Callinectes sapidus* Rathbun: effects of male mating history, male size and season. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 319, 43-55.

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.

Yang, G.; Kille, P.; Ford, A. T. (2008). Infertility in a marine crustacean: Have we been ignoring pollution impacts on male invertebrates? *Aquatic Toxicology*, 88, 81-87.

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.

Yano, I.; Fingerman, M.; Nagabhushanam, R. (2000). Endocrine control of reproductive maturation in penaeid shrimp. En: *Recent Advances in Marine Biotechnology: Aquaculture, Part A: Seaweeds and Invertebrates* (ed. M. Fingerman and R. Nagabhushanam), 161-176.

Ybran, R. G.; Lacelli, G. A. (2017) - Informe estadístico mercado de la soja – I.N.T.A.

Ye, H.; Huang, H.; Song, P. (2010). The identification and distribution of progesterone receptors in the brain and thoracic ganglion in the mud crab *Scylla paramamosain* (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Invert Neurosci.*, 10:11-16.

Young, F.; Ho, D.; Glynn, D.; Edwards, V. (2015) Endocrine disruption and cytotoxicity of glyphosate and roundup in human JAr cells in vitro. *Integr. Pharm. Toxicol. Genotoxicol.*, Vol. 1(1): 12-19.

Zapata, V.; López Greco, L. S.; Medesani, D. A.; Rodríguez, 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.

Zapata V.; López Greco, L. S.; Rodríguez, E. M. (2001). Effect of copper on hatching and development of larvae of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Brachyura). *Environ. Toxicol. Chem.*, 20, 1579-1583.

Zhu, C. H.; Xue, H. B.; Li, Y. J.; Huang, G. Z.; Liu, Y. Y.; Li, G. L. (2011). Effects of 4 nonylphenol on growth and sex differentiation in *Macrobrachium rosenbergii*. *J. Fish. China*, 33, 365-371.

Zmora, N.; Trant, J.; Zohar, J.; Sook Chung, J. (2009). Molt-inhibiting hormone stimulates vitellogenesis at advanced ovarian developmental stages in the female blue crab, *Callinectes sapidus* 1: an ovarian stage dependent involvement. *Saline Systems*, 5:7, 1-11.

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.