



TERATOGENIC EFFECT OF HERBICIDE GLIFONOX IN *RATTUS NORVEGICUS*, WISTAR STRAIN

EFECTO TERATOGÉNICO DEL HERBICIDA GLIFOTOX EN *RATTUS NORVEGICUS* CEPA WISTAR

Ricardo Ortiz Ortega^{1,1*}, Karla S. Martínez Elizalde^{2,2} y Tomás Ernesto Villamar-Duque^{3,3}

¹Proyecto CyMA, Laboratorio de Microbiología Ambiental, UIICSE, FES-IZTACALA, UNAM.
Av. de los Barrios s/n Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, 54090, Estado de México, México. *ricort@unam.mx

²Laboratorio de Farmacognosia, UBIPRO, FES-IZTACALA, UNAM.

Av. de los Barrios s/n Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, 54090, Estado de México, México.

³Bioterio General, FES-Iztacala, UNAM. Av. de los Barrios No. 1, Col. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, México. C.P. 54090.

ABSTRACT

Teratogenic effect of herbicide glyphosate-Roundup, sold under the name Glifotox on Wistar rats was evaluated. The biological material was treated intraperitoneally with glyphosate at concentrations of 100, 125, and 150 mg/kg from gestation day nine. Hysterectomy was performed on day 18 of gestation, and the uterine horns where the embryos were located, in addition to recording the percentage of malformed embryos by modifying the method of Wilson were observed. The liver was removed and quantified by spectrophotometry with transaminase activity showed higher concentrations malformation rate and higher enzyme activity was 125 mg/kg, below is the average of 100 mg/kg and higher concentrations such as 150 mg/kg a large number of resorptions was obtained. It is concluded that glyphosate is toxic affecting the liver and liver enzymes involved in the formation of amino acids also produce delay in embryonic development.

Keys words: Teratogenic, liver, GPT, GOT, glyphosate, isopropylamine.

RESUMEN

Se evaluó el efecto teratogénico del herbicida glifosato-Roundup, comercializado con el nombre de Glifotox, sobre ratas *Wistar*. El material biológico fue tratado por vía intraperitoneal con glifosato con concentraciones de 100, 125, y 150 mg/kg a partir del día nueve de gestación. La histerectomía se realizó en el día 18 de gestación, y se observaron los cuellos uterinos en donde se ubicaban los embriones, además de registrar el porcentaje de malformaciones en embriones por la modificación del método de Wilson. El hígado se retiró y cuantificó por espectrofotometría con la actividad de las transaminasas, las concentraciones que presentaron mayor tasa de malformaciones y mayor actividad enzimática fue la de 125 mg/kg, por debajo de la media se encuentra la de 100 mg/kg y a mayores concentraciones como la de 150 mg/kg se obtuvo un gran número de reabsorciones. Se concluyó que el glifosato es tóxico, afectando a hígado y enzimas hepáticas involucradas en la formación de aminoácidos, además de producir retraso en el desarrollo embrionario.

Palabras Clave: Teratogénesis, hígado, GPT, GOT, glifosato, isopropilamina.

INTRODUCCIÓN

Las malformaciones son alteraciones azarosas que constituyen la base de la diversificación del material hereditario, pueden ser producidas por agentes físicos como las radiaciones ionizantes que son absorbidos por el ADN provocando la aparición de formas tautómeras que originan mutaciones génicas; agentes biológicos que comúnmente son bacterias, virus o parásitos capaces de ocasionar teratogénesis y por agentes químicos, donde determinadas sustancias como el HNO₂ reaccionan con el ADN modificando bases nitrogenadas quitando grupos amino o adicionando grupos hidroxilo (Vázquez, 2006).

Dentro de las malformaciones por agentes químicos se encuentran los herbicidas que son productos fitosanitarios utilizados para la erradicación de plantas, pero por otro lado pueden causar graves problemas de salud en personas y animales, contaminar el agua, suelo y aire, además de que atentan contra la biodiversidad, ya que también infectan cultivos. Uno de los productos más comerciales es el que está hecho a base de glifosato que es una sal de isopropilamina de N-fosfaonometil glicina y un surfactante (polioxietil amina), su nombre comercial más conocido es Glifotox, pertenece a la familia de alquilaminas polietoxiladas sintetizadas de ácidos grasos de origen animal, este es el segundo pesticida más usado en el mercado tanto para sectores agrícolas como no agrícolas, se estima que en el año 2000 se utilizaron entre 30418 y 33142 toneladas de glifosato, la dosis letal media es aproximadamente de 467 mg/kg de peso vivo en los animales (Camino, 2010).

Los daños producidos por este herbicida van desde una toxicidad subaguda, daños genéticos, trastornos reproductivos, carcinogénesis o aumento de la frecuencia de tumores hepáticos, la importancia del daño hepático radica en que este órgano es el encargado de la síntesis de proteínas (albúmina, fibrinógeno y lipoproteínas del plasma) y el catabolismo de fármacos tóxicos (Mañas, 2006). Para la determinación del daño hepático se utilizan diversos métodos, uno de ellos es la cuantificación de transaminasas glutámico-pirúvica y su homóloga glutámico oxalacética (GPT/GOT) enzimas encargadas de catalizar la transferencia reversible de un grupo amino entre un aminoácido y un cetoácido. Esta función es esencial para la producción de los aminoácidos necesarios para la síntesis de proteínas en el hígado (Murray, 1984a).

Por consiguiente, la GOT está distribuida en citoplasma y mitocondria, mientras que la GTP sólo se encuentra en citoplasma, por otro lado su distribución tisular de GOT es amplia abarcando corazón, hígado, músculo esquelético y riñón, mientras que GPT sólo se encuentra presente en

hígado y riñón. La vida media para GOT es de 17 ± 5 h mientras que la de GPT es de aproximadamente 47 ± 10 h (Murray, 1984b).

La reacción de la enzima GPT presente en suero o plasma sanguíneo, transforma al α -cetoglutarato y a la L-alanina respectivamente en L-glutamato y piruvato. Para medir la actividad enzimática, el piruvato formado se hace reaccionar con la coenzima dinucleotido de nicotinamida-adenina en su estado reducido (NADH), para producir lactato y coenzima oxidada (NAD), así la longitud de onda solo absorbe el NADH, la disminución de la absorbancia es directamente proporcional a la desaparición del estado reducido de la coenzima, mientras más piruvato se forma, más rápidamente se produce la oxidación de la coenzima NADH y en consecuencia, la actividad enzimática de la GPT puede ser evaluada mediante la extinción de la especie absorbente, (Snell, 1990; Ishiguro et al., 1991).

Diversos estudios se han limitado a la determinación de los daños externos causados por glifosato siendo escaso el número de trabajos que agregan otros métodos para definir realmente los daños que origina éste herbicida. El objetivo de éste trabajo fue determinar el efecto teratogénico del herbicida glifotox en *Rattus norvegicus* cepa Wistar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se utilizaron ratas (*Rattus norvegicus*) de la cepa *Wistar*, del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, de un peso entre 270 y 300 g. se mantuvieron con alimento y agua *ad libitum*, en condiciones del bioterio a una temperatura aproximada de 18-26 °C, humedad relativa entre 40-70%, con un fotoperiodo de 12 h.

Se formaron tres grupos a los cuáles se les administró glifosato a los nueve días de gestación vía intraperitoneal las dosis de 100, 125 y 150 mg/kg, por tres días. Después de 18 días de gestación, los organismos fueron sacrificados en una cámara con CO₂, posteriormente se realizó la histerectomía para observar las posibles malformaciones macroscópicas en los embriones provocadas por el glifosato (Wilson, 1965), posteriormente se extrajo el hígado para evaluar el daño causado, cuantificando la cantidad de enzimas transaminasas con el kit ELITech, para AST/GOT 4+1 y ALT/GTP 4+1 SL, a una longitud de onda de 340 nm en un espectrofotómetro Turner sp-850 (Williams et al., 2000). Se realizó un análisis estadístico (ANOVA de un factor).

RESULTADOS

Se presentan las imágenes observadas en microscopio estereoscópico, de las extremidades de los diferentes organismos con diferentes tratamientos descritos previamente, se observa el efecto del glifosato (Fig. 1 c), sobre el proceso de gestación normal del modelo de estudio (Fig. 1 a, b y d).

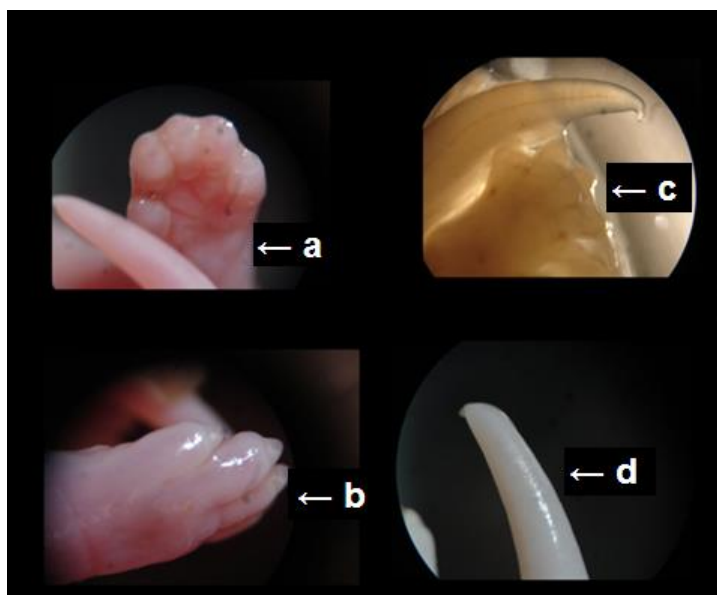


Fig. 1. Extremidades de fetos de rata Wistar de 18 días de gestación, fijados en formol al 10%. (a) Extremidad trasera normal, (b) extremidad delantera normal, (c) extremidad trasera con tratamiento de glifosato, (d) cola de feto normal.

Considerando la importancia del estudio fue necesario revisar también los efectos del glifosato sobre otros aspectos, como se muestra en la figura 2.

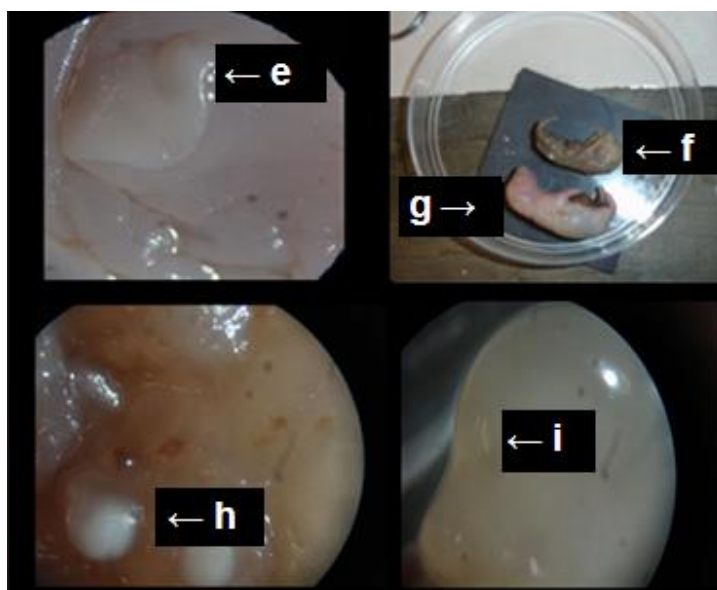


Fig. 2. Fetos de rata Wistar de 18 días de gestación, (e) Vista de oreja normal, (f) Feto con glifosato, (g) Feto normal, (h) Feto con glifosato de doble glóbulo ocular, (i) Vista de un feto con glifosato sin glóbulo ocular.

En la Tabla 1 se presenta el porcentaje de los daños macroscópicos encontrados en los fetos con las diferentes concentraciones de glifosato.

Tabla 1. Efectos del glifosato (Glifotox) sobre fetos de rata Wistar.

Malformaciones	Grupo control %	Primer grupo [100 mg/kg] %	Segundo grupo [125 mg/kg] %	Tercer grupo [150 mg/kg] %
Longitud	0	62.9	93.33	
Exoftalmia	0	1	0	-
Oreja anormal	0	76.6	96.29	-
Nariz-nuca	0	53.33	100	-
Patas traseras	0	80	85.18	-
Patas delanteras	0	63.33	96.29	-
Ausencia patas traseras	0	20	14.81	-
Ausencia patas delanteras	0	36.66	3.71	-
Acaudado	0	26.66	14.81	-
Microcaudado	0	73.33	85.18	-
Reabsorción	0	50	50	100

Se determinaron 10 tipos de malformaciones externas y reabsorciones en dos de las dosis aplicadas, para la dosis de 150 mg/kg resultó ser tóxica al presentar un 100% de reabsorciones, en comparación a las dosis baja e intermedia que presentaron un 50% de reabsorciones.

La malformación que presentó el mayor porcentaje fue la de oreja anormal al presentarse en un 76.6% en la dosis de 100 mg/kg y en un 96.29% en el grupo con la dosis de 125 mg/kg. La malformación que presentó los valores más bajos para la dosis de 100 mg/kg fue la exoftalmia al presentarse en un 1% y para la dosis de 125 mg/kg, no se presentó esta malformación (Tabla 1 y Fig. 3).

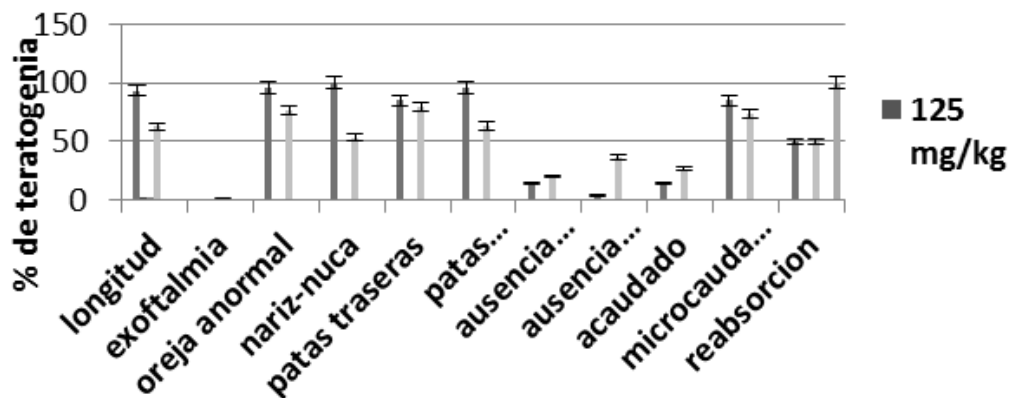


Fig. 3. Efecto producido por el glifosato sobre los fetos de rata Wistar, los datos se presentan como porcentaje de 108 fetos de ratas Wistar de 18 días de gestación.

La toxicidad hepática fue determinada mediante la actividad de GTP (Tabla 2), la concentración de GTP aumenta en el grupo con las dosis de 125 mg/kg, en comparación con el grupo tratado con 100mg/kg y en el grupo control, es importante señalar que no hay un cambio en la concentración en los tiempos 0, 90 y 150 minutos.

Tabla 2. Cuantificación de transaminasa GPT en hígado en los diferentes tratamientos, los valores se encuentran expresados en U/L.

		GPT							
Tratamiento	Control				100 mg/ml		125 mg/kg		
Tiempo (min)	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	
0	333.70	841.20	616.83	864.27	910.10	850.10	817.12	1064.77	
90	382.51	824.20	610.10	881.73	985.61	904.62	1858.29	1100.41	
150	380.19	820.09	616.13	867.76	1102.20	916.51	1969.09	1126.85	

Respecto a la enzima transaminasa (GOT), no se reporta elevada cantidad de transaminasas en el grupo control, mientras que los grupos con los diferentes tratamientos muestran una diferencia significativa, aproximadamente de dos veces mayor, lo que indica una elevada toxicidad hepática.

Tabla 3. Cuantificación de transaminasa GOT sobre los diferentes tratamientos, los valores se encuentran expresados en U/L.

		GOT							
Tratamiento	Control				100mg/kg		125 mg/kg		
Tiempo	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	
0	442.75	472.35	555.43	636.72	850.36	860.34	1077.28	830.22	
90	457.46	451.40	546.70	632.79	886.96	980.81	1185.77	855.64	
150	453.09	440.88	532.01	620.62	964.14	1008.31	1213.47	1113.56	

DISCUSIÓN

De acuerdo a Palmer (1997), cualquier tipo de malformación que se haya registrado puede ocurrir de forma esporádica en cualquier especie dada, y más de una causa puede generar una malformación. Una de estas causas es el glifosato, que contiene una sal de isopropilamina y el surfactante polioxietil amina (POEA) que es necesaria para una eficaz absorción del glifosato en plantas (Riechers et al., 1994). La evaluación del riesgo del glifosato se ha llevado a cabo, en la mayoría de los casos, en experimentos de laboratorio, en particular roedores, para trasladarlos a las situaciones humanas. Las malformaciones consisten en la ausencia de huesos o partes de los mismos y fusiones o hendiduras en el feto (Lorke, 1977). La falta de malformación, puede estar relacionada a la administración del tratamiento retrasado con el peso corporal y/o tamaño. Según

la OMS (1994), la administración de un nivel alto de dosis de glifosato en ratas preñadas administrada entre los días 6 y 19, determina una mayor incidencia de retraso del crecimiento de los embriones, incremento de las reabsorciones, disminución del número de implantaciones y fetos viables, así como alteraciones funcionales en la actividad específica de las enzimas hepáticas, en el corazón y el cerebro de ratas preñadas y embriones.

En la Figura 1, se muestran imágenes tomadas a un feto de rata (grupo control), en donde se observan extremidades como cola (d), pata delantera (b), pata trasera, palma y dedos (a), así como pata trasera con efecto producido por el glifosato, que fueron medidas en base a modificaciones del método de Wilson en 1965. Por otro lado, en la Figura 2, se presentan imágenes de fetos de rata, en donde se puede apreciar la oreja de un feto sin glifosato (control), sin embargo se presenta un feto de rata al que se le administró glifosato (f), en comparación con el feto del grupo control (g), éste es más corto en cuanto a longitud, y presenta una disminución del tamaño en las extremidades traseras. De igual forma, se observa un feto sin glóbulo ocular al que se le administró glifosato (i).

La aparición de múltiples alteraciones es significativamente mayor entre los grupos tratados y el grupo control (Tabla 1). En la Figura 2 h, se presenta un feto con exoftalmia, protuberancias de glóbulos oculares a cada lado de la cabeza (Wilson, 1965), mientras que en el inciso i, se obtuvo un feto con ausencia del glóbulo ocular. Tras la administración del teratógeno se produce un retraso considerable en la morfogénesis facial que se manifiesta en la disminución de la longitud de varias distancias faciales.

Sin embargo, la concentración de 125 mg/kg, presentó mayor número de malformaciones en los fetos que el tratamiento de 100 mg/kg de glifosato respectivamente. Cabe señalar, que para la concentración de 100 mg/kg de glifosato, se obtuvo para exoftalmia un 1%, mientras que para la concentración de 125 mg/kg, no presentó esta condición, y para la concentración de 150 mg/kg no hubo ningún daño o malformación debido a que a esta concentración, no se obtuvieron fetos viables, provocando así su reabsorción (Larsen, 1975).

Diversos autores mencionan pérdida de talla y peso corporal, lo que se puede apreciar en la Tabla 1, con la concentración de 100 mg/kg de glifosato, se obtuvo 62.9% de los fetos que redujeron su longitud, mientras que con la concentración de 125 mg/kg se obtuvo un porcentaje mayor (93.33%). En el grupo control no se presentaron variaciones en cuanto a la longitud del cuerpo, ya que presentaron rangos dentro del promedio de longitud del cuerpo 2.99 ± 0.65 cm (Lugo De Yarbuh et al., 2010).

El peso y la talla fetal no es un parámetro concluyente en los estudios de desarrollo, debido a que esto puede variar dependiendo del número de fetos de la camada (Almeida y Lemonica, 2000).

En las extremidades se obtuvo el mayor porcentaje de malformaciones (oreja anormal, micromelia, microacaudado y acaudado), debido a la acción del herbicida durante el periodo de organogénesis, para la concentración de 100 mg/kg, se manejaron porcentajes menores para ausencia de patas delanteras y traseras, así como también la reducción de las patas traseras y delanteras (micromelia), mientras que para la concentración de 125 mg/kg se obtuvieron porcentajes mayores para estas mismas características (Fig. 3). Posiblemente, el retraso en el desarrollo de estructuras, como las extremidades (en especial el de las patas traseras y la cola), el cráneo, el esternón, se deba a que una parte del calcio para la osificación se encuentra de forma

cristalina como fosfato y la adsorción del glifosato se correlaciona con la cantidad de sitios ligadores de fosfato disponibles, concentrándose también en estas zonas (WSSA, 1994).

En el Tabla 1 se pueden observar más a detalle, los porcentajes obtenidos para cada malformación medida, mostrando así diferencias significativas ($p < 0.5$), en cuanto a las concentraciones de 100 mg/kg y 125 mg/kg, destacando la segunda concentración por mayor índice de malformación presentes en los fetos, mientras que para la concentración de 150 mg/kg, no existieron diferencias significativas, debido a que en este no se obtuvo ningún dato que fuera relevante.

Daruich et al. (2001), reportan que la toxicidad a la exposición de agroquímicos como el glifosato durante la etapa de gestación, induce a una variedad de alteraciones funcionales en la actividad específica de las enzimas hepáticas, se ha sugerido medir los niveles séricos de las actividades de AST y ALT (GOT y GPT) como indicadores de daños hepáticos (De Boer et al., 2000).

En la Tabla 2, en donde se reportan los tratamientos, se cuantificó la actividad enzimática de las transaminasa GPT, el aumento de estas enzimas séricas puede ocurrir debido a la lesión hepática de menor importancia en la respuesta a drogas o productos químicos con cambios histológicos (Williams y Iatropoulos, 2002).

La concentración de la GTP se incrementa cuando se produce daño a las células hepáticas (Williams, 2000). El tratamiento de 125 mg/kg, presentó un mayor valor de la GPT, en comparación con la concentración de 100 mg/kg, lo que indica que al igual que las malformaciones producidas, coincide con los valores obtenidos en el daño del metabolismo hepático (Tabla 1).

La GOT se realizó con los mismos intervalos de tiempo que la GPT (Tabla 3), en donde se encuentran las UI/L obtenidas por espectrofotometría, sin embargo, en la concentración de 125 mg/kg, se presentan los índices de UI/L más altos en comparación a la concentración de 100 mg/kg, al igual que en la cuantificación anterior (Tabla 2). La actividad enzimática mayor es la de 125 mg/kg, por lo que se puede inferir que ambas enzimas ayudan de la misma manera a la determinación de daño hepático, cabe señalar, que existen diferencias entre ambas enzimas, que condicionan la mayor utilidad de la GPT, con respecto a la GOT, en la evaluación del daño hepático, como son la distribución celular, tisular y vida media (Castro y Pérez, 2006).

La mayor actividad registrada se presentó en la concentración de 125 mg/kg, que coincide con la misma concentración en donde se obtuvieron los porcentajes más elevados de malformaciones (Tabla 3). Al comparar los resultados obtenidos de GPT y de GOT, se puede observar que la aspartato aminotransferasa (AST), presenta mayor actividad que la alanina transaminasa (ALT), que comparadas con el grupo control, aumentaron su actividad enzimática lo que indica una toxicidad en hígado (Ishiguro et al., 1991). Se puede concluir que el glifosato es un herbicida teratogénico en concentraciones iguales o mayores a 100 mg/kg de peso corporal (cuatro veces menos su dosis letal media), capaz de generar diferentes tipos de malformaciones embrionarias cuando las hembras son expuestas a este compuesto durante el segundo tercio de gestación, además de ser tóxico para el hígado.

REFERENCIAS

1. Almeida F. y I. Lemonica, 2000. The toxic effects of *Coleus barbatus* B. on the different periods of pregnancy in rats. *Journal Ethnopharmacology*, 73: 53-60.
2. Camino M. y V. Aparicio, 2010. Taller Aspectos ambientales del uso de Glifosato. <http://inta.gob.ar/documentos/aspectos-ambientales-del-uso-del-glifosato> (accesado en octubre 10, 2014).
3. Castro del Pozo y J.L. Pérez, 2006. Manual de patología general, Elsevier, España. 344 p.
4. Daruich J, F. Zirulnik y M.S. Gimenez, 2001. Effect of the herbicide glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses. *Environmental Research*, 85: 226-231.
5. De Boer W.B., A. Segal, F.A. Frost y G.F. Sterrett, 2000. Can CD34 discriminate between benign and malignant hepatocytic lesions in fine-needle aspirates and thin core biopsies. *Cancer*, 90: 273-278.
6. Ishiguro M., M. Suzuki, K. Takio, T. Matsuzawa y K. Titani, 1991. Complete amino acid sequence of rat liver cytosolic alanine aminotransferase. *Biochemistry*, 30: 6048-6053.
7. Larsen R.V., G.S. Born, W.V. Kessler, S.M. Shaw y D.C. Van Sickel, 1975. Placental transfer and teratology of pentachlorophenol in rats. *Environmental Research Letters*, 10: 121-128.
8. Lorke D., 1977. Evaluation of skeleton. En: D. Neubert, H.J. Merker y T.E. Kwasigroch (Eds.), *Methods in prenatal toxicology, evaluation of embryotoxic effects in experimental animals*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. Germany. Pp. 52-71.
9. Mañas F.L., J. Peralta-Raviolo, H. García-Ovando, A. Weyers, L. Ugnia, M. Gonzalez-Cid, I. Larripa y N. Gorla, 2009. Genotoxicity of AMPA, the environmental metabolite of glyphosate, assessed by the comet assay and cytogenetic tests. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 72: 834-837.
10. Murray R., 1984a. Aminotransferases. En: A. Kaplan, F.F. Rubaltelli y C. Hammerman (Ed.), *Clinical Chemistry*, The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton. Pp 112-119.
11. Murray R. 1984b. Lactate dehydrogenase. En: F.F. Rubaltelli y C. Hammerman (Ed.), *Clinical Chemistry*, The C.V. Mosby Co. St Louis. Toronto. Princeton. Pp154-162.
12. Nyblom H., E. Björnsson, M. Simrén, F. Aldenborg, S. Almer y R. Olsson, 2006. The AST/ALT ratio as an indicator of cirrhosis in patients with PBC. *Liver International*, 26 (7): 840-846.
13. Palmer A.K., 1977. Incidence of sporadic malformations, anomalies and variations in random bred laboratory animals. En: D. Neubert, H.J. Merker y T.E. Kwasigroch (Eds.), *Methods in prenatal toxicology, evaluation of embryotoxic effects in experimental animals*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany, Pp 53-70.

14. Riechers D.E., L.M. Wax, R.A. Liebl y D.R. Bush, 1994. Surfactant-increased glyphosate uptake into plasma membrane vesicles isolated from common lambsquarters leaves. *Plant Physiology*, 105(4): 1419-1425.
15. Snell E.E., 1990. Vitamin B6 and decarboxylation of histidine. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 585: 1-12.
16. Williams G.M. y M.J. Iatropoulos, 2002. Alteration of liver cell function and proliferation: differentiation between adaptation and toxicity. *Toxicology Pathology*, 30: 41-53.
17. Williams G.M., R. Kroes y I.C. Munro, 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulation Toxicology Pharmacology*, 31: 117-165.
18. WSSA (Weed Science Society of America), 1994. *Herbicide Handbook*. Lawrence KS: Allen Press.
19. Wilson J.G., 1965. Methods for administering agents and detecting malformations in experimental animals. En: J. G. Wilson y J. Warkany. (Eds.), *Teratology, principles and techniques*. University of Chicago Press. Chiacago, Illinois. Pp 262-277.