

Andres E. Carrasco
Laboratorio Embriología Molecular
Efecto del glifosato en el desarrollo embrionario de
Xenopus laevis
(Teratogénesis y glifosato)
Informe preliminar
PRESENTACION

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Embriología Molecular CONICET-UBA sito en la Facultad de Medicina.

Los embriones de anfibios de la especie *Xenopus laevis* son un modelo tradicional para el estudio del desarrollo embriológico y constituyen el que mejor se presta para analizar las alteraciones de cualquier tipo en las etapas más tempranas del desarrollo embrionario, a diferencia de los modelos experimentales pollo y ratón, que no permiten estudiar de la misma manera los efectos de moléculas o fármacos.

Este modelo experimental, al igual que los otros mencionados, es adecuado para inferir posibles alteraciones y síndromes por defectos del desarrollo anotados en la descripción médica. Esto se debe a que el grupo de los vertebrados comparten una sorprendente conservación de los mecanismos genéticos que regulan el desarrollo embrionario y por lo tanto en gran medida conceptualmente homologables a la formación del embrión humano al punto que la investigación y determinación de estos mecanismos ha servido para comenzar a comprender determinados síndromes descriptos en la clínica.

Por ello en este momento es parte del proyecto sobre los efectos del glifosato en la mecánica del desarrollo embrionario incorporar el estudio de otros modelos de desarrollo.

El suscripto ha trabajado en embriología molecular desde 1981, siendo una de las contribuciones más importantes el descubrimiento y caracterización de los genes Hox en vertebrados en 1984.

La idea original de usar nuestra experiencia en mecanismos que controlan el desarrollo embrionario temprano y aportar una base experimental sobre los efectos del glifosato puro y del herbicida que lo contiene, en embriones de *Xenopus laevis* surge hace aproximadamente dos años a raíz de experiencias, contactos, y viajes personales a distintos lugares del país y la falta de datos experimentales, al menos en mi conocimiento, de evidencias sobre alteraciones producidas por el glifosato sobre el desarrollo embrionario de vertebrados durante las criticas etapas tempranas y en condiciones experimentales controladas.

Uno de los mejores reportes sobre los efectos del glifosato en células embrionarias en cultivos, fue realizado por el grupo de J. Seralini (2005, 2007 y 2009). Otro aporte importante sobre los efectos del desarrollo embrionario del erizo de mar fue reportado por Marc J. et al, *Toxicol. Appl. Pharmacology* 203 (1), 2005)

Cabria agregar que existieron otros hechos para iniciar esta investigación:

- Los reportes médicos sobre malformaciones de San Cristóbal y Malabrigo, Prov. De Santa Fe con índices de 12 malformaciones sobre cada 250 nacimientos, reportados por el Dr. Rodolfo Paramo.

- Otros ejemplos similares en Monte Cristo, Córdoba; Las Petacas, Santa Fe; Ituzango, Córdoba.

- El reporte de Horacio Lucero Jefe del Laboratorio de Biología Molecular del IMR, Chaco.

- El pedido de la Cámara de Diputados de Santa Fe al Poder Ejecutivo de la Provincia para que SENASA recategorizara al glifosato como de alta peligrosidad clase I.

- La clasificación de altamente toxico de la Northwest Coalition for Alternative to Pesticides, entre otros.

Esta comunicación tiene como función reportar los resultados generados hasta el presente.

La necesaria profundización de los mismos será conducida por el suscripto con el fin de comprender con mayor profundidad los mecanismos involucrados y la mecánica de las alteraciones observadas. La comunicación preliminar lleva sus interpretaciones e hipótesis en base a los resultados obtenidos hasta el momento.

Efecto del glifosato en el desarrollo embrionario de *Xenopus laevis*

INTRODUCCION

Los herbicidas y sus componentes

Una semilla transgénica es un desarrollo tecnológico que forma parte de un paquete tecnológico, inseparable del herbicida al que está asociada. En esta lógica siempre el herbicida en cuestión, sirve para seleccionar una planta modificada genéticamente para que sea resistente al mismo y que al mismo tiempo destruya las que no lo son.

Por lo tanto estos experimentos fueron dirigidos a estudiar los efectos que pudieren producir en el desarrollo de vertebrados –en particular durante el crítico periodo de la gastrulación y morfogénesis temprana- uno de los más comunes herbicidas usados en la agricultura

Los herbicidas del tipo del Roundup contienen glifosato en diferentes concentraciones además de adyuvantes, detergentes que facilitan la absorción del glifosato por la planta. Por ejemplo POEA (tallowamina polietoxilada) (POEA como otros detergentes son utilizados para facilitar la penetración en las plantas del glifosato, para mejorar la eficacia de la acción del herbicida permitiendo una mayor concentración del mismo, en las células vegetales. Todos los detergentes o sustancias tensioactivas son tóxicos para las células vivas porque alteran su membrana y cambian sus propiedades alterando la actividad metabólica. Por lo cual son en general nocivos y las células son dañadas hasta la muerte como lo mostró en distintos cultivos celulares el grupo de J. Seralini) es uno de los más comunes y muy tóxico dado que se degrada lentamente y por lo tanto se acumula en las células. De esta descripción se desprende que uno de los objetivos de este trabajo fue discriminar la posible actividad tóxica de cada componente en la mezcla comercial y determinar similitudes y diferencias entre el herbicida con sus aditivos, de la acción glifosato puro. Las diluciones recomendadas para la fumigación por la industria agroquímica, oscilan entre el 1 al 2% de la solución comercial (10 a 20ml por litro) En la realidad las diluciones empleadas actualmente están por encima de estos valores (10% o más) Sin embargo resulta difícil establecer cuál es la situación real en el modo de uso de estos herbicidas debido a la falta de información y control de uso de dosis necesarias en los cultivos, no habiendo estudios sobre la progresiva resistencia de las malezas, la largamente cuestionada biodegradabilidad y por lo tanto inocuidad de los componentes de los herbicidas para el medio ambiente y la salud humana.

Antecedentes de estudios experimentales del daño celular producidos por glifosato

Estudios en líneas celulares animales (Benachour N et al, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 2005 and Benachour N. and Seralini Gilles-Eric, Chemical Research in Toxicology, vol 22, 97-105 enero 2009) usando marcadores enzimáticos daño de la mitocondria (succinato dehidrogenasa) y de muerte celular programada (caspasas 3/7) mostraron el efecto tóxico en dosis inferiores 10 a 1000 veces menores a las usadas en agricultura producidas tanto por el herbicida comercial como por el glifosato puro. (muerte celular programada (apoptosis) es un mecanismo de muerte celular modulada en poblaciones y los procesos de patrón de formación y construcción embrionaria la división celular, eliminan de células que pudieren alterarse en forma no deseada, coopera en proveer y mantener la forma de las estructuras durante el desarrollo del embrión. La activación de las caspasas ante estímulos programados genéticamente o externos a las células es una etapa en el comienzo de una serie de mecanismo que conduce a la muerte celular cuando el organismo lo requiere. Por la modificación de estas vías moleculares son indicadores de muerte celular inadecuada y anormal) Otra contribución reveladora realizada por el grupo de Seralini, sostiene que diluciones del herbicida glifosato del orden 1/1000, produce, en cultivos de células animales, destrucción de

membranas y daño mitocondrial que llevan a la destrucción celular.

Es en este punto que se hace necesario analizar el problema con rigurosidad en relación con el posible efecto tóxico de las mezclas comerciales de los herbicidas precisando cuál es la contribución del glifosato puro en los posibles efectos que se vienen observando en los estudios observados hasta ahora por distintos grupos nacionales y extranjeros.

Según Seralini, el glifosato puro parece actuar en el curso de las primeras 24 horas activando las caspasas e induciendo muerte celular (apoptosis) en cultivos de células con dosis de 500 a 1000 veces menores que las usadas en agricultura y 200 veces menores que las necesarias para producir daño de membranas.

Por cierto tanto el herbicida comercial como el glifosato puro inducen muerte celular, pero mientras el primero parece ser el resultado de necrosis y apoptosis combinadas, el segundo por su acción a dosis muy pequeñas podría inducir apoptosis, y que al menos en parte, podría ejercer su efecto desde receptores de membrana celular. En otras palabras el glifosato podría estar interfiriendo en un mecanismo, todavía no explorado, que forma parte de la fisiología normal de las células y eventualmente en nuestro modelo la formación de tejidos y órganos, disparado desde receptores celulares específicos (intracelulares o de membrana). El glifosato puro también ha llamado la atención como interfiriendo en el mecanismo de reparación fisiológico del DNA que podrían conducir a la acumulación de mutaciones en algunos tipos celulares aumentando el riesgo de procesos de malignización celular.

Un reporte experimental en este sentido son los experimentos en huevos de erizo de mar que mostraron que el glifosato per se, deteriora los puntos de control del ciclo celular asociados a la reparación del DNA, (Marc J. y col, Res. Chem. Toxicology 2002) y el glifosato y su principal metabolito (AMPA) alteran la transcripción en embriones de erizo de mar (Marc J. y col, Toxicol. Appl. Pharmacol. 2005) afectando el desarrollo embrionario.

Esos puntos de control, esenciales para la célula, parecen asociarse a las CDK/ciclina B y su alteración induce a las células, vía el camino de las caspasas, a la apoptosis. (Belle R. y col, J. Soc. Biol. 2007, Le Bouffant R. y col, Cell. Mol. Life Sc. 2007).

Estudio de los efectos del glifosato

El estudio del desarrollo embrionario es ideal para determinar la concentración de un agroquímico como el glifosato tanto para estudiar mecanismos fisiológicos que conduzcan a producir células cancerosas o alteraciones durante el desarrollo como los observados en el estudio realizado aquí.

MATERIALES METODOS Y DISEÑO EXPERIMENTAL

Concentraciones de la solución herbicidas: La concentración estimada de glifosato del herbicida usado está estimada entre 500 y 600 g/l. Las diluciones para fumigar en agricultura están establecidas entre 1% y 30%. Esto equivale a aspersiones que van desde 6 gr/l a 200 gr/l respectivamente.

Análisis de resultados y estrategias empleadas

1. Por inmersión: los embriones como se desarrollan en medio líquido, se sumergen en una solución salina similar a la del medio natural con diluciones del herbicida comercial 1/5000.
2. Por microinyección. glifosato puro fue inyectado en una de las dos primeras células embrionaria. (la dosis corresponde al rango detectado por Peruzzo P. et al, Environmental Pollution, 2008, para aguas del sistema Pergamino-Arrecifes, Provincia de Buenos Aires y por la Agencia Protección Ambiental en territorio estadounidense).
3. Marcadores moleculares. El análisis de efectos en los embriones a distintos estadios del desarrollo se hizo usando la técnica In situ hibridización para detectar la expresión específicos de genes marcadores de territorios y poblaciones celulares de la placa neural temprana,

formación eje anteroposterior embrionario, estructuras romboencefálicas y cresta neural, etc.). El patrón formación de los cartílagos cefálicos en renacuajos, se analizó con la tinción de Alcian Blue.

RESULTADOS

1. Embriones del anfibio *Xenopus laevis* fueron incubados por inmersión en el herbicida en diluciones 1/5000, desde estadio de dos células hasta su análisis experimental. La dilución corresponde a dosis de glifosato entre 50 y 1540 veces inferior de las usadas en el campo (tomando rango de diluciones entre el 1% a 30% respectivamente) y 5000 veces menos de la solución comercial. Mayores dosis matan los embriones.

2. Embriones de *Xenopus laevis* fueron inyectados con 5 nl de glifosato puro en una blastomera en el estadio de dos células y dejados desarrollar hasta diferentes estadios del desarrollo embrionario. La dosis de glifosato inyectada en los embriones representa aproximadamente 10000 a 300000 veces menores que las usadas en el campo (tomando rango de diluciones entre el 1% y 30% respectivamente)

Experimentos de inmersión de herbicida,

- Disminución del largo del embrión, alteraciones que sugieren defectos en la formación del eje embrionario.

- Alteración del tamaño de la zona cefálica con compromiso en la formación del cerebro y reducción de ojos y alteraciones de los arcos branquiales y placoda auditiva.

- Alteración de los mecanismos de formación de la placa neural evidenciados por una disminución de neuronas primarias que podrían como en otros casos observados anteriormente, afectar el normal desarrollo del cerebro, cierre del tubo neural u otras deficiencias del sistema nervioso. (Franco et al. Development 1999 y Paganelli et al. MOD 2001)

Experimentos con glifosato puro,

- Alteraciones en la formación y/o especificación de la cresta neural craneal. (la cresta neural craneal es un conjunto de células ordenado en un territorio adyacente a los bordes externos de la placa neural que tienen como destino, entre otros con los arcos branquiales, la formación de cartílagos y huesos faciales. Cualquier alteración de forma por fallas de división celular o de muerte celular programada en esta región conduce a malformaciones faciales serias. En el caso de los embriones inyectados observamos una disminución de los marcadores de este tejido embrionario compatibles con una inhibición de la expresión de los mismos o con una disminución del número de células. Es sugestivo que la consecuencia de lo anterior se traduzca en una deformación de los cartílagos (condrogenesis craneal) cefálicos que constituyen el patrón de forma de los huesos de la cara. Esto es compatible con alteración de la muerte celular programada necesaria para la organización de la forma y por lo tanto con malformaciones craneales tal como fue sugerida en estudios ecotoxicológicos en anuros por Lajmanovich y col. de la Univ. del Litoral.

- El tubo intestino muestra alteraciones en su rotación y tamaño además de posibles alteraciones en la región cardiogénica.

DISCUSION

La acción del glifosato sobre los embriones sugiere un efecto específico que distorsiona o altera procesos biológicos normales en territorios y tejidos específicos. Las dosis usadas de glifosato son bajas lo que habilita a especular que no son suficientes para dañar membranas mitocondriales con muerte celular masiva, sino que actúan con tiempo necesario para la activación de las caspasas (enzimas asociadas a apoptosis) que desencadenarían la muerte celular programada en territorios específicos.

Los efectos observados del glifosato puro, en particular sobre cresta neural craneal y sus derivados, que pueden ser efectivamente compatibles con alteraciones en la regulación de la muerte celular programada, como ha sido reportado por otros grupos de investigación y son particularmente relevantes ya que resaltan los experimentos en cultivo de células del grupo de Seralini en Francia y

los trabajos del grupo de la Univ. Nacional del Litoral en larvas de anfibios, (Lajmanovich et al Bull.

Enviro.Contam.Toxicology, 2003). Los resultados de este grupo en anfibios, se compadecen con las observaciones de nuestros experimentos embriológicos.

Por lo tanto el hecho que en los experimentos aquí presentados, tanto el glifosato como el herbicida comercial afecten durante el desarrollo embrionario territorios embrionarios discretos (cabeza, ojos, intestino branquias) formados por tejidos y órganos específicos sugieren que:

1. En cada momento del desarrollo del embrión selectos grupos celulares parecen ser más sensibles al glifosato que otros, probablemente debido a estados funcionales distintos (proliferación diferenciación o migración celular). En algunos de ellos las células podrían presentar más sensibilidad que otras en un momento dado y habilitar a ser afectadas por el glifosato (por ejemplo poblaciones celulares que están en etapas de división celular o muerte celular programada o apoptosis).

2. En consecuencia, los efectos observados con las dosis aquí empleadas, en ambos grupos de experimentos, no destruyen completamente al embrión (una forma de muerte celular masiva) sino que alteran con distinta intensidad la forma y desarrollo de territorios morfogenéticos discretos.

3. Otro aspecto a resaltar es que concentraciones muy reducidas de glifosato como las usadas aquí respecto de las usadas en el terreno, producen en el embrión efectos reproducibles tanto morfológicos como moleculares acotados. Al menos hasta donde la interpretación de los marcadores moleculares nos permiten.

4. Esto posibilita interpretar que el sustento de los efectos aquí reportados producidos por el glifosato, estén asociados a la interferencia de mecanismos normales de regulación del desarrollo embrionario.

5. La conservación de la mecánica, regulación genética, especificación y determinación de territorios y poblaciones celulares durante el desarrollo embrionario, bien establecida desde los años 80 con el descubrimiento de los programas que conducen la morfogénesis (genes Hox) y los avances en la interpretación de las bases evolutivas de los vertebrados permiten inferir desde el principio de precaución de la ciencia médica que las alteraciones descritas sean efectivamente extrapolable al efecto sobre el desarrollo de cualquier vertebrado. El principio de precaución prevalece ante cualquier sospecha de daño a la salud pública.

Los experimentos por microinyección con uso posterior de marcadores moleculares de territorios y/o poblaciones celulares con cantidades discretas y controladas de glifosato puro en blastómeros embrionarios, tienen la ventaja de estudiar los efectos en las etapas tempranas del desarrollo cuando los procesos de morfogénesis están modelando el embrión y de asociar directamente a la droga con el efecto observado, evitando las posibles variaciones del medioambiente y la interferencia de los otros componentes.

El enfoque estratégico no pretende ser un estudio ecotoxicológico, sino encarar con marcadores moleculares y otras técnicas, la investigación de los mecanismos celulares propios del desarrollo embrionario normal, que pudieren estar involucrados su alteración.

Por lo tanto trata de independizar las observaciones experimentales de las variaciones del medio ambiente y de las conocidas diferencias de sensibilidad propias de las especies en su medio ambiente natural (pH, temperatura, concentraciones variables y diferentes mecanismos de absorción y excreción).