

**Evaluación de las propiedades embriotóxicas y  
teratogénicas de los herbicidas a base de glifosato  
mediante el bioensayo de toxicidad embrio-larval en pez  
cebra (*Danio rerio*).**

**VIVIANA BORTAGARAY GALLUZZO**

**Informe de pasantía de la Licenciatura en Biología  
Humana**

**Universidad de la República**

**Tutor: Dr. Daniel Rodríguez-Ithurralde**

**Laboratorio de Tesis:**

**Laboratorio de Neurociencia Molecular y Farmacología,  
Grupo de Toxicología del Desarrollo**

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE).  
Av. Italia 3318, Montevideo, Uruguay

## Índice

<b>Resumen</b> .....	4
<b>Introducción</b> .....	4
Propiedades físico-químicas y tóxicas del glifosato .....	6
Composición de las formulaciones más frecuentes .....	7
Mecanismos de acción tóxica del glifosato propiamente dicho.....	8
Mecanismos de acción tóxica del glifosato de los preparados herbicidas complejos.....	8
Persistencia en el suelo y en el medio acuático .....	9
Efectos sobre los animales .....	10
Toxicidad aguda de los componentes .....	11
Toxicidad crónica.....	12
Posibles formas de monitoreo .....	13
Desarrollo embrionario del pez cebra <i>Danio rerio</i> .....	13
Cigoto (0-3/4 h).....	14
Clivaje (3/4 -21/4 h) .....	14
Blástula (21/4 - 51/4 hpf) .....	15
Gastrulación (51/4-10 hpf).....	17
Período de segmentación (10 a 24 hpf).....	17
Período de farínula (24 hpf) .....	20
Períodos de eclosión.....	20
Período de larva temprana (más de 3 dpf) .....	20
<b>Objetivo general del estudio</b> .....	20
<b>Objetivos específicos</b> .....	21
<b>Materiales y métodos</b> .....	21
Obtención de embriones.....	21
Determinación de la LC50 .....	23
<b>Resultados</b> .....	23

Ensayos de mortalidad y determinación de LC50 .....	24
Mortalidad acumulativa.....	24
Eclosión acumulativa .....	25
Frecuencia cardíaca.....	27
Alteraciones morfológicas .....	28
<b>Conclusiones</b> .....	34
<b>Bibliografía</b> .....	36
<b>Glosario de términos</b> .....	41

## Resumen

Cada vez existe mayor evidencia que sugiere que los herbicidas formulados en base a N-(fosfometil) glicina, conocido como glifosato, usados mundialmente, representan un riesgo para la salud humana y mayoría de los seres vivos. En efecto, se ha detectado toxicidad para algas, moluscos, peces y anfibios. Dado que se han detectado concentraciones no permitidas del herbicida, sus metabolitos y coadyuvantes, en aguas y alimentos de consumo humano, existe fundada preocupación de que represente un peligro para la salud humana y animal que debería ser rigurosamente monitoreado. En este trabajo utilizoun test multiparamétrico de embriotoxicidad, previamente validado, que permite medir numerosos parámetros morfológicos, fisiológicos y bioquímicos en cientos de ensayos simultáneos con sensibilidad, reproductibilidad y bajo costo. Embriones de *Danio rerio* de una hora postfecundación (hpf), se incubaron a  $27.5 \pm 1$  °C, a razón de uno por pocillo en placas de ELISA en presencia de concentraciones finales (ccf) pre-establecidas de glifosato. Las curvas de mortalidad mostraron que a partir de ccf de 25 µg/ml, aquella fue significativamente dependiente de la concentración y del tiempo de exposición. A las 24 hpf se verificaron mortalidades del 35.4% a ccf de 50µg/ml, del 74% a 75 µg/ml y del 82% a 150 µg/ml, mientras que en controles se mantuvo entre 0-5%. A ccf de 12.5-50 µg/ml los eventos de eclosión fueron acelerados. Llegan, por tanto, a estar en contacto directo con el medio acuático externo formas más inmaduras que en los controles, que eclosionan significativamente más tarde. La frecuencia cardíaca embrionaria, medida a las 48 hpf, disminuyó significativamente a partir de los 25 µg/ml. A 50 µg/ml se comprobó edema cardíaco, así como retardo en la separación del saco vitelino. A ccf de 75µg/ml o superiores, todos los embriones mostraron alguna alteración del desarrollo tales como: edema cardio-pericárdico, enlentecimiento circulatorio, disminución de movimientos de flexión, ausencia de separación o alteraciones morfológicas del saco vitelino, incurvaciones anormales de columna vertebral y variadas malformaciones de cola o aletas. Algunas de las malformaciones registradas fueron graves e incompatibles con la sobrevivida. En conclusión, hemos demostrado efectos tóxicos y teratogénicos del glifosato a rangos de concentración publicados como atóxicos.

**Palabras clave:** desarrollo, ecotoxicología, embriotoxicidad, farmacología, glifosato, malformaciones, pez cebra, toxicología.

## Introducción

La contaminación ambiental de causa antropogénica es un fenómeno de extensión global. En los últimos 80 años, la producción de sustancias químicas ha experimentado un crecimiento explosivo, tanto en el número de nuevos compuestos como en la cantidad producida de cada uno de ellos, que ha alcanzado en la actualidad a más de 400 millones de toneladas anuales. El ingreso de contaminantes a ambientes acuáticos está asociado a la descarga de redes cloacales, efluentes industriales, vertidos accidentales y a actividades relacionadas con la agricultura, la explotación pecuaria, la forestación y la minería, entre otras. La contaminación de las aguas continentales por este tipo de actividades es de fundamental interés nacional, regional e internacional. Es universalmente aceptado que la escorrentía superficial y mecanismos conexos pueden hacer que numerosos pesticidas, otros agrotóxicos y agentes superficiales alcancen en concentraciones de riesgo a los cursos de agua utilizados para consumo animal o humano. Por otra parte, es sabido que la contaminación de los medios acuáticos provoca alteraciones en el equilibrio de los ecosistemas y repercute negativamente sobre la salud de los seres vivos del mismo, ya que el agua es su fuente primaria de subsistencia.

Por lo expuesto más arriba, se hace imprescindible el desarrollo de métodos de evaluación, diagnóstico y monitoreo de la calidad del agua para uso humano. En este trabajo utilizaré como modelo de compuesto tóxico al glifosato, ya que es de uso muy extendido en diversos cultivos, principalmente en el de soja y se sabe que llega a los cuerpos de agua. (Peruzzo et al., 2008).

Se han encontrado concentraciones potencialmente tóxicas de glifosato en muestras tomadas de cuerpos de agua cercanos a plantaciones de soja realizadas por siembra directa (Peruzzo et al., 2008), y se han detectado concentraciones no permitidas del herbicida, sus metabolitos y coadyuvantes, en aguas y alimentos para consumo humano (Mañas, 2010).

En los últimos 20 años ha ocurrido un aumento progresivo del uso agrícola de estos herbicidas en nuestro país, particularmente en los monocultivos de siembra directa (soja), donde habitualmente las cantidades aplicadas se incrementan mucho más allá de las

recomendaciones del fabricante. Por ello, existe preocupación no solamente por las concentraciones a que se están exponiendo los trabajadores agrícolas a los mismos, sino, además, por el incremento en las concentraciones del herbicida que podría estarse produciendo en los cuerpos de agua (Peruzzo et al., 2008) con consecuencias drásticas tanto para las especies acuáticas allí presentes como para el ser humano.

## Propiedades físico-químicas y tóxicas del glifosato

El glifosato, sal isopropilamínica de la N-(fosfonometil) glicina, es un herbicida de amplio espectro, no selectivo, de acción sistémica, comúnmente utilizado para eliminar malezas indeseables, pastos anuales y perennes, hierbas de hoja ancha y especies leñosas en ambientes agrícolas, forestales y paisajísticos (Chemical Profile for Glyphosate 2002; Bradberry et al., 2004). Al glifosato, lo podemos encontrar en el mercado bajo diferentes nombres comerciales, como ser Round up (Monsanto), Rodea, Accord, Kleen up, entre otros.

El glifosato es un polvo cristalino, altamente soluble en agua e insoluble en solventes orgánicos que tiene un tiempo de vida media en el suelo de unos 60 días según el fabricante, aunque diversos investigadores han reportado una vida media de uno, tres y hasta cinco años (Richard et al, 2005). En cuanto a su composición química, es una molécula formada por una fracción de glicina y un radical aminofosfato unido como sustituyente de uno de los hidrógenos del grupo a-amino, como se muestra en la figura 1.

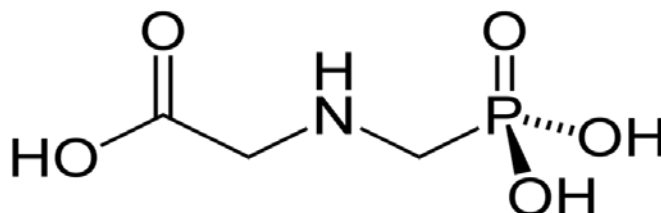


Fig. 1- Estructura química del glifosato.

## Composición de las formulaciones más frecuentes

El glifosato es el principal ingrediente de la formulación herbicida denominada Round-up, el que contiene 36% de equivalentes ácido y 48% de equivalentes sal (Martino, 1995). Es una solución viscosa de color ambarino claro, con un pH de 4.4 a 4.9, gravedad específica 1,17 y olor tenue a amina (similar a amoníaco). Las formulaciones más usuales contienen, además del ingrediente "activo", coadyuvantes y aditivos erróneamente denominados "inertes" (Cox et al, 2006), los cuales no siempre están claramente especificados en las etiquetas del producto (Sawada et al., 1988). Estas sustancias contribuyen a la acción tóxica de las formulaciones, y se ha comprobado que aquellas que las contienen producen en general mayor toxicidad aguda que el glifosato solo (Bradberry et al., 2004).

La formulación contiene además colorantes y surfactantes -como la polioxietilen-amina (POEA)- adicionados a fin de mejorar la penetración del herbicida a los tejidos de la planta, disminuyendo la tensión superficial a nivel de la hoja (Lipok et al., 2010). El Round up está compuesto por un 48% de glifosato, un 18% de surfactante, un 34% de agua destilada con cantidad no especificada de compuestos inertes.

Los surfactantes más utilizados, como el POEA, pertenecen a la familia de los compuestos amino etilados, cuyos componentes son mucho más tóxicos que el propio glifosato. La toxicidad aguda del surfactante POEA es entre 4 y 5 veces mayor que la del glifosato. Las LC50 oral (ratas) y dermal (conejos) se reportan de ~1200 y >1260 mg/kg respectivamente al que se le atribuyen diversos efectos (daños gastrointestinales, daños al sistema nervioso central, problemas respiratorios, cáncer en animales, daños al hígado, daños en riñones humanos). La poliacrilamida, que es agregada en algunas preparaciones del herbicida para reducir la deriva en el rociado y como surfactante, libera acrilamida, potente tóxico neural y reproductivo, siendo también un agente teratógeno y cancerígeno (Hardell et al., 1999). La cocción de vegetales que han estado expuestos al glifosato presentan liberación adicional de acrilamida (Weiss et al, 2002)

## **Mecanismos de acción tóxica del glifosato propiamente dicho**

La acción primaria del glifosato propiamente dicho se ejerce por inhibición de la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato-sintetasa (EPSPS), una enzima de la vía del ácido shikímico que está localizada en el cloroplasto de la planta (DellaCioppa *et al.*, 1986). La enzima es requerida para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos esenciales, y su inhibición impide que las plantas sintetizen tres aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) que son esenciales para su crecimiento y supervivencia (Schonbrunn *et al.*, 2001), usados por las plantas en la síntesis proteica y para producir muchos productos secundarios de la planta, como promotores e inhibidores de crecimiento, compuestos fenólicos y lignina (Franz *et al.*, 1997).

Desde la superficie de la planta, las moléculas de glifosato son adsorbidas en la células donde son translocadas a los tejidos meristemáticos (Laerke, 1995). En forestaciones, el glifosato es frecuentemente aplicado para liberar a las pequeñas plantas de coníferas de los dañinos efectos de competir con la vegetación indeseable.

Debido a que la enzima mencionada está ausente en animales, los fabricantes de los diferentes compuestos a base de glifosato alegan que el producto es inofensivo para los vertebrados, incluyendo los seres humanos. El glifosato puede interferir con algunas funciones enzimáticas animales, pero los síntomas de envenenamiento sólo ocurren a dosis muy altas. Se cree que también actúa de manera indirecta sobre el comportamiento de otras dos enzimas que son la clorismato mutasa y la prefrenato hidratasa.

## **Mecanismos de acción tóxica del glifosato de los preparados herbicidas complejos**

En cuanto a los mecanismos de acción tóxica de las mezclas herbicidas que normalmente se usan, se han postulado varios, incluyendo una acción desacoplante de la fosforilación oxidativa (Hayes *et al.*, 1991) e inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) (Modesto y Martínez, 2010). Estudios de laboratorio han mostrado efectos teratogénicos del Round up en animales (Lammer, *et al.*, 1990; Durston *et al.* 2011) y sus autores han



propuesto que la teratogénesis es causada por interferencia con la señalización vía ácido retinoico (Paganelli et al., 2010). Otros autores establecen que el principal metabolito de degradación del glifosato, el ácido aminometilfosfónico (AMPA) pasa a metilamina y de ésta, a formaldehído, con conocidas propiedades genotóxicas (Richard et al, 2005).

Junto a su metabolito más abundante, el AMPA -más tóxico y más resistente a la degradación que el propio glifosato- han sido clasificados entre los principales contaminantes de ríos, arroyos y cañadas (Benachour & Séralini, 2009)

### **Persistencia en el suelo y en el medio acuático**

En estudios de suelo se ha determinado que la vida media del glifosato va desde 3 a 130 días (EPA, 1990). El período de disipación en el suelo es en promedio de 44 a 60 días (Kollman and Segawa, 1995). En el suelo, el glifosato es resistente a la degradación química, estable a la luz solar y presenta baja tendencia al escurrimiento. Es relativamente inmóvil en la mayoría de los ambientes del suelo como consecuencia de su fuerte adsorción (Schuette, 1998; Sprankle et al., 1975). La ruta primaria de descomposición del glifosato en el medio ambiente es a través de la degradación microbiana en el suelo (Franz et al. 1997). La Fig. 2, muestra en forma esquemática las diferentes formas de degradación del glifosato en suelo y agua.

### **Efectos sobre los animales**

A pesar de que inicialmente se alegó que los herbicidas a base de glifosato carecían de efectos perjudiciales sobre los animales, en los últimos años se ha acumulado considerable evidencia de que pueden generar efectos tóxicos en un amplio espectro de seres vivos, incluyendo bacterias, algas, crustáceos (Tsui & Chu, 2003; Brausch & Smith, 2007), anélidos, moluscos, peces (Ojeda et al., 2007; Cavalcante et al., 2008; do Carmo Langiano, & Martinez., 2008; Bortagaray et al., 2009), anfibios (Mann & Bidwell, 1999; Smith, 2001; Relyea, 2005; Quassinti et al., 2008; Paganelli et al., 2010) aves y

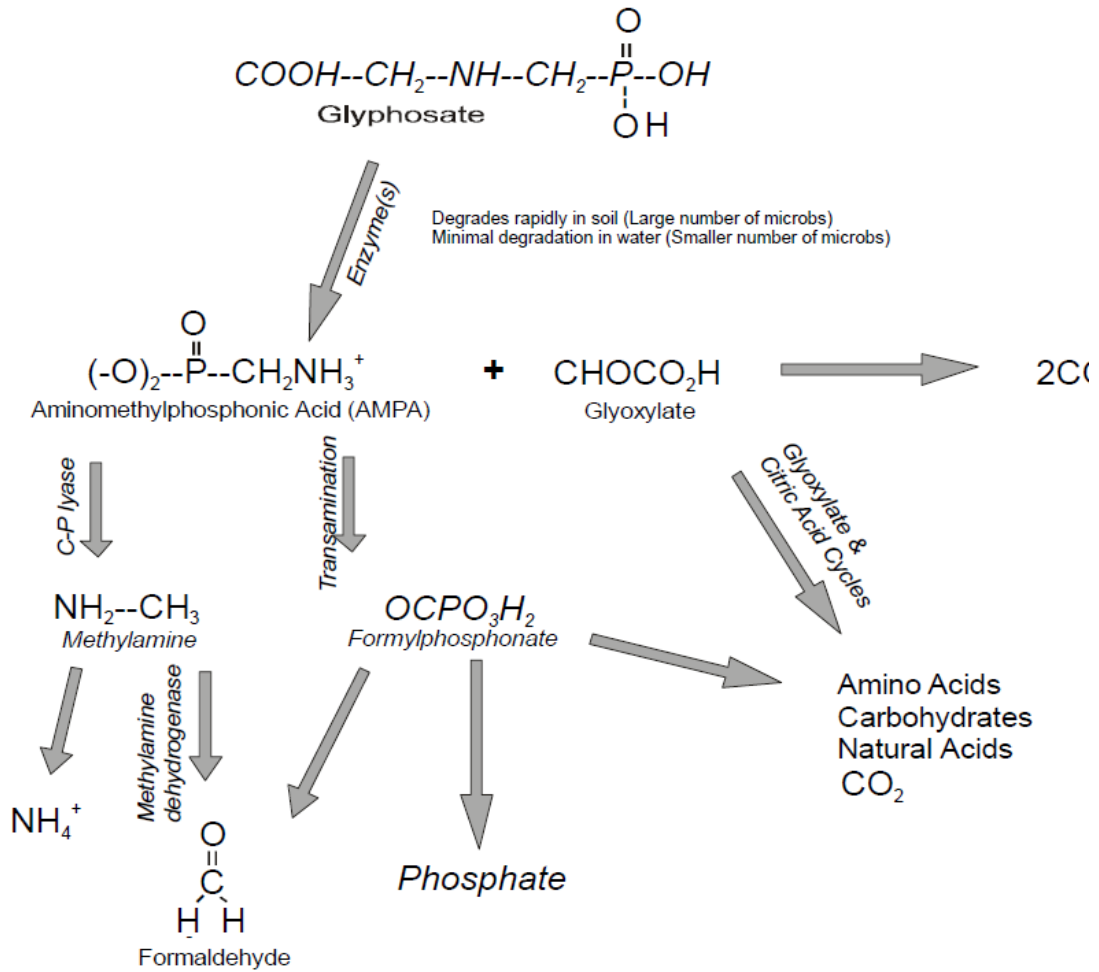


Fig.2- Diferentes vías de degradación del glifosato en suelo y medio acuático.

mamíferos (Acquavella et al., 1999; Richard et al., 2005). En humanos, cuando el glifosato es administrado en dosis consideradas generalmente como no tóxicas, es capaz de afectar la función celular, como en la esteroidogénesis, la viabilidad celular de la placenta humana, y de las células sanguíneas (Richard et al., 2005; Benachour & Séralini, 2009; Cruces, 2010).

## Toxicidad aguda de los componentes

Dependiendo de la presentación comercial y del fabricante, las mezclas herbicidas pueden además contener pequeñas cantidades contaminantes no deseadas, como el N-nitroso glifosato, el cual, como la mayoría de los compuestos N-nitroso es cancerígeno, (Richard et al, 2005). Este compuesto también puede formarse al combinarse el glifosato con los nitratos presentes en los fertilizantes, o en la saliva de quien lo ingiere (Richard et al, 2005). Además, en el Round-up, la POEA está contaminada con 1-4 dioxano, que ha causado cáncer en animales y daño hepático y renal en humanos (Kaczewer et al, 2002).

Los ingredientes incluidos en la siguiente lista fueron identificados en diferentes fórmulas comerciales a base de glifosato, se acompañan de una descripción clásica de sus síntomas de toxicidad aguda. Los efectos de cada sustancia corresponden, en algunos casos, a síntomas constatados mediante pruebas toxicológicas a altas dosis:

- Sulfato de amonio: irritación ocular, náusea, diarrea, reacciones alérgicas respiratorias. Daño ocular irreversible en exposición prolongada.
- Benzisotiazolona: eccema, irritación dérmica, fotorreacción alérgica en individuos sensibles.
- 3-yodo-2-propinilbutilcarbamato: Irritación ocular severa, mayor frecuencia de aborto, alergia cutánea.
- Isobutano: náuseas, depresión del sistema nervioso, disnea.
- Metil-pirrolidinona: Irritación ocular severa. Aborto y bajo peso al nacer en animales de laboratorio.
- Ácido pelargónico: Irritación ocular y dérmica severas, irritación del tracto respiratorio.
- Polioxietilen-amina (POEA): Ulceración ocular, lesiones cutáneas (eritema, inflamación, exudación, ulceración), náusea, diarrea.
- Hidróxido de potasio: Lesiones oculares irreversibles, ulceraciones cutáneas profundas, ulceraciones severas del tracto digestivo, irritación severa del tracto respiratorio.

- Sulfito sódico: Irritación ocular y dérmica severas concomitantes con vómitos y diarrea, alergia cutánea, reacciones alérgicas severas.
- Ácido sórbico: Irritación cutánea, náusea, vómito, neumonitis química, angina, reacciones alérgicas.
- Isopropilamina: Sustancia extremadamente cáustica de membranas mucosas y tejidos de tracto respiratorio superior. Lagrimeo, coriza, laringitis, cefalea, náusea.

En humanos, los casos de envenenamiento accidental agudo por herbicidas a base de glifosato son relativamente frecuentes (Burger et al, 2004). El cuadro clínico incluye irritaciones dérmicas y oculares, náuseas, mareos, vómitos, descenso de la presión sanguínea, reacciones alérgicas, dolor abdominal, pérdida masiva de líquido gastrointestinal, edema pulmonar, pérdida de conciencia, destrucción de glóbulos rojos, daños renal y cardíaco y eventualmente, la muerte (Burger et al, 2004).

## **Toxicidad crónica**

Existe mayor preocupación por los efectos crónicos, causados por exposiciones prolongadas al herbicida, que pasan muchas veces desapercibidas. Diversos estudios revelaron una clara relación entre la exposición al glifosato y el linfoma no Hodgkiniano (Fischer et al, 1999).

Estudios realizados con animales, han constatado toxicidad a largo plazo del glifosato. En ratas, la exposición crónica a altas dosis ha reportado disminución del peso del cuerpo en hembras; mayor incidencia de cataratas y degeneración del cristalino en machos y mayor peso del hígado en machos. En exposiciones prolongadas a dosis bajas ocurrió inflamación de la membrana mucosa estomacal en ambos sexos (Cox, 1995).

En ratones con dosis altas (alrededor de 4.800 mg/kg/día) se presentó pérdida de peso del cuerpo, excesivo crecimiento y posterior muerte de células hepáticas particulares e inflamación crónica de los riñones en machos; en hembras ocurrió excesivo crecimiento de células de los riñones. A dosis bajas (814 mg/kg/día) se presentó excesiva división celular en la vejiga urinaria (Cox, 1995).

Para la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA), exposiciones continuadas a residuos presentes en aguas a concentraciones por encima de 0.7 mg/L pueden causar daño renal. En pruebas de laboratorio con ratas y conejos el glifosato afectó la calidad del semen y la cantidad de espermatozoides (Cox 1995, Dinham, 1998). En seres humanos, exposiciones continuadas a residuos en aguas en concentraciones por encima de 0.7 mg/L pueden causar efectos en la funcionalidad el aparato reproductor (US EPA).

El conjunto de las evidencias enumeradas hasta aquí muestra que el uso incontrolado de los herbicidas a base de glifosato representa un peligro para la salud humana y animal, así como una amenaza para la biodiversidad, para los recursos pesqueros en general y para la piscicultura (Gluszczak et al., 2007; Salbego et al., 2010).

## **Posibles formas de monitoreo**

Por lo arriba señalado, se hace necesario el perfeccionamiento de métodos de diagnóstico de los efectos tóxicos de las formulaciones herbicidas, que puedan ser útiles en determinar la calidad del agua para uso humano (Rodríguez-Ithurralde, 2004, 2007). Un tipo de test altamente novedoso y que permite el ensayo de múltiples muestras y parámetros simultáneamente, son los tests de toxicidad embrio-larval realizados en el pez cebra. El mismo ha sido desarrollado en varios laboratorios (Braunbeck y Lammar, 2006) y perfeccionado en el Laboratorio de Neurociencia Molecular del IIBCE (Ojeda et al., 2007; Bortagaray et al. 2009, 2013; Rodríguez-Ithurralde, 2010 a,b). Como antecedente de dicha tecnología, se hace necesario un conocimiento detallado del desarrollo embrio-larval del pez cebra (Hill, 2005).

## **Desarrollo embrionario del pez cebra *Danio rerio***

La utilización de peces en la experimentación animal tiene sus inicios en el campo de la toxicología acuática. Los trabajos experimentales con peces se incrementan como resultado de la creciente utilización de pesticidas. A partir de los 60, además de establecerse las dosis letales en experimentos de toxicidad aguda, se utilizan los peces en

ensayos crónicos con la finalidad de determinar los efectos genotóxicos, patológicos, comportamentales (u otros) de determinados xenobióticos.

El modelo del pez cebra inicialmente se originó para el estudio del desarrollo embrionario en vertebrados. Este modelo genético es un puente entre los modelos animales más estudiados: entre la *Drosophila* (mosca) / *Caenorhabditis* (gusano) por un lado, y el ratón/hombre, por otro.

A continuación se describen una serie de etapas del desarrollo embrionario o embriogénesis del zebra fish: cigoto, clivaje, blástula, gastrulación, segmentación, farínula y períodos de eclosión. Los distintos estadios del desarrollo pueden relacionarse con las horas post-fecundación (hpf) a 27,5 °C.

### **Cigoto (0-3/4 h)**

El huevo fertilizado está en período de cigoto hasta que ocurre el primer clivaje, aproximadamente unos 40 minutos luego de que ocurre la fertilización. El huevo del pez cebra es telolecítico, pues su mayor parte está ocupada por vitelo; presenta dos regiones bien diferenciadas: un polo animal y un polo vegetal rico en vitelo.

La fecundación produce una instantánea reducción del tamaño del huevo y una pequeña separación inicial entre el corion y la membrana plasmática. El citoplasma del polo animal comienza a moverse favoreciendo la formación del blastodisco, el cual se separa del polo vegetal. La fertilización activa movimientos citoplasmáticos evidentes dentro de los primeros 10 minutos.

### **Clivaje (3/4 -21/4 h)**

La segmentación que presenta este organismo es meroblástica discoidal debido a que ocurre solo en el blastodisco, una delgada región del citoplasma libre de vitelo en el polo animal del cigoto. Después del primer clivaje las blastómeras se dividen aproximadamente cada 15 minutos.

## Blástula (21/4 - 51/4 hpf)

El alargamiento y la pérdida de sincronía en los ciclos celulares marcan el inicio de la transición de la blástula media (TBM), donde las células comienzan a tener movilidad y comienza la transcripción del genoma del cigoto. La fusión de las células en el borde vegetal del blastodermo con las células vitelinas subyacente produce la formación de la capa sincicial vitelina (CSV). En el estadio de blástula tardía

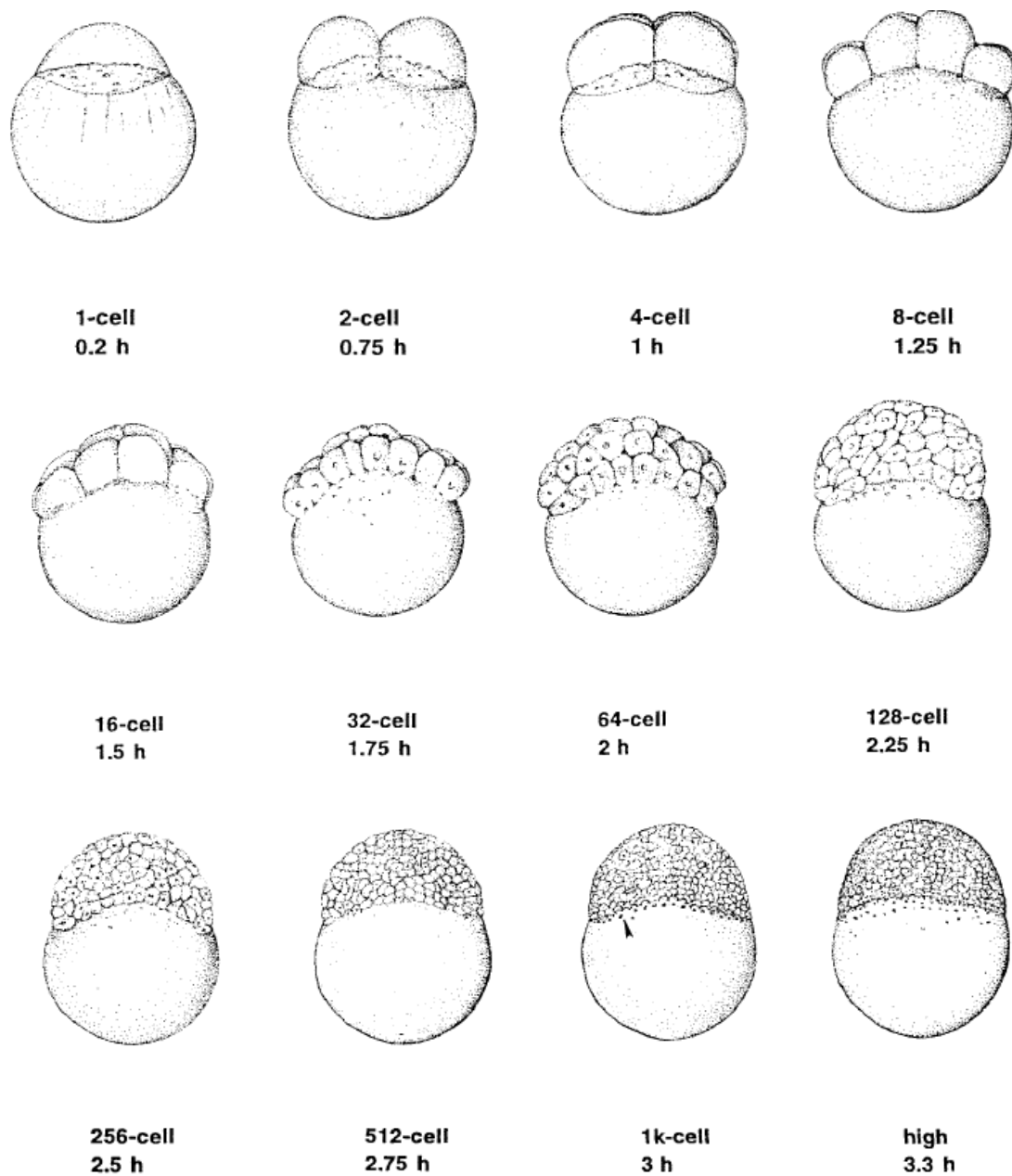


Fig. 3- Ilustración de las primeras 3.3 hpf del desarrollo de *Danio rerio*, según Kimmel et al. (1995).

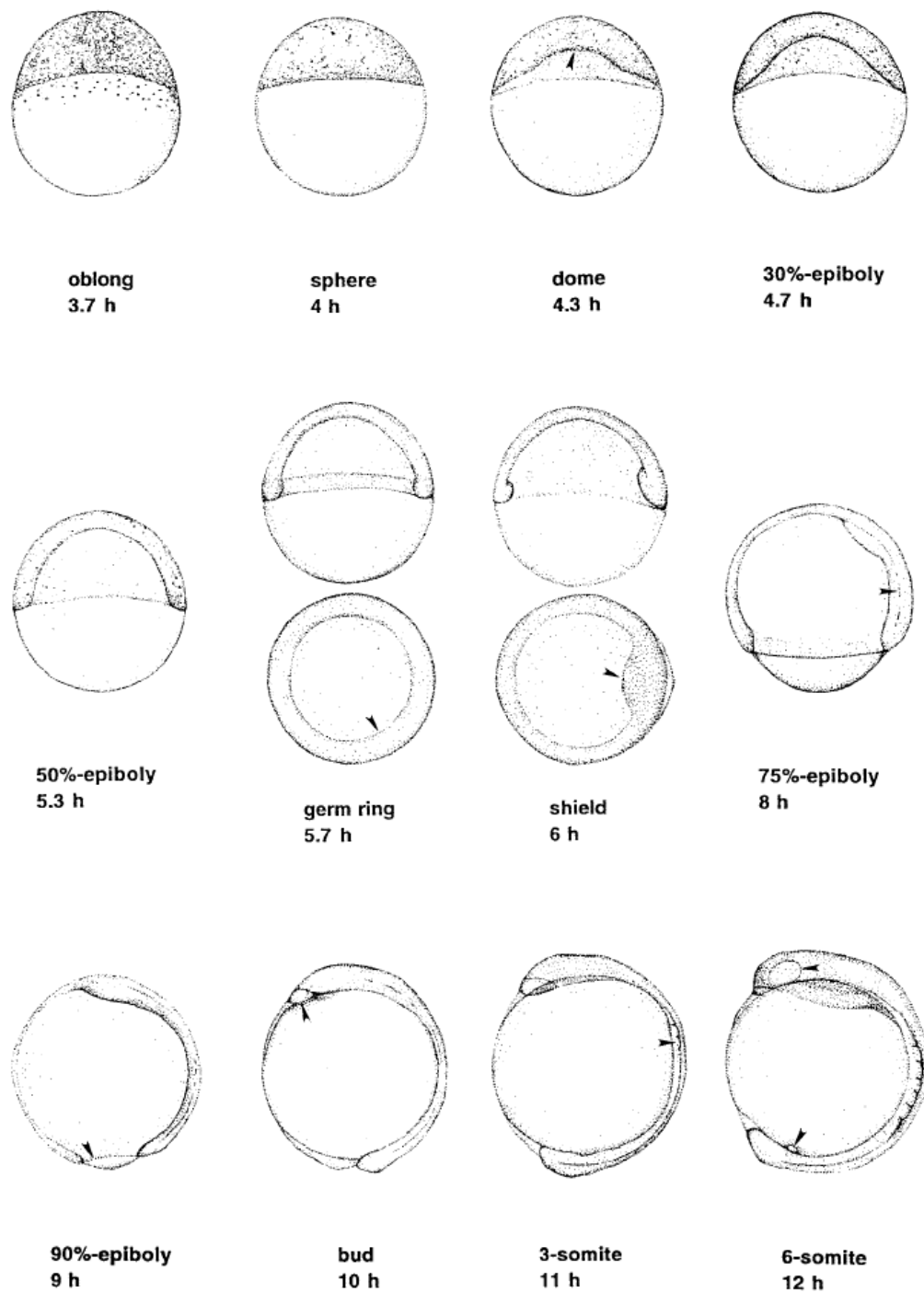


Fig. 4- Desarrollo del *Danio rerio*, entre las 3.7 y 12 hpf, según Kimmel et al. (1995).



comienza un fenómeno de migraciones celulares llamado epibolia, que consiste en el desplazamiento de la CSV y el blastodisco sobre la célula vitelina, envolviéndola completamente hacia el final del período de gástrula.

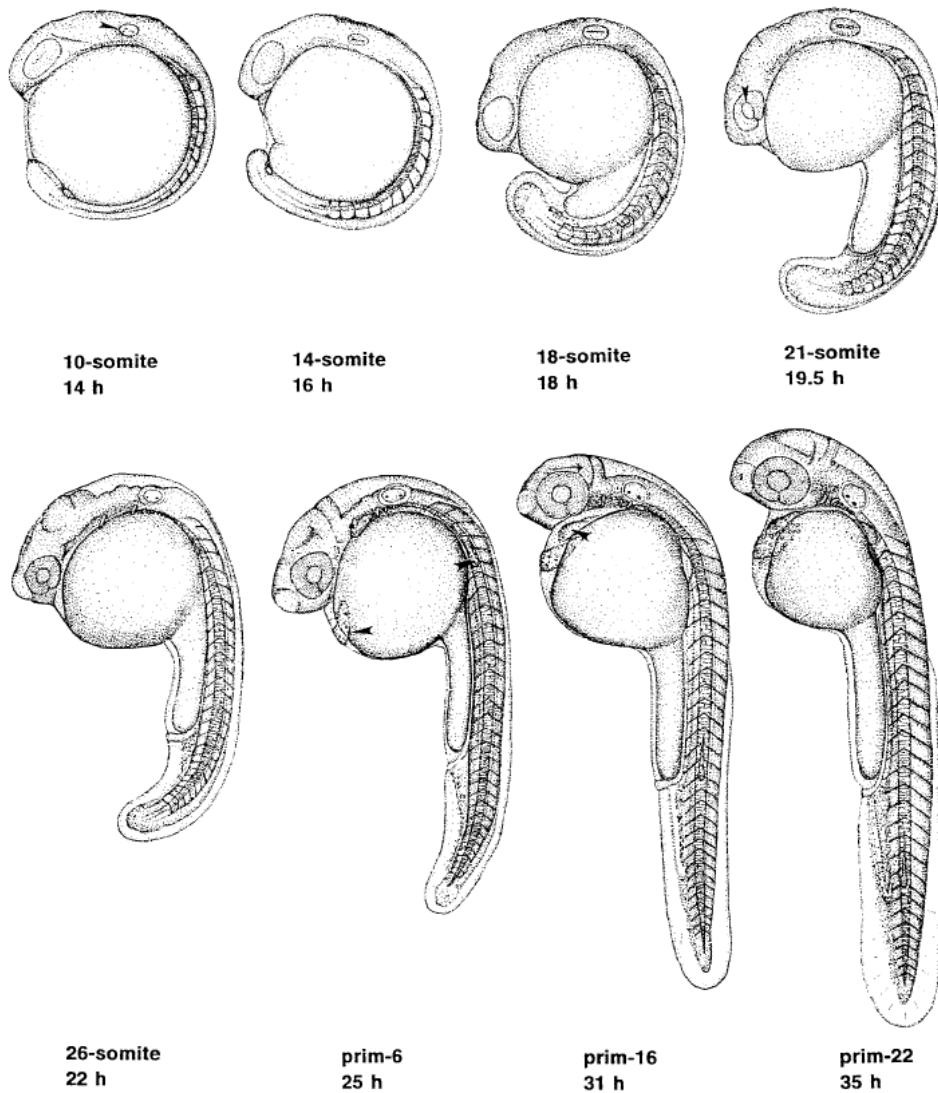


Fig. 5- Desarrollo del *Danio rerio*, entre las 14 y 35 hpf, según Kimmel et al. (1995).

### Gastrulación (51/4-10 hpf)

En la gastrulación ocurren movimientos morfogénicos de involución, convergencia y extensión, produciéndose las capas germinales primarias y los ejes embrionarios. Aparece una región marginal densa llamada anillo germinal alrededor de todo el perímetro del blastodermo. El primer movimiento de la gastrulación, es la epibolia de las células del

blastodermo sobre el vitelo. Luego, los movimientos convergentes rápidamente producen una acumulación local de células, llamada escudo embrionario. Las células del blastodermo germinal involucionan sobre si mismas, determinando así dos capas germinales, la superior llamada epiblasto, y la inferior llamada hipoblasto. Las células que permanecen en el epiblasto corresponden al ectodermo definitivo, que dará lugar a tejidos como la epidermis, el sistema nervioso central, la cresta neural y las placas sensoriales. Del hipoblasto derivarán estructuras comúnmente asociadas al mesodermo y endodermo. El escudo embrionario, es equivalente al organizador de Spemann en anfibios (Ho, 1992). La gastrulación llega a su fin cuando la epibolia ha terminado, y la célula vitelina ha sido cubierta totalmente por el blastodermo.

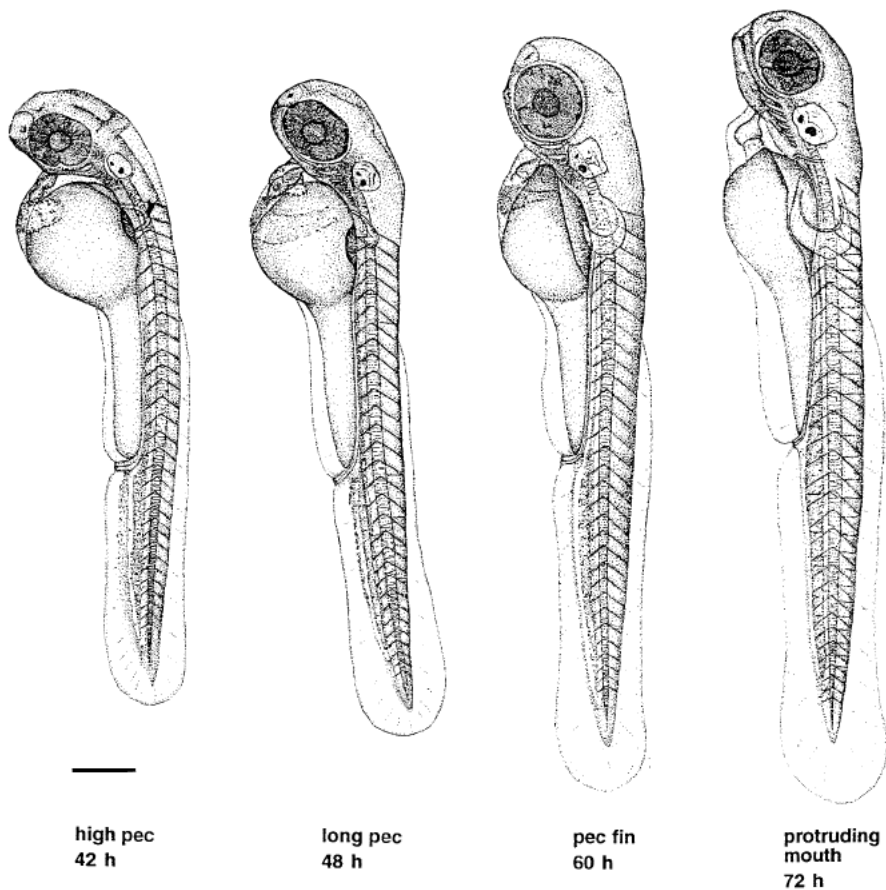


Fig. 6- Desarrollo del *Danio rerio*, entre las 42 y las 72 hpf, según Kimmel et al. (1995).

## **Período de segmentación (10 a 24 hpf)**

En este período se desarrollan los somites, se hacen visibles los rudimentos de los órganos primarios, el brote caudal es más prominente y el embrión se elonga. Se diferencian morfológicamente las primeras células y aparecen los primeros movimientos del cuerpo (Gilbert, 2006). Los somites aparecen en tronco y en cola, desarrollándose primero los anteriores y luego los posteriores. La mayoría de las células internas de cada somite originará un miótomo, o segmento muscular, separados de los miótomos adyacentes por un mioseptum conectivo.

Hacia ambos lados del tercer par de somites se desarrollan los riñones pronéfricos, primordios funcionales de los riñones del pez adulto. Otro derivado de los somites es el esclerótomo, que dará lugar al cartílago vertebral. Para el final de este período, el embrión posee entre 30 y 34 pares de somites.

En embriones de pez cebra la neurulación esta temporalmente superpuesta con el periodo de segmentación. Al comienzo de esta ultima aparece un esbozo transitorio de sistema nervioso central, y a medida que esta va avanzando, el rudimento da origen a estructuras neurales claramente diferenciadas, llamadas neurómeros (Gilbert, 2006). Los tres primeros neurómeros van a formar el cerebro anterior (diencéfalo y telencéfalo) y el cerebro medio (mesencéfalo), mientras que los 7 neurómeros restantes, y más posteriores, son llamados rombómeros (1 a 7), y van a formar el cerebro posterior o romboencéfalo, el que dará origen al metencéfalo y al mielencéfalo. Desde las paredes laterales del diencéfalo, se van a desarrollar muy temprano en este período los primordios ópticos, que darán origen a los ojos.

Durante este período, a nivel del tronco espinal comienza la diferenciación de las primeras neuronas sensoriales y motoras. A medida que avanza la diferenciación de las sinapsis entre estos dos tipos de neuronas, empiezan a aparecer respuestas motoras a los estímulos que ocurren sobre la región antero-dorsal del embrión.

## **Período de farínula (24 hpf)**

El embrión se caracteriza por su organización bilateral, ya posee la notocorda desarrollada y un grupo completo de somites que se extienden hasta el final de su cola. Entre las estructuras que se desarrollan en este período se encuentran las aletas, la boca, las mandíbulas, y los arcos branquiales. Se forma el sistema circulatorio, observándose latido cardíaco y circulación sanguínea. Además se diferencian las células pigmentarias (melanóforos), que son derivadas de células de la cresta neural.

## **Período de eclosión**

Durante el tercer día post fecundación, los embriones comienzan a eclosionar y reciben el nombre de larvas o eleutheroembriones, según la nomenclatura que se utilice (Belanger et al., 2010).

## **Período de larva temprana (más de 3 dpf)**

La formación de la mayoría de los rudimentos de órganos ya se ha completado aunque el embrión sigue creciendo. En la larva, los cambios son muy notorios: se infla la vejiga natatoria, y la larva comienza a nadar. Comienzan a mover las mandíbulas, las aletas pectorales y los ojos en busca de alimento externo. Las contracciones musculares desordenadas comienzan a ser sustituidas por movimientos coordinados que resultan en intentos de nado.

## **Objetivo general del estudio:**

El objetivo general de esta propuesta es estudiar los efectos de la formulación más usada del glifosato sobre el desarrollo embrio-larval del pez cebra (*Danio rerio*) como modelo de vertebrado.

## **Objetivos específicos:**

- 1.- Determinación de las curvas dosis-respuesta (concentración-respuesta) de la acción del tóxico.
- 2.- Determinar la concentración letal 50 (LC50) de la formulación herbicida.
- 3.- Analizar a diferentes concentraciones del herbicida, el conjunto de biomarcadores morfológicos, histo-estructurales, funcionales y eventualmente bioquímicas de uso habitual en el laboratorio.

## **Materiales y métodos**

### **Obtención de embriones**

En el estudio se emplean embriones de pez cebra (*Danio rerio*), producidos en la Unidad Zebrafish del Laboratorio de Neurociencia Molecular del IIBCE. La colonia es mantenida a una temperatura constante y controlada de  $27,5^{\circ}\text{C} \pm 1$ , en un ciclo de luz- oscuridad consistente en 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad (Nagel, 2002; Fraisse et al., 2006; Ojeda et al, 2007). El agua de sistema es pasada a través de un filtro de carbón activado granulado y luego por un filtro con poros de 3 micras. El pH ideal del agua es de 6.5-7.5; el pH de nuestras peceras es de  $7.0 \pm 0.5$ . La conductividad es de  $600 \mu\text{S}$ . Los niveles de amonio deben ser menores que 2 ppm, los niveles de nitrato menores a 40 ppm y los de nitrito menores a 1 ppm. Diariamente se verifican niveles de conductividad, se recambia un 10% del agua de cada pecera por filtrada limpia de sistema, se alimentan los peces 1 vez por día con artemia y 2 veces por día con escamas. Semanalmente, se verifican los niveles de amonio, nitrito y nitrato; los niveles de pH y se ajustan si es necesario. Mensualmente, se cambian los filtros si es necesario.

La cepa utilizada posee alta homogeneidad genética ya que es producto de sucesivos cruces endogámicos. Para la obtención de los embriones, se colocan a razón de dos

machos y una hembra en cada paridera, haciendo un total de cinco parideras. En cada paridera se colocan 5cm de alto de bolitas de vidrio para disminuir la predación de los huevos por los adultos durante la puesta, el efecto producido por estas es evitar que los adultos puedan comerse los embriones ya que estos quedan sobre el fondo de las parideras protegidos por las bolitas de vidrio. Al día siguiente, una hora luego del encendido de la luz (lo cual desencadena la actividad reproductiva), son retirados los embriones, con una pipeta de 2mm de diámetro, con un tiempo estimado de vida de una hora post fecundación (1 hpf), lavados en agua de sistema filtrada y colocados en placas de ELISA, a razón de un embrión por pocillo (Nagel, 2002), quedando así determinada la edad de los embriones con un error de una hora, como máximo.

En la primer columna de las placas se colocaron 1ml de agua de sistema, en cada pocillo correspondiendo al control negativo; en la segunda columna se colocaron en cada pocillo 1ml de la concentración de 12,5  $\mu\text{g/ml}$  de glifosato, y en la siguiente columna se colocaron 1ml de la concentración de 25  $\mu\text{g/ml}$ , y así en cada columna 1 ml por pocillo de las siguientes concentraciones finales de glifosato: 50, 60, 75 (en  $\mu\text{g/ml}$ ). Los embriones son incubados en las mismas condiciones de temperatura, pH, conductividad y luz que el resto de los peces del bioterio. A diferentes tiempos: 12, 24, 48, 72, 96 hpf (horas post fecundación), cada pocillo con su embrión correspondiente, es examinado en un microscopio estereoscópico Wild M5A (Heerbrugg) o en un estereomicroscopio Nikon modelo SMZ 745T y equipado para microfotografía con una cámara digital Micrometrics Modelo 319CU. Las fotografías son analizadas con el software ad-hoc. Parte de ellos son examinados con un microscopio Nikon E-200 con cámara incorporada. Para histología general, los embriones y larvas son fijados en paraformaldehído al 3%, y glutaraldehído 0,75% en un buffer cacodilato de sodio (pH 7,4) e incluidos en Araldita, seccionados en cortes semifinos y teñidos con solución de Richardson (azul de metileno 2%, azur II 1%, borato de sodio 2%).

Mediante la determinación de los puntos finales del desarrollo, establecidos en nuestro bioterio (Ojeda et al., 2007; Rodríguez-Ithurralde, 2010) de acuerdo con los estadios del desarrollo del pez cebra internacionalmente aceptados (Kimmel et al., 1995), se evalúan y cuantifican los cambios morfológicos y fisiológicos provocados por las distintas concentraciones de glifosato.

## **Determinación de la LC50**

La dosis letal 50 (LD50) es la cantidad de un material determinado completo de una sola vez, que provoca la muerte del 50% (una mitad) de un grupo de animales de prueba. La LD50 es una forma de medir el envenenamiento potencial a corto plazo (toxicidad aguda) de un material. LC se refiere a Concentración Letal. Los valores LC usualmente se refieren a la concentración de un químico en estudios ambientales, también puede significar la concentración de un químico en agua.

La mortalidad y LC50 se estudiaron mediante bioensayos estáticos, realizados por duplicado y utilizando tiempos de exposición de 24, 48, 72 y 96 hpf. En cada ensayo se incluyó un grupo control utilizando agua de sistema sin tóxico. Se emplearon las siguientes concentraciones finales nominales: 12,5, 25, 50, 75 y 150 µg/ml. La determinación de la LC50 a las 48 hpf fue realizado con el método de Probit (Bliss, 1934), tal como es recomendado por la EPA.

Empleando **test estadísticos paramétricos y no paramétricos**, según corresponda, se determinaron si las alteraciones de la sobrevivencia o del desarrollo observadas luego de la acción del glifosato (a diferentes tiempos y concentraciones) son o no significativas.

## **Resultados**

Uno de los aspectos más importantes en toxicología y ecotoxicología es la relación entre la concentración de un compuesto químico a la cual se expone un organismo y el consecuente efecto nocivo que éste le produce. Esta relación, conocida como dosis-respuesta, constituye la base para evaluar la toxicidad de un compuesto. Existen muchas formas de determinar toxicidad, sin embargo el indicador comúnmente más utilizado es la muerte del organismo de prueba luego de haber sido expuesto o haber estado en contacto con el compuesto en estudio.

## **Ensayos de mortalidad y determinación de LC50**

La mortalidad y LC50 se estudiaron mediante bioensayos estáticos, realizados por duplicado, utilizando tiempos de exposición de 24, 48, 72 y 96 hpf. En cada ensayo se incluyó un grupo control utilizando agua de sistema sin tóxico. Se emplearon las siguientes concentraciones finales nominales: 12,5, 25, 50, 75 y 150  $\mu\text{g/ml}$ . La determinación de la LC50 a las 48 hpf fue realizado con el método de Probit tal como es recomendado por la EPA de Estados Unidos. El método Probit, es un método paramétrico que consiste en transformar la proporción de mortalidades observada mediante la función Probit, y los valores de las concentraciones utilizadas en el ensayo a su logaritmo en base 10 ( $\log_{10}$ ). Asumiendo una distribución normal de dichos logaritmos, la relación entre las variables transformadas tiende a ser lineal; por lo que se puede realizar una regresión lineal y, de allí, es posible estimar el valor de LC50 y su intervalo de confianza, que en este trabajo fue del 95%. Mediante este método, la LC50 calculada es de 25.721  $\mu\text{g/ml}$ . Es decir, que a una concentración final de glifosato de 25.721  $\mu\text{g/ml}$ , se muere el 50% de la población de embriones de zebrafish expuesto al herbicida a las 48hpf en el experimento.

## **Mortalidad acumulativa**

Los ensayos realizados arrojaron resultados contundentes acerca de la toxicidad del herbicida aquí utilizado con respecto a la mortalidad. Se comprobó que la mortalidad aumenta de forma concentración y tiempo-dependiente. A medida que aumenta el tiempo de exposición y la concentración del herbicida, aumenta también la mortalidad.

En la Fig. 7, se observa que a partir de las ccf de 25 $\mu\text{g/ml}$ , la mortalidad de los embriones fue significativamente dependiente de la concentración y del tiempo de exposición al herbicida. Es decir que a mayores concentraciones de glifosato y mayor tiempo de exposición, aumenta la mortalidad significativamente. A las 24 hpf, en la ccf de 50  $\mu\text{g/ml}$ , se verificó una mortalidad del 35.4%, mientras que en la ccf de 75  $\mu\text{g/ml}$ , la mortalidad fue del 74%, con el mismo tiempo de exposición de los embriones al herbicida, observándose que la mortalidad está directamente relacionada a la concentración del herbicida. A una concentración de 150  $\mu\text{g/ml}$ , la mortalidad fue del 82%. En los controles, la mortalidad se mantuvo entre 0-5%. Comparando las



mortalidades de las concentraciones de 50, 75, 150  $\mu\text{g/ml}$  a las 24 hpf versus el control, se observa que la mortalidad está en concordancia con el aumento de la concentración del herbicida

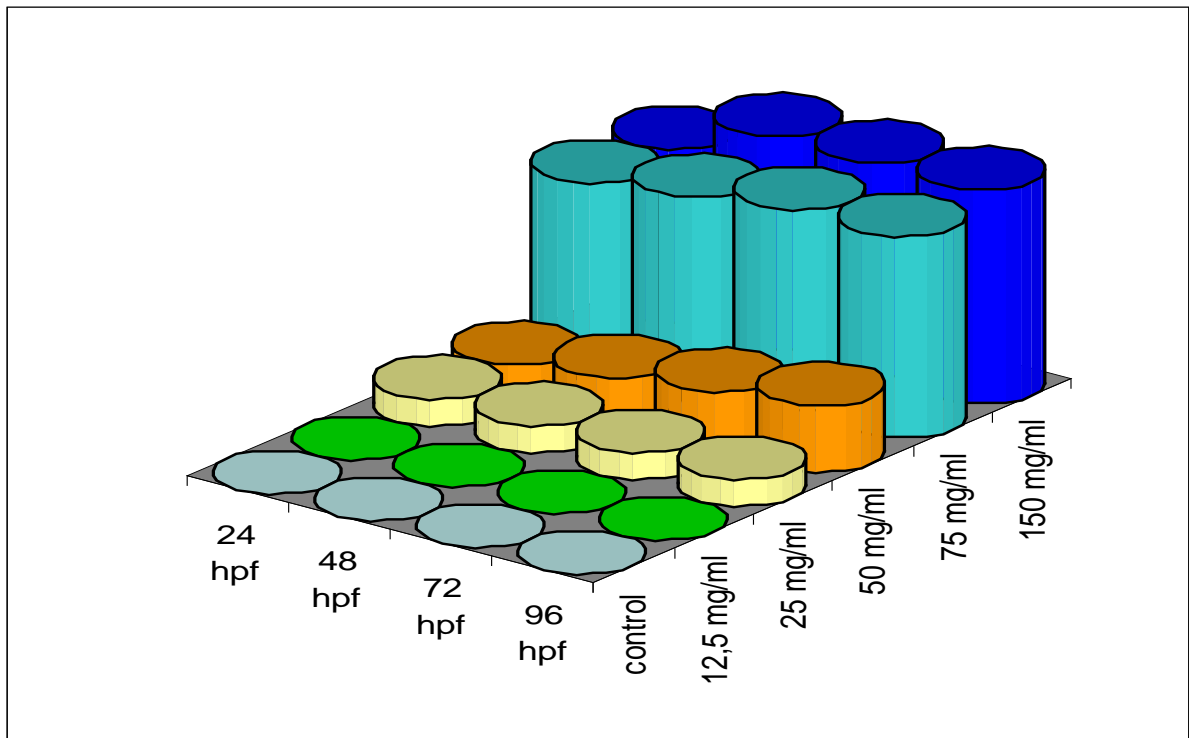


Fig. 7- Curva de mortalidad acumulativa en función de la concentración de glifosato, se observa que a partir de las ccf de 25 $\mu\text{g/ml}$ , la mortalidad de los embriones es significativamente dependiente de la concentración y del tiempo de exposición al herbicida. Se observa que a mayores concentraciones de glifosato y mayor tiempo de exposición, aumenta la mortalidad significativamente.

### Eclosión acumulativa

En el período de eclosión se identifica una larva de nado libre que aún posee saco vitelino. Dicho estadio generalmente comienza aproximadamente a partir de las 72 hpf, por lo cual no deberíamos ver a este tiempo muchos embriones eclosionados.

La Fig. 8 corresponde a una gráfica con las siguientes variables: porcentaje de embriones eclosionados, diferentes concentraciones de glifosato a las que fueron expuestos y el

tiempo en el cual se obtuvieron los datos, que fueron a las 72 y 96 hpf. A ccf entre 12,5-50  $\mu\text{g/ml}$ , se produce una aceleración de los eventos de eclosión. La proporción de embriones eclosionados a las 72 hpf, fue significativamente mayor que en los controles. Los controles eclosionan significativamente más tarde, coincidiendo con el tiempo determinado en los puntos finales del desarrollo.

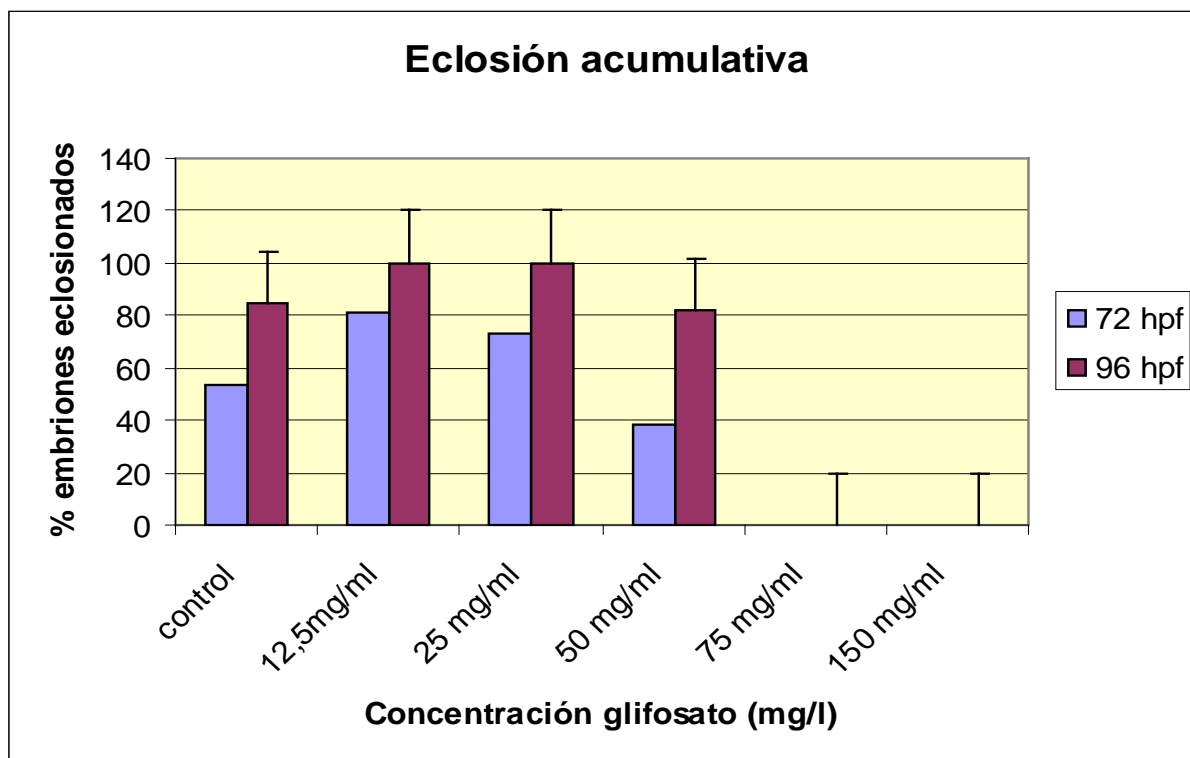


Fig. 8- Representación grafica de la eclosión de los embriones expuestos a ccf de glifosato de 12,5, 25 y 50  $\mu\text{g/ml}$  y de control a las 72 y 96 hpf. En embriones de ccf 12,5 y 25  $\mu\text{g/ml}$  se observa un mayor porcentaje de eclosión respecto al control lo que correspondería a una eclosión prematura de dichos embriones.

A las 72 hpf, el 80% de los embriones expuestos a una concentración final de glifosato de 12,5  $\mu\text{g/ml}$  ya eclosionaron, es decir, que hay formas inmaduras nadando libremente, las cuales en la mayoría de los casos no van a ser capaces de sobrevivir por si solas. A las 72 hpf eclosionaron alrededor de un 75% de los embriones expuestos a ccf de 25  $\mu\text{g/ml}$  de glifosato. Mientras que en los controles, la eclosión fue de un 50% para la misma edad. A las 96 hpf, el 100% de los embriones expuestos a concentraciones de 12,5 y 25  $\mu\text{g/ml}$  de glifosato ya había eclosionado.

## Frecuencia cardíaca

La frecuencia cardíaca esta definida como el número de contracciones del corazón por unidad de tiempo. Su medida se realiza en condiciones determinadas y controladas, como ser reposo, actividad, temperatura, pH y se expresa en latidos por minutos.

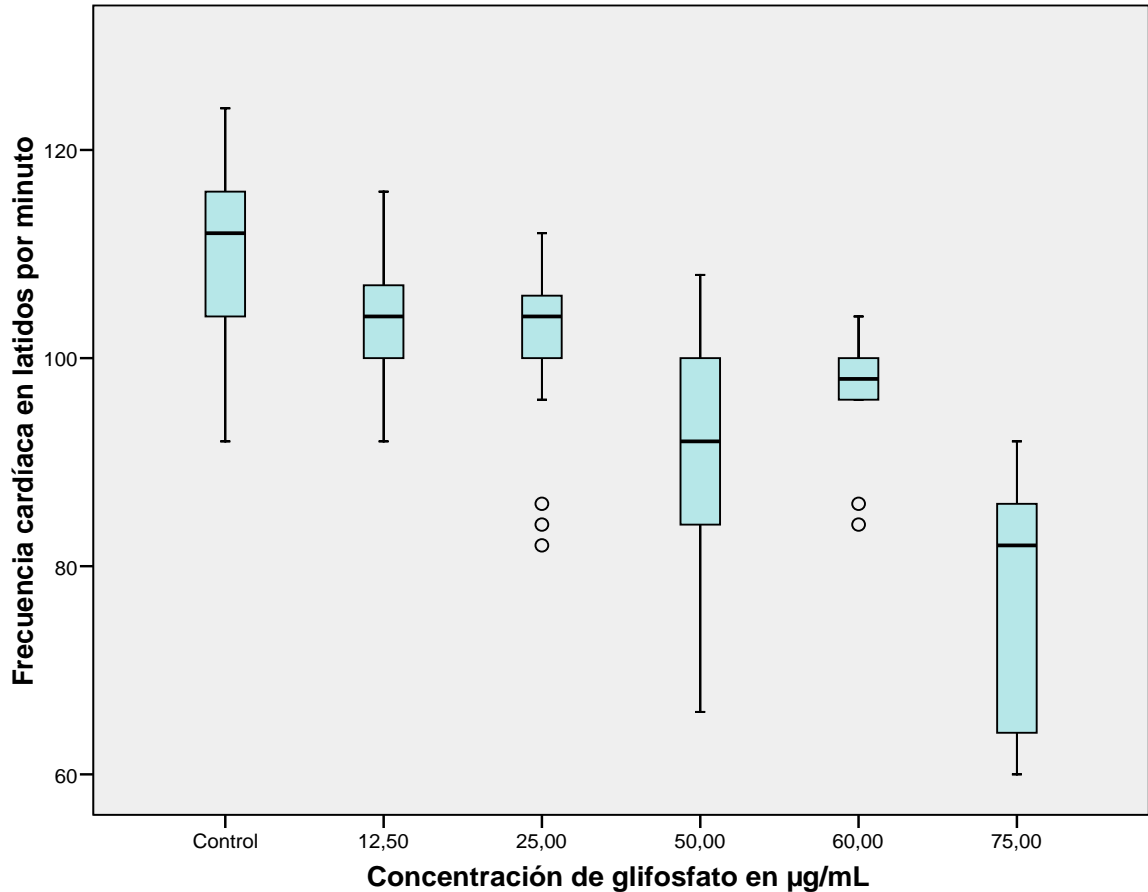


Fig. 9- Diagrama de cajas de la distribución de la frecuencia cardíaca en embriones de 48 hpf. Se muestra la distribución de la frecuencia cardíaca, expresada como número de latidos por minuto, en función de las diferentes concentraciones de glifosato a que fueron expuestos los especímenes, con un intervalo de confianza del 95%. La primera representación corresponde a la situación control.

El análisis de la frecuencia cardíaca, se representa mediante un diagrama de cajas, el cual muestra una representación de la distribución de datos, señalando donde caen la mayoría de los valores que difieren considerablemente de la norma. El lado inferior del rectángulo representa el primer cuartil, y el lado superior, el tercer cuartil, por lo tanto la altura de la caja representa el rango intercuartílico. La línea horizontal a través de la caja es la

mediana. Las líneas verticales que sobresalen de la caja, se denominan bigotes, estos se extienden, respectivamente hasta el mínimo y el máximo del conjunto de datos, siempre que estos valores no difieran de la media más de una vez y media el rango intercuartílico; los extremos de los bigotes están marcados por líneas horizontales cortas. Los valores indicados por puntos, ya sea por debajo o por encima de los bigotes inferior y superior, son considerados valores atípicos. La representación gráfica mediante diagrama de cajas, proporciona una visión general de la simetría de la distribución de los datos; si la mediana no está en el centro del rectángulo, la distribución no es simétrica.

Comparando las medianas de los valores en las concentraciones de 12,5 y 25µg/ml entre sí, no se observan variaciones, pero si los comparamos con el grupo control, se observa que la frecuencia cardíaca disminuye significativamente. En los embriones expuestos a las concentraciones de 50, 60 y 75µg/ml, la frecuencia cardíaca disminuye considerablemente respecto al control y a las concentraciones de 12,5 y 25 µg/ml. La frecuencia cardíaca embrionaria, medida a las 48 hpf, disminuye significativamente a partir de ccf de 25 µg/ml. A 50 µg/ml aparece edema cardíaco (lo menciono aquí pues puede condicionar un agravamiento de la condición fisiopatológica). El pico de incremento de la frecuencia cardíaca se encuentra a ccf de 60 µg/ml disminuyendo a las concentraciones de 50 y 75 µg/ml.

## **Alteraciones morfológicas**

Las alteraciones morfológicas corresponden a cambios estructurales que ocurren en tejidos o células, que se expresan y por lo tanto se pueden observar a nivel fenotípico en los embriones. Estos cambios se denominan alteraciones debido a que difieren de lo que es considerado como normal durante el desarrollo embrionario del zebrafish. Previo a la identificación de las alteraciones, se verificaron la presencia de puntos finales pre-establecidos del desarrollo de este embrión, aceptados internacionalmente, y basada en estos es que se identifican las alteraciones morfológicas.

En la Fig. 10 se muestran estereomicrografías de larvas y de un embrión que fueron expuestos al herbicida (ccf de 25 y 50 µg/ml) desde la primera hora post-fertilización hasta las 72 hpf. La misma ilustra una variedad de alteraciones estructurales, tales como

moderada y severa lordosis y moderada cifosis, rotación del eje antero-posterior, siendo todas alteraciones morfológicas a nivel de la columna vertebral. La Fig. 11, corresponde a estereomicrofotografías de larvas con un tiempo de exposición de 1 a 120 hpf, expuestas a ccf de glifosato de 25 y 50 $\mu$ g/ml. A las 96 hpf se observan malformaciones como ser cifosis distal y lordosis proximal, y a las 120 hpf se observan gibas de columna, cola con terminación romboide, gran vitelo y gran desarrollo ocular. En la Fig. 12 se pueden observar embriones con edades de 24 y 48 hpf, los cuales fueron expuestos a ccf del herbicida de 75 $\mu$ g/ml. Se observan groseras alteraciones morfológicas incompatibles con la vida, como ser embriones sin vitelo, sin diferenciación de cabeza ni de sistema nervioso central, algunos presentan el corion roto, y otros no desarrollaron somites.

La Fig. 13 muestra estereomicrofotografías de embriones de 48 hpf de edad, que fueron expuestos a ccf de glifosato de 75 $\mu$ g/ml, en las cuales se pueden observar graves malformaciones como gran presencia de vitelo, deformación en cola, escasa diferenciación a nivel de la cabeza. En la Fig. 14 se observan estereomicrografías de embriones que están cursando la etapa de faringula y que fueron expuestos a ccf de glifosato de 100  $\mu$ g/ml en un tiempo de 24 a 54 hpf, donde se pueden detectar graves alteraciones a nivel del corion.

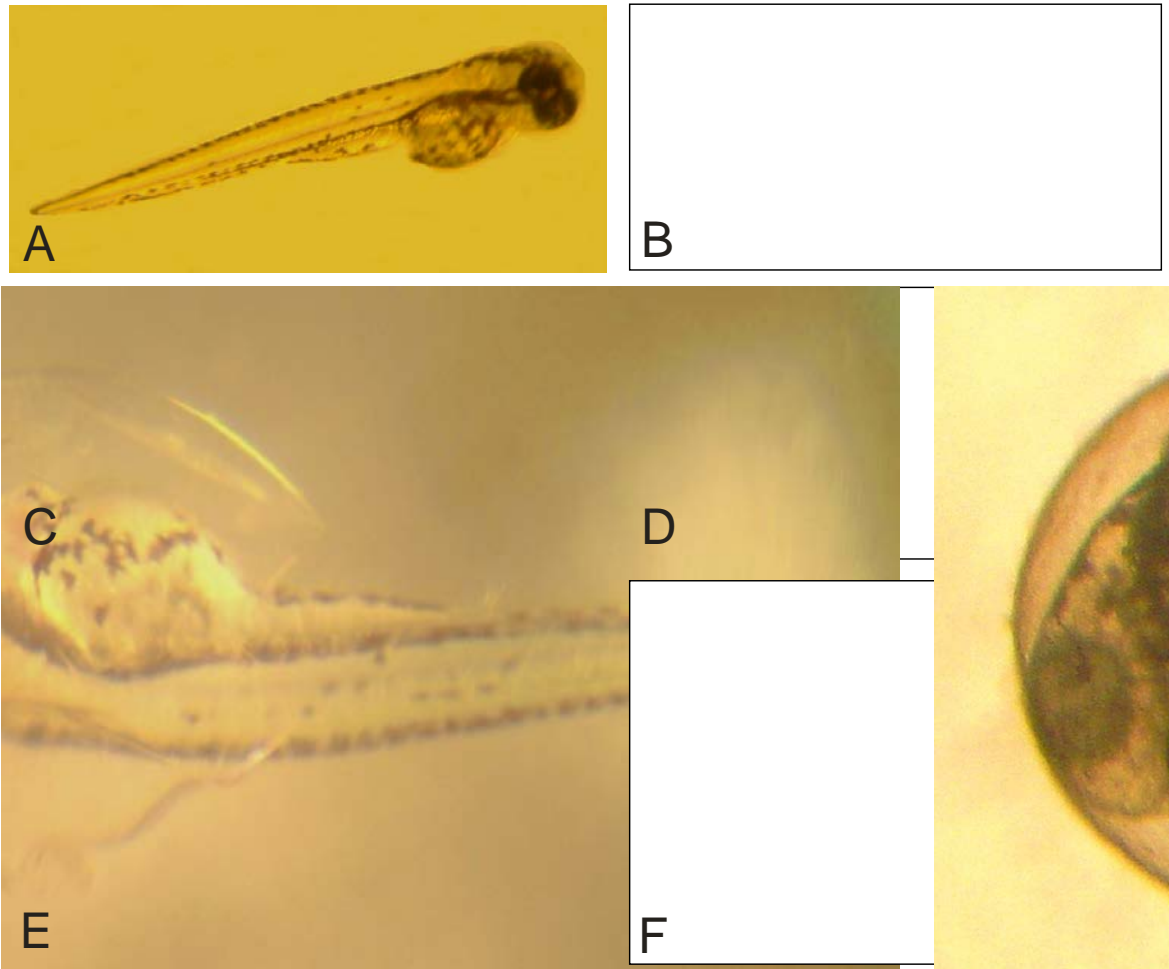


Fig. 10- Estereomicrofotografías de larvas (A-E) y un embrión (F) expuestos a ccf de 25 y 50  $\mu\text{g/ml}$  de glifosato desde 1 hpf hasta 72 hpf. (A) Control; (B) ccf: 25 $\mu\text{g/ml}$ , 48 hpf, moderada lordosis; (C) ccf: 25 $\mu\text{g/ml}$ , 72hpf, rotación de eje antero-posterior; (D) ccf: 25 $\mu\text{g/ml}$ , 72hpf, lordosis; (E) ccf: 50  $\mu\text{g/ml}$ , 72hpf, eclosión temprana, moderada cifosis y lordosis; (F) ccf: 50  $\mu\text{g/ml}$ , 72hpf

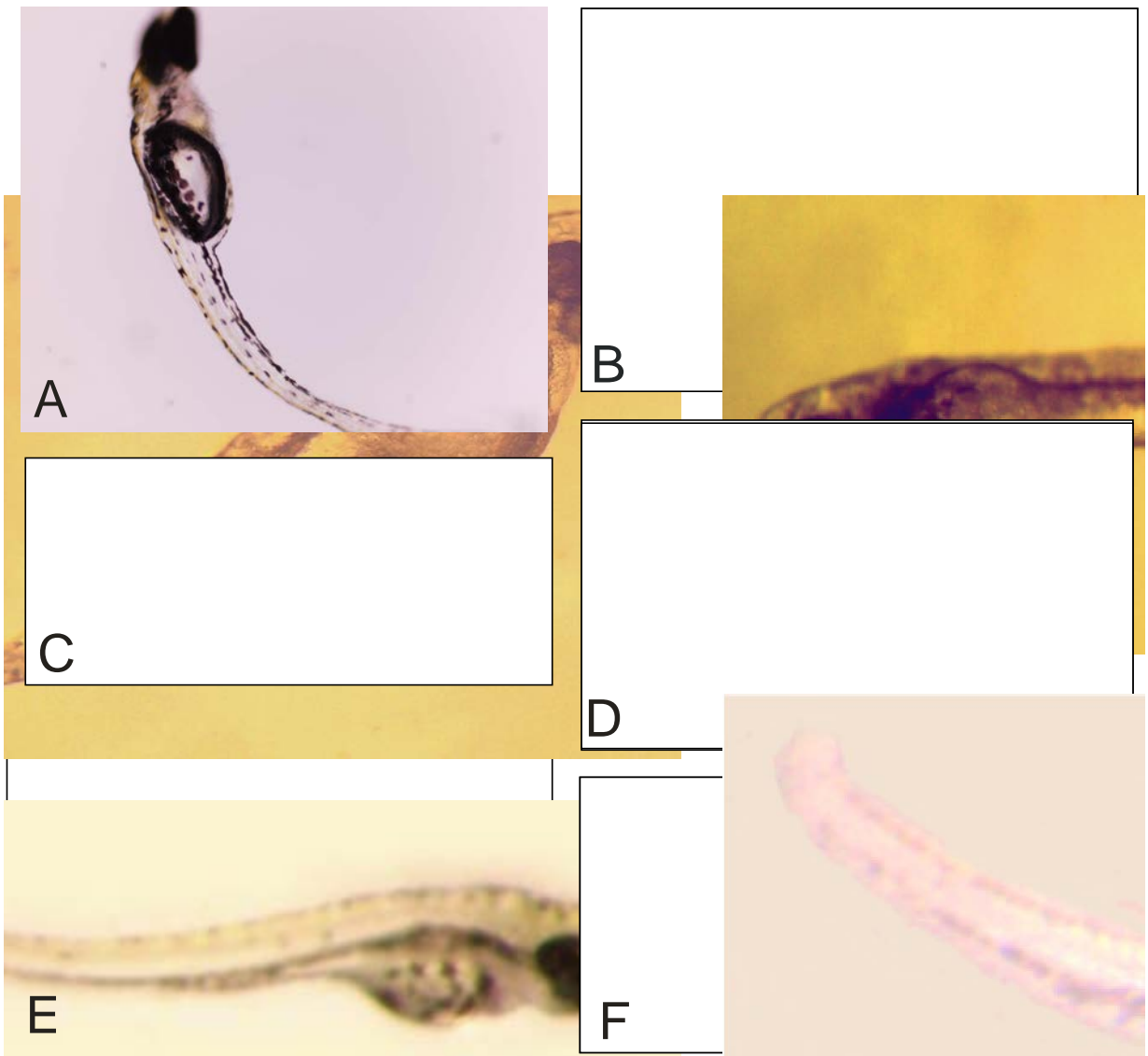


Fig. 11- Estereomicrofotografías de larvas expuestas a diferentes concentraciones de glifosato de 25 y 50µg/ml desde 1hpf hasta 120 hpf. (A) ccf: 25 µg/ml ,8dpf ; (B) ccf:50 µg/ml, 96hpf , cifosis distal; (C) ccf:50 µg/ml, 96hpf, lordosis proximal y cifosis distal; (D) ccf: 50µg/ml, 96hpf; (E) ccf: 50 µg/ml,120 hpf, giba de columna, cola termina romboide, gran vitelo, gran desarrollo ocular; (F) ccf: 50 µg/ml,120hpf

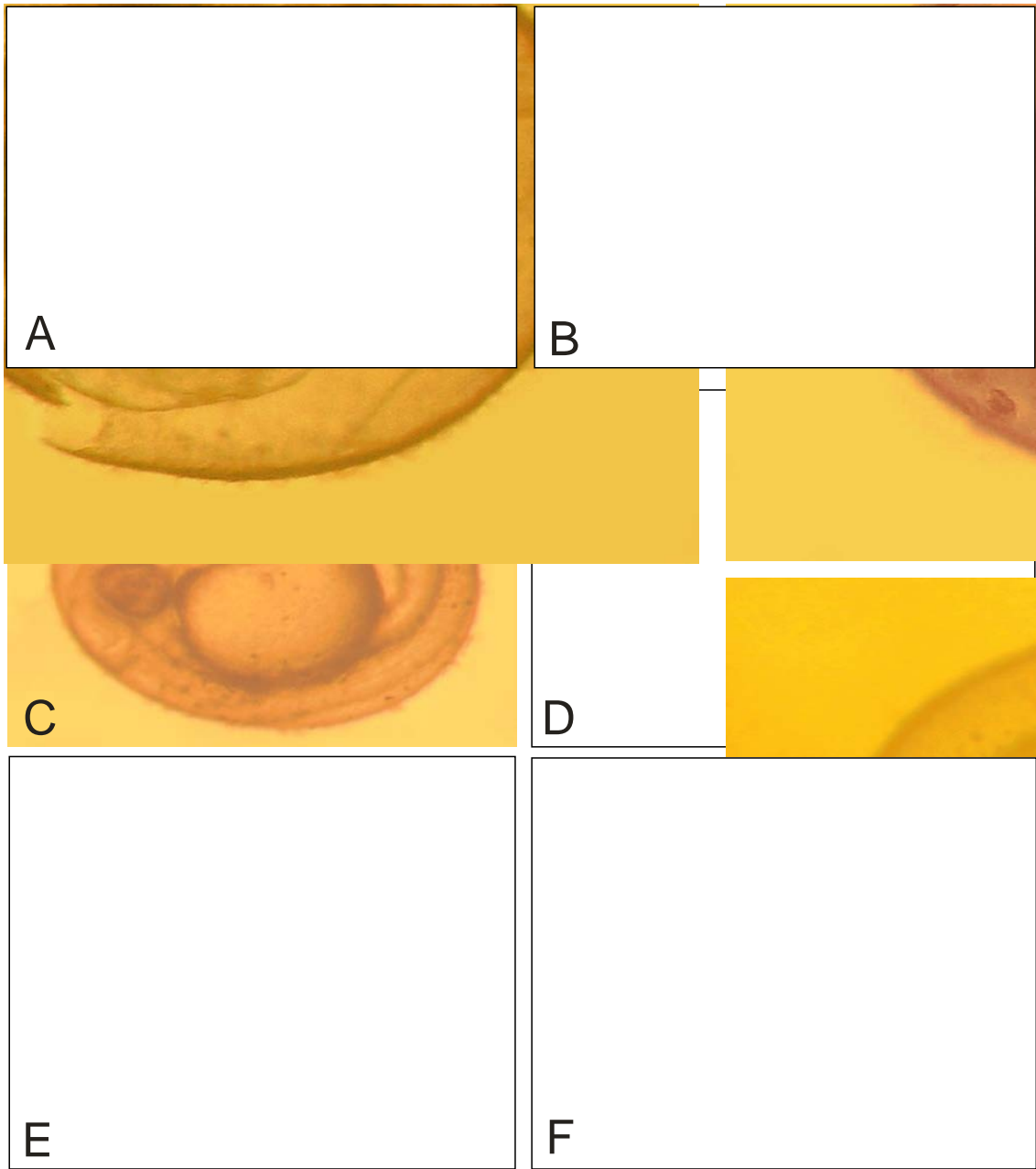


Fig. 12- Estereomicrofotografías de embriones de 24 y 48 hpf expuestos a concentraciones finales de glifosato de 75µg/ml. (A) ccf: 75µg/ml, 48hpf, sin corion, grosera incompatibilidad con la vida; (B) ccf: 75µg/ml, 48hpf, sin vitelo, no hay diferenciación de cabeza ni del sistema nervioso central; (C) ccf: 75µg/ml, 48hpf, gran desarrollo ocular; (D) ccf: 75µg/ml, 24hpf; (E) ccf: 75µg/ml, 48hpf, no hay desarrollo, corion roto; (F) ccf: 75µg/ml, 48hpf, no diferenciación cefálica, no somites.



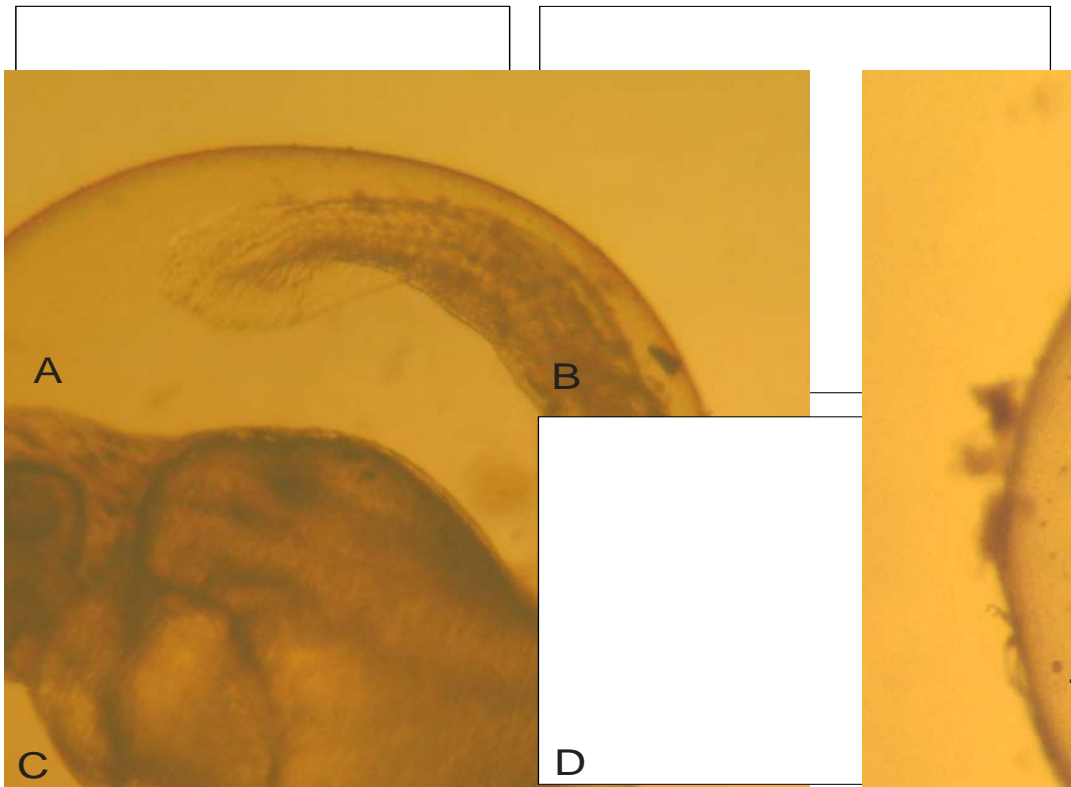


Fig. 13- Estereomicrofotografías de embriones de 48 hpf de edad, expuestos a ccf de glifosato de  $75\mu\text{g/ml}$ , (A) ccf:  $75\mu\text{g/ml}$ , 48hpf (B) ccf:  $75\mu\text{g/ml}$ , 48hpf ; (C) ccf:  $75\mu\text{g/ml}$ , 48hpf ; (D) ccf:  $75\mu\text{g/ml}$ , 48hpf



Fig. 14.- Estereomicrofotografías de embriones en etapa de faríngrula, expuestos a ccf de glifosato de  $100\mu\text{g/ml}$  desde las 24hpf hasta 54hpf (A-D).

## Conclusiones

Estos estudios demuestran efectos tóxicos y teratogénicos del glifosato a rangos de concentración previamente publicados como atóxicos

Algunas de las malformaciones registradas son graves, e incompatibles con la sobrevivencia. Las eclosiones, más tempranas que en los controles, determinan que se pongan en contacto directo con el medio acuático externo formas más inmaduras, las cuales no sobreviven lo que lleva a una disminución de la especie, con la posible consecuencia de que los peces al alimentarse de huevos de mosquitos ya no lo hacen y hay mayor proliferación de mosquitos que son transmisores de enfermedades como el dengue o la fiebre amarilla. La eclosión precoz podría ser una causa adicional de mortalidad, ya que eliminar la protección del corion en embriones todavía inmaduros en cuanto a su capacidad de adaptación al medio acuático externo. Esta eclosión precoz puede, cuando ocurre en el ambiente habitual del cuerpo de agua, causar mortandades de embriones determinadas por la acción de otros agentes químicos, físicos o biológicos, al carecer el embrión de la protección fisicoquímica que le proporciona el corion.

Se pudieron observar una variedad de alteraciones estructurales, tales como moderada lordosis y severa, rotación del eje antero-posterior, moderada lordosis y severa, y moderada cifosis, siendo todas alteraciones morfológicas a nivel de la columna vertebral, vinculadas al desarrollo del sistema nervioso central, lo que está en estrecha relación a los casos de bebés nacidos con espina bífida en poblaciones cercanas a cultivos de soja.

A  $75 \mu\text{g/ml}$  o superiores, todos presentan alguna alteración, como ser edema cardio-pericárdico, enlentecimiento circulatorio, disminución de movimientos de flexión del tronco del embrión, inhibición de las colinesterasas.

Algunos resultados sugieren mecanismos por cambios de tensión superficial. Ello podría comprometer eventos de fecundación, no solo en el modelo animal aquí estudiado sino que también en el hombre, ya que hay estudios que revelan la disminución de

espermatozoides en personas que están expuestas a dicho herbicida, ya sea por una relación laboral o por vivir en las cercanías a los lugares donde se fumiga con este.

En rigurosas mediciones realizadas en localidades de Argentina y Uruguay, los niveles de glifosato en agua variaron a lo largo del año y el día entre 0.1 y 0.7 mg/ml.

El conjunto de estos datos muestran que la llegada del herbicida y sus coadyuvantes a los cuerpos de agua representa un peligro potencial para la salud humana y animal

Por lo antes expuesto, la presencia y concentración de estos compuestos debería ser rigurosamente monitoreada

Se han verificado un conjunto de alteraciones en parámetros tanto funcionales, como bioquímicos, como morfológicos. Existe una correlación entre las concentraciones mas altas y la gravedad de las alteraciones comprobadas, con la excepción de aquellos casos en que, por estar expuestos a concentraciones muy elevadas, los embriones mueren en pocos minutos u horas.

En suma, hemos demostrado efectos tóxicos letales y no letales, así como efectos teratogénicos del glifosato a rangos de concentración que han sido previamente publicados como atóxicos.

El uso de herbicidas ha evolucionado hacia sustancias cada vez más selectivas a fin de evitar los daños que éstos producen al conjunto de la biota. Sin embargo, debido al progresivo encarecimiento de su investigación y desarrollo, se retornó al consumo masivo de este herbicida no selectivo creado en la década de 1960.

## **Bibliografía**

- Acquavella, J. F., Weber, J. A., Culler, M. R., Cruz, O. A., Martens, M. A., Holden, L. R., Riordan, S., Thompson, M., Farmer, D. (1999). Human ocular effects from self-reported exposures to Roundup herbicides. *Hum. Exp. Toxicol.* 18: 479-86.
- Belanger, S. E., Balon, E.K., Rawlings, J. M. (2010). Salatory ontogeny of fishes and sensitive early life stages for ecotoxicology tests. *Aquat. Toxicol.* 97: 88-95.
- Benachour, N., Séralini, G.E. (2009). Glyphosate Formulations Induce Apoptosis and Necrosis in Human Umbilical, Embryonic, and Placental Cells. *Chem. Res. Toxicol.* 22(1): 97-105.
- Bliss, C. I. (1934). The method of probits. *Science.* 79: 38–39
- Bortagaray, V., Barrios, L., Cruces Aramburu, R., Del Puerto, G., Ojeda, P., Saravia, A. Rodríguez-Ithurralde, D. (2009). Los ensayos de embriotoxicidad en pez cebra detectan una variedad de efectos teratogénicos del glifosato. 6th Jorn. SBBM, Biotechnology Section, (Uruguay).
- Bortagaray V, Texeira J, Etchartea A, del Puerto G, Cruces R, Fernández-Bornia F, Rodríguez-Ithurralde D, (2013). Determinación de la toxicidad de la cipermetrina de uso doméstico por medio del bioensayo de toxicidad embrio-larval en pez cebra (*Danio rerio*). II *Jornadas Investigación en Biología Humana*, pág. 36.
- Bradberry, S.M., Proudfoot, A.T., Vale, J.A. (2004). Glyphosate poisoning. *Toxicol Rev.* 23(3): 159-67.
- Braunbeck, T., Lammar, E. (2006). Fish embryo toxicity assays. German Federal Environmental Agency, 298: 1-40.
- Brausch, J.M., Smith, J.M. (2007). Toxicity of Three Polyethoxylated Tallowamine Surfactant Formulations to Laboratory and Field Collected Fairy Shrimp, *Thamnocephalus platyurus*. *Arch. Environm. Contam. Toxicol.* 52(2): 217-221.
- Burger, M., Fernández, S. (2004). Exposición al herbicida glifosato: aspectos clínicos toxicológicos. *Rev. Med. Uruguay.*, 20: 202-207.
- Cavalcante, D.G.S.M., Martinez, C.B.R., Sofia, S.H. (2008). Genotoxic effects of Roundup on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutation Research*, 655(1):41-46

- Chemical Profile for Glyphosate (2002). [www.scorecard.org](http://www.scorecard.org). Environmental Defense.  
CAS Number: 1071-83-6
- Cox, Caroline (1995) Glyphosate, Part 1: Toxicology. *Journal of Pesticides Reform*, 15, (3): 13.
- Cox, Caroline (1995) Glyphosate, Part 2: Human exposure and ecological effects. *Journal of Pesticides Reform*, 15, (4):14.
- Cox, C., Sorgan, M. (2006). Unidentified Inert Ingredients in Pesticides: Implications for Human and Environmental Health. *Environm. Health Perspect.*, 12: 114.
- Cruces Aramburu R, Bortagaray V, Saravia MA, Rodríguez Ithurrealde D, 2010. Concentraciones de glifosato similares a las detectadas en cuerpos de agua de la región causan teratogénesis y embriotoxicidad multisistémicas en pez cebra y hemólisis en eritrocitos humanos. *Congreso Uruguayo Zoología*, 1: 85-85.
- Della Cioppa, G., S.C. Bauer, B.K. Klein, D.M. Shah, R.T. Fraley, and G. Kishore. (1986). Translocation of the precursor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase into chloroplasts of higher plants in Vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol:83. 6873-6877
- do Carmo Langiano, V., Martinez, C. (2008). Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 147 (2008) 222–231.
- Durston, A. J., Timmermans, J. P. et al. (2011). Retinoic acid causes an anteroposterior transformation in the developing central nervous system. *Nature* 340 (6229): 140-144.
- Fischer, K., Kotalik, J., Kettrup A. (1997). Determination of acrylamide monomer in polyacrylamide degradation studies by high performance liquid chromatography. *J. Chromat. Sci.*, 37: 486-94.
- Franz, J.E., Mao M.K., and Sikorski J.A. (1997). Glyphosate: A unique global herbicide. American Chemical Society. 4: 65-97
- Fraysse, B., Mons, R, Garric, J. (2006). Development of zebrafish 4-day embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals. *Ecotox. Environ. Saf.*, 63: 253-267.
- Gilbert, S.F., et al., *Developmental Biology*. 8th ed. (2006), Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, 18: 817.

- Gluszczak L, Dos Santos D, Silveira B, Rodrigues R, Chitolina MR, Morsch V, Loro V. (2007). Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comp Biochem Physiol Part C* 2007, 146: 519–524
- Hardell, L., Eriksson, M. (1999). A Case-Control Study of Non-Hodgkin Lymphoma and Exposure to Pesticides. *Cancer*, 85: 1353-60.
- Hayes WJ, Laws ER. (1991). *Handbook of pesticide toxicology*. London: Academic Press, 3: 1339-4 Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, R.E. (2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol. Sci.*, 86: 6-19.
- Kaczewer, J. (2002). Toxicología del glifosato: Riesgos para la salud humana. En: *La Producción Orgánica Argentina*. MAPO., 607:553-561.
- Kimmel, Ch., Ballard, W., Kimmel, S.T, Ullmann, B., Schilling, T.F., (1995). Stages of embryonic development of the zebra fish. *Dev. Dynam.* 203: 253-310.
- Lammer EJ, Chen DT, Hoar RM, Agnish ND, Benke PJ, Braun JT, Curry CJ, Fernhoff PM, Grix AW Jr, Lott IT,(1990) Retinoic acid embryopathy. *N. Engl. J. Med.* 313 (14): 837-841.
- Lipok, J., Studnik, H., Gruyaert, S. (2010). The toxicity of Roundup 360 SL formulation and its main constituents: Glyphosate and isopropylamine towards non-target water photoautotrophs. *Ecotox. Environm. Saf.*, 73, 1681-1688.
- Mann, R.M. & J.R. Bidwell. (1999). The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of south-western Australian frogs. *Arch. Environm. Contam. Toxicol.*, 36:193-199.
- Mañas, F.; González, M.; García, H.; Weyers, I.; Vera, L.; Larripa, I.; Gorla, N. 2006. La genotoxicidad del herbicida glifosato evaluada por el ensayo cometa y por la formación de micronúcleos en ratones tratados. *Theoria*, 15 (2): 53-60.
- Modesto, K.A., Martinez, C.B. (2010). Efectos of Roundup Transorb on fish: hematology, antioxidant defensas and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*, 81: 281.287.
- Nagel, R (2002). DarT: the embryo test with the zebrafish *Danio rerio* – a gneal model in ecotoxicology and toxicology. *Altex.*, 19, Suppl 1: 38-48.

- Ojeda, M.P., Parnizari, F. & Rodríguez Ithurralde, D., (2007). Aspectos cuantitativos del desarrollo embrionario del pez cebra (*Danio rerio*) y su validación para ensayos de toxicidad ambiental. *Actas Fisiol. (Montevideo)*, 11: 74-74.
- Paganelli, A., Gnazzo, V., Acosta, H., López, S.L., Carrasco, A.E. (2010). Glyphosate-Based Herbicides Produce Teratogenic Effects on Vertebrates by Impairing Retinoic Acid Signaling. *Chem. Res. Toxicol.* 23: 1586-1595.
- Peruzzo, P., Marino, D., Cremonte, C., da Silva, M. Porta, A., Ronco, A. (2008). Levels of glyphosate in surface waters and soils associated with direct sowing soybean cultivation un north pampasic region of Argentina. *Environm. Pollut.*, 156: 61-66.
- Quassinti, L., Maccari, E., Murri, O. & Bramucci, M., (2008). Effects of paraquat and glyphosate on steroidogenesis in gonads of the frog *Rana sculenta* in vitro. Informe Glifosato CONICET, 2009.
- Relyea, R.A. (2005) The lethal impacts of Roundup and predatory stress on six species of North American tadpoles. *Arch Environ. Contam. Toxicol.*, 48: 351-357.
- Richard, S., Moslemi S., Sipahutar H.; Benachour N. & Seralini G.E. (2005). Differential Effects of Glyphosate and Roundup on Human Placental Cells and Aromatase. *Environ Health Perspect.*, 113(6): 716-720.
- Rodríguez-Ithurralde, D., Eguren, G., Pistone, G., Maruri, A. (2004). Utilización de biomarcadores en la detección de y evaluación de plaguicidas presentes en ambientes acuáticos. 3er Congreso Uruguayo de Toxicología Clínica.
- Rodríguez Ithurralde, D., (2007). Biomarcadores en peces autóctonos y exóticos para el monitoreo eco-toxicológico de los recursos acuáticos. *Actas Fisiol. (Montevideo)*, 11: 74-54.
- Rodríguez-Ithurralde, D. (2010). The use of selected fish species for water quality monitoring bioassays, with special reference to the zebrafish embryo toxicity assay (ZETA). 1<sup>st</sup> Urug. Cong. Zool., 1: 53.
- Rodríguez-Ithurralde, D. (2010). Zebrafish embryo toxicity and teratogenicity assays: applications in environmental risk assessment and drug discovery. 1st Latin American Zebrafish Network (LAZEN) Meeting. Institut Pasteur Montevideo, Dec 10.
- Salbego, J., Pretto, A., Gioda, C.R., de Menezes C.C., Lazzari, R., Radünz Neto J., Baldisserotto, B., Loro, V.L. (2010). Herbicide formulation with glyphosate affects

- growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 58: 740-7455.
- Sawada, Y., Nagai, Y., Ueyaama, M., Yamamoto, I. (1988). Probable toxicity of surface active agent in commercial herbicide containing glyphosate. Lancet 1 (8580): 229
- Schonbrunn, E., Eschenburg, S., Shuttleworth, WA., Schloss, JV., Amrhein, N., Evans, JN. (2001). Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98: 1376-1380.
- Schuette J. (1998) Environmental fate of glyphosate. Environmental Monitoring & Pest Management, Department of Pesticide Regulation, Sacramento, CA 9:5824-5624
- Smith G.R. (2001). Effects of acute exposure to a commercial formulation of Glyphosate on the Tad poles of Two Species of Anurans. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology (67): 483-8
- Tsui, M.T.K., Chu, L.M. (2003). Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. Chemosphere, 52: 1189-1197.
- Weiss G. (2002), Acrylamide in food: Uncharted territory. Science, 27: 297.



## Glosario de términos

<b>Término</b>	<b>Definición</b>
Antropogénico	Aquello causado por el hombre.
Alteración	Cambio en la forma de algo, perturbación, trastorno.
Arcos faríngeos	Resultan de la segmentación bilateral del mesodermo cefálico y están presentes en el desarrollo de todos los vertebrados (al menos en algún momento del mismo). En peces dan origen al aparato branquial, además de otros derivados.
Bioconcentración	Acumulación de sustancias tóxicas en un organismo. Ocurre en el caso de las sustancias que después de ser absorbidas no son excretadas.
Blastodermo	Macizo de células llamadas blastómeras, que resulta de las sucesivas divisiones celulares que ocurren en el polo animal embrión.
Blástula	Estadío temprano del desarrollo embrionario de la mayoría de los animales. En la blástula de peces, a diferencia de otros animales, no hay cavidad o blastocele.
Carcinogénico	Agente químico, físico o biológico que puede actuar sobre los tejidos vivos de tal forma que se produzca un neoplasma maligno.
Cifosis	Curvatura fisiológica de la columna vertebral en la región dorsal.
Citotóxico	Dañino para las células.
Gástrula	Estadío del desarrollo embrionario en el cual se produce intensa

reorganización celular.

Herbicida	Producto fitosanitario utilizado para eliminar plantas indeseadas
Lordosis	Alteración de la curvatura normal de la columna vertebral, de la zona lumbar.
Mutagénico	Agente físico o químico que induce mutaciones.
Neurulación	Proceso a través del cual cierta región del ectodermo dorsal mediante distintos procesos de señalización específica, se convierte en placa neural y a partir de esta se forma el tubo neural, rudimento del sistema nervioso central.
Notocorda	Cordón de mesodermo dorsal que separa al embrión en una mitad derecha y otra izquierda y que induce al ectodermo que se encuentra por encima de ella a convertirse en el futuro sistema nervioso.
Saco vitelino	Saco o anexo embrionario del huevo de amniota que almacena proteínas y otros nutrientes.
Segmentación	Etapas tempranas del desarrollo embrionario posterior a la fecundación, que consiste en una serie de divisiones mitóticas rápidas a través de las cuales el gran volumen del cigoto es dividido en numerosas células pequeñas.
Somitas	Bloques de células mesodérmicas correspondientes al mesodermo paraxial, ubicados a ambos lados del tubo neural y que darán origen a muchos de los tejidos conjuntivos del dorso (hueso, cartílago, dermis de la piel) y a músculos esqueléticos.
Teratogénico	Agente físico o químico capaz de producir defectos congénitos y/o malformaciones permanentes al organismo en desarrollo

durante el período prenatal, en dosis que no causan muerte a la madre. Estos defectos pueden causar aborto espontáneo.

Toxicología

Ciencia que estudia las sustancias químicas y los agentes físicos en cuanto son capaces de producir alteraciones patológicas a los seres vivos, a la par que estudia los mecanismos de producción de tales alteraciones y los medios para contrarrestarlas, así como los procedimientos para detectar, identificar y determinar tales agentes y valorar su grado de toxicidad.

Tubo neural

Tubo formado a partir de células del ectodermo dorsal neural y que posteriormente dará origen al sistema nervioso central.

**GRACIAS!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!**

