

# Estudio clínico-patológico de los efectos del glifosato (Roundup®) a niveles subletales en un modelo experimental murino

## Clinicopathologic study on the effects of Glyphosate (Roundup®) at sublethal levels in a murine experimental model

John E. Labrador Nieto, MVZ.<sup>1</sup>; Harlix D. Prada Reyes, MVZ.<sup>2</sup>; Carlos A. Rengifo, MVZ.<sup>3</sup>;

Catalina Lapuente Chala, MVZ.<sup>4</sup>; Ángel E. Céspedes Rubio, Ph.D.<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Unidad Médica Veterinaria Huellas. <sup>2</sup> Compañía Carval de Colombia. <sup>3</sup> Área de Patología, Departamento de Sanidad Animal, Grupo de Investigación en Enfermedades Neurodegenerativas (END). <sup>4</sup> Investigador Asociado, Grupo END. <sup>5</sup> Profesor-investigador y director del Grupo END, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia.

angelcespedes@hotmail.com

### Resumen

En Colombia, los pesticidas a base de glifosato se usan para el control de malezas en la agricultura y erradicación de cultivos ilícitos. Sin embargo, los efectos tóxicos en animales y humanos expuestos a dosis subletales son desconocidos. Este estudio evaluó los efectos clínico-patológicos de dietas con 7,5 ppm y 15 ppm glifosato en ratones *Mus musculus* gestantes, usando el herbicida Roundup®. Se registró el peso corporal de las hembras, de sus crías, y la viabilidad de las camadas diariamente. Las lesiones macroscópicas e histopatológicas en el hígado, riñón, útero y cerebro se determinaron a través de necropsias en los días 5, 30 y 45 después de la exposición, además de los índices orgánicos hepático y cardíaco. No hubo diferencias significativas en el peso corporal, el tamaño y la viabilidad de las camadas a ninguna de las dosis evaluadas. Se observó congestión y aumento en el tamaño del hígado, riñón y bazo, después de 5 días de exposición, sugiriendo un proceso de desintoxicación. A 30 y 45 días, no se observaron signos clínicos ni lesiones patológicas atribuibles al glifosato; sin embargo, un aumento en el tamaño de los hepatocitos, con contenido vacuolar y granular de aspecto proteináceo indican un efecto evidente, aunque sutil del Roundup® a dosis subletales con posible adaptabilidad orgánica. Se concluye que el consumo de alimento con 7,5 ppm y 15 ppm de glifosato durante 5, 30 y 45 días causa alteraciones sutiles de toxicidad en ratones durante la gestación, la lactancia y el posparto, pero no en sus camadas.

**Palabras clave:** Glifosato, pesticidas, modelo murino, toxicidad, daño celular.

### Abstract

In Colombia, glyphosate-based pesticides are used for weed control in agriculture and eradication of illicit crops; however, the toxic effects in animals and humans exposed to sublethal doses are unknown. This study evaluated the clinical and pathological changes induced by diets containing glyphosate at 7,5 ppm and 15 ppm in pregnant mice *Mus musculus*, using the herbicide Roundup®. The body-weight of pregnant females and offspring and the viability of litters were recorded daily. Gross and microscopic lesions in liver, kidney, uterus and brain were determined at necropsies performed at 5, 30 and 45 days post-exposure, in addition to the liver and heart organic indexes. No significant differences were found in body weight, size and viability of litters at any dose. Organs such as the liver, kidney and spleen were enlarged and congested at day 5 post exposure, suggesting a detoxification process. At 30 and 45 days, no clinical signs or pathological lesions attributed to glyphosate were found. However, there was an increase in the hepatocyte size, with vacuolar and granular cytoplasm and proteinaceous-like content, suggesting a subtle effect of sublethal doses of Roundup®, with possible organ adaptability. We conclude that the consumption of food containing 7.5 ppm and 15 ppm of glyphosate for 5, 30 and 45 days, cause subtle toxic alterations in mice during pregnancy, lactation and postpartum, but not in their litters.

**Keywords:** Glyphosate, pesticides, murine model, toxicity, cell damage.

## Introducción

En países industrializados, se aplican herbicidas en el 85-100% de los cultivos principales para controlar malezas y, aunque en países en desarrollo su uso es menor, se hace necesario en la medida que se intensifica la agricultura (Food and Agriculture Organization of the United Nations<sup>1</sup> [FAO], 1993). Por otra parte, el control de cultivos ilícitos en Colombia, particularmente coca y amapola, ha llevado a la aplicación aérea de herbicidas de amplio espectro como método controversial de erradicación (Nivia, 2001; Maldonado, 2001; Idrovo, 2004). Desde 1978, se han realizado aspersiones con diferentes químicos, como Paraquat, Glifosato, Tebuthiuron, Velpar (hexazinona) e Imazapyr. Entre 1992 y 1997 se asperjaron 187.858 ha; sin embargo, la producción de cultivos ilícitos se incrementó en un 243% y, para el periodo 2000-2006, se habían fumigado 670.900 ha (Ávila *et al.*, 2007).

El glifosato, ácido orgánico débil cuya molécula está formada por una fracción de glicina y otra de fosfometil (N-fosfometilglicina),  $C_3H_8NO_5$ , es un herbicida de amplio espectro, no selectivo, utilizado para eliminar malezas en cultivos de cereales; su aplicación produce inhibición de aminoácidos aromáticos en las plantas, que inactiva la enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintasa (Anadón *et al.*, 2009), la cual no existe en animales, por lo que la citotoxicidad del glifosato es considerada relativamente baja o inexistente en humanos (Monroy *et al.*, 2005).

El Roundup®, herbicida basado en glifosato adicionado con adyuvantes (Martínez *et al.*, 2007), ha sido mundialmente utilizado para el control de malezas (Nandula *et al.*, 2005; Çağlar y Kolankaya, 2008; Clair *et al.*, 2012), así como para erradicar cultivos ilícitos en nuestra región. Según la World Health Organization<sup>2</sup> (WHO, 2005), el glifosato es clasificado como herbicida categoría U (*Unlikely*), se considera que tiene pocas probabilidades de representar peligro para las personas, cuando es usado adecuadamente, dado su mecanismo de acción específico para plantas y microorganismos. Asimismo, la Environmental Protection

Agency<sup>3</sup> (EPA) de los Estados Unidos lo clasifica en la categoría III de toxicidad y en el grupo D de oncogenicidad por su relativa baja toxicidad aguda y por no existir indicios de carcinogenicidad en humanos y animales (Martínez *et al.*, 2007; Mink *et al.*, 2012).

El Roundup®, cuya composición química es glifosato (N-fosfometil-glicina) en forma de sal isopropilamina y polioxietilnamina (POEA) como surfactante, es mucho más tóxico que el glifosato puro, y se ha comprobado en diferentes estudios que el surfactante POEA es extremadamente tóxico para organismos acuáticos. Se ha reportado toxicidad por el glifosato y sus adyuvantes en peces nativos colombianos (Eslava *et al.*, 2007), que ocasionan lesiones hepáticas, con una  $CL_{50}$  a 96 horas de 23  $mg.L^{-1}$  en cachama blanca (Ramírez *et al.*, 2009). En estudios de genotoxicidad, se sugiere que el mecanismo de acción del glifosato no se limita solamente a las plantas, sino que puede afectar la estructura del ADN en células de peces (Cavalcante *et al.*, 2008) y mamíferos (Monroy *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2007).

Es evidente la preocupación por los efectos adversos que pueden presentarse en personas y animales, originados por el contacto con formulaciones comerciales de glifosato y la posible participación en la cadena alimenticia o por el consumo de aguas contaminadas, ya que se ha encontrado glifosato y su metabolito ácido aminometilfosfónico (AMPA), como contaminantes medioambientales, tanto en el suelo como en las riveras (Çağlar y Kolankaya, 2008); sin embargo, extensos estudios desarrollados por toxicólogos concluyen que el uso normal del herbicida original Roundup®, en las dosis indicadas, no produce efectos adversos sobre el desarrollo, la reproducción o el sistema endocrino en humanos y otros mamíferos (Williams *et al.*, 2000). Igualmente, la WHO (2005), la EPA (1993, 1997) y la European Commission (2002) han revisado los datos, y han concluido que el uso del glifosato, según las indicaciones de la etiqueta, podría no resultar en efectos reproductivos adversos, del desarrollo o defectos al nacimiento (Monsanto, 2002).

Los agricultores, ganaderos y campesinos generalmente desconocen los efectos tóxicos que los agroquímicos pueden ocasionar sobre

1 Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

2 Organización Mundial de la Salud.

3 Agencia de Protección Ambiental.

sus cultivos, animales y medio ambiente, en general, y más aún las medidas de bioseguridad para la manipulación de estas sustancias. Se han descrito signos compatibles con intoxicación por glifosato en humanos, incluso náuseas, vómitos, calambre abdominal, diarrea, ulceración gastrointestinal, daño renal y hepático, además fallo renal y respiratorio, convulsiones, coma y, eventualmente, la muerte (Anadón *et al.*, 2009); sin embargo, esto obedece a intoxicaciones por sobreexposición al glifosato, en tanto que no se han reportado estos signos bajo condiciones adecuadas de uso del agroquímico.

Diferentes investigaciones sobre exposición al glifosato, a las formulaciones comerciales que lo contienen y a uno de sus principales adyuvantes, el surfactante POEA, han demostrado efectos tóxicos sobre diversos ecosistemas, cambios en la actividad de enzimas hepáticas en ratas gestantes y sus fetos, alteraciones histopatológicas y bioquímicas en peces y ratas, anormalidades en el desarrollo de anfibios, biotas acuáticas e invertebrados (Bigwood, 2002), efectos teratogénicos en ratas y principalmente como disruptor endocrino al reducir los niveles de testosterona, entre otros (Martínez *et al.*, 2007; Clair *et al.*, 2012). Igualmente, la toxicidad del glifosato se ha relacionado con un retraso en el desarrollo del esqueleto fetal y efectos significativos sobre el sistema reproductivo de ratas Wistar macho púberes y adultas; sin embargo, no se han detectado estos efectos en humanos ni tampoco niveles séricos de glifosato o su metabolito AMPA en sangre materna y fetal (Aris y Leblanc, 2011). El uso del glifosato en fumigaciones aéreas o artesanales ha originado múltiples denuncias y cuestionamientos por parte de diversas comunidades, que argumentan falta de políticas gubernamentales eficaces para el comercio de agroquímicos, efectos nocivos contra la biodiversidad y posibles alteraciones en la salud y bienestar de la población (Maldonado, 2001).

Recientes estudios han mostrado que la infertilidad humana ha crecido entre un 50 y 60% a partir de 1960, especialmente en países industrializados; el notable aumento en anormalidades testiculares, durante un periodo relativamente corto, parece deberse a factores ambientales más que a factores hereditarios y a que la reproducción de los mamíferos se

produce en un ambiente contaminado por diversos xenobióticos (Mariana *et al.*, 2009). El empleo de estos productos y las dosis recomendadas deja abierta la discusión sobre los posibles efectos por su uso indiscriminado. Con esta investigación, se pretende determinar los efectos clínico-patológicos del glifosato contenido en la formulación del Roundup® en ratones gestantes y sus camadas, tras el consumo subcrónico de dietas contaminadas mediante aspersión, simulando los métodos de aplicación de este herbicida sobre cultivos tanto lícitos como ilícitos; por lo tanto, no se pretende ratificar la toxicidad aguda del glifosato en altas dosis, descrita por otros investigadores, sino evaluar la toxicidad por exposición subcrónica al producto comercial Roundup® (Glifosato + Surfactante).

## Materiales y métodos

La presente investigación fue realizada en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad del Tolima, con aprobación del Comité de Investigaciones, siguiendo las normas internacionales de protección y manejo de animales de laboratorio descritas en el *Guide for care and use of laboratory animals* y atendiendo a la Ley 84 de 1989 de protección animal en Colombia.

Se utilizaron 27 ratones *Mus musculus Swiss*, con 10 semanas de edad al inicio del experimento, en óptimo estado sanitario, procedentes del Instituto Nacional de Salud (INS). La dieta consistió en alimento balanceado con niveles energéticos y proteicos aceptables. Se conformaron nueve grupos de tres hembras cada uno, considerando dos factores y tres tratamientos. El factor A correspondió al tiempo de exposición al tóxico (5, 30 y 45 días) y el factor B a su nivel de concentración en la dieta (0 ppm, 7,5 ppm y 15 ppm). Se utilizaron tres réplicas por cada grupo (A x B). La inclusión del glifosato se hizo sobre bandejas metálicas con 1 kg de alimento peletizado a la vez y mediante aspersión con gota fina de una solución acuosa de Roundup® (glifosato 41% + POEA 15%) a las concentraciones requeridas (7,5 ppm o 15 ppm) de glifosato a 25 cm de altura. El alimento asperjado se dejó secar a temperatura de laboratorio (26 °C) y luego fue empacado y rotulado en bolsas de papel. La preparación fue hecha cada tercer día para mantener la concentración estimada en el alimento.

Los animales fueron precondicionados a las características de laboratorio y al alimento suministrado (libre del tóxico). Se colocó un macho en cada caja con tres hembras, lo que permitió la cópula por tres días; luego del día cinco se iniciaron los tratamientos. El alimento y el agua de bebida fueron administrados *ad libitum* durante la fase experimental. Diariamente, se registró el peso individual de cada hembra y, al final, se sacrificaron mediante dislocación cervical, previa desensibilización en campana saturada con éter. Se practicaron las necropsias a los tiempos programados y se tomaron muestras de útero, hígado, bazo, riñón, pulmón y cerebro para estudio histopatológico. Se establecieron los índices hepatosomático (IHS) y cardíaco somático (ICS) de los grupos tratados en relación con el grupo control, basado en la siguiente fórmula adaptada de Pérez (1997):  $IHS = \text{peso hepático (g)} / \text{peso corporal (g)} \times 100$ . El ICS se calculó de igual forma.

Las variables evaluadas durante la gestación y el destete fueron: ganancia de peso diario de cada hembra, número de ratones nacidos vivos por camada, peso total de la camada y viabilidad de los neonatos. Para las alteraciones morfológicas, se tuvieron en cuenta como variables de estudio el tipo y la extensión de la lesión tisular, el órgano afectado y los índices hepático y cardíaco. Histológicamente, se evaluaron diferentes órganos (hígado, riñón, bazo, pulmón, útero y cerebro).

Para comparar el efecto de los tratamientos se utilizaron dos modelos de diseño de la siguiente manera: para la ganancia de peso promedio por camada y la ganancia promedio por neonato se utilizó un arreglo factorial  $2 \times 3$  dispuesto en bloques completos al azar, y, para la varianza del peso de las madres, un arreglo factorial  $3 \times 3$  dispuestos en bloques al azar. En ambos casos, se utilizaron como bloques las semanas de duración del estudio y, para efectos de comparación múltiple de medias, se empleó la diferencia mínima significativa (dms). Los datos fueron analizados por medio del programa estadístico ESM versión 8.4 (2005).

## Resultados

En el presente estudio, no se observaron cambios clínicos sugestivos de intoxicación por Roundup® (Glifosato + surfactante) luego de varias semanas de administrarlo en la dieta de ratonas durante la gestación y el posparto. Tampoco se observaron diferencias significativas entre los tratamientos y

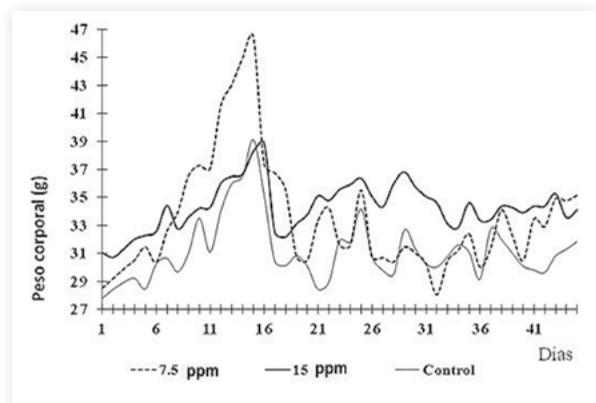
el control al evaluar la ganancia de peso diario de las hembras y sus crías, tamaño, peso y viabilidad de las camadas (Tablas 1 y 2). Las fluctuaciones de peso corporal en los animales expuestos a glifosato fueron similares a los controles. El análisis de varianza indica que no hay diferencias significativas entre tiempos de exposición, niveles de concentración y la interacción tiempo de exposición/niveles de concentración del tóxico; pero sí, una diferencia altamente significativa entre bloques (semanas), lo cual puede atribuirse a los periodos de gestación, parto y lactancia (Figura 1).

**Tabla 1.** Comparación del peso promedio y de los índices hepatosomático y cardiosomático, en dos grupos de ratones tratados y un grupo control, luego de 45 días de exposición a dietas contaminadas con Roundup®

Grupo	Peso vivo promedio (g)	Índice hepático (promedio)	Índice cardíaco (promedio)
Control	31,83	3,21	0,31
7,5 ppm	35,13	3,73	0,29
15 ppm	34,10	3,55	0,36

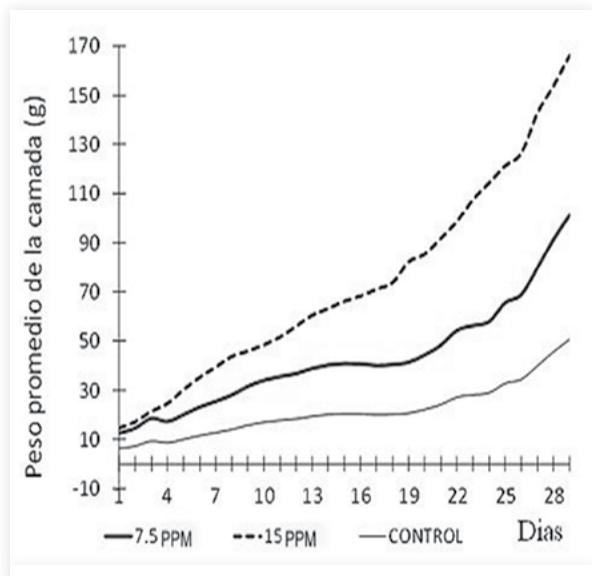
**Tabla 2.** Viabilidad de las camadas procedentes de ratonas expuestas durante 45 días a dos concentraciones de glifosato en la dieta

Variable	Control (0 ppm)	7,5 ppm	15 ppm
Número de gazapos nacidos	7	7	8
Número de gazapos destetados	7	7	8
Viabilidad	100%	100%	100%



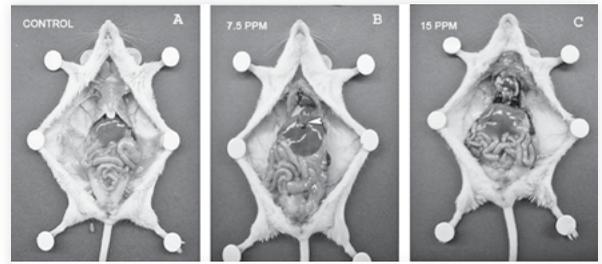
**Figura 1.** Perfil representativo de las fluctuaciones de peso corporal en ratones hembra durante el periodo de gestación y lactancia (45 días) en dos grupos experimentales expuestos a dietas contaminadas con glifosato y el control negativo.  $n = 3$ /grupo

Con relación a la ganancia de peso promedio por camada, el análisis de varianza señala que no hubo diferencia entre el tiempo de exposición ni el nivel de concentración por tiempo de exposición, pero sí diferencias altamente significativas entre niveles de concentración y semanas de exposición; dicha variación es tomada como normal teniendo en cuenta que se tratan de individuos que están en constante crecimiento y desarrollo corporal. Para la comparación entre niveles de concentración, se encontró que, a un nivel de significancia del 5% ( $p < 0.05$ ), todos los grupos presentan efecto diferente sobre la ganancia de peso por camada, pero al 1% ( $p < 0.01$ ) el nivel de 15 ppm supera en peso corporal los valores de 7,5 ppm y del testigo (0 ppm), y es considerado igual entre estos dos últimos (Figura 2).

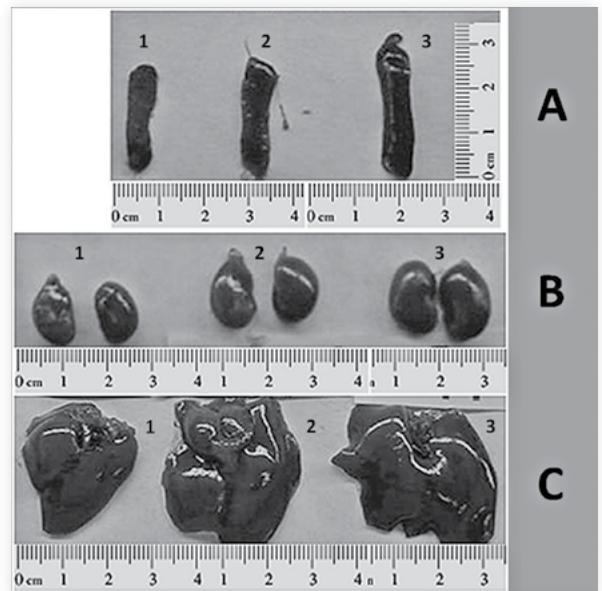


**Figura 2.** Ganancia de peso promedio por camada y por grupo hasta el destete (día 28 del nacimiento). Las camadas fueron procedentes de hembras que consumieron dietas contaminadas con glifosato (7,5 y 15 ppm) frente al grupo control, durante 45 días.

En los animales sacrificados al día 5 del experimento (día 10 de gestación), se observó congestión en hígado, útero, intestino delgado, píloro y región antral del estómago, principalmente a la concentración de 15 ppm con un evidente incremento en el tamaño hepático a ambas concentraciones (7,5 y 15 ppm) en relación con el control (Figura 3). En la necropsia, se evidenciaron megalias en bazo, riñones e hígado, sugestivas de un proceso de detoxificación, posiblemente debido a la adaptabilidad orgánica al compuesto. Los índices somáticos IHS e ICS no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo que recibió el alimento contaminado y el control; sin embargo, el hígado, los riñones y el bazo de los animales tratados con Roundup® fueron cualitativamente más grandes que el de los controles (Figura 4).

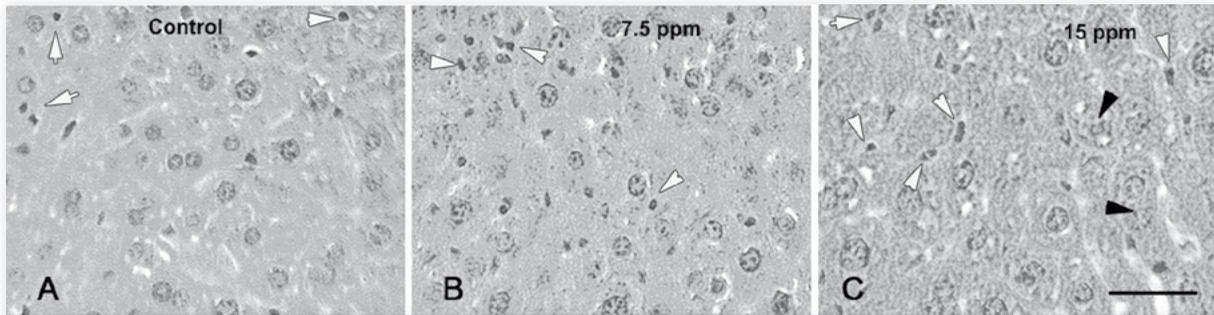


**Figura 3.** Aspecto macroscópico de los órganos abdominales *in situ* de ratones hembra, sacrificados luego de cinco días de consumir dietas con inclusiones de 7,5 ppm (B) y 15 ppm (C) de glifosato. Nótese el particular incremento en el tamaño del hígado a ambas concentraciones (B y C) con relación al control libre de tóxico (A). La punta de flecha señala un foco hemorrágico en el hígado del grupo a 7,5 ppm.



**Figura 4.** Incremento en el tamaño del bazo (A), riñón (B) e hígado (C) de ratones hembra tratados con glifosato en dosis de 7,5 ppm (A2, B2, C2) y 15 ppm (A3, B3, C3). Los paneles A1, B1 y C1 corresponden al grupo control no tratado, luego de 5 días de estudio. n = 3/grupo.

Microscópicamente, se observaron algunas lesiones, principalmente en el hígado, compatibles con un proceso degenerativo difuso, citoplasma de aspecto proteináceo granular y vacuolar, núcleos con vacuolización moderada, aumento en el tamaño de los cordones hepáticos e hiperplasia de las células de Kupffer (Figura 5). En el encéfalo, se observó satelitosis, gliosis y neuronofagia en casi todos los casos, incluso los controles; en el bazo, se evidenciaron componentes del proceso inflamatorio y cambios compatibles con hematopoyesis extramedular y en el útero se apreció un proceso inflamatorio crónico con focos activos en miometrio (imágenes no mostradas); sin embargo, ninguno de estos hallazgos demostró un efecto directo del glifosato, aunque tampoco se puede descartar que obedezcan a un sutil efecto del Roundup®.



**Figura 5.** Cambios microscópicos en tejido hepático de ratones expuestos a glifosato. Fotomicrografías del grupo control (A) y de los grupos expuestos al glifosato a 7,5 ppm (B) y 15 ppm (C), obtenidos de ratones hembra al día 45. Las puntas de flecha negras señalan hepatocitos con citoplasmas granulados y vacuolados de aspecto proteináceo con posibles cambios degenerativos, y, las puntas de flecha blancas, células de Kupffer en todos los grupos.  $n = 3/\text{grupo}$ . H&E, barra de escala = 10  $\mu$ .

## Discusión

Luego de varias semanas de exposición a dietas con Roundup® (glifosato + POEA) en dos concentraciones (7,5 ppm y 15 ppm), no se observaron efectos clínicos, cambios comportamentales ni pérdida de peso corporal, similar a lo reportado por Mariana *et al.* (2009) en estudios de toxicidad subcrónica. Tampoco se establecieron diferencias estadísticamente significativas en la ganancia de peso corporal, tamaño, peso y viabilidad de las camadas. En los animales expuestos al Roundup®, se determinaron alteraciones hemodinámicas con cambios congestivos y hemorragias, principalmente en el parénquima hepático, aumentó en el tamaño del hígado, bazo y riñones, a diferencia de los controles donde no se evidenciaron cambios; esto sugiere un proceso de detoxificación y adaptabilidad orgánica al glifosato contenido en las dietas.

En reportes hechos por la EPA (1998), en dosis superiores a 5.125 ppm de glifosato en la dieta de ratones CD-1, se observó disminución en la ganancia ponderal y aumento de peso relativo en corazón, riñones, hígado y otros órganos, estableciéndose el nivel sin efecto adverso observable (NOAEL) en 5.000 ppm en la dieta o 507 mg/kg p.v./d. Las concentraciones de glifosato empleadas en esta investigación (7,5 y 15 ppm), correspondientes a 57,28 mg.kg<sup>-1</sup>, están muy por debajo de las dosis tóxicas mínimas reportadas por la EPA en estudios crónicos en ratones expuestos a 814 mg/kg o 4.800 ppm en la dieta. Las concentraciones de glifosato en las dietas experimentales corresponden a las que, en la práctica, posiblemente se dan en los cultivos una vez se aplica el producto por aspersión en las dosis sugeridas por la casa productora, las cuales son de 0,49 mL/m<sup>2</sup> o 204,6 mg/m<sup>2</sup> (RAP-AL, 2007; Kacsewer, 2002).

En cultivos de células testiculares de Leydig obtenidas de rata, en concentraciones no citotóxicas (1-10 ppm), se sugiere que el glifosato puede actuar

como disruptor endocrino, por la presencia de adyuvantes más que por el glifosato mismo, aunque también puede tratarse de un efecto de toxicidad potenciado del glifosato y el adyuvante (Clair *et al.*, 2012). En este estudio con Roundup®, es posible que las pocas lesiones observadas tengan relación con la formulación asociada glifosato/POEA, aunque no se afectó la fertilidad, la natalidad ni la supervivencia de las camadas procedentes de los animales expuestos.

Microscópicamente, se observaron lesiones sutiles que pueden ser atribuidas directamente al glifosato o al surfactante POEA presentes en Roundup®. Se observó hiperplasia de células de Kupffer, aumento en el tamaño de los cordones hepáticos con citoplasmas de aspecto proteináceo granulados y vacuolados, lo cual puede interpretarse como cambios degenerativos en el hígado, debido a un déficit, principalmente, de tipo energético o a contaminantes externos de la dieta. En otros estudios de toxicidad con Roundup®, se ha reportado un incremento de células de Kupffer en sinusoides hepáticos de ratas tratadas con glifosato en varias dosis (4,87, 48,7, 487 mg/kg) en el agua de bebida durante 75 días, por lo que se concluye que el glifosato y el surfactante pueden actuar sinérgicamente en el metabolismo hepático o inducir lesiones en este, incluso hiperplasia en las células de Kupffer, grandes depósitos de fibras de reticulina y acúmulo de tejido conectivo colágeno tipo III, entre otros hallazgos histológicos (Benedetti *et al.*, 2004; Çağlar y Kolankaya, 2008). También se ha reportado infiltración de mononucleares, apoptosis, necrosis focal, congestión y edema hepático en ratas expuestas a posologías de 56 y 560 mg/kg p.v. (Çağlar y Kolankaya, 2008).

En el presente estudio, se observaron cambios citoplasmáticos (ver figura 5c) particularmente en el grupo de 15 ppm luego de 45 días de exposición al Roundup®, lo cual puede relacionarse con alteraciones metabólicas nutricionales o inducidos por toxicidad subcrónica, que ha conllevado cambios

degenerativos, posiblemente glucogénicos, por lo que es necesario realizar coloraciones especiales para confirmar estos últimos; sin embargo, no se observó condensación de cromatina, necrosis o apoptosis, frecuentes en lesiones hepatotóxicas, lo que concuerda con estudios recientes en ratas expuestas a 0,7 y 7 mg de glifosato/L de agua de bebida durante 30 y 90 días (Larsen *et al.*, 2012), donde tampoco se identificaron dichas lesiones.

En el bazo, se encontró hematopoyesis extramedular, hemosiderosis y componentes inflamatorios y, aunque Zúñiga *et al.* (2001) describen la hematopoyesis extramedular como un hallazgo fisiológico presumiblemente normal en la especie *Mus musculus*, la hemosiderosis y los focos inflamatorios sugieren un cuadro de toxicidad subcrónica. A nivel encefálico, se presentó satelitosis, gliosis y neuronofagia, lo cual puede estar relacionado con un proceso hipóxico, sin que existan reportes similares relacionados con toxicidad por Roundup®. Aunque se observó un incremento en el tamaño y peso del bazo, los riñones y el hígado de los animales tratados con Roundup®, en relación con el control (ver figura 3), no mostraron diferencias significativas en los índices somáticos (IHS e ICS) ni pudieron atribuirse a la toxicidad directa del producto en estudio; sin embargo, no se descarta que se trate de un efecto sutil en bajas dosis de glifosato o POEA, a pesar de que las concentraciones fueron más de 250 veces menores de las reportadas por otros autores como responsables de la acción tóxica. Es prudente considerar la influencia de otras variables, debido a que los procesos de detoxificación metabólica afectan particularmente al hígado y los riñones. El Roundup® también induce a una variedad de alteraciones bioquímicas hepáticas y renales, que pueden afectar el funcionamiento normal de estos órganos (El-Shenawy, 2009).

En un trabajo con células monoclonales humanas, Martínez *et al.* (2007) establecieron la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) del Roundup® a 24 horas en 56,4 µg/mL, mientras que la del glifosato grado técnico fue de 1.630 µg/mL (casi 30 veces mayor), lo cual hace pensar que la citotoxicidad con el producto comercial se debe al efecto del aditivo surfactante (POEA) o al efecto potenciado de este y el glifosato (Martínez *et al.*, 2007). En la presente investigación, los pocos cambios celulares encontrados obedecen posiblemente a la citotoxicidad del POEA o al efecto tóxico del glifosato potenciado por el surfactante, lo cual ha sido confirmado en otro estudio con cultivo celular, donde los niveles de citotoxicidad y genotoxicidad del glifosato ocurren en células de mamíferos, lo que sugiere que su mecanismo de acción no se limita a las células de plantas (Monroy *et al.*, 2005). En un estudio de genotoxicidad, se

reportaron diferencias significativas por la presencia de micronúcleos (fraccionamiento celular) en eritrocitos de ratones inyectados con 400 mg de glifosato/kg p.v. i.p., lo cual se relaciona con daño en el ADN (Mañas *et al.*, 2009).

La ingesta de alimento y de agua de bebida no se modificó en las hembras de los grupos tratados con glifosato y a ninguno de los tiempos de exposición evaluados (5, 30 y 45 días), comparados con el grupo control, lo cual ha ocurrido en otros experimentos con glifosato al 1% (10 mg/mL) en el agua de bebida de ratas durante 21 días, donde se reduce la ingesta de agua y alimento, lo que refleja una menor palatabilidad del agua tratada y un efecto del glifosato o de sus metabolitos sobre los centros neuroanatómicos de la sed en el cerebro (Beuret *et al.*, 2005; Çağlar y Kolankaya, 2008); la ganancia de peso diario, el peso corporal y el peso hepático disminuyeron por efecto del glifosato al 1%, en tanto que, en nuestro estudio, los pesos corporales y de los órganos fueron similares entre tratamientos comparados con el control, al no modificarse la ingesta diaria de alimento ni de agua y a las bajas concentraciones del glifosato en las dietas contaminadas. Cabe presuponer que el glifosato como contaminante del alimento pelletizado no afectó su palatabilidad y, por ende, no alteró el consumo ni la ganancia de peso corporal o somático; por el contrario, a 30 y 45 días de tratamiento, el peso corporal y visceral fue ligeramente mayor en los tratados con relación a los controles.

## Conclusiones

El consumo de dietas con niveles de inclusión bajos (7,5 y 15 ppm) de glifosato, durante 5, 30 y 45 días, no indujo alteraciones clínicas de toxicidad directa en ratonas *Mus musculus Swiss* a lo largo de la gestación, lactancia y posparto ni tampoco sobre sus crías; sin embargo, el aumento de tamaño hepático (hepatomegalia), renal y esplénico, así como los sutiles cambios microscópicos observados en hígado y bazo, pueden relacionarse con procesos metabólicos de detoxificación y hacen presumir un sensible efecto del glifosato o del adyuvante POEA contenido en Roundup®.

## Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos al personal de los laboratorios de Toxicología y de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, así como a la Oficina de Investigaciones y Desarrollo Científico de la Universidad del Tolima por la financiación del proyecto.

## Referencias

- Anadon, A., Martínez-Larrañaga, M.R., Martínez, M.A., Castellano, V.J., Martínez, M., Martín, M.T., 2009. Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. *Toxicology Letters* 190, 91-95.
- Aris, A., Leblanc, S., 2011. Maternal and fetal exposure to pesticides associated to genetically modified foods in Eastern Townships of Quebec, Canada. *Reproductive Toxicology* 31, 528-533.
- Ávila, R., Bravo, E., Breilh, J., Campaña, A., Paz-y-Miño, C., Peñaherrera, L., Valencia, J., 2007. El sistema de aspersiones aéreas del Plan Colombia y sus impactos sobre el ecosistema y la salud en la frontera ecuatoriana. Comisión Científica Ecuatoriana. Quito, Ecuador, pp. 1-150.
- Benedetti, A.L., Vituri, C.L., Trentin, A.G., Custódio, M.A. Alvarez-Silva, M., 2004. The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide Glyphosate-Biocarb®. *Toxicology Letters* 153, 227-232.
- Beuret, C.J., Zirulnik, F., Giménez, M.S., 2005. Effect of the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnant rats and their fetuses. *Reproductive Toxicology* 19, 501-504.
- Bigwood, J., 2002. Breve resumen de la literatura científica con respeto a los efectos nocivos de formulaciones que contienen glifosato en biotas acuáticas y suelos. Ministerio del Ambiente del Ecuador. 2002. Quito, Ecuador, pp. 1-20.
- Çağlar, S., Kolankaya, D., 2008. The effect of sub-acute and sub-chronic exposure of rats to the glyphosate-based herbicide Roundup. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 25, 57-62.
- Cavalcante, D., Martínez, C., Sofía, S.H., 2008. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutation Research* 655, 41-46.
- Clair, E., Mesnage, R., Travert, C., Séralini, G.E., 2012. A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells in vitro, and testosterone decrease at lower levels. *Toxicology in Vitro* 26, 269-279.
- Cox, C., 2000a. Glyphosate Factsheet, Parte 1: Journal of Pesticides Reform. *Journal of Pesticides Reform* 108, 14-20.
- Cox, C., 2000b. Glyphosate Factsheet, Parte 2: Human exposure and ecological effects. *Journal of Pesticides Reform* 108, 22-26.
- El-Shenawy, N., 2009. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28, 379-85.
- Eslava, P.R., Ramírez, W.F., Rondón, I.S., 2007. Sobre los efectos del glifosato y sus mezclas: impacto sobre peces nativos. Editorial Juan XXIII, Villavicencio, Meta, 1-2, pp. 1-150.
- FAO, 1996. Manejo de malezas para países en desarrollo. (Estudio FAO Producción y Protección Vegetal - 120). <http://www.fao.org> (consultado 14 de agosto de 2012).
- Kaczewer, J., 2007. Toxicidad del glifosato: riesgos para la salud humana. <http://www.ecoport.net> (Consultado 5 de agosto de 2012).
- Larsen, K., Najle, R., Lifschitz, A., Virkel, G., 2012. Effects of sub-lethal exposure of rats to the herbicide glyphosate in drinking water: Glutathione transferase enzyme activities, levels of reduced glutathione and lipid peroxidation in liver, kidneys and small intestine. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. Accepted Manuscript.
- Maldonado, A., Buitrón, R., Granda, P., Gallardo, L., 2001. Acción ecológica: reporte de la investigación de los impactos de las fumigaciones en la frontera ecuatoriana. Informe misión de verificación. Sucumbíos, Ecuador, pp. 1-20.
- Mañas, F., Peralta, L., Raviolo, J., García, H., Weyers, A., Ugnia, L., Cid, M.G., Larripa, I., Gorla, N., 2009. Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28, 37-41.
- Mariana, A., De Alaniz, M., Marra, C., 2009. The impact of simultaneous intoxication with agrochemicals on the antioxidant defense system in rat. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 94, 93-99.
- Martínez, A., Reyes, I., Reyes, N., 2007. Citotoxicidad del glifosato en células mononucleares de sangre periférica humana. *Biomédica* 27, 594-604.
- Mink, P., Mandel, J., Scurman, B., Lundin, J., 2012. Epidemiologic studies of glyphosate and cancer: a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 63, 440-452.
- Monroy, C.M., Cortés, A.C., Sicard, D.M., Groot de Restrepo, H., 2005. Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas *in vitro* a glifosato. *Biomédica* 25, 335-345.
- Monsanto, 2002a. Background: glyphosate and reproductive toxicology. <http://www.monsanto.com> (consultado 1 de septiembre de 2012).
- Monsanto, 2002b. Background: glyphosate and standard toxicology studies. <http://www.monsanto.com> (consultado 1 de septiembre de 2012).
- Nandula, V.K., Reddy, K.N., Duke, S.O., Poston, D.H., 2005. Glyphosate-resistant weeds: current status and future outlook – Review. *Outlooks on Pest Management*. USDA. pp. 183-187.
- Nivia, E., 2001. Las fumigaciones aéreas sobre cultivos ilícitos sí son peligrosas. Algunas aproximaciones. Conferencia *Las guerras en Colombia: drogas, armas y petróleo, The wars in Colombia: drugs, guns and oil*. Instituto Hemisférico de las Américas Universidad de California, Davis, pp. 1-21.
- Ramírez, W., Rondón, I., Vidal, H., Eslava, P., 2009. Toxicidad aguda y lesiones histopatológicas en cachama blanca (*Piaractus brachyomus*) expuestas a la mezcla de herbicida Roundup® más surfactante Cosmoflux® 411f. *Revista MVZ Córdoba* 14, 1563-1575.
- RAP-AL, 2007. Ficha técnica de glifosato. Red de Acción en Plaguicidas y sus Alternativas de América Latina (RAP-AL). <http://www.rap-al.org> (consultado 5 de agosto de 2012).
- USA, 1998, enero-diciembre Environmental Protection Agency. Glyphosate. EPA-Integration Risk Information System. <http://www.epa.gov/iris/subst/0057.htm> (consultado 5 de agosto de 2012).
- Williams, G.M., Kroes, R., Munro, I.C., 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 31, 117-165.
- World Health Organization, 2005. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2004.