

ACTUALIZACIÓN SOBRE ASPECTOS OXIDATIVOS DEL EFECTO DEL GLIFOSATO EN SISTEMAS BIOLÓGICOS

AN UPDATE ON THE EFFECTS OF GLYPHOSATE ON THE OXIDATIVE STATE IN BIOLOGICAL SYSTEMS

Juan Manuel Oстера, Gabriela Malanga, Susana Puntarulo

Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL), Universidad de Buenos Aires (UBA)-Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Fisicoquímica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Junín 956, 1113 Buenos Aires, Argentina

RESUMEN

El glifosato es un herbicida de amplio espectro que se utiliza para el control de malezas en cultivos de interés agrícola; genera la muerte del organismo blanco afectando su capacidad de sintetizar proteínas esenciales para la supervivencia. El glifosato inhibe la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa que forma parte de la vía metabólica de producción de aminoácidos aromáticos, ya que se comporta como un análogo de un sustrato de dicha enzima. Se han presentado evidencias que indican que el glifosato y sus formulaciones comerciales generan situaciones de estrés oxidativo en cianobacterias, microalgas y plantas superiores no blanco de este herbicida. Sin embargo, la verdadera dimensión de la magnitud del efecto oxidativo generado por la exposición al herbicida, aún es materia de deliberación. El objetivo del presente trabajo es resumir la información disponible sobre el metabolismo y la participación del estrés oxidativo en la toxicidad del glifosato en sistemas biológicos. El conocimiento de los riesgos ambientales generados por el uso del glifosato ayudará a evitar daños irreversibles tanto en plantas como en animales al emplear el herbicida.

Palabras clave: estrés oxidativo, glifosato, sistemas biológicos, toxicidad.

ABSTRACT

Glyphosate is a broad-spectrum herbicide used for weed control in crops of agricultural interest. This herbicide causes the death of the target by affecting their ability to synthesize proteins essential for survival. The activity of the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase enzyme, which is part of the metabolic pathway for production of aromatic amino acids, is inhibited by the glyphosate that behaves as an analogue of the second substrate (phosphoenolpyruvate). There is evidence that indicate glyphosate (and its formulations) produce oxidative stress in cyanobacteria, microalgae and non-target higher plants. However, the true dimension of the magnitude of the oxidative effect generated by the exposure is still a matter of discussion. The objective of the present study is to summarize the available information on the metabolism and the involvement of oxidative stress in the toxicity of glyphosate on biological systems. Increasing the awareness of the environmental risks generated by the use of glyphosate will help to avoid unrecoverable damage to both, plants and animals during herbicide handling.

Keywords: oxidative stress, glyphosate, biological systems, toxicity.

INTRODUCCIÓN

El glifosato (*N*-fosfonometil) glicina) es un herbicida de amplio espectro que se utiliza principalmente para el control de malezas en cultivos de interés agrícola. Originalmente patentado por la empresa estadounidense Monsanto en la década del 1970, su uso se ha ido incrementando con el correr de los años, especialmente a partir de la aparición de semillas de soja transgénica resistentes a dicho herbicida en el año 1996. En la actualidad, existen múltiples variedades de cultivos entre los que se encuentran el trigo, el maíz, el algodón y la alfalfa que muestran resistencia a la acción de este herbicida (Dill, 2008; Green, 2009; Dun *et al.*, 2014). El glifosato genera la muerte del organismo blanco afectando su capacidad de sintetizar proteínas esenciales para la supervivencia. La actividad de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa (EPSPS), que forma parte de la vía metabólica de producción de aminoácidos aromáticos, es inhibida por el glifosato que se comporta como un análogo del segundo sustrato (fosfoenolpiruvato) (Steinrücken y Amrhein, 1980). Además, Eker *et al.* (2006) y Cakmak *et al.* (2009) han informado que el glifosato puede unirse a diferentes metales esenciales presentes en el suelo, generando una disminución de su biodisponibilidad para la planta y, de este modo, provocando una deficiencia de nutrientes que podría contribuir al daño generado en dicho organismo. Esta facultad del glifosato de unirse a metales ha sido ampliamente estudiada y se han descrito casos de malnutrición de plantas resistentes al herbicida (Ozturk *et al.*, 2008; Bellaloui *et al.*, 2009; Saes Zobiolo *et al.*, 2010; Zobiolo *et al.*, 2010; Zobiolo *et al.*, 2011). Sin embargo, Duke *et al.* (2012) han señalado que la literatura científica que apoya estas afirmaciones ha resultado contradictoria, dado que muchos de esos estudios no han tenido en cuenta otras variables que pueden afectar la nutrición de las plantas, tales como las características del suelo y presencia de quelantes de metales en el mismo. Además, estos autores recopilaron evidencia científica que permite clasificar al glifosato como un quelante débil de metales, en comparación con los quelantes biológicos presentes en las plantas vivas. Las formulaciones comerciales de este herbicida contienen en su mayoría uno o más compuestos químicos conocidos como surfactantes, cuya función es facilitar el ingreso del herbicida a los tejidos de la planta. Se han realizado nume-

rosos estudios *in vivo* e *in vitro* en diversos tipos de células y organismos donde se ha observado que la toxicidad de los formulados comerciales del glifosato suele ser mayor que la observada al exponer distintos organismos (bacterias, microalgas, protozoos, crustáceos, ratones) al principio activo en estado puro (Bolognesi *et al.*, 1997; Tsui y Chu, 2003; Lipok *et al.*, 2010). Si bien la normativa internacional ha aprobado el uso del glifosato, cambios recientes en la política de algunas organizaciones internacionales tales como la International Agency for Research on Cancer (I.A.R.C.) han indicado la situación del glifosato como herbicida potencialmente tóxico para el ser humano y otros organismos no blanco (I.A.R.C. Monographs 112, 2015).

Estudios realizados durante la última década en variedad de modelos biológicos, han demostrado que el glifosato y sus formulaciones comerciales provocan distintos grados de toxicidad. En este sentido, Marc *et al.* (2004) estudiaron la acción de un formulado particular de glifosato (*Roundup 3plus*) como disruptor del ciclo celular en células de erizo de mar ya que este efecto es una de las características más comunes que presentan las células cancerígenas. Mañas *et al.* (2009) demostraron los efectos genotóxicos que el metabolito activo del glifosato, el ácido aminometilfosfónico (AMPA), ejerce sobre células humanas Hep-2 mediante ensayos de daño al ADN. Estudios realizados por Mesnage *et al.* (2012) determinaron el nivel de exposición de agricultores que utilizan herbicidas basados en glifosato mediante la medición del principio activo en muestras de orina. Estos experimentos demostraron no sólo que los fumigadores estaban expuestos a estos herbicidas, sino que se verificó una correlación entre el uso apropiado de equipos de protección personal y los niveles del compuesto hallados en las muestras biológicas. Por otro lado, se concluyó que las familias de los fumigadores pueden estar también expuestas a estos herbicidas debido a la presencia dentro del hogar de las ropas de trabajo contaminadas o por contacto dérmico con el aplicador. En la misma línea, Acquavella *et al.* (2004) obtuvieron resultados similares a los observados anteriormente, y lograron identificar aquellos factores que incrementan el riesgo de exposición a estos herbicidas durante su preparación y aplicación, a saber: falta de elementos de protección personal, reparación del equipo de fumigación durante la aplicación, utilización de tractores abiertos, y derrames ocurridos durante la preparación del herbicida. Curwin (2007) informó que el uso peridoméstico de herbicidas basados en glifosato agravaba la exposición por parte de las familias de los fumigadores. Previamente, De Roos *et al.* (2005) realizaron un análisis epidemiológico extenso utilizando datos obtenidos durante varios años con voluntarios de un programa de estudio de salud implementado en Estados Unidos. En este estudio se evaluó la posible correlación entre la exposición de fumigadores al glifosato comercial y el desarrollo de distintos tipos de cáncer por ejemplo, mieloma múltiple. Los autores sugieren una correlación entre la aparición de casos de mieloma múltiple y la aplicación de glifosato, lo que no se pudo apreciar para el resto de los tipos de cáncer analizados. Sin embargo, aclaran que esta relación sólo fue observada en unos pocos casos

y concluyen que es necesario continuar con el seguimiento de los individuos enrolados en el programa en cuestión para poder confirmar esta suposición.

En el año 2015 la I.A.R.C. incluyó al glifosato dentro del grupo 2 A, que comprende aquellas sustancias que se reconocen como “probables carcinógenos para los seres humanos”. Esta organización fundamentó su decisión en el análisis de estudios realizados en Estados Unidos, Suecia y Canadá con trabajadores de la agricultura; y en la revisión de publicaciones científicas que analizaron los efectos del glifosato y sus formulados comerciales en animales de laboratorio y en otros organismos no mamíferos (I.A.R.C. Monographs 112, 2015). A partir de la publicación de este informe, el German Federal Institute for Risk Assessment de Alemania realizó un análisis de riesgo concerniente al uso del glifosato y sugirió a la E.F.S.A. (European Food Safety Administration) considerar el informe de la I.A.R.C. en el proceso de reevaluación de la regulación del herbicida llevada a cabo en el año 2015 (B.F.R., 2015). El informe de la E.F.S.A. concluyó que el glifosato y sus formulaciones no presentan riesgo de carcinogenicidad en seres humanos si son utilizados de forma apropiada (EFSA Journal, 2015). En la misma línea se expresó la Health Canada Pest Management Regulatory Agency (P.M.R.A.) de Canadá, y la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (U.S.E.P.A.) (P.M.R.A., 2015; U.S.E.P.A., 2015).

El objetivo del presente trabajo es resumir la más reciente información disponible sobre el metabolismo y la participación del estrés oxidativo en la toxicidad del glifosato en sistemas biológicos fotosintéticos y animales, a los efectos de incrementar el conocimiento de los riesgos ambientales generados por su uso y fomentar el diseño adecuado de protocolos de prevención.

Metabolismo del glifosato

El glifosato es degradado a AMPA por múltiples bacterias del suelo, según los mecanismos que se muestran en la Figura 1. Se han descrito en bacterias tres vías metabólicas principales. Tanto en la vía dependiente de la actividad de la enzima glifosato óxido-reductasa como aquella de la enzima glicina oxidasa, AMPA y glioxilato son los productos finales. La tercera vía involucra la actividad de la enzima carbono-fósforo liasa que cataliza la escisión de la molécula de glifosato en el enlace carbono-fósforo dando como productos de reacción fosfato inorgánico y sarcosina. Algunos de los microorganismos que poseen estas enzimas capaces de metabolizar al glifosato han permitido la identificación de los genes codificantes para las mismas, los cuales son actualmente utilizados en la producción de cultivos transgénicos (Pollegioni *et al.*, 2011).

Las plantas genéticamente modificadas que pueden resistir la acción de este herbicida, lo hacen mediante mecanismos distintos: i) por la acción de un gen bacteriano que codifica para una forma de la ESPSP no sensible a la acción del herbicida, ii) por presencia de un gen bacteriano mutado que codifica para una forma de la enzima no sensible al glifosato, iii) por acción de un gen bacteriano que codifica para una enzima capaz de metabolizar al glifosato, o iv) por combinación

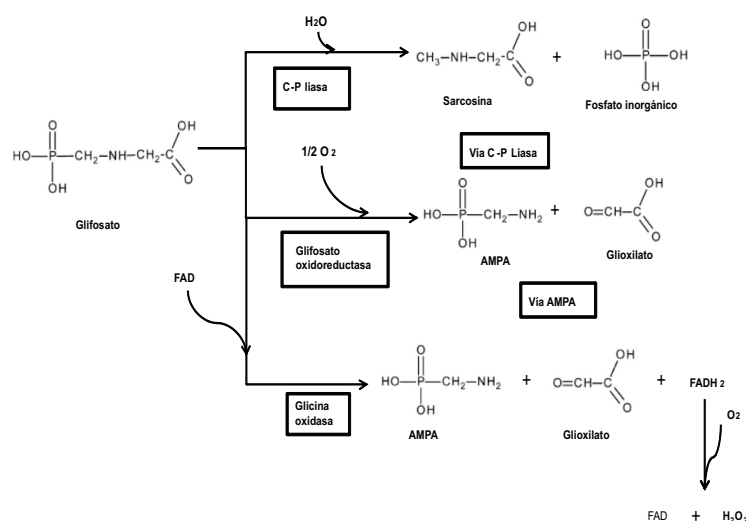


Figura 1. Diagrama indicando las principales vías de metabolización del glifosato en sistemas biológicos. AMPA: ácido aminometilfosfónico. Tomado y modificado de Pollegioni *et al.* (2011).

Figure 1. Main pathways for metabolization of glyphosate in biological systems. AMPA: aminomethylphosphonic acid. Taken and modified from Pollegioni *et al.* (2011).

de las posibilidades anteriores (Dun *et al.*, 2014). En los dos primeros casos, la planta no metaboliza al glifosato sino que la presencia de la forma no susceptible de la EPSPS le permite evitar la interrupción de la vía metabólica sobre la que actúa el herbicida. En el tercer caso, el gen exógeno codifica para una enzima denominada glifosato-N-acetiltransferasa (GAT) que cataliza una reacción de acetilación del glifosato, dando como producto *N*-acetil-glifosato, compuesto que no presenta actividad herbicida y puede ser posteriormente metabolizado y eliminado (Siehl *et al.*, 2007; Pollegioni *et al.*, 2011). En el último caso se combinan ambas opciones, es decir, la planta ha sido transformada utilizando dos de estos genes, con lo cual no sólo su enzima EPSPS no es susceptible a la acción del herbicida, sino que también posee actividad de la enzima GAT que le permite metabolizar al glifosato que ingresa a la planta (Dun *et al.*, 2014).

Con respecto al metabolismo *in vivo* del glifosato, Anadón *et al.* (2009) midieron los niveles de glifosato y AMPA en plasma de ratas Wistar luego de la administración del herbicida en forma oral e intravenosa (400 mg/kg de peso y 100 mg/kg de peso, respectivamente). En ambos casos se observó una metabolización muy baja del herbicida. Los niveles de AMPA en plasma fueron menores al 10% del total de glifosato administrado, y se adjudicó su presencia al metabolismo por microorganismos intestinales.

Radicales libres y estrés oxidativo en sistemas biológicos

Un radical libre se puede definir como una molécula o un átomo de existencia independiente con un electrón desapareado en el orbital externo (Yu, 1994). Existen distintos tipos de radicales libres de interés biológico: i) radicales libres del oxígeno (O_2^{\bullet} , anión superóxido; $\bullet OH$, radical hidroxilo), ii) radicales libres centrados en carbono (radical alquilo, R^{\bullet}), iii) radicales libres del nitrógeno (NO, óxido nítrico), y iv)

radicales libres donde el electrón desapareado se encuentra deslocalizado sobre varios átomos (A^{\bullet} , radical ascorbilo). El oxígeno molecular (O_2) es un biradical, es decir que posee dos electrones (e^-) desapareados ubicados cada uno en un orbital π . Teniendo el mismo número cuántico de espín, los dos e^- se localizan en configuración de espín antiparalelo. Cuando el O_2 oxida a otra molécula aceptando un par de e^- , ese par de e^- puede ser alineado con espín paralelo. Esta situación desfavorable, fuerza la transferencia de e^- a otras moléculas o átomos para recuperar su espín antiparalelo. Esta restricción de espín parece ser ventajosa para los organismos aeróbicos por su bajo contenido de O_2 reactivo, sin embargo se crea una situación en la cual la transferencia de un e^- puede conducir a la formación de una molécula o un átomo con un e^- desapareado y un radical libre (Fridovich, 1978).

Fisiológicamente, en las células aerobias se producen radicales libres. Entre el 2 y el 4% del O_2 consumido por las células vivas genera especies reactivas del O_2 (ROS). Esto se debe a que diversas organelas (como las mitocondrias, el retículo endoplasmático y los peroxisomas) y enzimas citoplasmáticas como la xantina oxidasa (XO) son capaces de reducir parcialmente el O_2 . El O_2 se puede reducir hasta formar agua (Figura 2). Los intermediarios de reducción del O_2 que incluyen especies radicales y no radicales, son especies químicas derivadas de las reducciones univalentes secuenciales del O_2 molecular: el O_2^{\bullet} , el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el $\bullet OH$. El O_2^{\bullet} es el primer intermediario de la secuencia de reducción univalente del O_2 a agua y puede conducir a la formación de otras especies reactivas tales como $\bullet OH$ y el H_2O_2 , ambas con mayor poder oxidante que el O_2^{\bullet} . También puede reaccionar con el H_2O_2 para generar O_2 singulete (1O_2). El H_2O_2 por definición no es un radical libre, sin embargo, es una especie

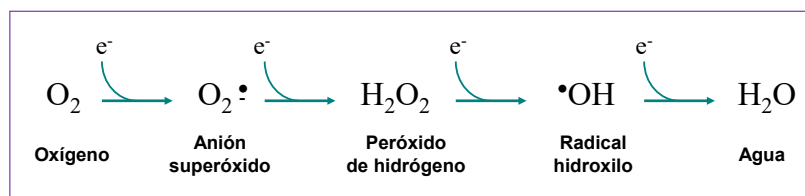


Figura 2. Reducción univalente del O_2 a H_2O indicando la generación de ROS.
Figure 2. Univalent reduction of O_2 to H_2O , indicating the generation of ROS.

altamente reactiva por la presencia de un enlace O-O muy lábil. La principal fuente de generación de H_2O_2 es la dismutación del $\text{O}_2^{\bullet -}$ catalizada por la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD). El $\bullet\text{OH}$ es generado, i) a partir de la descomposición de H_2O_2 a través de la reacción de Fenton y ii) a partir de la reacción de $\text{O}_2^{\bullet -}$ y H_2O_2 mediante la reacción de Haber-Weiss, catalizada por hierro (Fe) (Boveris, 1998). Por otro lado, un aumento en la generación de NO puede dar lugar a un aumento de la generación de las especies reactivas del N_2 (RNS), como el peroxinitrito (ONOO^{\bullet}) produciendo daño celular por nitración, nitrosilación y lipoperoxidación (Ducrocq *et al.*, 1999).

Para mantener bajas concentraciones en estado estacionario de las ROS y las RNS dentro de las células, se requieren sistemas de eliminación. Un antioxidante se define como cualquier sustancia que a concentraciones muy bajas comparadas con la de un sustrato oxidable, significativamente retrasa o inhibe la oxidación de éste. Comprende compuestos tanto de naturaleza enzimática como no enzimática (Halliwell y Gutteridge, 1984). Los antioxidantes enzimáticos incluyen las actividades de las enzimas SOD, catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), ascorbato peroxidasa (APx) y otras involucradas en la síntesis y regeneración de antioxidantes de bajo peso molecular (Sies, 1993). La SOD es una familia de metalo-enzimas que cataliza la dismutación de $\text{O}_2^{\bullet -}$. La CAT y las peroxidases (Pxs) son los principales sistemas enzimáticos que detoxifican H_2O_2 (Asada, 1992). La enzima CAT es una hemoproteína que presenta una función doble: i) descomposición de H_2O_2 (actividad catalítica) y ii) oxidación de dadores de hidrógeno (DH_2), como metanol, etanol, fenoles y ácido fórmico, con el consumo de un mol de peróxido (actividad peroxidática) (Aebi, 1984). La mayor parte de las Pxs son hemoproteínas que catalizan la oxidación por un e^- del dador de electrones (XH_2) formando como producto primario un radical libre (Jones *et al.*, 1998). Los antioxidantes no enzimáticos son generalmente moléculas pequeñas, que pueden ser: i) hidrofílicas, como el glutatión (GSH, L- γ -glutamil-L-cisteinilglicina) y el ácido ascórbico (AH), ii) lipofílicas, como el α -tocoferol (α -T) y el β -caroteno (β -C). Se incluyen también en este grupo compuestos fenólicos, como flavonoides y moléculas complejas, como el ácido fítico, la fitoferritina y los fitoquelatos (Foyer y Harbinson, 1994).

La concentración en estado estacionario de las especies activas es aquella en la cual la velocidad de utilización o desaparición de la especie es igual a su velocidad de producción (Boveris, 1998). El estrés oxidativo se produce por un desequilibrio, ya sea por un aumento en la producción de

las especies oxidantes o por una disminución de la actividad de las especies antioxidantes. Bajo estas condiciones, tanto las ROS como las RNS pueden reaccionar con biomoléculas y modificar la estructura y función de las mismas, para dar lugar a alteraciones por daño oxidativo y nitrosativo. Esto puede promover la muerte celular y dar lugar a estados fisiopatológicos, como la neurodegeneración, el cáncer, la mutagénesis, diversas enfermedades cardiovasculares, y al envejecimiento, entre otros (Sagara *et al.*, 1998)

El daño a macromoléculas involucra la reacción de las mismas con proteínas, ácidos nucleicos y lípidos (Halliwell y Gutteridge, 1984) (Figura 3). Los aminoácidos, eslabones de las proteínas y péptidos, son blanco para el ataque de radicales libres. Estudios sobre el daño oxidativo a aminoácidos ha provisto suficiente información sobre cambios en la macroestructura de las proteínas. Estas alteraciones conducen a cambios físicos en las proteínas, tales como la fragmentación, la agregación y la susceptibilidad a la digestión proteolítica. Finalmente, este daño puede llevar a cambios conformacionales y en la estructura terciaria de las proteínas (Yu, 1994). El daño al ADN estaría fundamentalmente mediado por $\bullet\text{OH}$ e incluiría alteración de las bases y ruptura de cadenas (Mitchell, 1995). La peroxidación de lípidos se define como el deterioro oxidativo de lípidos insaturados. Se trata de una reacción en cadena que consta de tres etapas fundamentales: la iniciación, la propagación y la terminación. Se define como iniciación aquella etapa en la que se generan especies radicales. Se considera que en esta etapa de la cadena, participan compuestos de alta capacidad oxidante derivados del Fe (ferrilo y perferrilo). Las reacciones de propagación son aquellas en la que se mantienen constante el número de especies activas y las reacciones de terminación son aquellas donde se consumen especies activas. La peroxidación lipídica provoca efectos citotóxicos a nivel molecular, que incluyen una alteración estructural de la membrana con alteraciones de la fluidez, permeabilidad incrementada de los constituyentes celulares y la inactivación de enzimas intrínsecas y transportadoras (Halliwell y Gutteridge, 1999).

Glifosato y estrés oxidativo en sistemas biológicos

El glifosato y sus formulaciones comerciales pueden alcanzar los cuerpos de agua cercanos a las zonas de aplicación de herbicidas principalmente mediante escorrentía. Es crítico adquirir conocimiento sobre el efecto que puedan tener estos herbicidas sobre la supervivencia y composición de las comunidades fitoplanctónicas, ya que se trata productores primarios que forman parte de numerosas redes

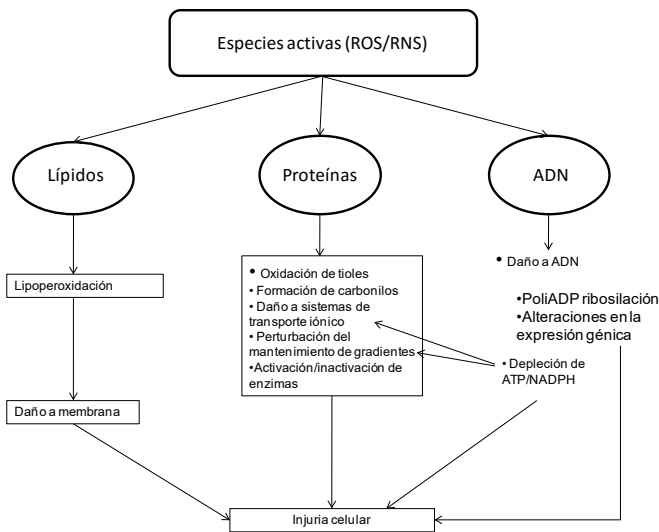


Figura 3. Diagrama resumiendo los efectos de la generación de ROS y/o RNS que conducen al daño celular.

Figure 3. Diagram summarizing the effects caused by the generation of ROS and/or RNS that lead to cell injury.

tróficas en los ecosistemas acuáticos. Se han presentado evidencias que indican que el glifosato y sus formulaciones comerciales generan situaciones de estrés oxidativo en cianobacterias (Chen *et al.*, 2012), microalgas (Vendrell *et al.*, 2009; Lipok *et al.*, 2010; Romero *et al.*, 2011) y plantas superiores no blanco de este herbicida (Sergiev *et al.*, 2006; Ahsan *et al.*, 2008). Se cree que la generación de estrés oxidativo es uno de los mecanismos por los cuales el glifosato presenta toxicidad en organismos no blanco, que no deberían verse afectados por la acción principal del principio activo. En el caso de las microalgas y las plantas superiores no blanco, el daño oxidativo se suma al provocado por la inhibición de la enzima EPSPS. Romero *et al.* (2011) estudiaron el daño asociado al estrés oxidativo generado por la exposición a un formulado comercial con agregado de surfactante sobre una cepa extremófila autóctona de la microalga *Chlorella kessleri*. Esta cepa se caracteriza por resistir altas concentraciones de metales pesados y ciertos funguicidas como el hexaclorobenceno. Los autores expusieron esta alga a concentraciones crecientes de formulado correspondientes a 40, 50, 60 y 70 mg/L de glifosato puro en el medio de cultivo, y midieron el daño oxidativo, los niveles de antioxidantes no enzimáticos y la actividad de enzimas antioxidantes. En todos los casos observaron un incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes, así como también una disminución en los contenidos de antioxidantes no enzimáticos. También observaron alteraciones morfológicas en aquellos cultivos expuestos a las concentraciones más elevadas del herbicida. En invertebrados acuáticos y terrestres se ha sugerido que el glifosato presenta toxicidad asociada a la generación de estrés oxidativo en base a la medición de la peroxidación lipídica y la determinación de las actividades de las enzimas CAT, SOD y glutatión S-transferasa (GST) (Contardo-Jara *et al.*, 2009; Iummato *et al.*, 2013).

Los peces han sido definidos como uno de los organismos más sensibles al glifosato, si bien no poseen la enzima principalmente afectada por este herbicida. Guilherme *et al.* (2012), Nwani *et al.* (2013) y Samanta *et al.* (2014) han presentado evidencias de daño oxidativo a lípidos y ADN como consecuencia de los efectos tóxicos del glifosato y sus formulados en distintas especies de peces de agua dulce. En la misma línea, Samanta *et al.* (2014) evaluaron también la actividad de las enzimas CAT y GST en peces de agua dulce expuestos durante 30 días a una concentración subletal (17,20 mg/L) de un formulado comercial del glifosato, observando patrones de peroxidación lipídica similares a los previamente publicados, así como también incrementos en la actividad de dichas enzimas, relacionadas con el control de los desbalances oxidativos en estos organismos. Por otro lado, Heu *et al.* (2012) mostraron que la exposición a glifosato, afecta a la integridad de la membrana mitocondrial de células epidérmicas humanas (línea HaCaT), aumentando la concentración de ROS y activando la apoptosis celular que conduce a la muerte celular programada en forma dependiente de la dosis y del tiempo de exposición empleado. Previamente, Mañas *et al.* (2009) expusieron células Hep-2 a diferentes concentraciones del metabolito AMPA, observando efectos genotóxicos tanto en cultivos celulares como en eritrocitos de ratones. Si bien los autores no enuncian una hipótesis referida al mecanismo por el cual el AMPA genera estos efectos, es sabido que los ROS pueden dañar el ADN, generando efectos genotóxicos en las células y organismos expuestos al mismo. Este resultado es muy relevante ya que la amplia distribución de los metabolitos del glifosato en el ambiente, sumado a una posible alta toxicidad del AMPA expondría a la comunidad biológica a un proceso de bioactivación.

Beuret *et al.* (2005) estudiaron el efecto que genera la exposición por vía oral a una solución 1% (P/V) de glifosato puro en agua de bebida sobre la peroxidación lipídica en hígado de ratas preñadas y sus fetos de 21 días de gestación. Los resultados obtenidos mostraron una pronunciada disminución de la actividad antioxidante de las enzimas SOD, GPx y CAT, así como también un aumento en la peroxidación lipídica (evaluada como el contenido de malondialdehído). Se ha propuesto que los altos niveles de peroxidación lipídica se deben al colapso del sistema antioxidante. Posteriormente, Astiz *et al.* (2009) estudiaron los efectos provocados por el glifosato y otros dos pesticidas (por separado y combinados) sobre el estado oxidativo y nitrosativo, así como la actividad de los sistemas antioxidantes en distintos órganos de ratas Wistar. En este estudio se simuló un modelo de exposición ambiental crónica a estos agroquímicos inyectando a los animales con los compuestos de interés, tres días a la semana durante cinco semanas, analizando el daño oxidativo y la respuesta de los sistemas antioxidantes en cerebro, riñones e hígado. En general, los efectos producidos por la combinación de pesticidas fueron mayores que los generados por los agroquímicos por separado. Respecto al glifosato, los resultados mostraron un aumento en los niveles de peroxidación lipídica en los tres órganos evaluados en los animales

expuestos tanto al glifosato puro como a las combinaciones de este herbicida con los otros pesticidas. En este modelo, ni el daño oxidativo a proteínas (medido como contenido de proteínas carboniladas), ni la presencia de RNS (estimadas por el contenido de nitratos y nitritos totales), ni la relación GSH/GSSG (glutación reducido/oxidado) se modificaron por la administración de glifosato. Sin embargo, el nivel de α -T se redujo en todos los órganos, y la actividad de las enzimas antioxidantes sólo se vio afectada en el cerebro de los animales tratados con glifosato por sí mismo o en combinación. Recientemente, Larsen *et al.* (2012) expusieron ratas Wistar durante 30 y 90 días, a concentraciones de glifosato iguales y por encima de los límites máximos permitidos por la EPA (U.S.E.P.A., 2011) en agua de bebida, evaluando el contenido de GSH, la actividad de GST y GPx, así como la peroxidación lipídica en hígado, riñón e intestino delgado de los animales. Los resultados mostraron un aumento en la cantidad de GSH en hígado a los 30 días y una disminución a los 90 días. Sin embargo, ni la peroxidación lipídica ni la actividad de la enzima GST mostraron cambios frente a ningún tratamiento. Por otro lado, la actividad de la enzima GPx aumentó con la extensión temporal de los tratamientos. A pesar de que se ha sugerido que estos resultados pueden deberse a una resistencia específica de estos animales al herbicida, no hay evidencias concluyentes al respecto.

Actualmente, es necesario clarificar si el glifosato puro y el compuesto comercial Roundup, tienen efectos equivalentes a nivel biológico. Esta importante interrogante surge a raíz de numerosos estudios realizados en forma comparativa. Bolognesi *et al.* (1997) evaluaron los efectos genotóxicos de ambos productos sobre un cultivo de linfocitos humanos *in vitro* y observaron un aumento equivalente en el daño acromosomal en cultivos expuestos a concentraciones similares de ambos compuestos. Por otro lado, Gasnier *et al.* (2009) expusieron cultivos de la línea celular hepática HepG2 a diferentes formulaciones comerciales de glifosato y al herbicida puro, en concentraciones por debajo de las utilizadas a nivel agrícola, observando efectos de disrupción endócrina y de daño a ADN en todas las formulaciones testeadas, por encima de los niveles generados por el herbicida de grado analítico puro. En la misma línea, Chauhan *et al.* (2014) expusieron cultivos de la línea celular HepG2 a AMPA, glifosato puro y a un formulado a base de este herbicida y determinaron una activación de la vía apoptótica frente al tratamiento con el formulado, pero no así frente al AMPA y al glifosato puro. Además, los parámetros relacionados con el estrés oxidativo y los sistemas antioxidantes fueron afectados en mayor grado por el formulado que por el metabolito o el herbicida puro.

En vertebrados, Peixoto (2005) observó efectos tóxicos diferenciales del glifosato y su formulado comercial RoundUp, en la fosforilación oxidativa de mitocondrias aisladas de células hepáticas de ratas Wistar. Dicho autor propone una posible acción de los surfactantes y otros compuestos "inertes" de las formulaciones comerciales del glifosato, como agentes con una toxicidad mayor comparada con la del glifosato puro. Tsui y Chu (2003) y Romero *et al.* (2011) también han propuesto que los efectos tóxicos de las formulaciones

comerciales podrían ser mayores que la del compuesto puro. Además, El-Shenawy (2009) estudió el efecto sobre el estado oxidativo hepático de ratas albinas de la exposición a distintas concentraciones subletales de glifosato y Roundup. Las ratas recibieron un tratamiento sub-crónico con la administración del glifosato puro o su formulación Roundup en forma intraperitoneal. Se inocularon dosis repetidas día por medio con una duración total del experimento de una y dos semanas. Los resultados mostraron una mayor disminución del GSH en los grupos tratados con Roundup comparados con la exposición a glifosato, en forma dependiente de la duración del tratamiento. El nivel de NO (medido como contenido de nitratos y nitritos) en hígado aumentó en los animales tratados con Roundup. Sin embargo, la exposición a glifosato por sí mismo mostró diferencias sólo en los tratamientos más prolongados. La peroxidación lipídica resultó superior a la determinada en los animales controles sólo en el caso de los tratamientos prolongados con ambos compuestos. En estudios realizados con líneas celulares humanas epidérmicas (HaCaT), Gehin *et al.* (2006) mostraron que la exposición de dichas células al glifosato puro o en formulados comerciales (*RoundUp 3plus*) genera una disminución en los niveles de GSH. Los experimentos realizados en estas líneas celulares epidérmicas tienen una gran importancia dado que la piel es una de las vías de absorción de los plaguicidas y herbicidas de uso agrícola. Los resultados obtenidos en líneas celulares epidérmicas pueden aportar información acerca de los daños producidos por estos agroquímicos sobre una de las barreras de protección del cuerpo humano frente a la exposición a estos productos tóxicos.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Si bien la evidencia publicada hasta el momento no alcanza para definir al glifosato como perjudicial para el ser humano, el uso indiscriminado de este producto y sus formulaciones comerciales a largo plazo, puede tener consecuencias aún no dilucidadas para la salud. Es claro que el glifosato y, especialmente sus formulados, generan efectos tóxicos en organismos no blanco. Los estudios realizados en diferentes organismos no blanco donde se observa daño oxidativo asociado a la exposición al glifosato podrían estar indicando la presencia de un mecanismo alternativo de acción relacionado con la generación de ROS y/o RNS. Sin embargo, aunque los resultados presentados sugieren una relación con la generación de estrés oxidativo, aún son necesarios estudios más específicos al respecto para poder llegar a conclusiones mecanísticas. Las investigaciones que se realicen para dilucidar estos mecanismos seguramente permitirán caracterizar el daño generado por estos herbicidas sobre especies no blanco y quizás proveer la información necesaria para prevenir dichos efectos. Por otro lado, aún persiste la duda básica sobre el papel que juegan los adyuvantes presentes en las formulaciones, cuya participación podría ser desde complementaria hasta crítica, pudiendo actuar como agentes fundamentales en la desestabilización de las membranas biológicas conduciendo a una severa disfunción de las mismas por lipoperoxidación. Otro aspecto no dilucidado

de los efectos oxidativos del glifosato (ya sea por sí mismo o en combinación con los coadyuvantes) es si la aparición de alteraciones en el balance oxidativo celular de los órganos no blancos actúa como un fenómeno iniciador del daño celular o si se trata de un efecto secundario que amplifica el daño primario.

Este conjunto de interrogantes no resueltos hace que la bioquímica de los procesos celulares en los que participa el glifosato deba ser descripta a fin de establecer con carácter realista el grado de toxicidad del compuesto y ajustar las precauciones que se deban tomar para su uso a los efectos de evitar daños innecesarios en las personas y el medio ambiente.

REFERENCIAS

- Acquavella, J.F., Alexander, B.H., Mandel, J.S., Gustin, C., Baker, B. y Chapman, P. 2004. Glyphosate biomonitoring for farmers and their families: Results from the farm family exposure study, *Environmental Health Perspectives*. 112: 321-326.
- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 105: 121-126.
- Ahsan, N., Lee, D.G., Lee, K.W., Alam, I., Lee, S.H., Bahk, J.D. y Lee, B.H. 2008. Glyphosate-induced oxidative stress in rice leaves revealed by proteomic approach. *Plant Physiology and Biochemistry*. 46: 1062-1070.
- Anadón, A., Martínez-Larrañaga, M.R., Martínez, M.A., Castellano, V.J., Martínez, M., Martín, M.T., Nozal, M.J. y Bernal, J.L. 2009. Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid in rats. *Toxicology Letters*. 190: 91-95.
- Astiz, M., de Alaniz, M.J.T. y Marra, C.A. 2009. Antioxidant defense system in rats simultaneously intoxicated with agrochemicals. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 28: 465-473.
- Bellaloui, N., Reddy, K.N., Zablutowicz, R.M., Abbas, H.K. y Abel, C.A. 2009. Effects of glyphosate application on seed iron and root ferric (III) reductase in soybean cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57: 9569-9574.
- Beuret, C.J., Zirulnik, F. y Giménez, M.S. 2005. Effect of the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnant rats and their fetuses. *Reproductive Toxicology*. 19: 501-504.
- Bolognesi, C., Bonatti, S., Degan, P., Gallerani, E., Peluso, M., Rabboni, R. y Roggeri, P. 1997. Genotoxic activity of glyphosate and its technical formulation roundup. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45: 1957-1962.
- Boveris, A. 1998. Biochemistry of free radicals: from electrons to tissues. *Medicina*. 58: 350-356.
- Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR.) 2015. BfR-contribution to the EU-approval process of glyphosate. BfR Communication No 008/2015. Disponible en: <http://www.bfr.bund.de/cm/349/bfr-contribution-to-the-eu-approval-process-of-glyphosate-is-finalised.pdf>
- Cakmak, I., Yazici, A., Tutus, Y. y Ozturk, L. 2009. Glyphosate reduced seed and leaf concentrations of calcium, manganese, magnesium, and iron in non-glyphosate resistant soybean. *European Journal of Agronomy*. 31: 114-119.
- Chaufan, G., Coalova, I. y Ríos de Molina, M.C. 2014. Glyphosate commercial formulation causes cytotoxicity, oxidative effects, and apoptosis on human cells: differences with its active ingredient. *International Journal of Toxicology*. 33: 29-38.
- Chen, L., Xie, M., Bi, Y., Wang, G., Deng, S. y Liu, Y. 2012. The combined effects of UV-B radiation and herbicides on photosynthesis, antioxidant enzymes and DNA damage in two bloom-forming cyanobacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 80: 224-230.
- Contardo-Jara, V., Klingelmann, E. y Wiegand, C. 2009. Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation and antioxidant enzymes. *Environmental Pollution*. 157: 57-63.
- Curwin, B.D., Hein, M.J., Sanderson, W.T., Striley, C., Heederik, D., Kromhout, H., Reynolds, S.J. y Alavanja, M.C. 2007. Urinary pesticide concentrations among children, mothers and fathers living in farm and non-farm households in Iowa. *Annals of Occupational Hygiene*. 51: 53-65.
- De Roos, A.J., Blair, A., Rusiecki, J.A., Hoppin, J.A., Svec, M., Dosemeci, M., Sandler, D.P. y Alavanja, M.C. 2005. Cancer incidence among glyphosate-exposed pesticide applicators in the Agricultural Health Study. *Environmental Health Perspectives*. 113: 49-54.
- Dill, G.M., CaJacob, C.A. y Padgett, S.R. 2008. Glyphosate-resistant crops: adoption, use and future considerations. *Pest Management Science*. 64: 326-331.
- Ducrocq, C., Blanchard, B., Pignatelli, B. y Ohshima, H. 1999. Peroxynitrite: an endogenous oxidizing and nitrating agent. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 55: 1068-1077.
- Duke, S.O., Lydon, J., Koskinen, W.C., Moorman, T.B., Chaney, R.L. y Hammerschmidt, R. 2012. Glyphosate effects on plant mineral nutrition, crop rhizosphere microbiota, and plant disease in glyphosate-resistant crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60: 10375-10397.
- Dun, B., Wang, X., Lu, W., Chen, M., Zhang, W., Ping, S. y Wang, Z. 2014. Development of highly glyphosate-tolerant tobacco by coexpression of glyphosate acetyltransferase *gat* and EPSPS *G2-aroA* genes. *The Crop Journal*. 2: 164-169.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2015. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate. *EFSA Journal*. 13: 4302 - 4409.
- Eker, S., Ozturk, L., Yazici, A., Erenoglu, B., Romheld, V. y Cakmak, I. 2006. Foliar-applied glyphosate substantially reduced uptake and transport of iron and manganese in sunflower (*Helianthus annuus* L.) plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54: 10019-10025.
- Ei-Shenawy, N.S. 2009. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 28: 379-385.
- Foyer, C.H. y Harbinson, J. 1994. Oxygen metabolism and regulation of photosynthetic electron transport. En *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*. C. Foyer y P.M. Mullineaux (eds.), pp 1-13. CRC Press, Boca Ratón, U.S.A.
- Fridovich, I. 1978. The biology of oxygen radicals. *Science* Washington DC. 201: 875-880.
- Gasnier, C., Dumont, C., Benachour, N., Clair, E., Chagnon, M.C. y Seralini, G.E. 2009. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology*. 262: 184-191.
- Gehin, A., Guyon, C. y Nicod, L. 2006. Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCaT: The protective effect of Vitamins C and E. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 22: 27-34.
- Green, J.M. 2009. Evolution of Glyphosate-Resistant Crop Technology. *Weed Science*. 57: 108-117.
- Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M.A. y Pacheco, M. 2012. DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide - Elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 743: 1-9.

- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemistry Journal*. 219: 1-14.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. 1999. *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd ed. Clarendon Press. Oxford.
- Health Canada Pest Management Regulatory Agency. 2015. Proposed Reevaluation Decision on Glyphosate (PRVD2015-01). Pest Management Regulatory Publications. Health Canada. ISSN: 1925-0967.
- Heu, C., Elie-Caille, C., Mougey, V., Launay, S. y Nicod, L. 2012. A step further toward glyphosate-induced epidermal cell death: Involvement of mitochondrial and oxidative mechanisms. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 34: 144-153.
- International Agency for Research on Cancer/World Health Organization. 2015. IARC Monographs Volume 112-09: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides. Glyphosate. Disponible en: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol112/mono112-09.pdf>
- Iummato, M.M., Di Fiori, E., Sabatini, S.E., Cacciatore, L.C., Cochón, A.C., Ríos de Molina, M.C. y Juárez, A.B. 2013. Evaluation of biochemical markers in the golden mussel *Limnoperna fortunei* exposed to glyphosate acid in outdoor microcosms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 95:123-129.
- Larsen, K., Najle, R., Lifschitz, A. y 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*. 34: 811-818.
- Lipok, J., Studnik, H. y Gruyaert, S. 2010. The toxicity of Roundup360 SL formulation and its main constituents: Glyphosate and isopropylamine towards non-target water photoautotrophs. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 73: 1681-1688.
- Mañas, F., Peralta, L., Raviolo, J., Ovando, H.G., Weyers, A., Ugnia, L., González Cid, M., Larripa, I. y Gorla, N. 2009. Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 28: 37-41.
- Marc, J., Mulner-Lorillon, O. y Bellé, R. 2004. Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. *Biology of the Cell*. 96: 245-249.
- Mesnage, R., Moesch, C., Le Grand, R., Lauthier, G., Spiroux de Vendômois, J., Gress, S. y Séralini, G.E. 2012. Glyphosate Exposure in a Farmer's Family. *Journal of Environmental Protection*. 3: 1001-1003.
- Mesnage, R., Bernay, B. y Séralini, G.E. 2013. Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology*. 314: 122-128.
- Mitchell, D.L. 1995. Ultraviolet radiation damage to DNA. En *Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference*. Meyers, R.A. (ed.), pp 939-943. VCH Publishers, New York.
- Nwani, C.D., Nagpure, N.S., Kumar, R., Kushwaha, B. y Lakra, W.S. 2013. DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in freshwater fish, *Channa punctatus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 36: 539-547.
- Ozturk, L., Yazici, A., Eker, S., Gokmen, O., Römheld, V. y Cakmak, I. 2008. Glyphosate inhibition of ferric reductase activity in iron deficient sunflower roots. *New Phytologist*. 177: 899-906.
- Peixoto, F. 2005. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Chemosphere*. 61: 1115-1122.
- Pollegioni, L., Schonbrunn, E. y Siehl, D. 2011. Molecular basis of glyphosate resistance-different approaches through protein engineering. *The FEBS journal*. 278: 2753-2766.
- Romero, D.M., Ríos de Molina, M.C. y Juárez, A.B. 2011. Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of *Chlorella Kessleri*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74: 741-747.
- Saes Zobiolo, L.H., de Oliveira, R.S., Kremer, R.J., Constantin, J., Bonato, C.M. y Muniz, A.S. 2010. Water use efficiency and photosynthesis of glyphosate-resistant soybean as affected by glyphosate. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 97: 182-193.
- Sagara, Y., Dargusch, R., Chambers, D., Davis, J., Schubert, D. y Maher, P. 1998. Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*. 24: 1375-1389.
- Samanta, P., Pal, S., Mukherjee, A.K. y Ghosh, A.R. 2014. Biochemical effects of glyphosate based herbicide, Excel Mera 71 on enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE), lipid peroxidation (LPO), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and protein content on teleostean fishes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 107: 120-125.
- Sergiev, I.G., Alexieva, V.S., Ivanov, S.V., Moskova, I.I. y Karanov, E.N. 2006. The phenylurea cytokinin 4PU-30 protects maize plants against glyphosate action. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 85: 139-146.
- Siehl, D.L., Castle, L.A., Gorton, R. y Keenan, R.J. 2007. The molecular basis of glyphosate resistance by an optimized microbial acetyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*. 282: 11446-11455.
- Sies, H. 1993. Strategies of antioxidant defense. *European Journal of Biochemistry*. 215: 213-219.
- Steinrücken, H.C. y Amrhein, N. 1980. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 94: 1207-1212.
- Tsui, M.T.K. y Chu, L.M. 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: Comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*. 52: 1189-1197.
- U.S. EPA. 2011. Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories. EPA 820-R-11-002. Office of Water. U.S. Environmental Protection Agency. Washington, DC.
- U.S.E.P.A. 2015. EDSP: Weight of Evidence Analysis of Potential Interaction with the Estrogen, Androgen or Thyroid Pathways. Chemical: Glyphosate. Office of Pesticide Programs. U. S. Environmental Protection Agency. Disponible en: https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-06/documents/glyphosate-417300_2015-06-29_txr0057175.pdf
- Vendrell, E., Gómez De Barreda Ferraz, D., Sabater, C. y Carrasco, J.M. 2009. Effect of glyphosate on growth of four freshwater species of phytoplankton: A microplate bioassay. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 82: 538-542.
- Yu, B.P. 1994. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiological Reviews*. 74: 139-155.
- Zobiolo, L.H.S., Junior, R.S.D.O., Kremer, R.J., Muniz, A.S. y Junior, A.D.O. 2010. Nutrient Accumulation and Photosynthesis in Glyphosate-Resistant Soybeans Is Reduced Under Glyphosate Use. *Journal of Plant Nutrition*. 33: 1860-1873.
- Zobiolo, L.H.S., Kremer, R.J., Oliveira, R.S. y Constantin, J. 2011. Glyphosate affects chlorophyll, nodulation and nutrient accumulation of 'second generation' glyphosate-resistant soybean (*Glycine max* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 99: 53-60.