

EFFECTOS DE UN HERBICIDA A BASE DE GLIFOSATO SOBRE LA GENERACIÓN DE ALTERACIONES METABÓLICAS SISTÉMICAS Y CAMBIOS HISTOLÓGICOS HEPÁTICOS EN UN MODELO ANIMAL DE INSULINORRESISTENCIA

EFFECTS OF A GLYPHOSATE-BASED HERBICIDE ON SYSTEMIC METABOLIC ALTERATIONS AND HISTOLOGIC HEPATIC CHANGES PRESENT IN AN ANIMAL MODEL OF INSULIN RESISTANCE

Verónica Reus¹, Iván Huespe¹, María del Carmen Contini², Mariana Cabagna¹, Carlos Recce¹, Soledad Jauregui¹, Denise Andres¹, Esteban Martín Repetto³, Cora Cymeryng³, Pablo Arias^{1,4}

RESUMEN

Introducción: el estrés oxidativo y la inflamación asociados a la insulinorresistencia (IR) contribuyen a generar esteatohepatitis no alcohólica. También la exposición al glifosato, un herbicida ampliamente utilizado, incrementa la peroxidación lipídica hepática con aumento de radicales libres de O₂.

Objetivos: evaluar los efectos de la administración prolongada de un herbicida a base de glifosato sobre la generación de IR, estrés oxidativo y cambios histológicos hepáticos en animales tratados con una dieta rica en sacarosa (DRS).

Metodología: ratas Wistar macho (~300 g) recibieron Credit® por vía intraperitoneal (~50 mg/kg de glifosato tres veces por semana; grupo G, n=6), sacarosa al 30% en el agua de bebida (grupo S, n=6), ambos tratamientos (grupo G+S, n=8), o ninguno de ellos (grupo C, n=7). Tras una exposición de 8-10 semanas se midieron glucemia e insulinemia basales y tras una carga de glucosa intraperitoneal. En la semana 13, tras la eutanasia, se extrajo el hígado (tinciones con hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson, TBARS).

Resultados: no hubo diferencias significativas en los niveles glucémicos basales o postcarga. Los tratamientos con G o S generaron incrementos leves de la IR evidenciados por el índice HOMA-IR, mientras que la combinación de G+S llevó a un aumento altamente significativo de este parámetro. También fue más marcado, en estos animales, el grado de lipoperoxidación (TBARS) medido en homogenatos hepáticos. La evaluación histológica mostró signos de esteatosis y fibrosis en los grupos G y G+S, e infiltrados inflamatorios en todos los grupos tratados.

Conclusiones: aislado o en combinación con sacarosa, el herbicida a base de glifosato aumentó el grado de esteatosis y fibrosis a nivel hepático. Por otro lado, la administración del herbicida incrementó la magnitud de la insulinorresistencia inducida por la DRS generando un mayor estrés oxidativo a nivel hepático.

Palabras claves: glifosato, insulinorresistencia, sacarosa, estrés oxidativo, esteatosis hepática, inflamación, fibrosis.

ABSTRACT

Introduction: insulin-resistance (IR) -associated inflammation and oxidative stress are involved in the etiopathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. Exposure to glyphosate, a broadly used herbicide, has also proved to increase the hepatic content of free oxygen radicals.

Objectives: to evaluate the effects of the prolonged administration of a glyphosate-containing herbicide on IR, hepatic oxidative stress levels and histologic changes in sucrose-treated rats.

Methodology: male Wistar rats weighing ~300 g received the herbicide (Credit®) injected intraperitoneally (i.p.) 3 times/week at a dose of 50 mg/kg glyphosate (group G, n=6), 30% sucrose in the drinking water (group S, n=6), both treatments (n=8, group G+S) or vehicle injections and tap water (n=7, controls or group C). Serum insulin and glucose levels (basal and after an i.p. glucose load) were measured during weeks 8-10 after initiating these treatments. During week 13, animals were slaughtered, and liver tissue samples were taken for histologic evaluations and for oxidative stress/lipidic peroxidation estimation (TBARS).

Results: no significant changes in glycemic levels were found. IR (as estimated by HOMA-IR) was slightly increased versus controls in animals receiving G or S, and significantly augmented in G+S rats. These animals also showed marked elevations in hepatic TBARS content. Histologic evaluations showed signs of steatosis and fibrosis in the G and G+S groups, and inflammatory infiltrates in all treated groups.

Conclusions: the administration of glyphosate to animals receiving a sucrose-rich diet results in increased metabolic disturbances. Hepatic oxidative stress is also augmented, thus showing an additive effect of glyphosate on metabolic and hepatic changes observed in sucrose-treated animals.

Key words: glyphosate, insulin resistance, sucrose, oxidative stress, hepatic steatosis, inflammation, fibrosis.

- ¹ Laboratorio de Investigaciones Biomédicas, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina
- ² Cátedra de Evaluación Nutricional, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina
- ³ Laboratorio de Endocrinología Molecular, CEFYBO/CONICET, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, CABA, Argentina
- ⁴ Cátedra de Fisiología Humana, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario, Santa Fe, Argentina

Contacto del autor: Pablo Arias
E-mail: drpabloarias@hotmail.com
Correspondencia: Boulevard Oroño 893, 7° piso A,
(S2000DSI) Rosario, Santa Fe, Argentina
Tel.: (011) 154-577- 8232
Fecha de trabajo recibido: 18/04/16
Fecha de trabajo aceptado: 29/04/16

Conflicto de intereses: los autores declaran no presentar conflictos de intereses en relación al tema tratado en el presente trabajo de investigación.

INTRODUCCIÓN

El hígado graso no alcohólico (HGNA) es la forma más común de injuria hepática en países desarrollados¹. Se caracteriza por la acumulación excesiva de grasa en el hepatocito (esteatosis macrovesicular), en ausencia de antecedentes de consumo de alcohol en cantidades consideradas hepatotóxicas y de procesos inflamatorios². La esteatohepatitis (EH) se caracteriza por la presencia de esteatosis más cuerpos de Mallory, necrosis y fibrosis; se trata de una entidad de alto riesgo de evolucionar a cirrosis, el estadio más avanzado de la enfermedad². Actualmente la EH ha sido reconocida como la causa más común de cirrosis, y la mortalidad proporcional por causa hepática en este grupo alcanza el 17,5% contra sólo el 2,7% en individuos sin EH o HGNA³. La prevalencia del hepatocarcinoma celular es mayor en pacientes con obesidad y diabetes tipo 2 y correlaciona con la duración de la enfermedad metabólica⁴.

Si bien aún existen muchos interrogantes en cuanto a la etiología de esta complicación, se reconocen como factores causales elementos tanto ambientales como genéticos. La ingesta calórica excesiva, la alimentación rica en grasas y el exceso de carbohidratos simples (sobre todo fructosa) en la dieta han sido utilizados en trabajos experimentales para inducir HGNA⁵. Debe señalarse que la incorporación dietaria de fructosa se ha incrementado considerablemente en las últimas décadas de la mano del consumo de gaseosas, que son endulzadas con jarabes ricos en este monosacárido⁶. La esteatosis hepática, en su forma primaria, reconoce como mecanismo patogénico fundamental (pero no único) a la insulinorresistencia (demostrable en la casi totalidad de los pacientes con este trastorno)⁷.

En cuanto a la patogénesis de la EH, desde hace una década es ampliamente aceptado el modelo

de los dos impactos o "*hits*", a saber: 1) acumulación grasa; 2) inflamación/proliferación⁵. El primero, reversible, se explica por el desbalance entre la oferta y la salida de ácidos grasos libres de los hepatocitos. El segundo impacto se asocia a cambios inflamatorios/proliferativos desencadenados por la infiltración grasa de los hepatocitos y en los que intervienen la disfunción mitocondrial, la generación de estrés oxidativo, la puesta en marcha de programas de defensa celular y la secreción de citoquinas proinflamatorias. Otras formas de esteatosis reconocen exposición a tóxicos ambientales, entre los cuales se encuentran diversos pesticidas⁵.

El progresivo desarrollo de la siembra directa de soja, que utiliza variedades resistentes a los herbicidas, generó un gran incremento en los últimos 20 años del uso del glifosato⁸. Las cifras de utilización anual del mismo en nuestro país pasaron específicamente en la última década de 100.000 litros a 150.000.000 litros⁹. El glifosato es un ácido orgánico débil formado por una molécula de glicina y otra de fosfometilo. Este herbicida produce la inhibición de aminoácidos aromáticos en los vegetales por inactivación de la enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintetasa. Esta enzima no existe en animales y, en consecuencia, la citotoxicidad del glifosato es considerada relativamente baja o inexistente en humanos¹⁰. Sin embargo, la mayoría de los productos comerciales que contiene glifosato está combinada con un surfactante, que ayuda al glifosato a penetrar los tejidos vegetales. Esto confiere a la formulación comercial características toxicológicas diferentes al glifosato solo¹¹. El surfactante más utilizado es la polioxietileno amina (POEA), que le otorga al producto utilizado en el campo mucha mayor toxicidad¹².

Uno de los primeros reportes en relacionar al glifosato con posibles efectos adversos sobre los mamíferos fue el de Hietanen et al.¹³, quienes en

1983 publicaron un reporte donde demostraron alteraciones en la actividad de enzimas hepáticas en ratas expuestas a glifosato durante 14 días. En 1998, Peluso et al. observaron alteraciones dosis dependientes en el ADN del hígado y riñones de ratas expuestas al herbicida Roundup®¹⁴. En el año 2004 un grupo de la Universidad Nacional de San Luis, en nuestro país, publicó un trabajo realizado en ratas Wistar, donde demostró que el glifosato al 1% genera en las ratas expuestas y en sus fetos una excesiva peroxidación lipídica hepática¹⁵, lo que provocaría una alteración severa de los sistemas de defensa antioxidantes. Ese mismo año, investigadores de Brasil publicaron un trabajo donde demostraron, también en ratas, alteraciones hepáticas generadas por la exposición subcrónica al glifosato¹⁶. Con respecto a los mecanismos carcinogénicos, los trabajos experimentales no reflejan un aumento de estos procesos, pero se debe tener en cuenta que la conversión de glifosato a N-nitrososofonometil glicina, potencialmente carcinogénica, requiere de una alimentación rica en nitratos, hecho que no ha sido tenido en cuenta en la mayoría de los estudios de carcinogénesis realizados en roedores¹⁷.

Si bien no existen evidencias unívocas con respecto a una mayor prevalencia de diabetes mellitus (DM) en poblaciones expuestas a herbicidas como el glifosato o similares, trabajos experimentales muestran un impacto de las alteraciones de la generación de especies reactivas del oxígeno sobre la acción de insulina y la secreción de la misma^{18,19}. Estos mecanismos están ligados con la patogénesis de la DM tipo 2, trastorno que afecta en nuestro país a 8-10% de la población adulta^{20,21}, con una prevalencia en franco aumento en la última década. Las alteraciones en la acción de la insulina constituyen el trastorno subyacente al síndrome metabólico o de IR, que combina obesidad visceral, hipertensión y dislipidemia. Este síndrome constituye un factor de riesgo para DM tipo 2, enfermedad cardiovascular, NASH y diversas neoplasias, y su prevalencia en nuestro país supera el 20% de la población adulta²². Estos datos epidemiológicos sugieren fuertemente la posibilidad de existencia del síndrome de IR en pacientes expuestos a agroquímicos a base de glifosato, dada la alta y ubicua utilización de los mismos⁹, asociación no estudiada hasta ahora en cuanto a sus posibles efectos metabólicos y hepatotóxicos.

La administración a ratas de una dieta rica en sacarosa (DRS) por períodos breves (de aproxima-

damente 12 semanas) constituye un modelo de IR con incremento de los depósitos lipídicos y esteatosis hepática sin disminución de la secreción insulínica^{23,24}. Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados nos propusimos evaluar, en ratas con insulinoresistencia inducida por una DRS, si el tratamiento prolongado con un herbicida conteniendo glifosato agravaba el cuadro metabólico que caracteriza al estado de insulinoresistencia, incrementando el estrés oxidativo y las alteraciones histológicas (depósitos lipídicos, cambios inflamatorios) a nivel del tejido hepático.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este estudio experimental se utilizaron Wistar macho adultas alojadas en condiciones estándar (jaulas grupales de 4-6 animales, temperatura 22-24 °C, humedad 50-70%, luces encendidas 7-19 hs, libre acceso a agua de la red y alimento balanceado) en el bioterio de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Litoral, institución cuyo Comité de Ética aprobó el protocolo de estudio. A los tres meses de edad (peso aproximado 300 g) las ratas fueron distribuidas en cuatro grupos:

- Grupo control o C (n=7, bebiendo agua de la red y recibiendo solución fisiológica por vía intraperitoneal -i.p.- tres veces por semana).
- Grupo glifosato o G (n=6, bebiendo agua de la red y recibiendo tres veces por semana una inyección i.p. del herbicida comercial Credit® -Nufarm S.A., Buenos Aires, Argentina- conteniendo 50 mg/kg de glifosato).
- Grupo sacarosa o S (n=6, recibiendo sacarosa al 30% en el agua de bebida y solución fisiológica i.p. tres veces por semana).
- Grupo glifosato + sacarosa o GS (n=8, recibiendo sacarosa al 30% en el agua de bebida y una inyección i.p. del herbicida comercial con 50 mg/kg de glifosato tres veces por semana).

Todos los animales continuaron recibiendo alimento balanceado *ad libitum*. Cada dos semanas se registraron las variaciones ponderales, y tras ocho semanas se tomaron muestras de sangre de la cola (bajo anestesia con pentobarbital) para medir el hematocrito, así como los valores de glucemia, trigliceridemia (Laboratorios Wiener, Rosario, Argentina) e insulinemia (Rat Insulin EIA, Bertin Pharma, Rockwell, MD, EUA) en ayunas. Se estimó el grado de insulinoresistencia utilizando el modelo de homeostasis (HOMA-IR) descrito por

Matthews et al.²⁵. Se empleó, además, el índice HOMA- β para estimar la secreción de insulina²⁵.

Entre la octava y la décima semana de tratamiento se realizó una prueba de tolerancia a la glucosa en tres ratas de cada grupo: tras un ayuno de 8 hs de duración, los animales fueron anestesiados con pentobarbital y recibieron una inyección i.p. de solución glucosada al 10% conteniendo 2 g/kg de glucosa; se obtuvieron muestras de sangre inmediatamente antes y 30, 60, 90 y 120 min después de la administración de la solución glucosada para la medición de glucemia e insulinemia. En la semana 13 los animales fueron sacrificados por intoxicación con CO₂. Se extrajeron tres fragmentos hepáticos de los lóbulos derecho, izquierdo y medio, siendo divididos en muestras de ~0,125 cm³ destinadas a la evaluación histológica (fijación en formalina al 10% en PBS), y en pequeños fragmentos de ~0,03 mm³ que fueron congelados rápidamente sobre hielo seco y almacenados a -80°C para la medición del estrés oxidativo.

Para la evaluación histológica, realizada en forma ciega con respecto a los tratamientos aplicados, los fragmentos fueron incluidos en parafina. Se obtuvieron 3-5 cortes (5 μ m) de cada muestra (tinciones: hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson). Inicialmente se evaluó todo el preparado a 10x. Luego se analizaron 20 campos consecutivos con el objetivo 40x. Se estudiaron los hepatocitos de las tres zonas del acino hepático de Rappaport: periportal, intermedia y perivenosa. Se valoraron las siguientes características histológicas del tejido hepático: hepatocito (relación núcleo citoplasma, cromatina y presencia o no de inclusiones intracitoplasmáticas), espacios periportal y características de la tríada^{26,27}. Posteriormente se evaluó en todos los preparados si presentaban o no:

- Degeneración balonizante y microvesículas lipídicas.
- Dilatación de las venas centrolobulillares.
- Infiltrado inflamatorio en las triadas portales (se consideró positivo si presentaban incremento de la cantidad células inflamatorias en más de 1 de cada tres espacios porta).
- Fibrosis del parénquima hepático (tinción tricrómica de Masson).

La medición del nivel de estrés oxidativo se hizo a través de la cuantificación de lipoperóxidos en homogenatos de las muestras hepáticas utilizando una modificación previamente descrita de la técnica del ácido tiobarbitúrico²⁸.

La evaluación estadística incluyó inicialmente el

estudio de la distribución de los resultados numéricos mediante la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnoff. Todos los datos cuantitativos presentaron una distribución normal por lo cual los resultados fueron analizados en busca de diferencias significativas mediante un ANOVA seguido por las pruebas post-hoc de Dunnett o Tukey. Las diferencias entre proporciones (variables cualitativas) fueron evaluadas mediante pruebas de chi². Una p < 0,05 fue considerada significativa (pruebas de 2 colas).

RESULTADOS

La evaluación ponderal realizada quincenalmente no mostró diferencias significativas entre los cuatro grupos, y tampoco se detectaron diferencias relevantes entre los diferentes grupos experimentales en cuanto a la glucemia o la insulinemia en ayunas o al hematocrito (datos no presentados). En las muestras obtenidas durante la semana 8, los animales de los grupos S y GS, pero no los del grupo G, presentaron valores significativamente más elevados de triglicéridos en relación a los controles (p=0,002; Figura 1). Con respecto a los parámetros de sensibilidad a la insulina y secreción de esta hormona, los animales del lote G y del lote S presentaron cambios no significativos en los índices HOMA-IR y HOMA- β (Figuras 2 y 3). En cambio, como puede observarse en las mismas figuras, los animales del lote GS presentaron diferencias relevantes con respecto a los controles en los índices HOMA-IR (p=0,0132) y HOMA- β (p=0,0102).

El ascenso de los niveles glucémicos 30 min tras la administración de glucosa i.p. fue similar en los cuatro grupos. A los 90-120 min los valores glucémicos retornaron a niveles cercanos a los basales, sin que se detectaran diferencias entre los grupos estudiados (Figura 4A). Las insulinemias medidas tras la carga de glucosa i.p. mostraron valores superiores en los animales tratados con glifosato + sacarosa, sin que las diferencias alcanzaran significación estadística frente a los restantes grupos (Figuras 4B y 4C).

Con respecto al grado de estrés oxidativo medido en homogenatos de tejido hepático, los tratamientos con sacarosa o glifosato en forma aislada incrementaron levemente los valores de TBARS, mientras que la combinación de ambos factores indujo un aumento significativo de este parámetro (Figura 5).

En la evaluación histológica los hígados pertenecientes a los animales del grupo C mostraron:

- Láminas de hepatocitos poliédricos, mononucleados, bien delimitados, con núcleos eucromáticos y citoplasma granular eosinófilo, dispuestas de manera radial con respecto a la vena central, separadas por capilares sinusoidales con eritrocitos en su interior.

- Venas centrales sin infiltrados periféricos y de tamaño conservado.

- Tríadas portales con sus tres componentes y muy escaso tejido conectivo rodeándolos, con hepatocitos periféricos sin particularidades.

Las alteraciones histopatológicas encontradas en los grupos tratados fueron:

1) Hepatocitos con microvesículas lipídicas y signos sugestivos de tumefacción celular hepatocitaria en los animales de los grupos G y GS ($p=0,0308$ y $p=0,0046$ versus grupo C respectivamente; Tabla 1).

2) Infiltrado inflamatorio periportal de grado leve y moderado, presentando todos los grupos tratados diferencias significativas con el grupo control ($p=0,0064$ versus C; Tabla 2).

3) Un incremento significativo del grado de fibrosis (estadio 1 o superior según el score de Knodell) en los animales pertenecientes a los grupos G y GS ($p=0,0075$ y $p=0,0046$ respectivamente frente al grupo C; Tabla 3).

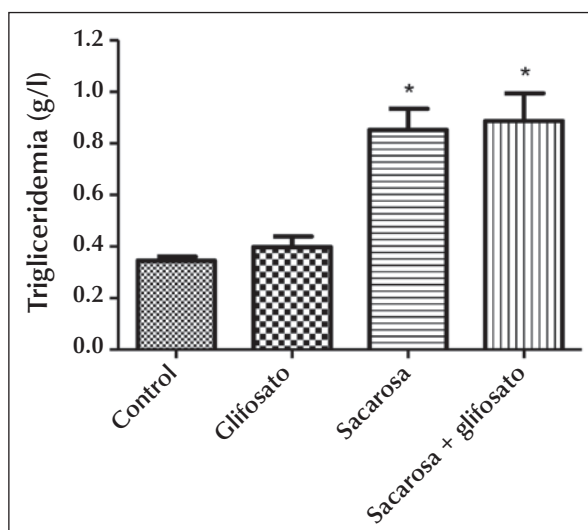


Figura 1: Niveles séricos de triglicéridos medidos en muestras de sangre de la cola obtenidas tras 12 hs de ayuno a las 8 semanas de tratamiento con sacarosa (diluida al 30% en el agua de bebida, $n=6$), glifosato (una inyección i.p. del herbicida Credit® conteniendo 50 mg/kg de glifosato, tres veces por semana, $n=6$), sacarosa + glifosato ($n=8$) o vehículo i.p. y agua corriente (controles, $n=7$). Los datos se presentan como media aritmética + error estándar de la media (* $p=0,002$ vs controles y glifosato, ANOVA de una vía y prueba de Tukey).

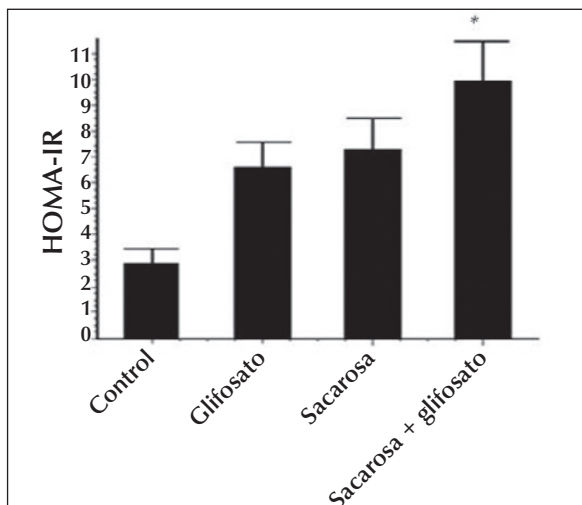


Figura 2: Índice HOMA-IR calculado a partir de la glucemia y la insulinemia medidas en muestras de sangre de la cola obtenidas tras 12 hs de ayuno a las 8 semanas de tratamiento con sacarosa (diluida al 30% en el agua de bebida, $n=6$), glifosato (una inyección i.p. del herbicida Credit® conteniendo 50 mg/kg de glifosato, tres veces por semana, $n=6$), sacarosa + glifosato ($n=8$) o vehículo i.p. y agua corriente (controles, $n=7$). Los datos se presentan como media aritmética + error estándar de la media (* $p=0,0132$ vs controles; ANOVA de una vía y prueba de Dunnett).

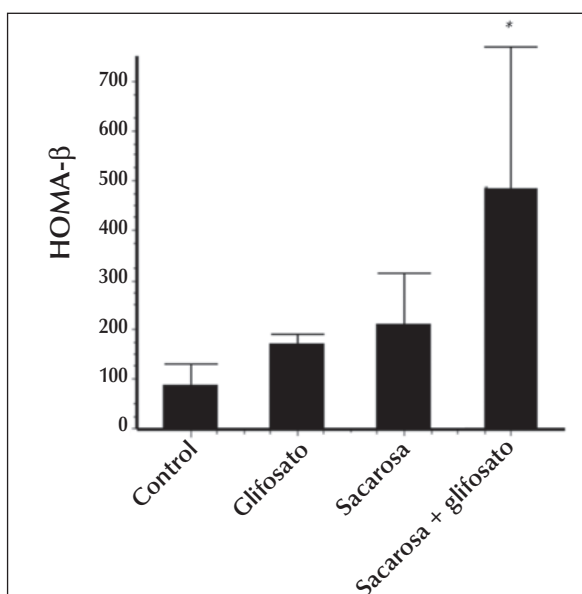
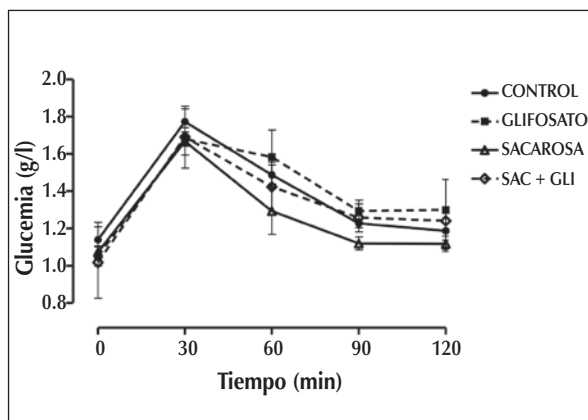
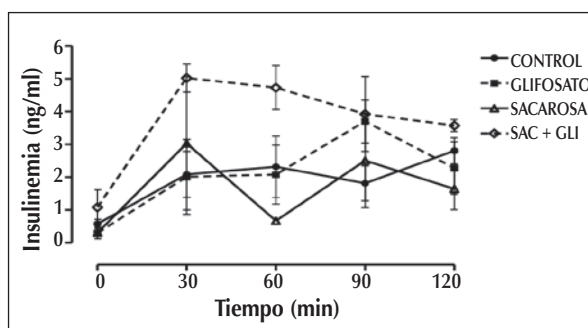


Figura 3: Índice HOMA-β calculado a partir de la glucemia y la insulinemia medidas en muestras de sangre de la cola obtenidas tras 12 hs de ayuno a las 8 semanas de tratamiento con sacarosa (diluida al 30% en el agua de bebida, $n=6$), glifosato (una inyección i.p. del herbicida Credit® conteniendo 50 mg/kg de glifosato, tres veces por semana, $n=6$), sacarosa + glifosato ($n=8$) o vehículo i.p. y agua corriente (controles, $n=7$). Los datos se presentan como media aritmética + error estándar de la media (* $p=0,0102$ vs controles; ANOVA de una vía y prueba de Dunnett).

A)



B)



C)

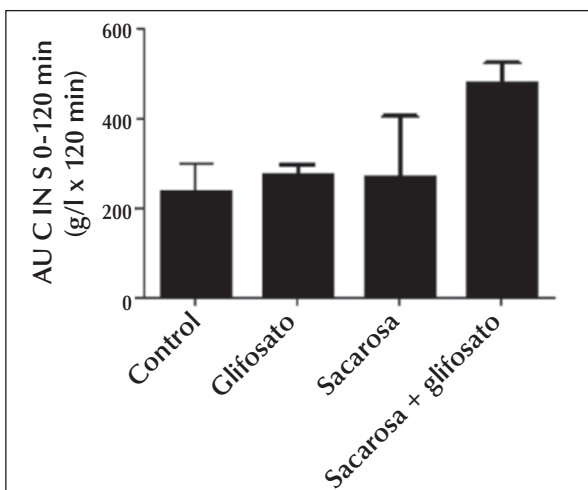


Figura 4: Niveles de glucemia (A) e insulinemia (B) medidos en muestras de sangre de la cola obtenidas durante una prueba de tolerancia a la glucosa (2 g/kg de dextrosa intraperitoneal) realizada tras 8-10 semanas de tratamiento con sacarosa (diluida al 30% en el agua de bebida, n=6), glifosato (una inyección i.p. del herbicida Credit® conteniendo 50 mg/kg de glifosato, tres veces por semana, n=6), sacarosa + glifosato (n=8) o vehículo i.p. y agua corriente (controles, n=7) (C). Área bajo la curva de insulinemia. Los datos se presentan como media aritmética ± error estándar de la media (p=N.S.).

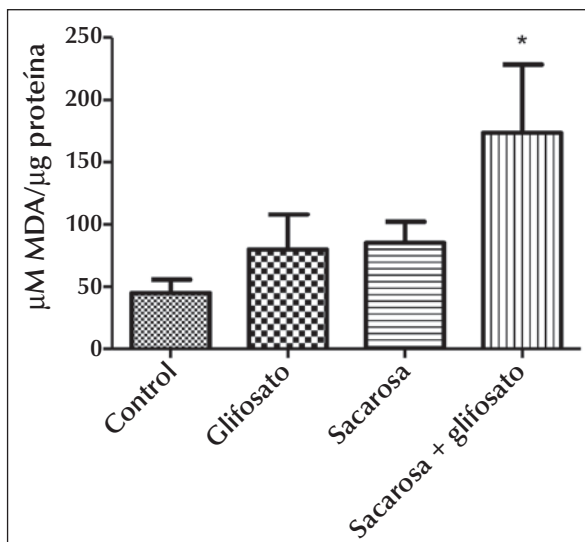


Figura 5: Concentración de lipoperóxidos (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico o TBARS, expresadas en μM de malondialdehído o MDA por μg de proteína) en homogenatos de tejido hepático obtenido tras la necropsia realizada a las 13 semanas de tratamiento con sacarosa (diluida al 30% en el agua de bebida, n=6), glifosato (una inyección i.p. del herbicida Credit® conteniendo 50 mg/kg de glifosato, tres veces por semana, n=6), sacarosa + glifosato (n=8) o vehículo i.p. y agua corriente (controles, n=7). Los datos se presentan como media aritmética + error estándar de la media (*p=0,0482 vs controles; ANOVA de una vía y prueba de Dunnett).

Presencia de tumefacción celular y/o microvesículas ("lipid ghosts")	Controles (n= 7)	Glifosato (n= 6)	Sacarosa (n= 6)	Glifosato + sacarosa (n= 8)
No	6	1	2	1
Sí	1	5*	4	7*

$\chi^2=9,139$; *p<0,05 vs controles.

Tabla 1: Número de animales de los distintos grupos que presentó alteraciones celulares sugerentes de acumulación lipídica en cortes de tejido hepático (tinción: hematoxilina + eosina) obtenidas tras la necropsia realizada a las 13 semanas de tratamiento con sacarosa (diluida al 30% en el agua de bebida), glifosato (una inyección i.p. del herbicida Credit® conteniendo 50 mg/kg de glifosato, tres veces por semana), sacarosa + glifosato o vehículo i.p. y agua corriente (controles).

Presencia de infiltrado periportal leve a moderado	Controles (n= 7)	Glifosato (n= 6)	Sacarosa (n= 6)	Glifosato + sacarosa (n= 8)
No	6	1	1	1
Sí	1	5*	5*	7*

$\chi^2=11,71$; * $p<0,01$ vs controles.

Tabla 2: Número de animales de los distintos grupos que presentó infiltrado inflamatorio periportal leve a moderado en cortes de tejido hepático (tinción: hematoxilina + eosina) obtenido tras la necropsia realizada a las 13 semanas de tratamiento con sacarosa (diluida al 30% en el agua de bebida), glifosato (una inyección i.p. del herbicida Credit® conteniendo 50 mg/kg de glifosato, tres veces por semana), sacarosa + glifosato o vehículo i.p. y agua corriente (controles).

Presencia de fibrosis en el parénquima hepático	Controles (n= 7)	Glifosato (n= 6)	Sacarosa (n= 6)	Glifosato + sacarosa (n= 8)
No	6	1	2	1
Sí	1	6*	4	7*

$\chi^2=10,91$; * $p<0,02$ vs controles.

Tabla 3: Número de animales de los distintos grupos que presentó fibrosis en cortes de tejido hepático (tinción tricrómica de Masson) obtenido tras la necropsia realizada a las 13 semanas de tratamiento con sacarosa (diluida al 30% en el agua de bebida), glifosato (una inyección i.p. del herbicida Credit® conteniendo 50 mg/kg de glifosato, tres veces por semana), sacarosa + glifosato o vehículo i.p. y agua corriente (controles).

DISCUSIÓN

El consumo de una dieta rica en sacarosa, asociado a la administración intraperitoneal de un herbicida conteniendo glifosato (150 mg/kg semanales del compuesto activo), indujo alteraciones metabólicas características del estado de insulinoresistencia (IR), con un incremento del estrés oxidativo a nivel hepático. Si bien estas alteraciones se manifestaron parcialmente en los lotes de animales tratados con sacarosa o glifosato en forma exclusiva, la combinación de ambos factores (doble injuria) generó cambios metabólicos más marcados que los dos tratamientos por separado, alcanzando estas diferencias significación estadística frente a los controles. En respuesta a la insulinoresistencia incrementada por la administración de ambos tratamientos en forma conjunta se observó un aumento significativo de la secreción de insulina estimada por el índice

HOMA- β . Demostramos también la toxicidad hepática del herbicida a base de glifosato a la dosis utilizada en estos experimentos, que se manifiesta en los grupos G y GS por tumefacción celular, presencia de microvesículas correspondientes a depósitos lipídicos (*lipid ghosts*) y por un incremento del grado de fibrosis. Los fenómenos inflamatorios, sugeridos por la presencia de infiltrados periportales, fueron comunes a los tres grupos de tratamiento.

Existen controversias marcadas con respecto a la toxicidad de los herbicidas en base a glifosato (GBH) y a su impacto ambiental. Desde su introducción en la década de 1970 hasta el comienzo de este milenio estos productos fueron considerados como de muy baja o nula toxicidad²⁹. Sin embargo, la preocupación con respecto a posibles daños ha ido en aumento de la mano del masivo incremento en su uso: se estima que, en los Estados Unidos, la aplicación de estos productos creció más de 30 veces entre 1997 y 2014 (de 2,72-3,62 x 10⁶ kg a más de 108,8 x 10⁶ kg)^{30,31}. En nuestro país su uso se incrementó durante la última década en unas 150 veces⁹. La aparente inocuidad y seguridad ligada al uso del glifosato, por su baja toxicidad y escasa persistencia tras la aplicación, ha sido rebatida por numerosos estudios que demuestran, entre otros aspectos, su presencia en granos y en productos elaborados, por ejemplo, pan³² y, sobre todo y en altas concentraciones, en porotos de soja provenientes, entre otros lugares, de nuestro país³³. En esta última evaluación, realizada en 2013 en muestras de porotos de soja obtenidas en la provincia de Salta, se encontraron restos de glifosato en una concentración de hasta 100 mg/kg, varias veces superior al límite permitido. Al presentar los productos agrícolas grados diversos (inclusive muy elevados) de contaminación, el problema de la exposición no se limita a las zonas en las que se realiza la fumigación con estos productos, y esto se explica por la demostración de glifosato en líquidos biológicos (sangre, orina) de personas (incluso embarazadas) que viven en regiones urbanas³⁴. Por otro lado, también se encuentran residuos de esta sustancia en la orina de vacas criadas en regiones en las cuales se utilizan estos productos³⁵, por lo que la posibilidad de incorporación del glifosato al organismo humano no se limita a la ingesta de productos vegetales.

Una de las razones por las que el glifosato fue considerado como de muy baja toxicidad para el reino animal es su mecanismo de acción, la inhibición de una enzima presente únicamente en las plantas¹⁰.

Sin embargo, en las últimas dos décadas se han descrito numerosos efectos tóxicos en vertebrados e invertebrados, y que incluyen, entre otras alteraciones, disrupción endocrina, embriopatías y daño tisular (hepático y renal fundamentalmente)³⁶. Más alarmante aún es la reciente declaración, por parte de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer de la OMS, del glifosato como una sustancia "probablemente carcinogénica en humanos"³⁷.

Con respecto a los efectos de los GBH sobre citoquímica, estructura y función hepáticas, los informes sobre alteraciones asociadas a la exposición a distintas dosis de estos productos se han sucedido desde comienzos de 1980¹³⁻¹⁶. Benedetti et al., en 2004, informaron sobre incrementos en los niveles circulantes de aminotransferasas (sugiriendo daño hepatocelular), aumento del número de células de Kupffer en los sinusoides hepáticos y presencia de fibrosis parenquimatosa tras la exposición subcrónica de ratas Wistar a un GBH¹⁶. Estos resultados, obtenidos con dosis tan bajas como de 4,87 mg/kg de glifosato cada dos días, podrían explicar por qué, en nuestro estudio, los animales del grupo GS no presentaron alteraciones histológicas más relevantes que los del grupo G a pesar de haber resultado la adición de ambos tratamientos en un mayor grado de insulinoresistencia y de generación de estrés oxidativo. Se puede hipotetizar, incluso, que otros mecanismos además de la generación de estrés oxidativo intervienen en la producción del daño hepático registrado tras la exposición a las dosis del GBH utilizadas en nuestro estudio. Se han mencionado, a modo de ejemplo, la activación de la vía apoptótica asociada a calpaína³⁸ o la generación de alteraciones mitocondriales, con aumento de la permeabilidad de la membrana y desacoplamiento de la fosforilación oxidativa³⁹.

A diferencia de lo que ocurre con algunos pesticidas clorados (aldrin, clordano, heptacloro y diclorvos, por citar algunos ejemplos) y con otros contaminantes orgánicos persistentes como las dioxinas y los bifenilos policlorados, estudios epidemiológicos como el realizado por Montgomery et al.⁴⁰ no muestran un incremento de la prevalencia de diabetes en trabajadores rurales (fumigadores) expuestos a glifosato. En forma similar, Mink et al.⁴¹ no encontraron, en una revisión sistemática de los estudios relacionando la exposición a glifosato con el riesgo de sufrir enfermedades no oncológicas, una asociación entre este herbicida y una prevalencia incrementada de diabetes.

Estos autores mencionan como una dificultad inherente a los estudios incluidos en la revisión la imposibilidad de establecer en forma fehaciente el grado de exposición de los individuos, lo que atenta sin duda alguna contra la calidad de los resultados. Una segunda fuente de error está dada por la multiplicidad de compuestos a los que los fumigadores y usuarios en general están expuestos. Ambos factores impiden establecer una relación causal entre el grado de exposición (variable en cuanto a magnitud y especificidad) y la magnitud de los fenómenos de toxicidad, incluyendo la aparición de diabetes. No existen, en nuestro conocimiento, publicaciones que hayan evaluado el efecto del glifosato por sí solo, o bien de algún GBH, sobre la generación de diabetes en animales de experimentación, así como tampoco sobre la sensibilidad a la insulina *in vivo* o *in vitro*.

Dado que el diseño experimental del presente trabajo no incluyó la evaluación de posibles mecanismos de generación de insulinoresistencia, no podemos realizar más que especulaciones con respecto a los resultados observados. Se puede mencionar, por ejemplo, la puesta en marcha de un estado proinflamatorio mediado por el incremento de radicales libres de oxígeno que, como ha sido revisado previamente¹⁸, puede abocar en la generación de insulinoresistencia. Distintos autores han demostrado activación de mecanismos de inflamación, tales como incremento de los niveles de TNF- α ⁴² o de la producción de prostaglandinas E2 y F2 α ⁴³ tras la administración de GBHs. La presencia incrementada de células inflamatorias señalada por nosotros y por Benedetti et al.¹⁶ es también una clara demostración de la activación de procesos inflamatorios a nivel hepático. Otro mecanismo potencialmente involucrado en el incremento de la insulinoresistencia observado tras la exposición a sacarosa y GBH en forma conjunta sería la alteración de la flora bacteriana inducida por el fitofármaco. En este sentido se ha descrito que el glifosato genera alteraciones *in vitro* de la microbiota en ganado bovino⁴⁴ y en aves de corral⁴⁵. Finalmente, una publicación reciente de Martini et al.⁴⁶ señala que, en adipocitos en cultivo, el glifosato inhibe la activación de los receptores PPAR γ , efecto que podría contribuir a la generación de insulinoresistencia.

Además de la ausencia de evaluaciones mecánicas y de una titulación de la dosis requerida para alcanzar los efectos observados, otra debilidad de

nuestro estudio puede residir en el hecho de que no se usó glifosato en forma pura, o de alguna de sus sales, sino en forma de un compuesto herbicida que lo incluía en su formulación junto a otros elementos, como el surfactante polioxietileno amina (POEA) y excipientes no declarados en la hoja de seguridad del producto⁴⁷. Resulta difícil separar la toxicidad del glifosato de aquella correspondiente a la formulación utilizada, así como también determinar la contribución del surfactante presente en la misma a los efectos observados. En general, existe consenso en que los herbicidas que asocian POEA al glifosato son más tóxicos que el glifosato en forma aislada^{42,48-50}. Existen, por otro lado, estudios experimentales que sugieren que la POEA tiene toxicidad por sí sola⁵¹. El principal metabolito del glifosato, ácido aminometilfosfónico o AMPA, tiene además efectos tóxicos demostrados en distintos sistemas celulares⁵². Finalmente la toxicidad podría presentar, de acuerdo a Caglar y Kolankaya, un dimorfismo sexual⁵³. Estos resultados resaltan aún más la complejidad del problema planteado por la utilización de grandes cantidades de GBHs en base a la falsa premisa de la baja toxicidad de su componente activo, pero sin tener en cuenta que se trata de compuestos con múltiples ingredientes, cada uno ligado quizás a efectos tóxicos independientes o aditivos.

En conclusión, nuestros resultados muestran que la administración de un herbicida conteniendo glifosato en dosis discretamente elevadas, teniendo en cuenta los niveles de esta sustancia demostrados en productos agropecuarios tratados con estos fitoquímicos, pero muy inferiores a las consideradas tóxicas por organismos de protección ambiental, induce *per se* cambios histológicos hepáticos (esteatosis, inflamación y fibrosis, disrupción de la histoarquitectura normal) y potencia la insulinoresistencia y el estrés oxidativo generados por la administración concomitante de una dieta rica en sacarosa.

Financiamiento del estudio

El presente estudio fue subsidiado por la Universidad Nacional de Litoral en el marco del Programa de Promoción y Apoyo a la Investigación en Temas de Interés Institucional (PAITI, Resolución C.S. N° 653/2011).

BIBLIOGRAFÍA

1. Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Gastroenterology* 2006; 40 (3) Suppl 1:S5-10.
2. Angulo P. GI Epidemiology: nonalcoholic fatty liver disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2007; 25; 883-889.

3. Rafiq N, Bai Ch, et al. Long-term follow up of patients with nonalcoholic fatty liver. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2009; 7; 234-238.
4. El-Serag HB, Tran T, Everhart JE. Diabetes increases the risk of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004; 126: 460-8.
5. Anderson N, Borlak J. Molecular mechanisms and therapeutic targets in steatosis and steatohepatitis. *Pharmacol. Rev.* 2008; 60:311-357.
6. Bray GA, Nielsen SJ, Popkin BM. Consumption of high-fructose corn syrup in beverages may play a role in the epidemic of obesity. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004; 79:537-43.
7. Angelico F, Del Ben M, Conti R, et al. Insulin resistance, the metabolic syndrome, and nonalcoholic fatty liver disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005; 90:1578-1582.
8. Pengue W. Producción agroexportadora e inseguridad alimentaria: el caso de la soja argentina. *Rev. Iber. Econ. Ecol.* 2004; Vol. 1: 46-55.
9. Trigo E, Cap E. Diez años de cultivos genéticamente modificados en la agricultura argentina; 2006. <http://www.argenbio.org/h/biblioteca/index.php> (Acceso: 24/03/2016)
10. Monroy C, Cortez A, Sicard D, Restrepo H. Cytotoxicity and genotoxicity of human cells exposed in vitro to glyphosate. *Biomedica* 2005; 25:335-345.
11. Adam A, Marzuki A, Arman H, Asís M. The oral and intratracheal toxicities of Roundup and its components to rats. *Vet. Hum. Toxicology.* 1997; 39 (3):147-151.
12. Sawada Y, Nagai Y, Ueyama M. Probable toxicity of the surface active agent in commercial herbicide containing glyphosate. *Lancet* 1988; 6(1):299-303.
13. Hietanen E, Linnainmaa K, Vainio H. Effects of phenoxy-herbicides and glyphosate on the hepatic and intestinal biotransformation activities in the rat. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh).* 1983; 53:103-112.
14. Peluso M, Munnia A, Bolognesi C, Parodi S. 32P-Postlabeling detection of DNA adducts in mice treated with the herbicide Roundup. *Environ. Mol. Mutagen.* 1998; 31:55-59.
15. Beuret C, Zirulnik F, Gimenez S. Effect of the herbicide glyphosate on liver lipoperoxidation in pregnant rats and their fetuses. *Reproduct. Toxicol.* 2005; 19:501-504.
16. Benedetti A, Vituri L, Trentin A, Domingues M, Alvarez-Silva M. The effects of sub-chronic exposure of Wistar rats to the herbicide Glyphosate-Biocarb. *Toxicol. Lett* 2004; 153:227-32.
17. Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO). Pesticide residues in food 1986. Joint Meeting on Pesticide Residues (JMPPR), Rome, Italy. FAO Plant Production and Protection Paper 78/2, p. 63 (1987).
18. Evans JL, Maddux BA, Goldfine ID. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxid. Redox. Signal.* 2005; 7:1040-52.
19. Sakai K, Matsumoto K, Nishikawa T, Suefuji, et al. Mitochondrial reactive oxygen species reduce insulin secretion by pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res. Commun.* 2003; 300:216-22.
20. Lapertosa S, González C, Benítez J, Céspedes MS, Bordón C, de Loredó L, Santoro S, de Sereday M. Prevalencia de Diabetes Mellitus tipo 2 en población adulta de Gobernador Virasoro, Provincia de Corrientes. *Revista ALAD* 2009; 17: 1-18.
21. Ministerio de Salud de la Nación. Tercera Encuesta Nacional de Factores de Riesgo para Enfermedades No Transmisibles. http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000544cnt-2015_09_04_encuestanacional_factores_riesgo.pdf (acceso 24/03/2016).

22. Lúquez H, De Loredó L, Madoery RJ, Luquez H (h), Senestrari D. Síndrome metabólico: prevalencia en dos comunidades de Córdoba, Argentina, de acuerdo con definiciones ATP-III y OMS. *Rev. Fed. Arg. de Cardiología* 2005; 34: 80-95.
23. Ferreira M del R, Lombardo YB, Chicco A. β -Cell adaptation/dysfunction in an animal model of dyslipidemia and insulin resistance induced by the chronic administration of a sucrose-rich diet. *Islets* 2010; 2:367-73.
24. Zago V, Lucero D, Macri EV, et al. Circulating very-low-density lipoprotein characteristics resulting from fatty liver in an insulin resistance rat model. *Ann Nutr. Metab.* 2010; 56(3):198-206.
25. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412-9.
26. Trujillo E, Vásquez B, del Sol M. Características estereológicas del hígado de rata (*Rattus norvegicus*) sometidas a menopausia inducida por ovariectomía. *International Journal of Morphology*. Dic. 2011. Vol. 29 N° 4.
27. Carrara Moreti DL, Lopes RA, Vinha D. Efectos del albendazol en el hígado de feto de rata. *Estudios morfológicos y morfométricos*. *Int. J. Morphol.* 2005. 23(2):111-120.
28. Pomeranic Y, Grion N, Gadda L, Pannunzio V, Podesta EJ, Cymering CB. Adrenocorticotropin induces heme oxygenase-1 expression in adrenal cells. *J. Endocrinol.* (2004) 180: 113-24.
29. Williams GM, Kroes R, Munro IC. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2000 Apr; 31(2 Pt 1):117-65.
30. Aspelin A, Grube AH. Pesticide industry sales and usage: 1996 and 1997 market estimates, Office of Pesticide Programs, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.; 1999. <http://1.usa.gov/20qXcOb>. Acceso: 24/03/2016
31. Benbrook C. Trends in the use of glyphosate herbicide in the U.S. and globally. *Environmental Sciences Europe*. 2015; 28(3). <http://dx.doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>. Acceso: 24/03/2016.
32. UK Department for Environment, Food & Rural Affairs. PRiF: Monitoring program. <http://www.food.gov.uk/business-industry/farmingfood/pesticides>. Acceso: 24/04/2016.
33. Test Biotech. High levels of residues from spraying with glyphosate found in soybeans in Argentina. 2013. <http://www.testbiotech.org/node/926>. Acceso: 24/03/2016.
34. Aris A, Leblanc S. Maternal and fetal exposure to pesticides associated to genetically modified foods in Eastern Townships of Quebec, Canada. *Reprod. Toxicol.* 2011, 31:528-33.
35. Krüger M, Schrödl W, Neuhaus J, Shehata AA. Field investigations of glyphosate in urine of danish dairy cows. *J. Environ Anal Toxicol.* (2013) 3: 186. doi:10.4172/2161-0525.1000186.
36. Myers JP, Antoniou MN, Blumberg B, Carroll L, Colborn T, Everett LG, Hansen M, Landrigan PJ, Lanphear BP, Mesnage R, Vandenberg LN, Vom Saal FS, Welshons WV, Benbrook CM. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environ Health.* 2016; 15:19.
37. Guyton KZ, Loomis D, Grosse Y, El Ghissassi F, Benbrahim-Talaa L, Guha N, Scoccianti C, Mattock H, Straif K, International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group ILC. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *Lancet Oncol.* 2015; 16:490-491.
38. Astiz M, Alaniz MT, Marra CA. Effect of pesticides on cell survival in liver and brain rat tissues. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2009; 72: 2025-2032.
39. Peixoto F. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Chemosphere* 2005; 61: 1115-1122.
40. Montgomery MP, Kamel F, Saldana TM, Alavanja MCR, Sandler DP. Incident diabetes and pesticide exposure among licensed pesticide applicators: Agricultural Health Study, 1993-2003. *Am. J. Epidemiol.* 2008; 167:1235-1246.
41. Mink PJ, Mandel JS, Lundin J, Scurman BK. Epidemiologic studies of glyphosate and non-cancer health outcomes: a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2011; 61:172-184.
42. El-Shenawy NS. Oxidative stress responses of rats exposed to Roundup and its active ingredient glyphosate. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2009; 28: 379-385.
43. Astiz M, Hurtado de Catalfo GE, García MN, Galletti SM, Errecalde AL, de Alaniz MJT, Marra CA. Pesticide-induced decrease in rat testicular steroidogenesis is differentially prevented by li-poate and tocopherol. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2013; 91:129-138.
44. Ackermann W, Coenen M, Schrödl W, Shehata AA, Krüger M. The influence of glyphosate on the microbiota and production of botulinum neurotoxin during ruminal fermentation. *Curr. Microbiol.* 2015; 70:374-82.
45. Shehata AA, Schrödl W, Aldin AA, Hafez HM, Krüger M. The effect of glyphosate on potential pathogens and beneficial members of poultry microbiota in vitro. *Curr. Microbiol.* 2013; 66:350-8.
46. Martini CN, Gabrielli M, Brandani JN, Vila M del C. Glyphosate inhibits PPAR gamma induction and differentiation of preadipocytes and is able to induce oxidative stress. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2016; Apr 4. doi: 10.1002/jbt.21804. [Epub previo a la impresión]
47. Nufarm. <http://www.nufarm.com/assets/17054/1/CREDIT480SL.pdf>. Acceso: 24/03/2016.
48. Kim YH, Hong JR, Gil HW, Song HY, Hong SY. Mixtures of glyphosate and surfactant TN20 accelerate cell death via mitochondrial damage-induced apoptosis and necrosis. *Toxicol. In Vitro* 2013; 27: 191-197.
49. Defarge N, Mesnage R, Gress S, Seralini GE. Letter to the editor: developmental and reproductive outcomes of roundup and glyphosate in humans and animals. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews* 2012; 15: 433-440.
50. Chaufan G, Coalova I, Ríos de Molina M del C. Glyphosate commercial formulation causes cytotoxicity, oxidative effects, and apoptosis on human cells: differences with its active ingredient. *Int. J. Toxicol.* 2014; 33: 29-38.
51. Defarge N, Takács E, Lozano VL, Mesnage R, Spiroux-Vendômois J, Seralini GE, Székács A. Co-formulants in glyphosate-based herbicides disrupt aromatase activity in cells below toxic levels. *Int. J. Environ Res. Public Health* 2016; 13, 264; doi:10.3390/ijer-ph13030264.
52. Mañas F, Peralta L, Raviolo J, García Ovando H, Weyers A, Ugnia L, González Cid M, Larripa I, Gorla N. Genotoxicity of AMPA, the environmental metabolite of glyphosate, assessed by the Comet assay and cytogenetic tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2009; 72: 834-7.
53. Caglar S, Kolankaya D. The effect of sub-acute and sub-chronic exposure of rats to the glyphosate-based herbicide Roundup. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2008; 25: 57-62.