

32. Salud Humana

Neurotoxicidad del glifosato sobre la maduración neuronal. Estudios celulares, bioquímicos y comportamentales en ratas.

seba_14_8@hotmail.com; srosso@fbioyf.unr.edu.ar;

Laboratorio de Toxicología Experimental, CONICET.

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario

Resumen

El correcto funcionamiento del cerebro se basa en la precisa conectividad de los circuitos neuronales. Actualmente existen evidencias que demuestran la alta vulnerabilidad del sistema nervioso a contaminantes ambientales. En este sentido, el uso masivo de plaguicidas constituye una amenaza de alto riesgo para la salud humana. Basados en estas evidencias y antecedentes de nuestro laboratorio nos propusimos estudiar los efectos neurotóxicos del glifosato durante estadios maduros del desarrollo neuronal.

Para evaluar la toxicidad inducida por la exposición “*in vivo*” al herbicida se trataron ratas durante el período de maduración del sistema nervioso y sinaptogénesis. Se realizaron pruebas neurocomportamentales, y luego, se analizó el nivel de expresión de marcadores sinápticos a través de pruebas bioquímicas. Además, por medio de ensayos en neuronas en cultivo y microscopía, se estudió el efecto del herbicida sobre la formación y maduración de estructuras sinápticas especializadas.

Los resultados evidenciaron que las ratas expuestas a glifosato presentaron signos claros de neurotoxicidad, tanto en los procesos de aprendizaje y memoria, como en la expresión de marcadores sinápticos. Por otra parte, los estudios en neuronas en cultivo mostraron una disminución en la densidad y maduración de estructuras especializadas del aparato sináptico.

Estos hallazgos sugieren que la exposición a dosis sub-letales de glifosato afectaría la maduración y funcionalidad del sistema nervioso.

Palabras clave: Neurotoxicidad, Glifosato, Sinapsis, Herbicida.

Introducción

El correcto funcionamiento del cerebro se basa principalmente en la precisa conectividad de los circuitos neuronales. Una neurona en estadio maduro muestra una clara arquitectura caracterizada por un axón largo, distalmente ramificado, el cual permite la transmisión de señales y un árbol dendrítico altamente complejo que se halla especializado en recibir e integrar la información (Jan y Jan, 2003; McAllister, Katz y Lo, 1999). El crecimiento y maduración de espinas dendríticas, proyecciones ricas en actina que se encargan principalmente de recibir señales excitatorias, son cruciales para el ensamblaje de circuitos neuronales funcionales (Stamatakou et al., 2013).

Con respecto a esto existen día a día más evidencias acerca de la vulnerabilidad del sistema nervioso al efecto de agentes exógenos, a los que el ser humano se halla expuesto, muchas veces en forma crónica, a través del medio ambiente, la alimentación o por su propia actividad laboral. Particularmente, el masivo y no controlado uso de plaguicidas en nuestro país constituye una amenaza ambiental de alto riesgo para la salud humana. En Argentina existe un amplio espectro de herbicidas, sin embargo el glifosato (ingrediente activo del herbicida Round up) se ha convertido en uno de los más utilizados debido a la producción de cultivos

genéticamente modificados. El glifosato es un ácido, pero es usado como sal isopropilamina de glifosato. Las formulaciones comerciales contienen, además del principio activo, adyuvantes que facilitan la penetración a los tejidos de la planta y exacerbarían su potencial tóxico. Si bien este herbicida ha sido clasificado como inocuo, en la actualidad surgen cada vez más evidencias que demuestran los efectos adversos que alertan sobre la salud del ser humano. Diversos estudios muestran su potencial toxicidad a nivel endócrino, reproductivo y sobre el ciclo celular (E. Dallegrave et al. 2003 y 2007; Gasnier et al., 2009; Marc, Mulner-Lorillon y Belle, 2004). Sin embargo, existe escasa información acerca de los efectos tóxicos sobre el sistema nervioso. En este contexto, algunos trabajos informan sobre distintos cambios comportamentales vinculados con la exposición al herbicida que podrían estar asociados a modificaciones en los niveles de distintos neurotransmisores (Hernández-Plata et al., 2015; Ait Bali, Ba-Mhamed y Bennis, 2017). Sin embargo aún no se conocen los aspectos celulares y moleculares que subyacen estas alteraciones.

En el presente trabajo mostraremos algunos de los efectos neurotóxicos que produce el glifosato sobre el sistema nervioso central de mamíferos e intentaremos comenzar a dilucidar

cuales son los mecanismos por los que se generan estas alteraciones.

Objetivos

- a) Evaluar la toxicidad inducida por la exposición "in vivo" a glifosato sobre la funcionalidad del sistema nervioso.
- b) Examinar si la formación y complejidad de las espinas dendríticas, y el ensamblaje de las terminales pre- y post-sinápticas son afectadas por la exposición neuronal al herbicida glifosato.

Materiales y Métodos

Exposición in vivo a glifosato y estudios neurocomportamentales.

Ratas de origen wistar fueron criadas en un ambiente controlado de temperatura (23 °C), bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas y con libre acceso al agua y comida. Todos los procedimientos fueron realizados siguiendo protocolos aprobados por el Manual de Cuidado y

Uso de Animales de Laboratorio del National Institute of Health (NIH). Los mismos fueron corroborados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas de la Universidad Nacional de Rosario.

Para el desarrollo experimental se determinaron 3 grupos de animales, uno control y los otros dos basados en distintas dosis del herbicida (35 mg/Kg y 70 mg/Kg, cada 48 horas vía subcutánea). Cada animal recibió inyecciones día por medio durante 3 semanas de solución de buffer fosfato salino (PBS, vehículo) o glifosato según las dosis antes mencionadas (Figura 1). El tratamiento se llevó a cabo desde el día postnatal (PND) 7 hasta PND 27, periodo crítico de la maduración neuronal y sinaptogénesis en ratas (Semple et al., 2014).

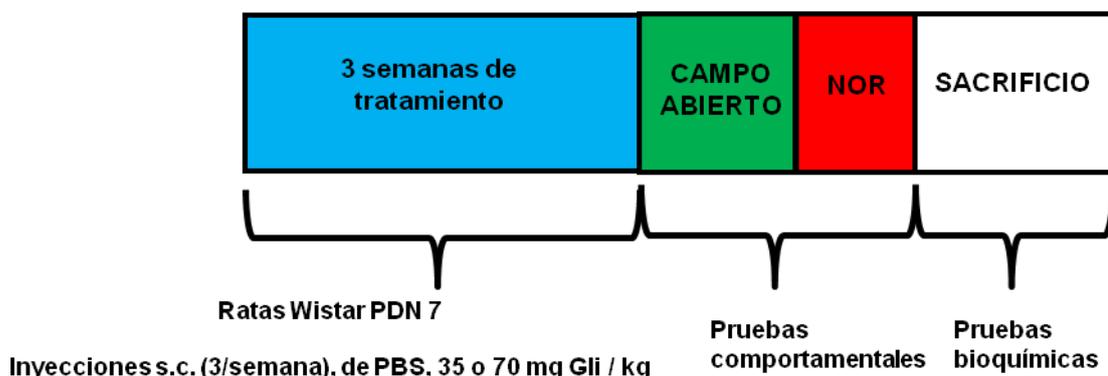


Figura 1. *Diseño experimental de la exposición repetida a glifosato.* NOR: Novel Object Recognition; PND: día post natal; s.c.: subcutánea; Gli: glifosato

Para estudiar la actividad locomotora de los animales se utilizó el test denominado campo abierto. Este ensayo es usado como prueba de elección para determinar los niveles generales de actividad y los hábitos exploratorios de roedores con desordenes del sistema nervioso central (Pacchioni et al., 2009). El mismo se lleva a cabo en una caja de acrílico colocada dentro de una estructura de aluminio que contiene 8 pares de haces infrarrojos localizados a 3 centímetros del piso. El animal es colocado en la arena y se le permite moverse libremente por la misma durante 30 minutos. La interrupción de los haces de luz es registrada automáticamente por medio de una computadora que está conectada a la caja a través de un analizador. Luego, con la utilización de un software adecuado, fue posible estimar la actividad total de los animales, que resulta de la sumatoria de la actividad ambulatoria y la estereotipia. Esta prueba se realizó el PND 28.

El estudio de la capacidad de aprendizaje y memoria se llevó a cabo a

través del test denominado Novel Object Recognition (NOR). Esta prueba se basa en la tendencia espontanea de los roedores de explorar durante más tiempo un objeto nuevo que uno familiar. La elección de explorar un objeto nuevo refleja el aprendizaje y la memoria de reconocimiento (Bevins et al., 2006).

El NOR se realizó en las mismas cajas acrílicas utilizadas para el test de campo abierto con dos clases de objetos diferentes. Ambos objetos deben ser similares en tamaño pero diferentes en forma y apariencia. En la fase de familiarización los animales son expuestos a dos objetos idénticos y se permite que exploren libremente durante 3 minutos. Al día siguiente las ratas exploran la caja en presencia de un objeto familiar y un objeto nuevo con el propósito de medir la memoria a largo plazo. Finalmente se determina el tiempo dedicado a explorar cada objeto y el índice porcentual de discriminación (Figura 2). Esta prueba se llevó a cabo durante los PND 29 y 30.

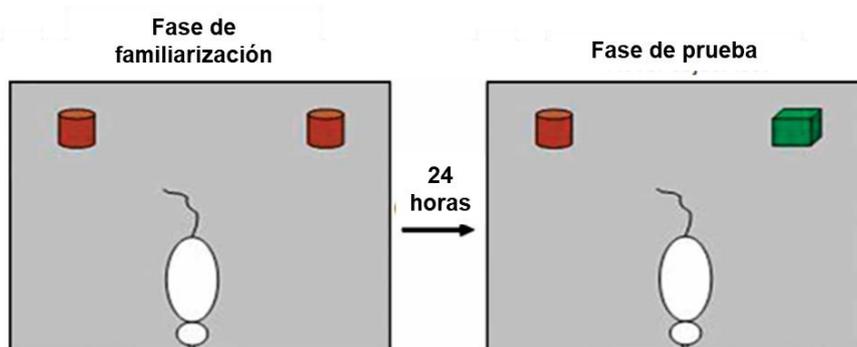


Figura 2. Novel Object Recognition. Diagrama del test utilizado para evaluar la capacidad de aprendizaje y memoria.

Evaluación de marcadores pre y post sinápticos por Western blot.

Una vez concluidas las pruebas comportamentales, los animales fueron sacrificados, se les extrajo el cerebro y se homogeneizó el hipocampo en buffer RIPA de lisis celular con el agregado de inhibidores de proteasas y fosfatasas. Las proteínas se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se reveló con ECL en placas radiográficas (Rosso et al., 2004). Los anticuerpos primarios utilizados fueron: anti-PSD95 monoclonal de ratón, anti-Sinapsina I policlonal de conejo y anti- β actina monoclonal de ratón. Las cuantificaciones correspondientes se realizaron midiendo la densidad óptica de las bandas con el software ImageJ.

Efecto del glifosato sobre la formación y maduración de estructuras sinápticas especializadas.

Se realizaron cultivos de neuronas piramidales de hipocampo de embriones de rata de 18 días de gestación siguiendo protocolos ya descriptos (Rosso, 2004). Las células se mantuvieron en cultivo utilizando el medio Neurobasal suplementado con B27 y glutamina y se le agrego glifosato (0,5 o 1 mg/ml) a los 10 días in vitro (DIV). Las neuronas fueron transfectadas a los 9 DIV con una construcción de EGFP utilizando Lipofectamina 2000 y analizadas a los 17 o 20 DIV.

Para llevar a cabo las técnicas de inmunofluorescencia, adquisición de imágenes y análisis de las mismas se siguieron los procedimientos utilizados por Coullery, 2016. Los cultivos fueron fijados con 4% paraformaldehído/ 4% sucrosa en PBS por 20 minutos a temperatura ambiente y se utilizaron anticuerpos primarios contra PSD95 y Sinapsina I. Además se usaron anticuerpos secundarios conjugados con Alexa Fluor.

Para la obtención de imágenes se utilizó un microscopio invertido confocal Zeiss LSM880. Se tomaron un total de 15 a 25 células por condición, se analizaron 3 o 4 segmentos dendríticos por neurona y el número de espinas y sinapsis fue contado manualmente. Las espinas dendríticas fueron definidas como protrusiones ubicadas sobre el eje de la dendrita y se clasificaron morfológicamente en 3 categorías: Mushroom, Stubby y Thin según orden decreciente de maduración. La sinapsis fue definida como la colocación del marcador post sináptico PSD95 y el presináptico Sinapsina I sobre una espina dendrítica.

Análisis estadístico.

Los valores fueron presentados como el promedio \pm SEM y corresponden al menos a 3 experimentos independientes. Para los conjuntos de datos con distribución normal se utilizó el test estadístico ANOVA, mientras que para

aquellos que no cumplían esta condición su usó el test de Kruskal-Wallis.

Resultados y Discusión

Disminución en los niveles de actividad locomotora y hábitos exploratorios.

El test de Campo Abierto arrojó como resultado que los animales tratados con la dosis más baja de glifosato no

presentaron diferencias estadísticas con respecto al grupo control. En cambio el grupo tratado con la dosis de 70 mg/Kg/48 horas evidenció una menor actividad desde el comienzo de la prueba, que se acentúa con el paso del tiempo, volviéndose significativa a partir de los 20 minutos (Figura 3).

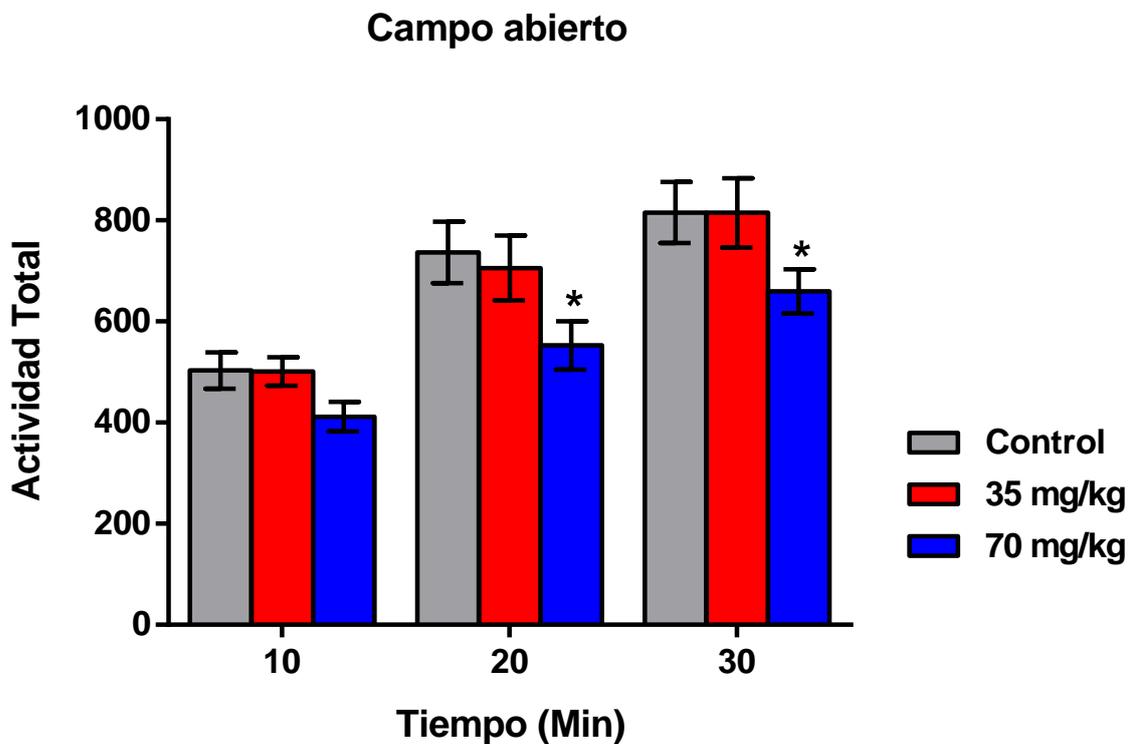


Figura 3. Campo abierto. Actividad total (ambulaci3n + estereotipía) de animales control y expuestos a glifosato. Resultados obtenidos a partir de 3 experimentos independientes. N=15 para cada tratamiento. *p <0.05 respecto al grupo control. Barras de error representan \pm SEM.

Alteración en los procesos de aprendizaje y memoria.

En el test NOR se observó que ambos grupos de animales tratados dedicaron un tiempo estadísticamente menor a explorar el objeto nuevo que los animales control, observándose una mayor diferencia en la dosis más alta. En concordancia el índice de discriminación para los animales control fue prácticamente el doble que el de los animales tratados con glifosato (Figura 4). Esto demuestra que la exposición al

herbicida produce alteraciones en la memoria de reconocimiento.

Descenso en la expresión de marcadores sinápticos.

La evaluación por western blot del nivel de proteínas involucradas en la maquinaria sináptica, como lo son Sinapsina I y PSD95, mostró la disminución significativa de marcadores tanto pre como post sinápticos en ratas expuestas a la dosis de 70 mg/Kg/48 horas (Figura 5).

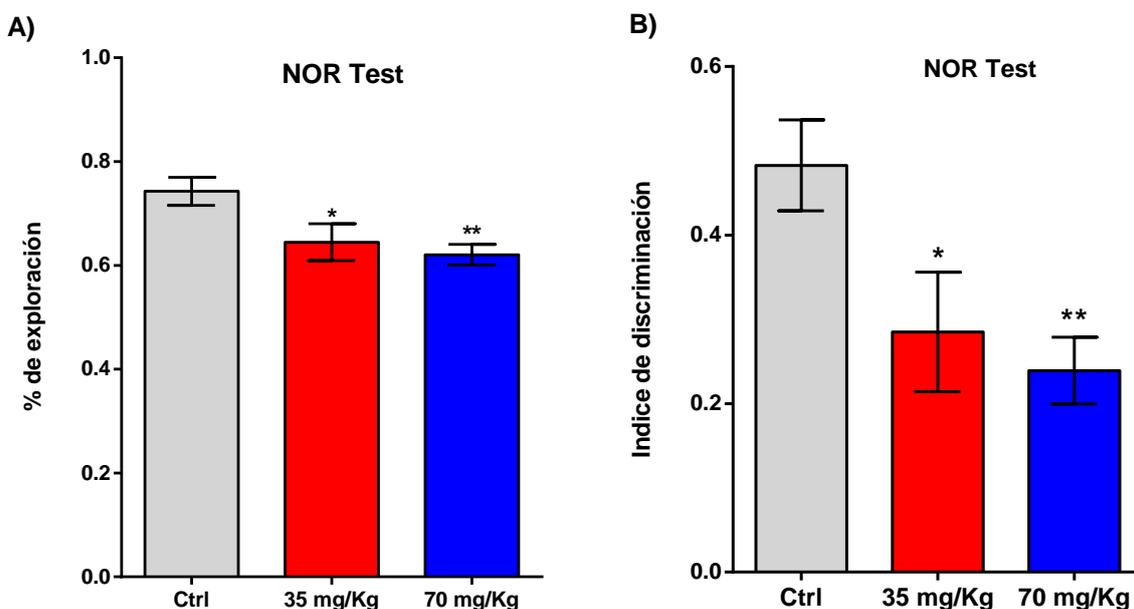


Figura 4: Novel Object Recognition. A) Porcentaje de tiempo dedicado a explorar el objeto nuevo de animales control y tratados con glifosato. B) Índice de discriminación de objetos definido como $(NO-FO)/(NO+FO)$ para animales control y tratados. NO = tiempo dedicado a explorar el objeto nuevo. FO = tiempo dedicado a explorar el objeto familiar. Resultados obtenidos a partir de 3 experimentos independientes. N=11 para cada tratamiento. *p < 0.05, **p < 0.01 respecto al grupo control. Barras de error representan \pm SEM

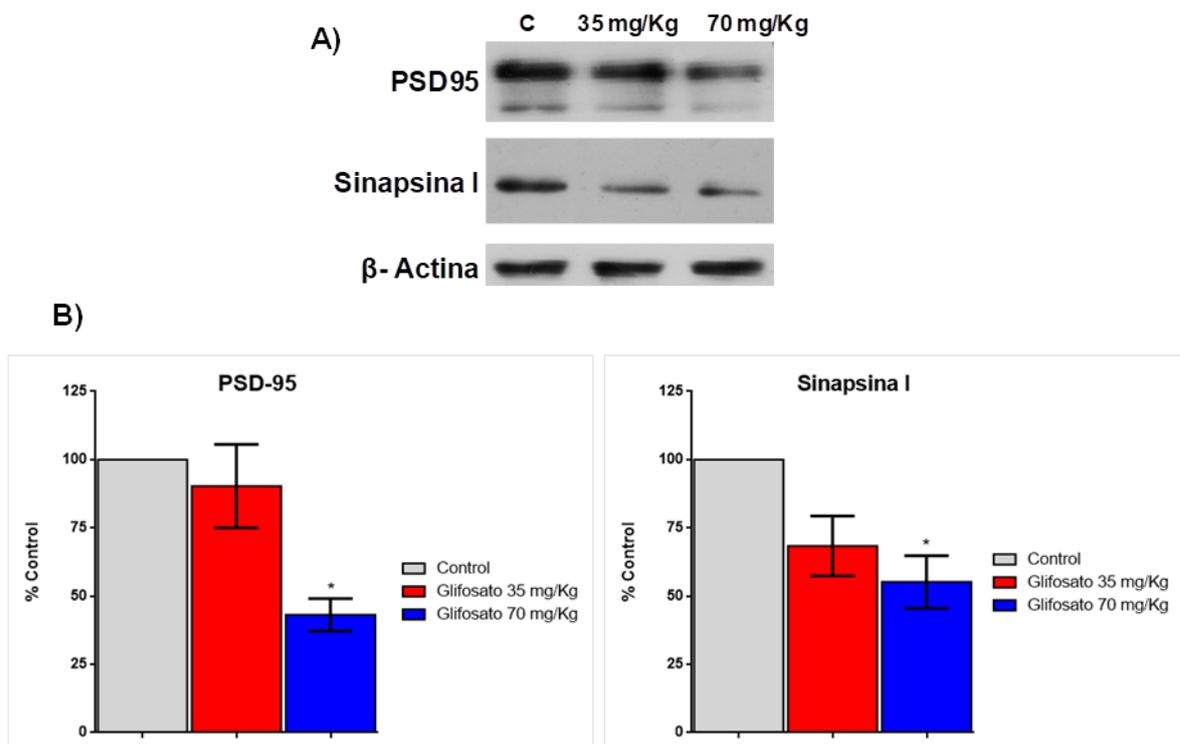


Figura 5: Expresión de proteínas sinápticas. A) Western blot representativo de los niveles de PSD 95, Sinapsina I y β -Actina en el hipocampo de ratas control y tratadas con glifosato. B) Las cuantificaciones muestran los niveles relativos de densidad óptica de PSD 95/ β -Actina y Sinapsina I/ β -Actina. Resultados obtenidos a partir de 3 experimentos independientes. N=4 para cada tratamiento. *p <0.05 respecto al grupo control. Barras de error representan \pm SEM.

Disminución en la maduración y densidad de espinas dendríticas.

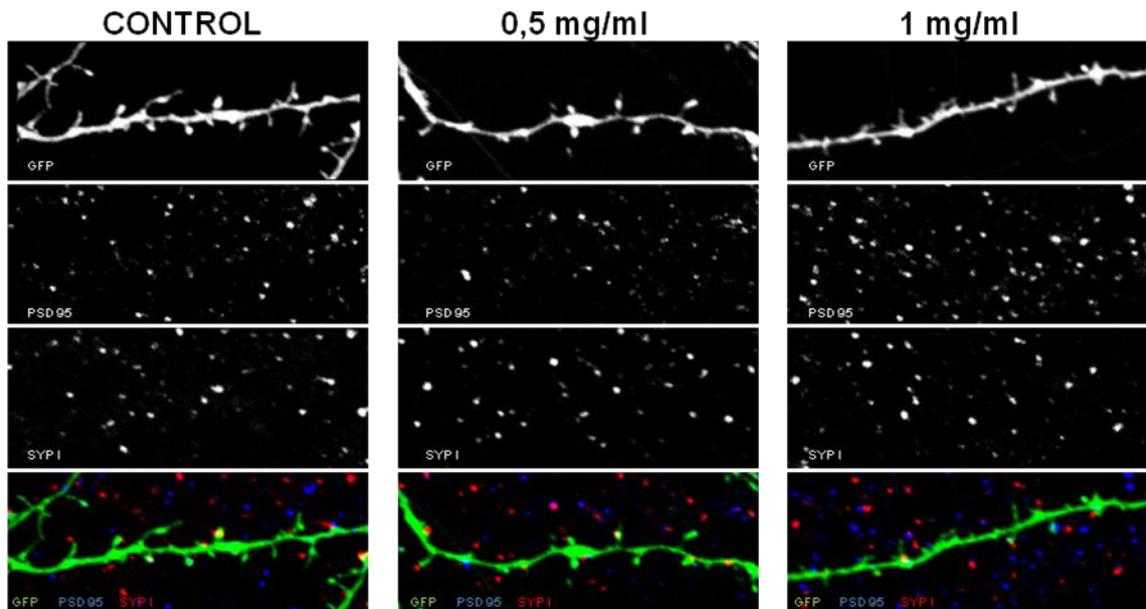
Los ensayos con neuronas en cultivo demostraron que el efecto del glifosato sobre la morfología y el número de espinas a lo largo de la dendrita se acrecienta tanto con la dosis como con el tiempo de exposición al herbicida (Figura 6 y 7). Las diferencias observadas utilizando la dosis de 1 mg/ml son estadísticamente mayores que aquellas vistas con la dosis de 0,5 mg/ml. Lo mismo ocurre con el tiempo, ya que la

disminución del número de espinas a 20 DIV es notoriamente más grande que el observado a 17 DIV.

Reducción del número de sinapsis.

En relación a lo observado con la maduración y densidad de espinas dendríticas, el número de sinapsis cada 100 μ m exhibe un comportamiento similar (Figura 6 y 7). La variación observada es dependiente tanto de la dosis como del tiempo de exposición al glifosato, mostrando una disminución muy marcada a los 20 DIV.

A)



B)

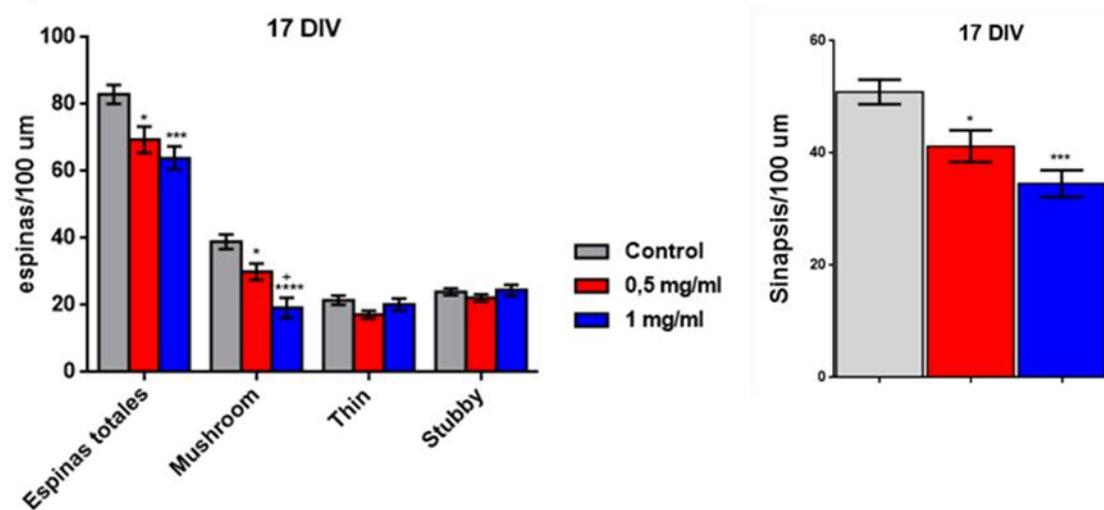


Figura 6: Microscopía confocal de neuronas piramidales de hipocampo. Cultivos controles y expuestos a glifosato. A) Imágenes representativas de segmentos dendríticos de neuronas de 17 DIV. B) Cuantificaciones correspondientes al número de espinas y sinapsis cada 100 μm. Resultados obtenidos a partir de 3 experimentos independientes. N=15 neuronas por condición, 3 segmentos dendríticos por neurona. *p <0.05, **p <0.01, ***p <0.001 y ****p <0.0001 respecto al grupo control. *p <0.05 respecto a 0,5 mg/ml. Barras de error representan ±SEM

Debido a la escasa información disponible sobre los efectos del glifosato sobre el sistema nervioso central de mamíferos, el presente estudio fue

diseñado para comenzar a esclarecer las bases moleculares y celulares que explican la toxicidad del herbicida sobre

la maduración neuronal y los cambios comportamentales que esto genera. Nuestros resultados muestran que la exposición a glifosato induce una disminución de la actividad locomotora.

Este perfil hipoactivo es similar al observado por Hernández-Plata et al., 2015 y Ait Bali et al. 2017 y podría estar relacionado a modificaciones en los niveles de neurotransmisores.

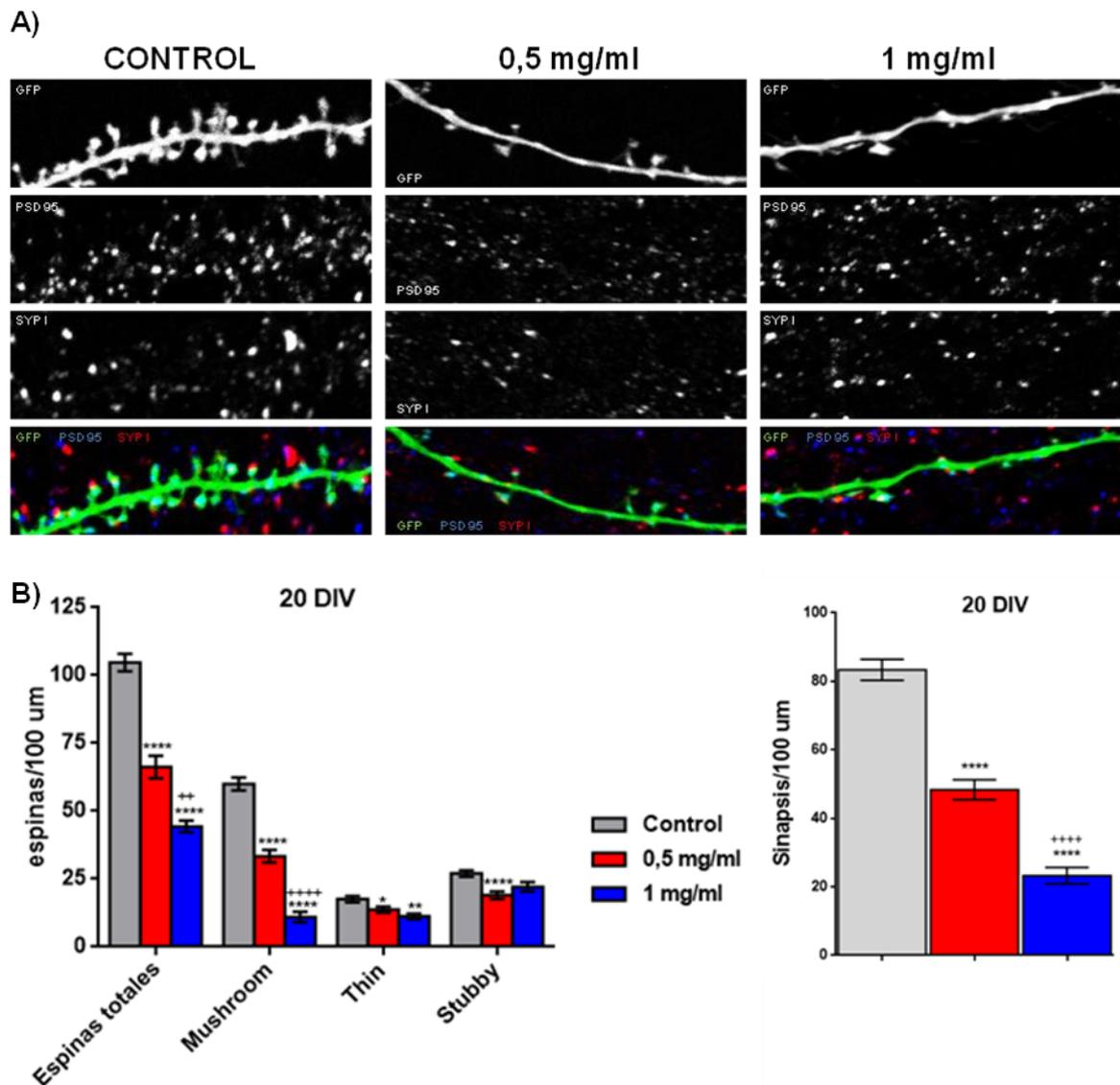


Figura 7: Microscopía confocal de neuronas piramidales de hipocampo. Cultivos controles y expuestos a glifosato. A) Imágenes representativas de segmentos dendríticos de neuronas de 20 DIV. B) Cuantificaciones correspondientes al número de espinas y sinapsis cada 100 μm. Resultados obtenidos a partir de 3 experimentos independientes. N=15 neuronas por condición, 3 segmentos dendríticos por neurona. *p < 0.05, **p < 0.01 y ****p < 0.0001 respecto al grupo control. **p < 0.01 ****p < 0.0001 respecto a 0,5 mg/ml. Barras de error representan ±SEM

Los cambios neurocomportamentales muestran también modificaciones en los procesos de aprendizaje y memoria. El presente estudio muestra por primera vez esta clase alteraciones asociados con la exposición al herbicida. El hipocampo es un área cerebral fundamental para la consolidación de la memoria y modificaciones en sus circuitos neuronales pueden generar serios desórdenes neurológicos (Antunes y Biala, 2012). En este sentido los cambios mostrados en la expresión de proteínas pre y post sinápticas en esta área cerebral podrían brindar las bases moleculares que expliquen estas alteraciones.

Cambios en la densidad y morfología de las espinas dendríticas, así como en el número de sinapsis, han sido relacionadas con numerosos desórdenes del sistema nervioso central (Gass y Olive 2012; Penzes et al. 2011). Estas observaciones confirman el rol central de las espinas dendríticas, en el control del correcto funcionamiento del cerebro (Romero et al., 2013). Los resultados que hemos obtenido en cultivo primario de neuronas muestran por primera vez que la exposición in vitro a glifosato reduce considerablemente tanto la densidad de espinas dendríticas, como el número de sinapsis y brindan información de cómo alteraciones celulares podrían explicar los cambios comportamentales observados.

Conclusiones

Estos hallazgos sugieren que la exposición a dosis sub-letales de glifosato afectaría la maduración y funcionalidad del sistema nervioso modificando las conexiones neuronales. Las alteraciones morfológicas a nivel celular y los cambios en la expresión de proteínas asociadas a la maquinaria sináptica podrían comenzar a explicar los mecanismos por los cuales el herbicida ejerce su efecto neurotóxico.

Bibliografía

- Jan YN, Jan LY. (2003). The control of dendrite development. *Neuron*. 40(2):229-42 doi: 10.1016/S0896-6273(03)00631-7.
- McAllister AK, Katz LC, Lo DC. (1999). Neurotrophins and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*. 22:295-318 doi: 10.1146/annurev.neuro.22.1.295.
- Stamatakou E, Marzo A, Gibb A, Salinas PC. (2013). Activity-dependent spine morphogenesis: a role for the actin-capping protein Eps8. *J Neurosci*. 33(6):2661-70. doi:10.1523/JNEUROSCI.0998-12.2013.
- Dallegre E, Mantese FD, Coelho RS, Pereira JD, Dalsenter PR, Langeloh A. (2003). The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup in Wistar rats. *Toxicol Lett*. 142(1-2):45-52. doi: 10.1016/S0378-4274(02)00483-6

- Dallegrave E, Mantese FD, Oliveira RT, Andrade AJ, Dalsenter PR, Langeloh A. (2007). Pre- and postnatal toxicity of the commercial glyphosate formulation in Wistar rats. *Arch Toxicol.* 81(9):665-73. doi: 10.1007/s00204-006-0170-5
- Gasnier C, Dumont C, Benachour N, Clair E, Chagnon MC, Séralini GE. (2009). Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology.* 262(3):184-91. doi: 10.1016/j.tox.2009.06.006.
- Marc J, Mulner-Lorillon O, Bellé R. (2004). Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. *Biol Cell.* 96(3):245-9. doi:10.1016/j.biocel.2003.11.010
- Hernández-Plata I, Giordano M, Díaz-Muñoz M, Rodríguez VM. (2015). The herbicide glyphosate causes behavioral changes and alterations in dopaminergic markers in male Sprague-Dawley rat. *Neurotoxicology.* 46:79-91. doi: 10.1016/j.neuro.2014.12.001
- Ait Bali Y, Ba-Mhamed S, Bennis M. (2017). Behavioral and Immunohistochemical Study of the Effects of Subchronic and Chronic Exposure to Glyphosate in Mice. *Front Behav Neurosci.* 11:146. doi: 10.3389/fnbeh.2017.00146.
- Semple BD, Blomgren K, Gimlin K, Ferriero DM, Noble-Haeusslein LJ. (2014). Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Prog Neurobiol.* 106-107:1-16. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.04.001
- Pacchioni AM, Vallone J, Worley PF, Kalivas PW. (2009). Neuronal pentraxins modulate cocaine-induced neuroadaptations. *J Pharmacol Exp Ther.* 328(1):183-92. doi: 10.1124/jpet.108.143115.
- Bevins RA, Besheer J. (2006). Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study 'recognition memory'. *Nat Protoc.* 1(3):1306-11. doi: 10.1038/nprot.2006.205
- Rosso SB, Sussman D, Wynshaw-Boris A, Salinas PC. (2004). Wnt signaling through Dishevelled, Rac and JNK regulates dendritic development. *Nat Neurosci.* 8(1):34-42. doi: 10.1038/nn1374
- Coullery RP, Ferrari ME, Rosso SB. (2016). Neuronal development and axon growth are altered by glyphosate through a WNT non-canonical signaling pathway. *Neurotoxicology.* 52:150-61. doi: 10.1016/j.neuro.2015.12.004
- Antunes M, Biala G. (2012). The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn*

- Process. 13(2):93-110. doi: 10.1007/s10339-011-0430-z.
- Gass JT, Olive MF. (2012). Neurochemical and neurostructural plasticity in alcoholism. ACS Chem Neurosci. 3(7):494-504. doi: 10.1021/cn300013p.
- Penzes P, Cahill ME, Jones KA, VanLeeuwen JE, Woolfrey KM. (2011). Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. Nat Neurosci. 14(3):285-93. doi: 10.1038/nn.2741.
- Romero AM, Renau-Piqueras J, Pilar Marin M, Timoneda J, Berciano MT, Lafarga M, Esteban-Pretel G. (2013). Chronic alcohol alters dendritic spine development in neurons in primary culture. Neurotox Res. 24(4):532-48. doi: 10.1007/s12640-013-9409-0.

Financiamiento.

Este trabajo fue financiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANCyT), la Universidad Nacional de Rosario y Conicet.