

**EVALUACIÓN TÓXICA, CITOTÓXICA Y GENOTÓXICA *IN VIVO* DEL
HERBICIDA GLUFOSINATO DE AMONIO EN SU FORMA COMERCIAL
(FINALE), EN CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN *ALBINO SUIZO*.**



MARIA ANGELICA RIASCOS CUENU

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE BIOLOGIA
POPAYAN
2018**

**EVALUACIÓN TÓXICA, CITOTÓXICA Y GENOTÓXICA *IN VIVO* DEL
HERBICIDA GLUFOSINATO DE AMONIO EN SU FORMA COMERCIAL
(FINALE), EN CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA DE RATÓN ALBINO SUIZO**

TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE BIÓLOGA

MARIA ANGELICA RIASCOS CUENU

DIRECTOR

WILIAN ORLANDO CASTILLO, Ph.D

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE BIOLOGIA
POPAYAN
2018**

Nota de aceptación

Director _____

Wilian Orlando Castillo Ph.D

Jurado Jovanna Vanessa Ramos

Biol. Jovanna Vanessa Ramos Angulo

Jurado Rosa Amalia Dueñas C.

Rosa Amalia Dueñas Ph.D

Fecha y lugar de sustentación: Popayán, 22 de junio de 2018

Quiero agradecer a mis padres, los cuales siempre se han esforzado en función de motivarme a sacar todas mis metas adelante, estando firme conmigo, incluso en los momentos más difíciles en este proceso de formación, gracias a ellos culmino una etapa de vida que me ha dejado muchas enseñanzas y me ha enriquecido a nivel personal; también quiero agradecer a todos los profesores por guiarme de la mejor manera y darme herramientas para la vida y en el campo laboral.

CONTENIDO

	Pág
CONTENIDO	4
LISTA DE TABLAS	6
RESUMEN	7
1. INTRODUCCIÓN	9
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	11
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. MARCO TEÓRICO	15
4.1 GENERALIDADES DE PLAGUICIDAS	15
4.2.1 Herbicidas:	15
4.2.1.1 Glufosinato de amonio:	16
4.2.1.2 Finale:	16
4.3 BIOENSAYOS Y CONCEPTOS DE TOXICOLOGÍA	16
4.3.1.1 Método de Finney:	17
4.3.1.1.2 Probit:	17
4.3.1.2 Relación dosis-efecto	17
4.3.1.3 Relación dosis-respuesta	18
4.3.1.4 Dosis efectiva (DE):	18
4.3.2 Tóxico:	18
4.3.3 Toxicidad:	18
4.3.3.1 Toxicidad aguda:	18
4.3.4 Citotoxicidad:	18
4.3.4.1 Índice Mitótico (IM):	18
4.3.5 Genotoxicidad:	19
4.3.5.1 Alteraciones cromosómicas (AC):	19
4.3.6 Mecanismos de tinción diferencial de los cromosomas en metafase sustituidos con Bromodeoxiuridina (BrdU)	19
4.3.6.1 Metafasas de primer ciclo:	20
5 ANTECEDENTES	21

6	OBJETIVOS	27
6.1	OBJETIVO GENERAL	27
6.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
7	METODOLOGÍA	28
7.1	ANIMALES Y CONDICIONES EXPERIMENTALES	28
7.2	PREPARACIÓN Y ADMINISTRACIÓN DE LAS DOSIS	28
7.3	ESTIMACIÓN DE RANGO DE DOSIS Y PORCENTAJE DE MORTALIDAD; DL50	29
7.3.1	Dosis subletales:	29
7.4	PRUEBAS CITOGENÉTICAS	30
7.4.1	Implantación de Bromodeoxidurina (BrdU):	31
6.4.2	Cosecha de células de médula ósea:	31
7.4.2.1	Preparación	31
7.4.3	Tinción diferencial:	32
7.4.4	Identificación de Aberraciones cromosómica:	32
7.5	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	32
7.5.1	Método estadístico DL50:	32
7.5.2	Método estadístico para análisis citogenético:	33
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
8.1.1.1	Conversión de porcentajes de mortalidad a probit y cálculo de la DL50.	35
8.1.2	Sintomatología:	38
8.2	Genotoxicidad	39
8.3	Citotoxicidad	46
9.	CONCLUSIÓN	49
10.	RECOMENDACIONES	50
	REFERENCIAS	51
	ANEXOS	60

LISTA DE TABLAS

	Pag
Tabla 1. Tratamientos y dosis subletales utilizados en citogenética	30
Tabla 2. Resultados de las dosis de FINALE para la determinación de la DL50 administradas vía oral en ratones Albino suizo de la cepa ICR	34
Tabla 3. Transformación de porcentaje de mortalidad a probit.....	35
Tabla 4. Signos de toxicidad por efecto de FINALE en ratones Albino suizo de la cepa ICR durante procedimiento de DL50, observados durante 24 horas	38
Tabla 5. Comparaciones con diferencias significativas en términos de genotoxicidad.	39
Tabla 6. Datos citogenéticos; porcentaje de índice mitótico y anomalías presentes en los tratamientos	41
Tabla 7. Comparaciones con diferencias significativas en términos de citotoxicidad.....	46

RESUMEN

Diferentes plaguicidas se han asociado con enfermedades como el cáncer, efectos mutagénicos, neurotóxicos, o patologías combinadas; tanto en seres humanos, como en otras especies animales. El estudio de las propiedades genotóxicas de un compuesto, así como el seguimiento en poblaciones animales o humanas expuestas, es una herramienta útil para estimar el riesgo que éste tiene sobre la población en general. En este estudio se evaluó la toxicidad, citotoxicidad y genotoxicidad del herbicida FINALE en ratones *Albino Suizo* de la cepa ICR. El estudio se llevó a cabo en dos fases, iniciando con la identificación de toxicidad, donde se estimó la DL50 del herbicida comercial, en contraste con la DL50 reportada en otros estudios con respecto al compuesto activo. Respecto a los resultados de toxicidad aguda no hubo síntomas o respuestas que indicaran diferencias entre la mezcla comercial y el compuesto activo. Partiendo de la DL50 de FINALE se calcularon seis (6) dosis subletales con las cuales se evaluó el posible efecto citogenético, en donde en términos de citotoxicidad se obtuvieron diferencias significativas con respecto al control negativo en todas las dosis experimentales. En el análisis de genotoxicidad sólo hubo dos dosis con valores significativos con respecto al control negativo, Alta 1 (243mg/kg) y Alta 2 (291,6mg/kg), finalmente se estima que en condiciones recomendadas, el herbicida FINALE, no representa un peligro para la población, no obstante, este tipo de productos requieren de más investigación.

Palabras Claves: DL50, Glufosinato de Amonio, Mutagénesis, Alteraciones cromosómicas.

ABSTRACT

Many pesticides have been associated with diseases such as cancer, mutagenic, neurotoxic, or combined pathologies; both in humans, as in other animal species. The study of the genotoxic properties of a compound, as well as the monitoring in exposed animal or human populations, is a useful tool to estimate the risk that this type of chemical has on the general population. Therefore, in this study the toxicity, cytotoxicity and genotoxicity of the FINALE herbicide were evaluated in Swiss Albino mice of strain ICR; whose study was carried out in two sessions, starting with toxicity, where the LD50 of the commercial herbicide was estimated, and in contrast to the LD50 reported in other studies with respect to the active compound, there were no significant differences. Based on the DL50 of FINALE, six (6) sublethal doses were calculated with which the possible effect on cytogenetics was

evaluated, in which, in terms of cytotoxicity, significant differences were obtained with respect to the negative control. In genotoxicity there were no significant values, but nevertheless two treatments, High 1 and High 2, had significant differences with respect to the negative control, finally it is estimated that under recommended conditions, the FINALE herbicide, does not represent a danger for the population, however, these types of products require more research.

Key words: LD50, Glufosinate of Ammonium, Mutagenesis, Chromosomal alterations.

1. INTRODUCCIÓN

Los efectos adversos de los pesticidas sobre las personas que los utilizan; los trabajadores y las comunidades, así como el medio ambiente, ahora se reconocen en todo el mundo como un tema de gran preocupación (Watts, 2016). Los efectos que podrían tener los plaguicidas sobre los humanos es un desafío mundial para la salud, especialmente en los países menos desarrollados (London & Bailie, 2001; Jaga & Dharmani, 2003; Shadboorestan *et al.*, 2016). El aumento del uso de plaguicidas es el resultado al crecimiento poblacional mundial y por ende de la alta demanda en pro de la agricultura para el sustento de la sociedad (Population Reference Bureau, 2015; Elias & Bernot, 2017); esto ha dado lugar a concentraciones muy altas de plaguicidas en el medio ambiente, los cuales han generado múltiples efectos negativos con respecto a la contaminación ambiental y en la salud de las personas (Tiryaki & Temur, 2010). Se ha estimado que cada año a nivel mundial hay aproximadamente un millón de intoxicaciones agudas por exposición a plaguicidas; con una tasa de mortalidad entre 0,4% y 1,9% (OMS, 1990; García *et al.*, 2012).

Los pesticidas son una de las pocas sustancias tóxicas liberadas deliberadamente en el medio ambiente para matar organismos vivos como plantas no deseadas (herbicidas), insectos (insecticidas), hongos (fungicidas) y roedores (rodenticidas) (Kim *et al.*, 2017), por lo tanto, su empleo para una óptima supervivencia está desempeñando una función trascendental para las personas. Sin embargo, se ha demostrado que estos productos tienen capacidad para producir toxicidad genómica; esta genotoxicidad se considera un factor de riesgo primario que podría desencadenar procesos nocivos a lo largo de los años; como por ejemplo, efectos carcinogénicos, neurológicos y reproductivos, producto de las diferentes formas de exposición, ya sean ocupacionales o ambientales (Jacobsen-Pereira *et al.*, 2018). En este orden de ideas; la evaluación de posibles efectos tóxicos sobre el genoma y el biomonitorio en poblaciones expuestas a plaguicidas es fundamental para una mejor regulación y protección con respecto a estos químicos como plaguicidas; no obstante, ha sido difícil identificar los efectos que estos productos puedan inducir en las personas, debido que estas sustancias se usan a menudo como mezclas complejas entre diferentes productos, es decir; combinación de diferentes tipos de herbicidas o plaguicidas (Bolognesi & Holland 2016).

En Latinoamérica, los herbicidas son el tipo de plaguicidas más empleados. Colombia lidera la lista con la mayor demanda de estos (FAOSTAT, 2013). Entre los herbicidas utilizados nacionalmente está el Glufosinato de amonio (GLA) (compuesto activo), el cual es ampliamente utilizado a nivel mundial (Inoque *et al.*, 2013). Este compuesto ha generado diferentes controversias respecto a los efectos tóxicos que puede inducir en las personas; no está claro hasta qué grado

puede influir su modo de acción (Hack et al., 1994; Watanabe, 1997; Schulte-Hermann et al., 2006; Laugeray et al., 2014; Calixto et al., 2018); por ende es de importancia el estudio, confirmación e investigación de los diferentes contextos y formas en los que estos productos puedan influir en la salud, teniendo en cuenta sus diferentes presentaciones comerciales, como es el caso del herbicida FINALE, cuyo compuesto activo es el GLA.

Herbicidas que contengan GLA han sido considerados en Colombia, como los más opcionados para la erradicación de cultivos ilícitos y como producto herbicida en general; cabe resaltar, que en la actualidad es sólo una propuesta, la determinación de este herbicida, para los fines mencionados; no obstante, su comercialización es vigente (Caracol Radio, 2016), así como la falta de estudios nacionales que aporten al conocimiento y seguridad de posibles efectos secundarios en términos de salud, que puedan conllevar a enfermedades complejas como el cáncer.

Se ha demostrado *in vivo* (para el compuesto activo) e *in vitro* (para la mezcla comercial BASTA) que el GLA tiene efectos embriotóxicos en ratones (Watanabe, 1997; Fabian et al., 2011); pero a su vez se polemiza su efecto en humanos (Schulte-Hermann et al., 2006). Además de su embriotoxicidad se le atribuyen diversos efectos tóxicos para el hombre, tales como pérdida de memoria y convulsiones, cuando hay un exceso de exposición (Inoue et al., 2013; Calas et al., 2016). Con respecto a mutagenicidad para el GLA (compuesto activo), se estableció que no representa ningún peligro en mamíferos (Ebert, Leist, & Mayer, 1990; Hack et al., 1994), sin embargo, la investigación en términos de genotoxicidad ha sido muy poca, y todavía faltan puntos por abarcar, para poder establecer una posición final sobre hasta qué instancia el GLA puede representar un riesgo para la salud.

Por consiguiente, en este estudio se pretende evaluar la toxicidad, citotoxicidad y genotoxicidad del herbicida glufosinato de amonio en su forma comercial FINALE en ratones *Albino Suizo* de la cepa ICR, con la finalidad de proporcionar información útil y preventiva sobre los productos a los que usualmente, directa o indirectamente, estamos expuestos.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los plaguicidas son productos químicos ampliamente empleados por el hombre para el control de plagas agrícolas (Bolognesi, 2003, Mansour, 2004, Gómez, 2007). A nivel mundial, desde los años cuarenta, el uso de plaguicidas ha aumentado de una manera continua, llegando a 5 millones de toneladas en 1995 (Torres & Capote, 2004). Actualmente en países desarrollados se observa una tendencia a la reducción en el uso de los plaguicidas; no obstante, su aplicación continúa siendo intensiva en países tropicales como Colombia (Capote et al., 2004). Estudios han demostrado que sólo un 0,1% de la cantidad de plaguicidas aplicado llega a la plaga, mientras que el restante, circula por el medio ambiente; contaminando el suelo, el agua y la biota. Por lo tanto, es un desafío caracterizar el destino final y la toxicidad no prevista de estos plaguicidas, a fin de evaluar con certeza el riesgo asociado a su uso (Carvalho et al, 1998 citado por D. Torres, T. Capote et al., 2004).

Según datos recopilados por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación; en Latino América y el Caribe durante el 2010, se emplearon 222.367,59 toneladas de plaguicidas, siendo los herbicidas los más utilizados con 11.788,14 toneladas; en donde Colombia, es uno de los principales consumidores con 14.374,79 toneladas (Gómez et al., 2013). Este tipo de agroquímicos poseen propiedades mutagénicas que inducen alteraciones en el ácido desoxirribonucleico (ADN) (Kausar et al., 2014; Chaves et al., 2017).

Actualmente crece la incertidumbre sobre los efectos adversos en la salud de personas expuestas a este grupo de plaguicidas; no obstante, se han realizado varios estudios utilizando pruebas citogenéticas como Alteraciones Cromosómicas (AC), Micronúcleos (MN), Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH) y Ensayo Cometa (EC) (Gentile, et al., 2016). Este tipo de estudios usualmente son realizados en biomodelos murinos como ratones; debido a que los datos son extrapolables a humanos, y en el caso de los ratones, es uno de los mejores modelos murinos para estudios de experimentación (Hernández, 2006). Las pruebas citogenéticas en plaguicidas, pese a su alta efectividad en términos de solución a preguntas de investigación, tienden a variar partiendo de un determinado contexto de indagación. Están sujetas a factores como: el grupo químico al que pertenece el plaguicida, la formulación técnica, el ingrediente activo que constituye el producto, el tipo de exposición (crónica o aguda), la cantidad empleada, la exposición a mezclas, el clima, la temporada del año en el que se asperjan, la edad de las personas, entre otros factores, que pueden generar cambios significativos en un determinado resultado; siendo de gran relevancia tener estudios nacionales que aborden y respondan con especificidad a este tipo de ambigüedades (Gómez, 2007); sin embargo, si se hace una evaluación

retrospectiva en Colombia, de herbicidas que contengan Glufosinato de amonio (GLA) con respecto a estudios nacionales, no se tiene ningún registro; como es el caso del herbicida BURNER (fabricado a nivel nacional), cuyo compuesto activo es el GLA al igual que para el herbicida FINALE (fabricación extranjera).

El GLA es empleado a nivel mundial como ingrediente principal para diferentes herbicidas. Actúa como un inhibidor selectivo de la glutamina sintetasa y el glutamato descarboxilasa, dando niveles disminuidos de ácido glutámico, lo que afecta al sistema nervioso central (Inoque et al., 2013). En condiciones agudas el GLA induce a efectos neurotóxicos, como lo demuestran los síntomas neurológicos (convulsiones y pérdida de memoria) en personas que han intentado suicidarse al ingerir grandes cantidades de estos herbicidas (Laugeray et al., 2014). En los años noventa, se descubrió que el glufosinato *in vitro* induce dismorfogénesis en mamíferos (Watanabe & Iwase, 1997), sin embargo, hay vacíos sobre los alcances que este herbicida puede tener sobre la salud de las personas desde un contexto genotóxico, debido que los enfoques de los estudios están en su gran mayoría asociados al sistema nervioso y desarrollo embrionario. En términos de genotoxicidad, en animales sólo se cuenta con dos estudios; uno en mamíferos con el compuesto activo y otro en anfibios con la mezcla comercial (Ebert et al., 1990, Lajmanovich et al., 2014). Sin embargo, no hay estudios genotóxicos aplicados a mamíferos con la mezcla comercial (herbicida), que es lo que se emplea como plaguicida, y finalmente es a la mezcla que directa o indirectamente la población va a estar expuesta. En este orden de ideas, y debido a los vacíos científicos en Colombia con respecto a los productos que contienen GLA como el herbicida FINALE, se estima que es relevante evaluar el potencial Tóxico, Citotóxico y Genotóxico de este producto, utilizando biomodelos idóneos para experimentación, como es el caso de ratones; los cuales son ampliamente utilizados por su fácil extrapolación de resultados a seres humanos, y de forma indirecta identificar posibles riesgos en el empleo de este herbicida por exposición ocupacional y ambiental / consumo de alimentos, que puedan tener residuos de herbicidas como FINALE (MAFF, 1990; Fabian *et al.*, 2011).

3. JUSTIFICACIÓN

Muchos plaguicidas se han asociado con efectos cancerígenos, teratógenos, mutagénicos, espermatogénicos, fetotóxicos, neurotóxicos o una combinación de varios de estos, tanto en seres humanos como en otras especies animales (Vega y Maroto 1984, García 1997, Castro et al., 2004). No obstante, a nivel mundial existe desconocimiento acerca del daño que pueden ocasionar estas mezclas complejas. Según la Academia Nacional de Ciencias de los EE.UU, la información toxicológica es suficiente sólo para 10% de los ingredientes activos comercializados de plaguicidas, para 52% es incompleta y para los 38% restantes no hay información (García 1997, Castro et al., 2004).

La evaluación del daño del material genético por agentes potencialmente dañinos es una herramienta valiosa en salud pública y ocupacional. El estudio de las potenciales propiedades genotóxicas de un compuesto, así como el seguimiento en poblaciones animales o humanas expuestas a sus posibles efectos es una herramienta útil para estimar el riesgo de genotoxicidad, y con ello posibles enfermedades como el cáncer y enfermedades congénitas (Bolognesi, 2003; Peralta et al., 2011).

Los herbicidas con GLA, como la mayoría de plaguicidas organofosforados está relacionado con la inhibición de la actividad de enzimas que interaccionan en el sistema nervioso central, por lo tanto, la mayor parte de estudios están dirigidos a evaluar los efectos neurotóxicos y conductuales que usualmente estos provocan a dosis agudas (Ortega et al., 1994); los daños a largo plazo (subcrónico y crónico) no han sido estudiados con la misma intensidad, dejando un sin número de probabilidades de alteraciones en la salud de las personas que podrían ser prevenidas.

Los ensayos citogenéticos como Alteraciones Cromosómicas (AC), Intercambio de cromátidas hermanas (ICH) y Micronúcleos (MN), son importantes biomarcadores que permiten detectar y relacionar daños en el ADN respecto a una determinada exposición y por lo tanto aplicar estrategias direccionadas a la prevención. Estos ensayos son los biomarcadores más utilizados en estudios poblacionales, y llevados a cabo con modelos murinos, como es el caso de este estudio (Hagmar et al. 1998, Cuenca y Ramirez, 2004, Bonassi et al. 2005, Mañas et al., 2009). En esta investigación se usaron ratones, debido a que son los más utilizados para experimentación *in vivo*; son biomodelos elegidos para conocer la reacción de un organismo mamífero frente a una intoxicación, reacciones o trastornos inmunológicos, oncología, teratología y embriología (Hernández, 2006). Por lo tanto, la experimentación en ratones es idónea para aportar datos confiables en función de la retroalimentación científica a nivel nacional y mundial, conforme en

un contexto de bienestar social en pro de la salud y prevención de las personas que posiblemente tendrán algún tipo de exposición al herbicida FINALE.

Es importante resaltar que este es el primer estudio que se realiza con el herbicida comercial FINALE, en un contexto genotóxico y citotóxico para mamíferos a nivel nacional. Los resultados aquí obtenidos serán de gran utilidad para futuras investigaciones a corto, mediano y largo plazo, las cuales puedan finalmente llegar a una conclusión sobre los verdaderos efectos del herbicida FINALE sobre la salud humana y su mejor forma de uso.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 GENERALIDADES DE PLAGUICIDAS

Los plaguicidas se definen como cualquier sustancia o mezcla de sustancias utilizada para matar, repeler o controlar diferentes tipos de organismos entre ellos los hongos, bacterias, insectos, caracoles, gusanos, roedores y malezas. Este término general abarca grupos específicos de agroquímicos como herbicidas, fungicidas, insecticidas, acaricidas, nematocidas, moluscicidas, rodenticidas, reguladores del crecimiento, repelentes, rodenticidas y biocidas (EPA, 2014; Bolognesi & Holland, 2016). Estos compuestos comprenden un grupo de sustancias pertenecientes a distintas familias químicas y por consiguiente, presentan diferencias en sus modos de acción, absorción, biotransformación, y eliminación. Sin embargo, algunos residuos de estos compuestos persisten en los alimentos y constituyen un riesgo importante para la salud humana (Repetto, 2010).

Los pesticidas son compuestos biológicamente activos diseñados para afectar selectivamente los sistemas funcionales o moléculas diana específicas para la "plaga". Debido a las similitudes en las macromoléculas biológicas de todos los organismos, ha resultado difícil una selectividad absoluta, por ende, en aras de protección para las especies no objetivo, incluidos los humanos, la gran mayoría de los plaguicidas se han caracterizado por diversos grados de toxicidad con unos rangos estándares establecidos a nivel mundial basados en técnicas como la dosis letal media (DL50) (Chandra et al., 2014, Bolognesi & Holland, 2016).

4.2 CLASIFICACIÓN DE LOS PLAGUICIDAS

Los plaguicidas se clasifican en función de su uso, estructura química, modo de acción, y/o formulación, aunque algunos de ellos se usan contra dos o más grupos de plagas (Repetto et al., 1995; Font et al., 2012). Debido a la amplia cantidad de sustancias y combinaciones de compuestos los plaguicidas se han clasificado según la plaga que atacan; insecticidas, acaricidas, herbicidas, nematocidas, fungicidas, molusquicidas y rodenticidas (Repetto, 2010).

4.2.1 Herbicidas: un herbicida es una sustancia química utilizada para matar o controlar el crecimiento de plantas no deseadas. Los herbicidas se clasifican de acuerdo con la selectividad, tiempo de aplicación (preimplantación incorporada, preemergencia o postemergencia) y translocación en la planta (contacto o sistémica) (Mosier et al., 1990). Los herbicidas selectivos se usan para erradicar

plantas específicas, sin embargo, los no selectivos dañan todas las plantas presentes. Los herbicidas de contacto matan solamente las partes de la planta que entran en contacto con el producto químico, mientras que los herbicidas sistémicos son absorbidos por el follaje y translocado (desplazado) por toda la planta (AgCandM, 2007; Piotrowski, 2011).

4.2.1.1 Glufosinato de amonio: El glufosinato (4-(hidroxi(metil)fosfinoil)-DL-homoalaninato de amonio) es un compuesto natural aislado de dos especies de *Streptomyces fungi* (Ortiz et al., 2011). El glufosinato (GLF) inhibe irreversiblemente la glutamina sintetasa (GS), que cataliza la síntesis de glutamina a partir del glutamato y amoníaco. La inhibición de la GS conduce a la acumulación de amoníaco intracelular y a una deficiencia de glutamina, que es fitotóxico (Moon & Chun, 2016). El GLA, es un ácido fosfínico análogo del ácido glutámico, los registros se han concedido en muchos países desde 1984; las propiedades herbicidas del GLA fueron descritas por Hoechst AG en 1976 (Schwerdtfeger et al., 1981). En vista de la analogía estructural entre este compuesto y el ácido glutámico, se han incluido numerosos exámenes especiales en los estudios de toxicidad (E. Ebert & Mayer, 1990).

4.2.1.2 Finale: es un herbicida no selectivo, cuyo compuesto activo es el GLA, soluble en agua para su aplicación como aerosol foliar; sirve para el control de un amplio espectro de hierbas anuales, perennes emergidas y malezas de hoja ancha. Las plantas que aún no han surgido en el momento de la aplicación no serán controladas; este producto dañará o matará toda la vegetación verde contactada por el rocío (BAYER).

4.3 BIOENSAYOS Y CONCEPTOS DE TOXICOLOGÍA

4.3.1 Dosis letal media (DL50): la toxicidad de un producto químico se puede medir de varias maneras; sin embargo, la toxicidad para humanos se estima basándose en resultados de pruebas obtenidas en ratas, ratones u otros animales. No obstante, cualquier producto químico o sustancia que sea venenoso para estos animales, no necesariamente lo van a ser para humanos. Algunos pesticidas son peligrosos, incluso mortales después de una gran dosis (toxicidad aguda), o dosis pequeñas repetidas (toxicidad crónica) (Gutierrez & Salsamendi, 2001). Para medir la toxicidad se utilizan bioensayos basados en las tasas de mortalidad, a fin de cuantificar el efecto de la toxina (Lipnick et al., 1994). Esta medida se conoce como dosis letal cincuenta (LD50), la cual se define como la dosis en la que muere el cincuenta por ciento (50%) de la población de animales expuestos (Chandra et al., 2014; Lipnick et al., 1994). Esta dosis puede ser administrada por vía oral,

dérmica, intravenosa y subcutánea. La determinación de esta prueba examina la relación entre la dosis y la respuesta (Repetto, 2010). Normalmente la DL50 es expresada en miligramos de sustancia por kilogramo de peso corporal del animal (mg/kg) (Repetto, 2010). Esta medida proporciona información sobre los riesgos para la salud que puedan derivarse a corto plazo por la exposición al químico o sustancia en estudio, incluyendo datos que sirven de base para el etiquetado y clasificación de estos productos (Repetto, 2010). La DL50 se puede calcular por varios métodos aceptados como el de Miller & Tainter, Bliss, Litchfield & Wilcoxon, Finney y Wily Thompson (Chandra *et al.*, 2014).

4.3.1.1 Método de Finney: se utiliza para transformar los resultados de mortalidad obtenidos (en%) a valores Probit, donde los valores de Probit para mortalidad de 0% y 100% dependen del número de animales de experimentación por grupo, que luego se procesan (Finney, 1971; Arambaši *et al.*, 2014).

4.3.1.1.2 Probit: el análisis Probit se usa comúnmente en toxicología en pro de determinar la toxicidad relativa de productos químicos; esto con el objetivo de poder proporcionar información con respecto a la seguridad del uso de estas sustancias. Esto se hace probando la respuesta de un organismo bajo diversas concentraciones de la sustancia química en cuestión y luego comparando las concentraciones o dosis a las que se les encuentra una respuesta (vicent, 2008; Chandra *et al.*, 2014; Arambaši *et al.*, 2014).

El análisis Probit actúa como una transformación de sigmoide a lineal y luego ejecuta una regresión en la relación. Una vez que se ejecuta una regresión, se puede usar el resultado del análisis Probit para comparar la cantidad de sustancia química requerida para crear la misma respuesta en cada una de las diversas sustancias en estudio; usualmente para comparar las diferentes toxicidades de los productos se utilizan métodos como la DL50/LC50 en el cual se obtiene respuesta del 50% de la población; este tipo de resultados son los experimentos modernos más utilizados de dosis-respuesta (vicent, 2008; Arambaši, *et al.*, 2014; M.Suseela *et al.*, 2015).

4.3.1.2 Relación dosis-efecto: es la relación entre la dosis y el efecto a nivel individual; un aumento de la dosis puede incrementar la intensidad de un efecto o su gravedad, estas características nos permiten obtener una curva de dosis-efecto a nivel de todo el organismo. Hay algunos efectos tóxicos, como la muerte o el cáncer, que no tienen grados, sino que son efectos de un “todo”, más no un término medio (Stellman, 1998).

4.3.1.3 Relación dosis-respuesta: es la relación entre la dosis y el porcentaje de individuos que presentan un determinado efecto. Al incrementarse la dosis lo normal es que aumente el número de individuos afectados en la población expuesta (Stellman, 1998).

4.3.1.4 Dosis efectiva (DE): dosis calculada estadísticamente, de un agente químico o físico (radiación) que se espera que produzca un efecto determinado en un sistema biológico dado (IUPAC, 1993).

4.3.2 Tóxico: cualquier agente químico o físico capaz de inducir un efecto adverso para un organismo vivo (Duffus, 1993).

4.3.3 Toxicidad: capacidad para producir daño a un organismo vivo, en relación con la cantidad o dosis de sustancia administrada o absorbida, la vía de administración y su distribución en el tiempo (Duffus, 1993).

4.3.3.1 Toxicidad aguda: La toxicidad aguda de una sustancia química se refiere a los efectos adversos que se manifiestan tras la administración por vía oral, cutánea, intravenosa u intramuscular de una sola dosis de dicha sustancia (Gutierrez & Lopez, 2001; Repetto, 2010).

4.3.4 Citotoxicidad: la citotoxicidad es la cualidad de ser tóxico para las Células. Estas pueden experimentar necrosis, en la que pierden integridad de membrana y mueren como resultado de la lisis celular; pueden dejar de crecer y dividirse; o activar un programa genético de muerte celular controlada, denominado apoptosis (Duffus, 1993).

4.3.4.1 Índice Mitótico (IM): permite calcular el porcentaje de células en división celular respecto al número total de células contabilizadas; un aumento en el IM indica un posible efecto sobre el control de la división celular, el cual puede ser inducido por un agente mitogénico. La disminución del mismo indica un bloqueo en el ciclo ocasionando un posible daño en los mecanismos de la mitosis o apoptosis (Rojas & cols 1993; Hoyos *et al* 2002).

- Índice Mitótico (IM) =
$$\frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células en división celular}}{\text{Total de células analizadas}} \times 100$$

4.3.5 Genotoxicidad: un agente genotóxico es aquel compuesto de naturaleza química, física o biológico capaz de inducir, directa o indirectamente, alteraciones en el material genético de los seres vivos llevando a la aparición de mutaciones que derivan en patologías y/o cambios en las características de un organismo (Suárez y Soberón, 2009; Turrado, 2014). El daño inducido incluye no sólo al ADN, sino también a todos aquellos componentes celulares que se encuentran relacionados con la funcionalidad y comportamiento de los cromosomas dentro de la célula (Abrevaya, 2008).

4.3.5.1 Alteraciones cromosómicas (AC): las (AC) son una de las consecuencias biológicas importantes de la exposición humana a la radiación ionizante y otros agentes genotóxicos; en estudios epidemiológicos, se ha demostrado que las personas con frecuencias elevadas de AC en sus linfocitos de sangre periférica tienen un riesgo significativamente elevado de desarrollar cáncer (Obe *et al.*, 2002). Las AC se analizaron por primera vez en la década de 1930 por Karl Sax y colegas, utilizando microsporas de polen de *Tradescantia* (Sax, 1938, Tucker & Preston, 1996). Este biomarcador detecta cambios citológicos que afectan al número o la estructura de los cromosomas que constituyen el cariotipo de una especie; estas alteraciones corresponden a rupturas y rearrreglos en el mismo o entre diferentes cromosomas (Gomez, 2007). Los cambios en la estructura o número de cromosomas pueden ocurrir espontáneamente o por efecto de radiaciones, agentes químicos o biológicos (Mateuca *et al.*, 2012). Las AC se han usado como biomarcadores de exposición ocupacional o ambiental por más de 30 años, para evaluar el daño genotóxico (Mateuca *et al.* 2012) y son considerados como un biomarcador de efectos tempranos en la predicción de cáncer (Hagmar *et al.*, 2004, Bonassi *et al.*, 2008, Rupa *et al.*, 1989, Carbonell *et al.*, 1993; Kaiomova & Khabutdinova 1998; Cuenca & Ramírez 2004; Zeljezic *et al.*, 2009; Gomez *et al.*, 2013).

4.3.6 Mecanismos de tinción diferencial de los cromosomas en metafase sustituidos con Bromodeoxiuridina (BrdU): la tinción diferencial con BrdU se basa en tres principios; 1) que la replicación del ADN es de naturaleza semiconservativa, 2) la estructura de la cromátida es compuesta por una doble hélice simple y 3), que los cromosomas se segregan aleatoriamente en la división celular (Schneider *et al.*, 1978). Después de un ciclo de replicación en presencia de BrdU, ambas cromátidas contienen una cadena de ADN sustituida con BrdU (líneas discontinuas) y una cadena de ADN parental no sustituida (líneas continuas). Estas cromátidas son bioquímicamente idénticas y, por lo tanto, tienen intensidades iguales cuando se tiñen con un colorante fluorescente o no fluorescente. Después de dos ciclos de replicación en presencia de BrdU, una cromátida tiene su ADN uniformemente sustituido con BrdU, mientras que la cromátida hermana está bifilamente sustituida con BrdU. Las cromátidas que contienen ADN sustituido de forma bifilar fluorescen menos intensamente que sus

cromátidas hermanas sustituidas uniformemente cuando se tiñen con colorante fluorescente tal como Hoechst 33258, AO o DAPI, y tienen una tinción de Giemsa disminuida con microscopio óptico. Después de tres ciclos de replicación en presencia de BrdU, la mitad de la longitud cromosómica solo tiene ADN bifilarmente sustituido y fluoresce con fluorescencia igualmente disminuida o con tinción de Giemsa disminuida de forma equivalente. La longitud cromosómica restante tiene cromátidas que se asemejan bioquímicamente a los segundos cromosomas del ciclo de replicación y, por lo tanto, tienen propiedades de tinción diferencial similares. Esta capacidad para identificar inequívocamente células que se han replicado una, dos, tres o más veces en presencia de BrdU ha llevado el uso de esta técnica para el análisis del ciclo celular (Tice *et al.*, 1976; Schneider *et al.*, 1977; citado por Schneider *et al.*, 1978).

4.3.6.1 Metafases de primer ciclo: se analizan para alteraciones cromosómicas en metafases de primer ciclo de división debido a que muchas aberraciones cromosómicas se pierden o aparecen en forma alterada en subsecuentes divisiones celulares (Schneider *et al.*, 1978; Hoyos *et al.*, 2002)

5 ANTECEDENTES

Tabla 1. Antecedentes Tóxicos, Citotóxicos y Genotóxicos

Autores	Sistema biológico	Plaguicida/sal	TTO	Efecto	Detalles
Ebert, Leist, & Mayer, 1990	Ratones, Ratas, Perros y conejos.	Sal / Glufosinato de amonio y formulada.	<i>In vivo</i> e <i>in vitro</i>	Negativo	Se evaluó la toxicidad y genotoxicidad de la sal de amonio por las vías oral, subcutánea, intraperitoneal y dermal. Los animales utilizados fueron perros, ratones, ratas y conejos, los cuales se sometieron a diferentes tipos de tratamientos de acuerdo a la toxicidad aguda, subcrónica o prolongada, crónica y oncogénica y mutagenicidad. Las dosis fueron relativamente variadas de acuerdo a las características de los tipos de toxicidad y diferentes diseños experimentales. Finalmente determinaron que la toxicidad del GLA no representaba peligro mutagénico en animales experimentales.
Hack, Ebert, Ehling, & Leist, 1994	Perros y Ratas.	Sal / Glufosinato de amonio.	<i>In vivo</i> e <i>In vitro</i>	Negativo	Se evaluó aspectos del modo de acción, en los tejidos y a nivel enzimático en diferentes órganos bajo parámetros como toxicidad aguda; para lo cual se emplearon cuatro grupos de ratas winstar, y en toxicidad subcrónica; evaluado en cinco grupos de ratas winstar y en tres grupos de perros beagle. Las vías de administración fueron Intraventricular y oral. Se concluyó que bajo usos recomendados los herbicidas que contengan GLA como principio activo no representan un peligro.
Tomoko, 1996	Ratas	Sal /Glufosinato de amonio	<i>In vivo</i>	Positivo	Se evaluaron los efectos latentes y funcionales de una pequeña dosis de GLA en la función cerebral en animales juveniles. Se examinaron las ratas expuestas a GLA para las neuronas glutaméricas usando la respuesta al ácido Kaínico. El ácido kainico posee un receptor subtipo de glutamato en el cerebro e induce el comportamiento de los wet-dog y las convulsiones límbicas típicas notablemente en el hipocampo y la amígdala. Se inyectaron subcutáneamente (sc) ratas hembra

					Wistar-Imamichi de siete días de edad con diferentes dosis durante 7 días. El GLA se disolvió en agua desionizada. Las ratas fueron destetadas a las 3 semanas de edad y evaluaron la respuesta al ácido kaínico a las 5 ó 6 semanas de edad.
Watanabe & Iwase, 1996	Ratones	Sal / Glufosinato de amonio.	<i>In vitro</i>	Positivo	Se examinó si el glufosinato podría afectar el crecimiento embrionario y el desarrollo en ratones utilizando embriones. Los ratones preñados fueron sacrificados por dislocación cervical en los días 8 y 10 de gestación. Se recogieron embriones de cada útero y se prepararon para el cultivo. Se encontró que el glufosinato de amonio causó defectos craneales en los embriones. El glufosinato afectó especialmente al neuroepitelio de la vesícula cerebral y del tubo neural, lo que condujo a la muerte celular neuroepitelial. Sin embargo se necesitan más estudios para determinar el mecanismo bioquímico por el cual el glufosinato ejerce embriopatía.
Koyama et al., 1997	Ratas	Herbicida BASTA, Sal/Glufosinato de amonio y Sodiumpolyoxyethylene alkylether sulfate (AES)	<i>In vitro</i> e <i>in vivo</i>	Positivo	Se intentó explicar el componente exacto y su modo de acción responsable de los efectos cardiovasculares directos del herbicida, investigando independientemente los efectos de BASTA (herbicida comercial), GLA (Sal) y AES (tensoactivo del herbicida) sobre el sistema cardiovascular en ratas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . Se concluye que los efectos de BASTA en experimentos <i>in vivo</i> no son causados por el componente principal, GLA, sino que son causados principalmente por AES a través de sus efectos vasodilatadores más efectos cardioestimuladores en dosis bajas y efectos cardiosupresores en dosis altas.
Watanabe, 1997	Ratones	Sal / Glufosinato de amonio	<i>In vitro</i>	Positivo	Se examinó la muerte celular inducida por el glufosinato sobre el neuroepitelio de embriones de ratón. La micrografía electrónica reveló condensación y segregación de cromatina, cuerpos apoptóticos extracelulares y fragmentos celulares fagocitados por macrófagos en el neuroepitelio de la vesícula cerebral y el tubo neural. Se concluye que la

					exposición por GLA induce apoptosis en el neuroepitelio de los embriones.
Matsumura, et al., 2001	Ratones	Sal /Glufosinato de amonio.	<i>In vivo</i>	Positivo	Debido a las similitudes estructurales entre el glufosinato y el glutamato, la convulsión inducida por el glufosinato de amonio se puede atribuir a la activación del receptor de glutamato. Tres antagonistas del receptor de N-metil-D-asparato (NMDA), dizocilpina, LY235959 y Compuesto 40, y un antagonista del receptor de amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-ácido propiónico (AMPA) / kainato, NBQX, se administraron conjuntamente con glufosinato de amonio (80 mg / kg, por vía intraperitoneal) en ratones. Se concluyó que la convulsión causada por el glufosinato de amonio está mediada por los receptores NMDA.
Ori,Anaka, Ujisawa, &Himada, 2003	Humanos	Herbicida Basta	<i>In vivo</i>	No aplica	Caso Clínico: Se encontró que el glufosinato(DL- GLUF) se distribuyó en el líquido cefalorraquídeo en el envenenamiento con glufosinato. Un japonés de 50 años de edad (pesando 67 kg) intentó suicidarse ingiriendo aproximadamente 100 ml de BASTA (que contenía DL- GLUF 18,5 g, relación de D-GLUF a L- GLUF: 1: 1). Se observó depresión respiratoria grave 26 h después de la ingestión, y se le suministró tratamiento con ventilación artificial.
Schulte-Hermann et al., 2006	No aplica	Herbicida BASTA y Sal	Revisión retrospectiva	Negativo	El Grupo de Evaluación de SciencePartners (Grupo de Evaluación) ha realizado un análisis independiente del herbicida glufosinato-amonio (GA) en relación con su potencial de causar toxicidad reproductiva en seres humanos.
Calas et al., 2008	Ratones	Sal / Glufosinato de amonio.	<i>In vivo</i>	Positivo para 5 y 10 mg / kg, los cuales inducen (1) alteraciones leves de	Los ratones C57BL / 6J fueron tratados durante 10 semanas tres veces a la semana con 2,5, 5 y 10 mg / kg de GLA. Los efectos de este tratamiento crónico se evaluaron a nivel de comportamiento, Estructural y metabólico utilizando pruebas de memoria espacial, actividad locomotora y ansiedad, análisis de textura de resonancia magnética del hipocampo (MRI) y ensayo de actividad

				la memoria	del hipocampo GS, respectivamente.
Fabian et al., 2011	Ratones	Herbicida BASTAS-15	<i>In vitro</i> e <i>In vivo</i>	Positivo para la intoxicación materna con BASTA-15; podría afectar el desarrollo de los embriones de preimplantación	En este estudio se evaluó el posible efecto del envenenamiento materno por BASTA-15 sobre las capacidades de desarrollo y la calidad de los embriones pre-implantables. Durante las pruebas <i>in vivo</i> , los ratones fertilizados se alimentaron con varias dosis de BASTA-15 durante varios días. Durante los ensayos <i>in vitro</i> , los embriones aislados se cultivaron en un medio con la adición de herbicida o su compuesto principal glufosinato de amonio.
Faro, Ferreira Nunes, Alfonso, Ferreira, & Durán, 2013	Ratas	Herbicida GLA	<i>In vivo</i>	Positivo; hay producción de NO a través del efecto del GLA. Además se observó bloqueo parcial de la liberación de dopamina tras la administración de receptores antagonistas del NDMA	Se evaluó el posible papel de los receptores glutamatérgicos y la producción de óxido nítrico (NO) en los efectos del glufosinato amónico (GLA), un pesticida estructuralmente relacionado con el glutamato, en la liberación <i>in vivo</i> de dopamina estriatal <i>in vivo</i> en estado despierto y en movimiento del animal. Para ello, se utilizaron antagonistas de los receptores NMDA (MK-801 y AP5) o AMPA / kainato (CNQX), o inhibidores de la óxido nítrico sintasa (NOS) (L-NAME y 7-NI) para estudiar los efectos del GLA en la liberación de dopamina del estriado de rata.
Inoue et al., 2013	Humanos	Herbicida: Basta®, Hayabusa® y Basta 0,2®.	Restrospectiva de pacientes <i>in vivo</i> .	No aplica	Este estudio es una serie de casos observacionales retrospectivos. Los sujetos fueron 16 pacientes que presentaron intoxicación aguda por glufosinato. Se dividieron en un grupo con paro respiratorio o convulsión durante la hospitalización (grupo grave) y un grupo sin (grupo no severo).

Laugeray et al., 2014	Ratones	Sal /Glufosinato de amonio	<i>In vivo</i>	Positivo	Este trabajo proporciona nuevos datos sobre el vínculo entre la exposición pre y postnatal a El herbicida GLA y la aparición de síntomas similares al autismo. También plantea preocupaciones fundamentales acerca de la capacidad de las actuales pruebas de seguridad para evaluar los riesgos de exposición a los pesticidas durante los períodos de desarrollo críticos. Estas alteraciones del comportamiento mostraron un sorprendente parecido con los cambios observados en los modelos animales de trastornos del espectro autista.
Lajmanovich et al., 2014	<i>Rhinella arenarum</i>	Herbicida: Liberty®, LY®	<i>In vivo</i>	Negativo	Se investigaron los cambios en algunos parámetros de células sanguíneas circulantes de renacuajos del sapo común (<i>Rhinella arenarum</i>) expuestos durante 48 o 96 h a tres concentraciones subletales de una formulación comercial de un herbicida a base de glufosinato amonio (GLA) (Liberty®, LY®). La frecuencia de MN y otras anomalías nucleares eritrocíticas (ENA, es decir, núcleos lobulados, binucleados o núcleos segmentados, núcleos en forma de riñón, núcleos dentados, Y núcleos picnóticos) se compararon con controles positivos (ciclofosfamida, CP, 40 mg / L) y negativos (agua del grifo desclorada).
Calas et al., 2016	Ratones*	Sal / Glufosinato de amonio	<i>In vivo</i>	No aplica	En el ratón, el tratamiento intraperitoneal con 75 mg / kg de GLA genera convulsiones tónico-clónicas repetitivas asociadas con un 100% de mortalidad dentro de las 72 h posteriores al tratamiento. En este contexto se caracterizó las convulsiones inducidas por GLA, sus consecuencias histológicas y la efectividad del tratamiento con diazepam.
Herzine et al., 2016	Ratones	Sal / Glufosinato de amonio	<i>In vivo</i>	Positivo	Se demostró que la exposición perinatal a dosis bajas de GLA induce alteraciones en la proliferación de neuroblastos dentro de la zona subventricular (SVZ). Estos trastornos no sólo son concomitantes a los cambios en la morfología celular, la proliferación y la apoptosis, sino que también están asociados con los cambios

					transcriptómicos.
Gonzalez et al., 2018	Ratones	Sal/Glufosinato de amonio	<i>In vivo</i>	Positivo	El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del GLA sobre la calidad de los espermatozoides y de su ADN después de haber sido expuestos al producto, mientras se encontraban en la fase de espermatida temprana o en la fase de espermatozoide en proceso de maduración epidídimal.

6 OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad *in vivo* del herbicida Glufosinato de amonio en su forma comercial (FINALE) en médula ósea de ratón *Albino Suizo*.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer la DL50 y describir signos de toxicidad del herbicida FINALE en ratones *Albino suizo*.
- Identificar la capacidad citotoxicidad del herbicida FINALE en ratones *Albino suizo*.
- Determinar la genotoxicidad del herbicida FINALE en ratones *Albino suizo*.

7 METODOLOGÍA

Este estudio es de tipo experimental, donde se utilizaron ratones de laboratorio *Albino suizo* de la cepa ICR. En una primera fase se calculó la dosis letal cincuenta (DL50) del herbicida FINALE por el método de Finney, seguido por la caracterización de los efectos tóxicos mediante un cuadro de presencia-ausencia (Anexo I) y finalmente la evaluación citogenética. Las variables independientes fueron las dosis suministradas y las dependientes los posibles efectos tóxicos, citotóxicos y genotóxicos.

7.1 ANIMALES Y CONDICIONES EXPERIMENTALES

Se utilizaron 90 ratones machos *Albino Suizo* de la cepa ICR con edades entre 8 y 12 semanas de edad (biomodelos certificados para pruebas experimentales, suministrados por VECOL), de los cuales, cincuenta se utilizaron en el bioensayo de DL50 y 40 en ensayos citogenéticos. Estos animales se aclimataron a condiciones de laboratorio (ciclo Luz/oscuridad natural, temperatura ambiente $23\pm 15^{\circ}\text{C}$), se les administró una dieta con alimento especial para roedores "LabDiet" y se les proporcionó agua de grifo.

7.2 PREPARACIÓN Y ADMINISTRACIÓN DE LAS DOSIS

El herbicida fue previamente diluido en un factor 1:1 con agua de grifo, como solución de trabajo. Los ratones estuvieron en ayuno cuatro horas antes de la dosificación. El compuesto se administró utilizando una aguja de punta redonda mediante gavage (Fig 1) con una dosis única (dosis aguda). El volumen de la dosis fue proporcional al peso de los animales; el grupo control negativo estuvo sometido al método de Gavage con agua para mantener las mismas condiciones de manejo con respecto al resto de los animales tratados (Chandra et al., 2014).



Figura 1. Administración de dosis oral de herbicida FINALE mediante el método de gavage con aguja de punta redonda.

7.3 ESTIMACIÓN DE RANGO DE DOSIS Y PORCENTAJE DE MORTALIDAD; DL50

Se seleccionaron cuatro dosis del herbicida FINALE (solución de trabajo) partiendo de una dosis referencia de 436mg/kg (Inoue, 1982; Ebert et al., 1990) y un control negativo con agua de grifo (no aplica para control positivo) (Chandra et al., 2014; M.Suseela et al., 2015); se utilizaron cincuenta ratones, los cuales fueron observados durante 24 horas para identificar signos y síntomas tóxicos. Después de 24 horas, se contó el número de muertes en cada grupo, los cuales estaban conformados de diez, donde finalmente se calculó el porcentaje de mortalidad, el cual se transformó a Probit usando el método de Finney para el cálculo estadístico de la DL50 (Chandra et al., 2014).

7.3.1 Dosis subletales: una vez establecida la DL50 se establecieron seis dosis sub-letales; definidas como Alta o máxima tolerada (80% de la DL50), alta 3 (70% de la DL50), alta 2 (60% de la DL50), alta 1 (50% de la DL50), media (40% de la DL50) y baja (20% de la DL50) (Tabla 1) con las cuales se procedió a la evaluación de la citotoxicidad y genotoxicidad en la cual se evaluó las posibles alteraciones que estas dosis sub-letales podrían inducir.

Tabla 1. Tratamientos y dosis sub-letales del herbicida FINALE y controles utilizados en citogenética

GRUPOS DE EVALUACIÓN	TRATAMIENTO	(%) CON RESPECTO A DL50	DOSIS	
CN	Agua	-----	0,2 ml*	
	Baja	20%	97,2mg/kg	
	Media	40%	194,4mg/kg	
	Grupo experimental	Alta 1	50%	243mg/kg
		Alta 2	60%	291,6,mg/kg
		Alta 3	70%	340,2mg/kg
		MaxT	80%	388,8mg/kg
CP	Ciclofosfamida	-----	5mg/kg	

CN: control negativo (agua)

X*: cantidad (ml) total suministrada al animal independiente de su peso

CP: control positivo (ciclofosfamida)

-----: No aplica para los controles positivo y negativo.

7.4 PRUEBAS CITOGÉNÉTICAS

Para la evaluación del potencial Genotóxico y Citotóxico, los animales se distribuyeron aleatoriamente en cinco grupos de ocho ratones. En cada grupo experimental se utilizaron tratamientos diferentes; un control negativo y otro positivo más las seis dosis sub-letales previamente calculadas a partir de la DL50 (Tabla 1). El control negativo se trató con agua de grifo, sometiendo al animal a la técnica de gavage. El control positivo fue tratado con ciclofosfamida vía intraperitoneal y las dosis subletales del herbicida FINALE fueron suministradas vía oral mediante gavaje. El proceso citogenético inició con la implantación de la bromodeoxiuridina (BrdU) (Mannheim Boehringer) (fig. 2a); pasada una hora se le administró un respectivo tratamiento (Dosis baja, media, alta 1, alta 2, alta 3, máxima tolerada, control positivo y negativo) (Fig. 1). Después de 22 horas de la implantación de la BrdU se inyectó por vía intraperitoneal Vinblastina (SIGMA Company) (detiene el ciclo celular) (fig 2b). Finalmente cumplidas las 24 horas se procedió a sacrificar los animales por dislocación cervical, para la extracción de los fémures y cosechar las células de la médula ósea del ratón (Hoyos *et al.*, 2002).

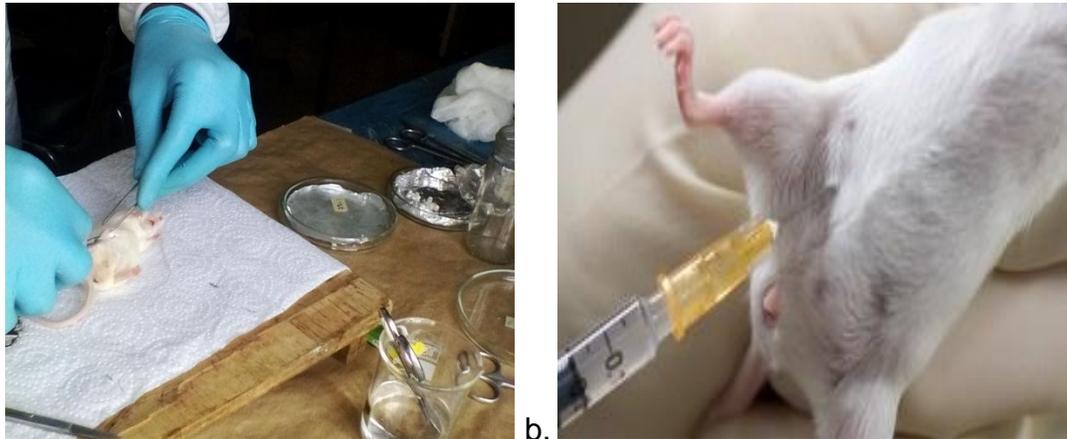


Figura 2 a. Implantación de Bromodeoxiuridina (BrdU); b. Inyección intraperitoneal, tomado de [Procedures With Care, 2018]

7.4.1 Implantación de Bromodeoxidurina (BrdU): Tabletas BrdU de 25mg y cubiertas parcialmente con parafina, (Boehringer Mannheim, Catálogo # 586064) se implantaron debajo de la piel en la región abdominal de cada ratón (8-12 semanas) previamente anestesiados con cloroformo, haciendo una pequeña incisión; luego se cerró la incisión con grapas especiales. Este procedimiento se realizó bajo luz amarilla. El cubrimiento parcial con parafina permite la correcta absorción de la BrdU (McFee & cols 1983; Hoyos *et al.*, 2002).

6.4.2 Cosecha de células de médula ósea: después de las 24 horas de implantación de la BrdU, se sacrificaron los ratones y se procedió a remover los dos fémures de cada ratón, para la extracción de células de médula ósea, utilizando una aguja de insulina con Buffer Salino Fosfato (PBS), previamente calentado a 37°C. La jeringa de insulina se inyectó a través de la médula ósea aspirando y lavando consecutivamente hasta haber sacado la mayor cantidad de células de médula ósea, que fueron recolectadas simultáneamente en un tubo falcon de 15mL. Las células fueron sometidas a centrifugación de 800-1000 r.p.m y luego incubadas con solución hipotónica (0,075 Mde KCl) a 37°C, con el fin de expandir las células. Pasada media hora, se agregó fijador carnoy's bien frío (3:1 metano - ácido acético glacial) con el objeto de parar la acción de la solución hipotónica. Las muestras se sometieron nuevamente a centrifugación por cinco minutos; por consiguiente, se le removió sobrenadante y se le agregó nuevamente carnoy's frío y posteriormente se dejó en refrigeración durante 30 minutos; dando inicio a 2 lavados con carnoy's y centrifugación intermedia entre un lavado y otro a 800-1000 r.p.m. Finalmente las muestras de médula ósea de ratón fueron goteadas en placas frías previamente sumergidas en ácido acético al 60%.

7.4.2.1 Preparación de las placas para goteo de muestras: las placas fueron lavadas con ácido acético al 60% y flameadas un día antes de la cosecha de

médula ósea de ratón, con el propósito de dejar sumergidas las placas en un coplin con ácido acético debidamente refrigerado (Hoyos *et al.*, 2002).

7.4.3 Tinción diferencial: para iniciar tinción, las placas fueron secadas a temperatura ambiente mínimo tres días; luego se inició el procedimiento de tinción partiendo de treinta (30) minutos en coloración de Hoechst 33258 (Sigma Aldrich), en seguida, se lavaron a través de tres cambios de agua destilada, para sumergirlos posteriormente en un coplin con buffer MacIlvane (se retira la placa), después se gotearon las placas con el buffer hasta cubrir toda la muestra; éstas se irradian en luz de mercurio por veinte (20) minutos. Finalmente, las placas se tiñeron con solución Giemsa (Sigma Aldrich) al 10% por seis (6) minutos (Goto *et al.*, 1975), una vez secas las placas, fueron montadas permanentemente con Entellan (Merck KGaA).

7.4.4 Identificación de Aberraciones cromosómica: se analizan solamente células completas, es decir; que contengan 40 cromosomas. Se da lectura de al menos 100 metafases en primer ciclo de división por animal (fig. 3) (Hoyos *et al.*, 2002).

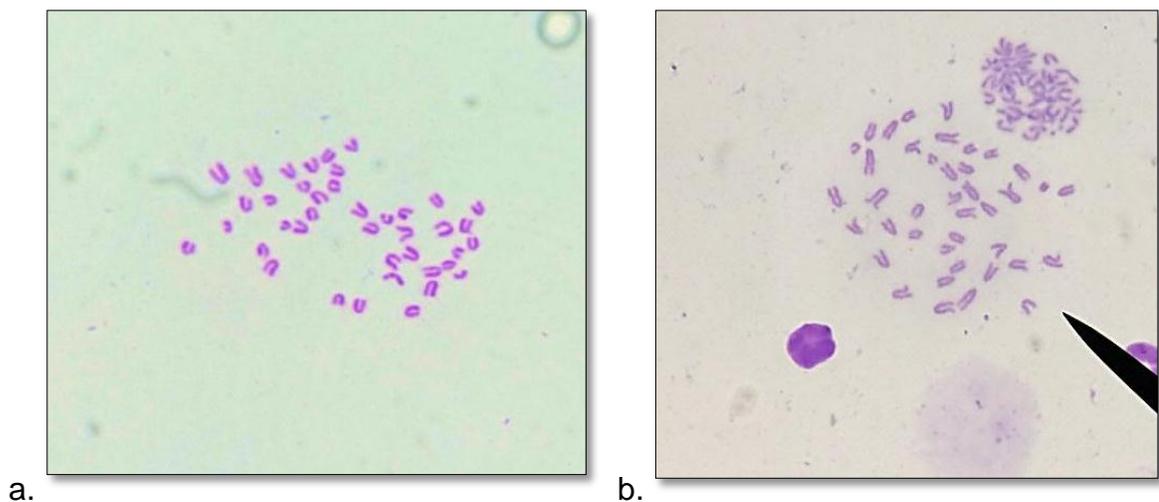


Figura 3. Metafases de primer ciclo de división

7.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

7.5.1 Método estadístico DL50: La LD50 se determinó mediante el método de regresión logarítmica / regresión Probit (Finney, 1971). Se realizaron cinco ensayos que contenían 10 ratones cada uno y se administraron cuatro dosis del herbicida FINALE a una concentración de 75g de herbicida en 5ml de agua, vía oral. Las dosis fueron 386mg/kg, 436mg/kg, 486mg/kg y 536mg/kg de peso de ratón, más una dosis de agua (2ml) como control negativo. Partiendo de los porcentajes de mortalidad por cada ensayo, se transformaron dichos valores en

probit empleando el método de finney (tabla 2), la cual se trazó gráficamente entre los valores probit obtenidos y las dosis log; luego se calculó LD50 con la ayuda del cálculo de la regresión lineal (Finney, 1971; Chandra *et al.*, 2014)

7.5.2 Método estadístico para análisis citogenético: Los efectos de genotoxicidad y citotoxicidad fueron analizados usando el Programa R (v 3.4.4). Inicialmente se realizó la prueba bondad de ajuste de los datos, con la prueba de Anderson-Darling, usando el paquete estadístico Nortest (Gross & Ligges, 2015), se encontró que ninguna de las variables de respuesta tuvieron distribución normal, motivo por el cual se procedió a ajustar modelos lineales generalizados mixtos; como la variable de respuesta del presente estudio fueron conteos de eventos (alteraciones) a nivel celular y genético, la distribución a la que se ajustó el modelo fue de tipo Poisson.

Los modelos lineales generalizados se construyeron con el paquete lsmeans (Lenth, 2016), usando las dosis como factores fijos y la repetición como factor aleatorio, lo que reduce la parcialidad de las observaciones. Posteriormente se realizaron comparaciones múltiples usando el paquete Multcomp (Hothorn et al. 2017) con el ajuste de Bonferroni, que disminuye la probabilidad de cometer error tipo I, finalmente se realizaron los agrupamientos entre los tratamientos usando el paquete lsmeans (Lenth, 2016).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 TOXICIDAD

8.1.1 Dosis letal cincuenta (DL50): en el presente estudio, la mortalidad de los ratones fue determinada por dosis orales del herbicida FINALE (GLA como compuesto activo). Las dosis fueron desde 386mg/g a 536mg/kg de ratón. La mortalidad se ilustró en términos de porcentaje con respecto a las dosis suministradas (Tabla 2).

Los animales fueron expuestos a diferentes dosis de FINALE, donde su mortalidad mostró un efecto dosis-respuesta; partiendo del 10% de mortalidad a una dosis de 386mg/kg, 20% a 436mg/kg, 50% a 486mg/kg, y 70% a 536 mg/ kg de ratón (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados de las dosis del herbicida FINALE para la determinación de la DL50 administradas vía oral en ratones Albino suizo de la cepa ICR

DOSIS (mg/Kg)	LOGDOSIS	N° ANIMALES		%MORTALIDAD	%CORREGIDO	PROBIT
		Iniciales	Muertos			
(Agua)	-----	10	0	-----	-----	-----
386	2,58658	10	1	10	10	3,72
436	2,63948	10	2	20	20	4,16
486	2,68663	10	5	50	50	5
536	2,72916	10	7	70	70	5,52

Agua: control negativo
----- : no aplica

La representación gráfica de mortalidad porcentual versus concentración logarítmica y mortalidad Probit versus concentración logarítmica del herbicida FINALE (tabla 2) mostró una curva sigmoidea típica (Gráfico 1) y una línea recta (Gráfico 2) respectivamente que están de acuerdo con el principio del análisis Probit (Finney, 1971).

8.1.1.1 Conversión de porcentajes de mortalidad a probit y cálculo de la DL50. Los animales muertos en cada nivel de dosis fueron transformados a probit (tabla 3).

Tabla 3 Transformación de porcentaje de mortalidad a probit, método de Finney

Percentage	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	2.67	2.95	3.12	3.25	3.36	3.45	3.52	3.59	3.66
10	3.72	3.77	3.82	3.87	3.92	3.96	4.01	4.05	4.08	4.12
20	4.16	4.19	4.23	4.26	4.29	4.33	4.36	4.39	4.42	4.45
30	4.48	4.50	4.53	4.56	4.59	4.61	4.64	4.67	4.69	4.72
40	4.75	4.77	4.80	4.82	4.85	4.87	4.90	4.92	4.95	4.97
50	5.00	5.03	5.05	5.08	5.10	5.13	5.15	5.18	5.20	5.23
60	5.25	5.28	5.31	5.33	5.36	5.39	5.41	5.44	5.47	5.50
70	5.52	5.55	5.58	5.61	5.64	5.67	5.71	5.74	5.77	5.81
80	5.84	5.88	5.92	5.95	5.99	6.04	6.08	6.13	6.18	6.23
90	6.28	6.34	6.41	6.48	6.55	6.64	6.75	6.88	7.05	7.33

*Tomada de chandra *et al.*, 2014

Los valores Probit se trazan frente a las dosis logarítmicas y luego se relaciona la dosis correspondiente a Probit 5, el cual nos representa el 50% de los animales que respondieron a los tratamientos con herbicida FINALE, es decir; la DL50 (gráfico 2). En el presente caso, el Log LD50 es 2,69 y LD50 = 486 mg / kg.

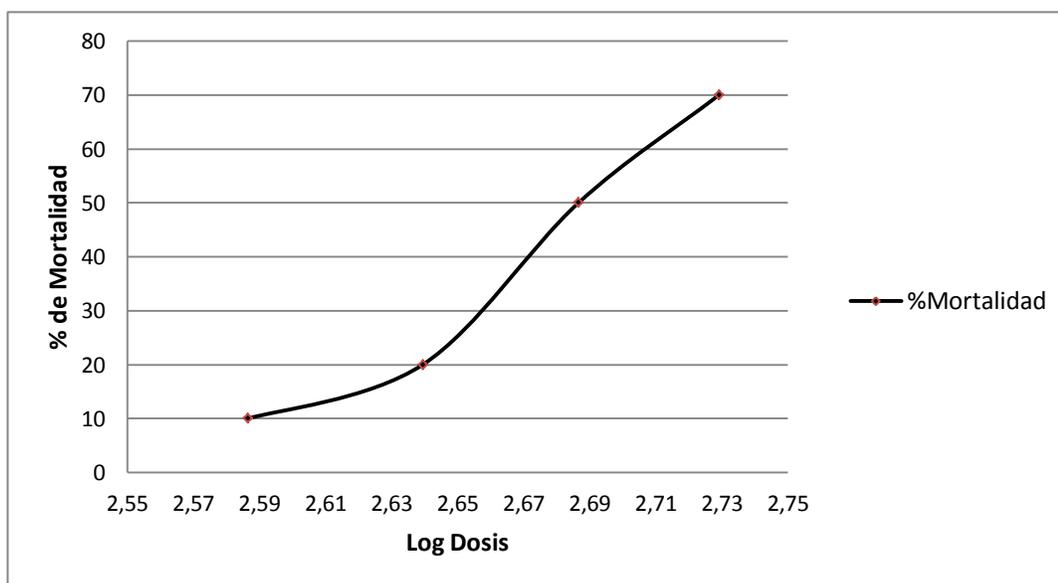


Gráfico 1. Curva sigmoide, % Mortalidad vs LogDosis. Curva dosis efecto, en la cual los puntos muestran los datos experimentales.

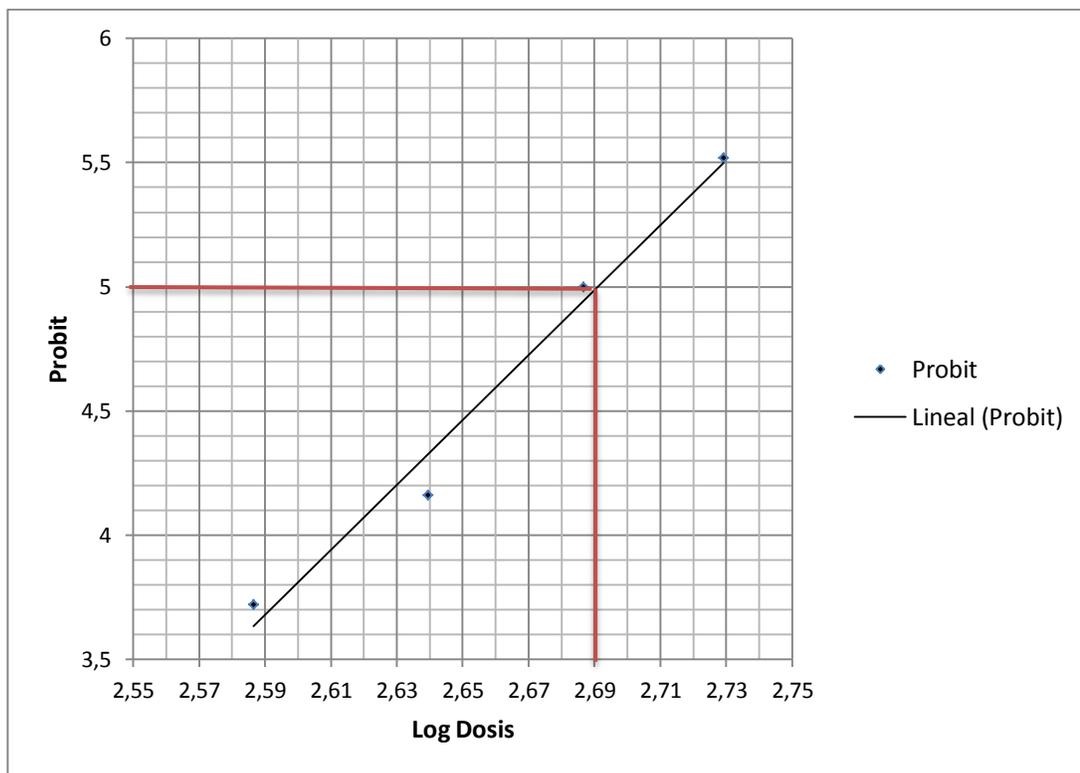


Gráfico 2. Regresión lineal probit vs LogDosis de FINALE. La línea negra representa la solución de la ecuación de probit en función del logaritmo de la dosis de FINALE; la línea roja indica la interpolación de la DL50. Los “puntos” muestran los datos experimentales.

Cada plaguicida puede variar mucho dependiendo del grado de toxicidad y las propiedades de cada uno de sus componentes; dado que la evaluación de la toxicidad de una sustancia problema es un fenómeno sensible, que puede estar influenciado por varios factores, como el tamaño del animal, el estado nutricional, especificidad de especie (incluyendo el grado de susceptibilidad a un determinado componente), peso del animal, su etapa de desarrollo, tiempo de exposición y temperatura; por lo tanto, son varios los factores que pueden estar involucrados en cómo un determinado químico, en este caso herbicida, pueda estar influyendo en una especie, aun cuando lo que se va a obtener es un dato estadístico como lo es la LD50 (M.Suseela, *et al.*, 2015).

La DL50 oral del compuesto activo del herbicida FINALE /GLA, ha sido reportado en ratones y ratas desde 1980 (Wolterink *et al.*, 2012) con los siguientes datos: para ratones de la cepa NMRI, machos y hembras, la DL50 fue de 431 y 416 mg/kg de peso corporal respectivamente, en ambos como solvente vehículo se utilizó agua desionizada (Mayer & Weigand, 1980a; Mayer & Weigand, 1980b; Wolterink *et al.*, 2012), en ratones de la cepa ICR machos y hembras reportaron que la DL50 era 436 y 464 mg/kg de peso corporal respectivamente, en este caso

utilizaron como vehículo agua salina (Inoue, 1982), y para las ratas de la cepa Wistar la DL50 fue 2000mg/kg de peso corporal utilizando como solvente vehículo agua desionizada (Mayer & Weigand, 1980c; Wolterink *et al.*, 2012), sin embargo en ratas de la cepa F344 en un reporte de 1990 por E. Ebert y colaboradores la DL50 para machos y hembras fue de 1660 y 1510 mg/kg de peso corporal respectivamente, habiendo variaciones con respecto a las DL50 entre estas cepas. En términos generales, se puede asumir que en murinos el valor de la DL50 puede estar sujeto a la cepa de la especie y al vehículo que se utilice para suministrar las dosis; ya que por cuestiones de afinidad/químicas puede haber variaciones en el resultado esperado (chandra *et al.*, 2014); en el caso de este estudio, como vehículo se utilizó agua de grifo, en pro de diseñar un experimento aplicado al uso al que es sometido el herbicida cuando se administra en plantaciones agrícolas, partiendo que lo que se quiere verificar es a qué grado el empleo del herbicida FINALE (mezcla comercial) puede representar un riesgo en términos tóxicos para la población, ya que las investigaciones anteriores con respecto a la DL50, están basadas en el compuesto activo que es el GLA y no a la mezcla comercial (Mayer & Weigand, 1980a; Mayer & Weigand, 1980b, Inoue, 1982, E. Ebert *et al.*, 1990).

En este estudio, se calculó la DL50 para la mezcla comercial FINALE, el cual tuvo un valor de 486mg/kg de peso corporal (Tabla 2); en contraste para lo reportado por Inoue, 1982; para ratones machos de la misma cepa tratados con el compuesto activo fue 436mg/kg de peso corporal; concluyendo que en términos de toxicidad aguda, el compuesto activo podría ser más nocivo que la mezcla comercial/FINALE; ya que la cantidad en miligramos que se requiere para causar letalidad al 50% de la población es menor para el compuesto activo; sin embargo, el vehículo empleado en ambos experimentos no son iguales, y esto podría influir en términos de comparar este reporte y el de Inoue. No obstante, el vehículo empleado en este estudio permitió evaluar las condiciones “reales” de posibles riesgos; puesto que el herbicida FINALE es diluido en agua para su uso en condiciones normales y recomendadas; y es de ésta forma en la que las personas se ven expuestas directa (trabajadores) o indirectamente (alimentación/ambiente en general) a este tipo de productos.

Según modificaciones establecidas por la organización mundial de la salud (OMS) en el año 2009, toda sustancia en la categoría III, con una dosis oral >50-2000mg/kg de peso corporal se considera moderadamente peligrosa; donde la DL50 calculada en este estudio para FINALE (486mg/kg) quedaría ubicada en esta categoría, concordando con lo reportado para el compuesto activo GLA; el cual está ubicado en la categoría III en la mayoría de las casas comerciales que lo suministran (Inoue, 1982; Ebert *et al.*, 1990; Hack *et al.*, 1994; FINALE); por lo tanto se concluye que en términos de toxicidad aguda (DL50) la mezcla comercial

FINALE con respecto al compuesto activo GLA, no muestran diferencias significativas.

8.1.2 Sintomatología: Durante la exposición de diferentes dosis del herbicida FINALE en el cálculo de la DL50, se observaron síntomas como somnolencia, disnea, pérdida del equilibrio, tremor, convulsiones, hipersensibilidad, piloerección, taquipnea y aumento de excreción. La frecuencia de estos eventos fueron variados con respecto a la dosis que se le suministraban por ensayo; todos los síntomas reportados a excepción de aumento de excreción y piloerección, estuvieron presentes en todos los ensayos realizados por dosis (Tabla 4).

Tabla 4. Signos de toxicidad por efecto de FINALE en ratones Albino suizo de la cepa ICR durante procedimiento de DL50, observados durante 24 horas

SÍNTOMAS	DOSIS			
	386mg/kg	436mg/kg	486mg/kg	536mg/kg
Hipersensibilidad	X	X	X	X
Somnolencia	X	X	X	X
Disnea	X	X	X	X
Pérd-equilib	X	X	X	X
Tremor	X	X	X	X
Convulsiones	X	X	X	X
Taquipnea	X	X	X	X
Piloerección		X	X	X
Aumento-Excreción				X

Pérd-equilib: pérdida de equilibrio
 Aument-Excreción: aumento de excreción

La principal ruta potencial de exposición para herbicidas que contengan GLA en mamíferos es la ingestión; la intoxicación aguda generalmente es causada por el consumo accidental o uso inadecuado de productos tóxicos, y la intoxicación crónica por el consumo de residuos en alimentos contaminados, o en el ámbito laboral, en donde van a estar constantemente en exposición a dichos productos (Fabian et al., 2011).

Los residuos de GLA en la alimentación humana o animal varían de 0.5 a 50 mg / kg dependiendo del tipo de alimento (MAFF, 1990; Fabian *et al.*, 2011). Los informes sobre envenenamiento humano documentan que herbicidas que contienen GLA (dosis agudas) inducen convulsivos y alteraciones de la conciencia con insuficiencia respiratoria y circulatoria (Koyama *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1998; Lluís *et al.*, 2008; Fabian *et al.*, 2011).

Este estudio evidencia y ratifica que los herbicidas que contienen GLA inducen síntomas que también se presencian utilizando únicamente el compuesto activo o la sal de GLA (Ebert *et al.*, 1990; Hack *et al.*, 1994; Tomoko, 1996; Matsumura *et al.*, 2001; Faro *et al.* 2013; Calas *et al.*, 2016), sin embargo; se le ha atribuido síntomas como efectos cardiovasculares al tensioactivo aniónico, polioxietileno alquil éter sulfato de sodio (AES) presente en la mezcla comercial de herbicidas que contienen como principio activo GLA (Koyama *et al.*, 1997); por lo tanto se estima que los síntomas producidos por la mezcla comercial tienden a ser relativos con respecto a qué componente lo provoque; ya sea el compuesto activo, los tensioactivos presentes en la mezcla, o la acción sinérgica en sí del producto en cuestión; concluyendo que las mezclas comerciales como FINALE requieren de más investigación y detalle con respecto a los roles que pueden estar teniendo los componentes que conforman la mezcla, aun cuando en esta investigación los síntomas observados (tabla 4) coincidan con los reportados para el compuesto activo GLA (Ebert *et al.*, 1990; Faro *et al.*, 2013; Calas *et al.*, 2016).

8.2 Genotoxicidad

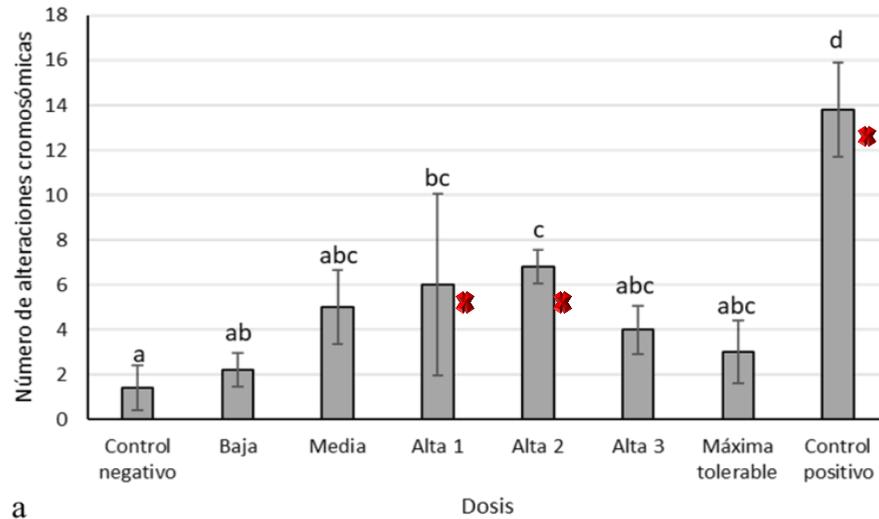
Entre las dosis experimentales con FINALE, sólo dos (Alta 1; 243 mg/kg y Alta 2; 291,6 mg/kg) mostraron diferencias significativas con respecto al control negativo, con un intervalo de confianza (i.c) de 0.0147 y 0.0039 respectivamente (tabla 5, gráfico 3), el control positivo (ciclofosfamida) mostró un incremento de alteraciones, lo cual era esperado debido a la propiedad mutagénica de este químico (Abo-Zeid *et al.*, 2018).

Tabla 5. Comparaciones con diferencias significativas en términos de genotoxicidad.

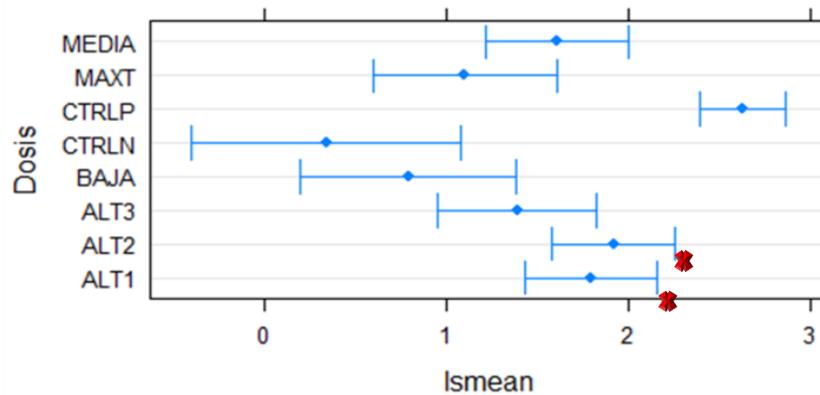
Comparación entre tto /genotoxicidad	P-Valor
CN-CP	<0.0001*
CN-Alta 1	0.0147*
CN-Alta 2	0.0039*
CN-Alt 3	0.4710
CN-Baja	1.0000
CN-MaxT	1.0000
CN-Media	0.0815

X* Diferencias significativas entre dosis con respecto al control negativo
 CN: control negativo
 CP: control positivo
 TTO: tratamiento
 MaxT: máxima tolerada

En la tabla cinco se ilustran los valores con diferencias significativas entre dosis con respecto al control negativo.



a



b

* Tratamientos con valores significativos (tabla 5)

Gráfico 3. Efecto de distintas dosis de FINALE sobre las células de médula ósea de ratón. **a.** Promedio de alteraciones cromosómicas contadas. Las barras representan el intervalo de confianza al 95%. **b.** Comparación del promedio de mínimos cuadrados obtenido con el paquete *lsmeans*

Tabla 6. Porcentaje de índice mitótico y anomalías presentes en células de médula ósea de ratón

TTO	Dosis (mg/kg)	IM (%) EN 2000 CÉLULAS	Células con poliploidía	ABERRACIONES/100 CÉLULAS/RATÓN (N° REPETICIONES 5)						N° DE CÉLULAS CON ABERRACIÓN	X̄ ABERR
				Gaps		Total Gaps	Ruptura		Total Rupt		
				cromt	crom		cromt	crom			
CN	-----	7%	2	0	0	0	0	0	0	2	0,4
CP	5	4% _c	14*	20	9	29*	17	9	26*	69*	13,8*
BAJA	97,2	3% _c	2	6	0	6	3	0	3	11	2,2
MEDIA	194,4	3% _c	8	8	2	10	5	2	7	25	5
ALTA 1	243	5% _c	7	11	4	15**	6	2	8	30*	6*
ALTA 2	291,6	3% _c	10	6	5	11**	8	5	13**	34*	6,8*
ALTA 3	340,2	3% _c	11	3	2	5	3	1	4	20	4
MAX T	388,8	4% _c	8	3	2	3	2	0	2	15	3

X*: diferencias significativas de genotoxicidad con respecto al control negativo <0,0001 – 0,0147

Xc: diferencias significativas de citotoxicidad con respecto al control negativo <0,0001 – 0,0002

X** Diferencias cualitativas entre anomalías genéticas

X̄ ABERR Promedio por TTO de aberraciones cromosómicas

CN: control negativo

CP: control positivo

Cromt: cromatídica

Crom: cromosómica

TTO: tratamiento

En genotoxicidad se pudo evidenciar anomalías genéticas como gaps, rupturas (fig. 4) y poliploidías (fig. 5) en los diferentes tratamientos con FINALE y el control positivo ciclofosfamida. Con respecto al herbicida, en las dosis que más anomalías se pudo observar fue en Alta 2, seguido de Alta 1 y media (gráfico 4); en relación a las anomalías registradas en las dosis mencionadas, hubo un marcado incremento de gaps y rupturas (cromatídicas y cromosómicas para los dos casos) en relación a las registradas en el control negativo; donde en este caso, para el control negativo, no hubo presencia de este tipo de anomalías (tabla 6, gráfico 5).

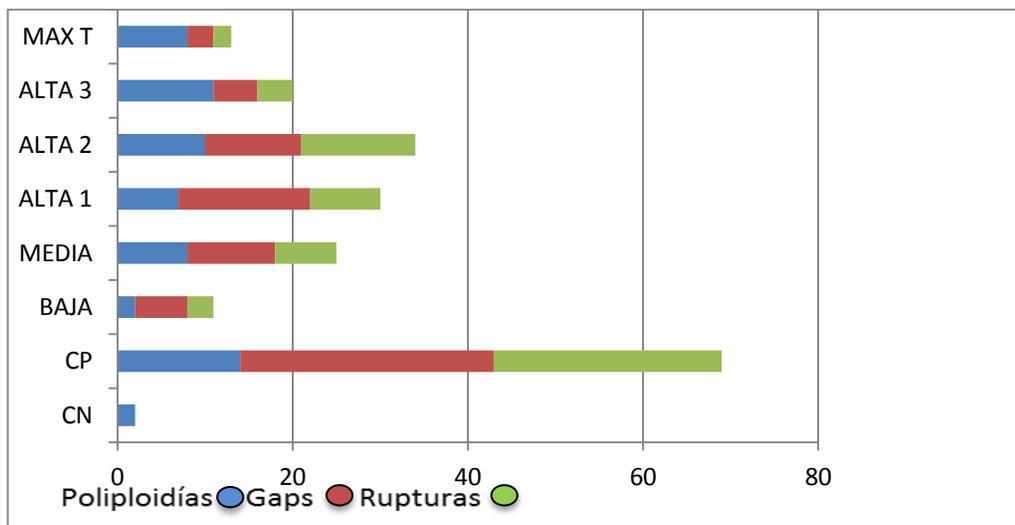


Gráfico 4. Total de anomalías cromosómicas por tratamiento suministrado.

La genotoxicidad y citotoxicidad de herbicidas que contienen GLA, ha sido poco estudiada, desde el reporte de Ebert *et al.*, 1990, donde se hace un resumen de estudios vigentes hasta la fecha (1990); más las propias conclusiones aportadas por su grupo de investigación, concluyen, que compuestos que contengan GLA no representan un peligro genotóxico. Cabe resaltar, que los blancos dianas para este químico en los reportes mencionados por Ebert *et al.*, 1990, fueron pocos y muy puntuales en referencia a mamíferos, siendo sólo dos; ensayos *in vitro* de aberraciones cromosómicas estructurales en linfocitos humanos, donde el análisis de las metafases no indicó ningún aumento en células aberrantes (Pirovano & Milone, 1985; Ebert *et al.*, 1990), y un ensayo de micronucleos *in vivo* en la cual no se encontró aumento en el número de eritrocitos policromáticos micronucleados en los grupos tratados con GLA (Jung & Mayer, 1986 Ebert *et al.*, 1990). No obstante un estudio realizado por Gonzalez *et al.*, 2018, sugieren que las espermátidas tempranas y los espermatozoides maduros son blancos de la exposición a GLA ya que se concluye que la exposición subaguda a GLA en ratones causa alteraciones sobre los parámetros de calidad del ADN y cromatina espermática, afectando dos etapas de la espermatogénesis (espermátida temprana y espermatozoide maduro), en lo cual además de reafirmar su potencial embriotóxico (Watanabe, 1996 Watanabe & Iwase, 1996; Matsumura *et al.*, 2001; Calas *et al.*, 2008; Fabian *et al.*, 2011; Laugeray. *et al.*, 2014; Lajmanovich *et al.*, 2014) se puede observar propiedades genotóxicas al material genético.

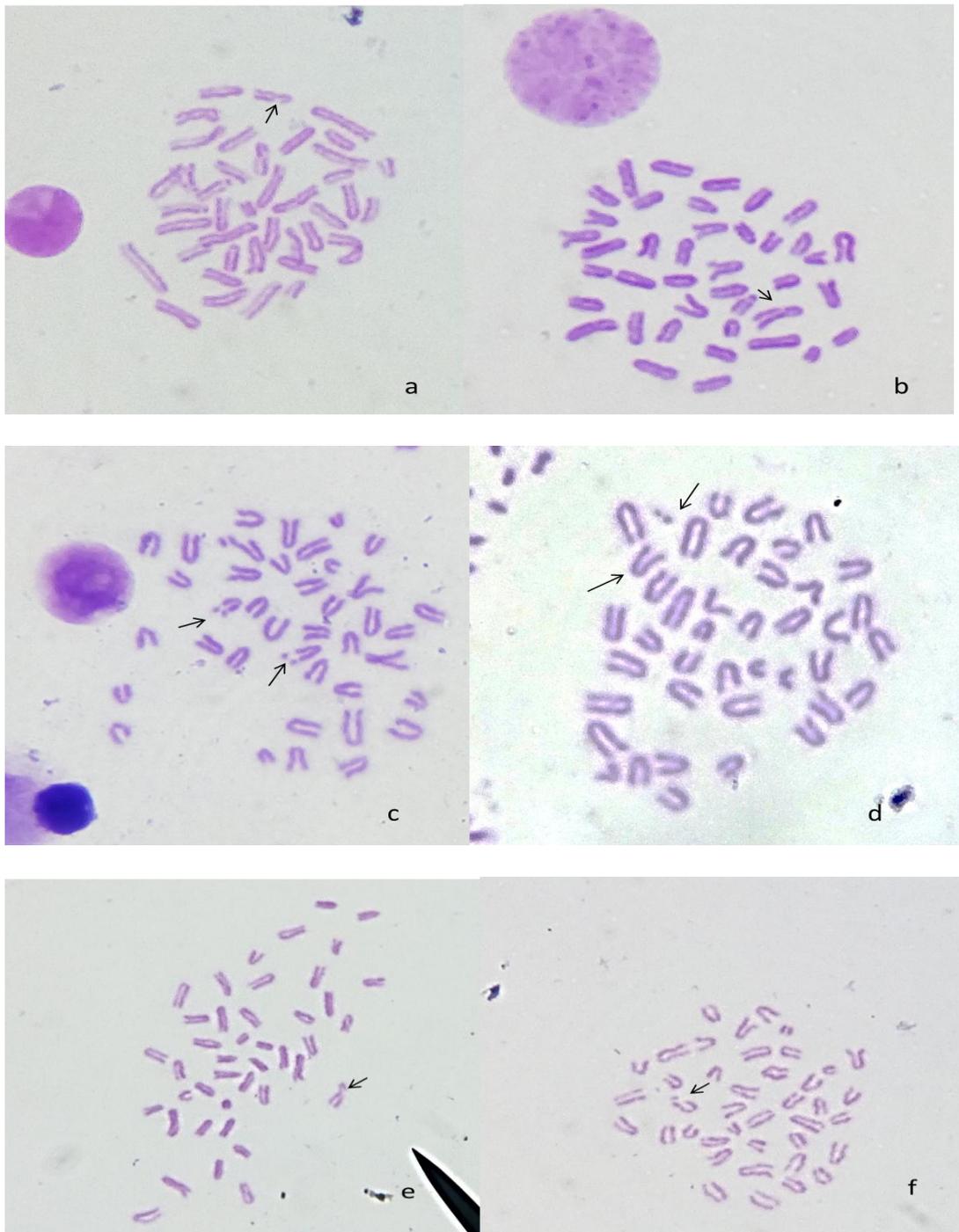


Fig 4. Aberraciones cromosómicas gaps y rupturas en metafases de médula ósea de ratón: a, c, e y f) ruptura cromatídica; b y c) gaps; c y d) ruptura cromosómica. *Ruptura cromosómica:* se deben a radiaciones o productos químicos tóxicos (TRAu'ri, 1971; Obe *et al.*, 2002). Cuando esto ocurre, los dos fragmentos pueden volver a unirse, o un fragmento puede unirse a otro cromosoma roto. Las roturas cromosómicas no

reparadas están asociadas con condiciones premalignas como ataxia telangiectasia, síndrome de Bloom, anemia de Fanconi, deficiencia de glutatión reductasa, agranulocitosis de Kostmann y anemia perniciosa (TRAu'ri, 1971). *Gaps*: o brechas cromáticas ocurren como dos tipos morfológicamente indistinguibles: el tipo clastogénico (daño del ADN) y el tipo turbagénico (sin daño del ADN), y son inducidos por muchas genotoxinas de una manera dependiente de la dosis (Brøgger, 1982).

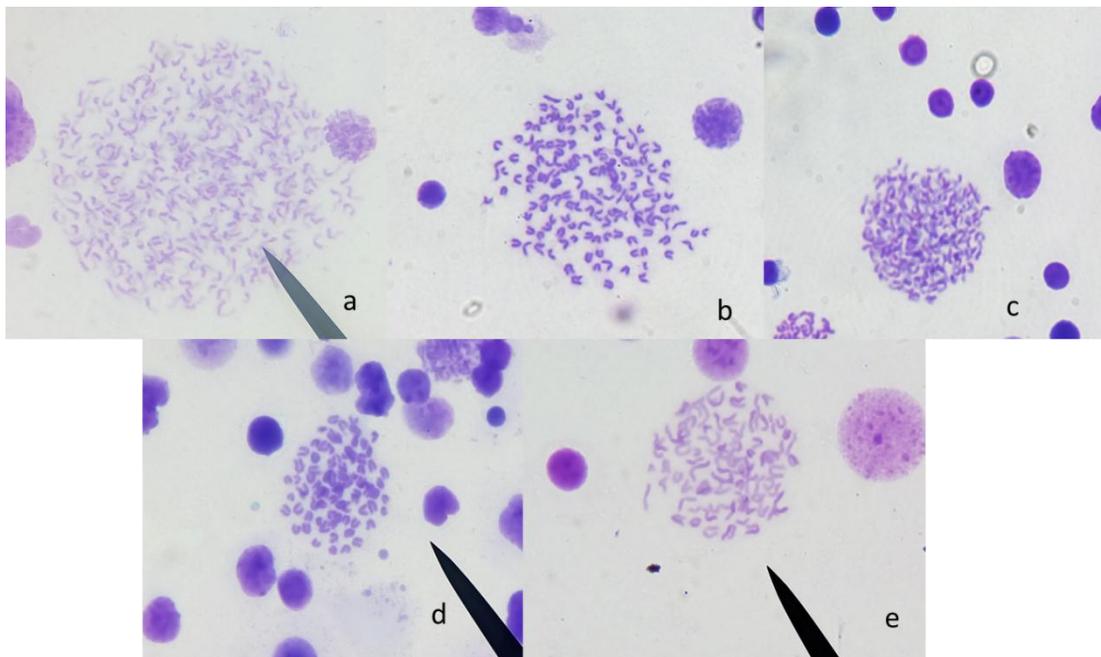


Fig 5. Anomalías en células metafásicas de células de médula ose de ratón. Poliploidías: a) segundo ciclo de división (no incluidas en el conteo de AC); b,c,d,e) poliploidias de primer ciclo de división. *Poliploidía*: la condición en la cual una célula u organismo normalmente diploide adquiere uno o más conjuntos adicionales de cromosomas. La poliploidía surge como resultado de la no disyunción total de los cromosomas durante la mitosis o la meiosis (Francesoc, 1989; Soltis & Soltis1999).

En este estudio sólo hubieron dos dosis, Alta 1(243mg/kg) y Alta 2 (291,6mg/kg) las cuales mostraron un aumento significativo de alteraciones cromosómicas respecto al CN (Tabla 5 y 6), se estima que el herbicida FINALE, tiene propiedades genotóxicas en células de médula ósea, entre el rango de las dosis previamente mencionadas, obteniendo en conclusión un rango de dosis efectiva, del herbicida FINALE para alteraciones cromosómicas (Gráfico 6), ya que a mayor dosis/ Alta 3 y MaxT no hubo efecto genotóxico significativo con respecto al CN, y tampoco en dosis inferiores como baja y media (Tabla 5, Gráfico 3a), por tanto, en dosis particulares y determinados tipos de células, como las espermáticas

tempranas y espermatozoides maduros de ratón (González *et al.*, 2018), y en este caso, células de médula ósea de ratón; este compuesto tiene potencial genotóxico. No obstante, en condiciones adecuadas y medidas de seguridad recomendadas, este herbicida no representa un peligro para la población humana (Ebert *et al.*, 1990; Hack *et al.*; Schulte-Hermann *et al.*, 2006).

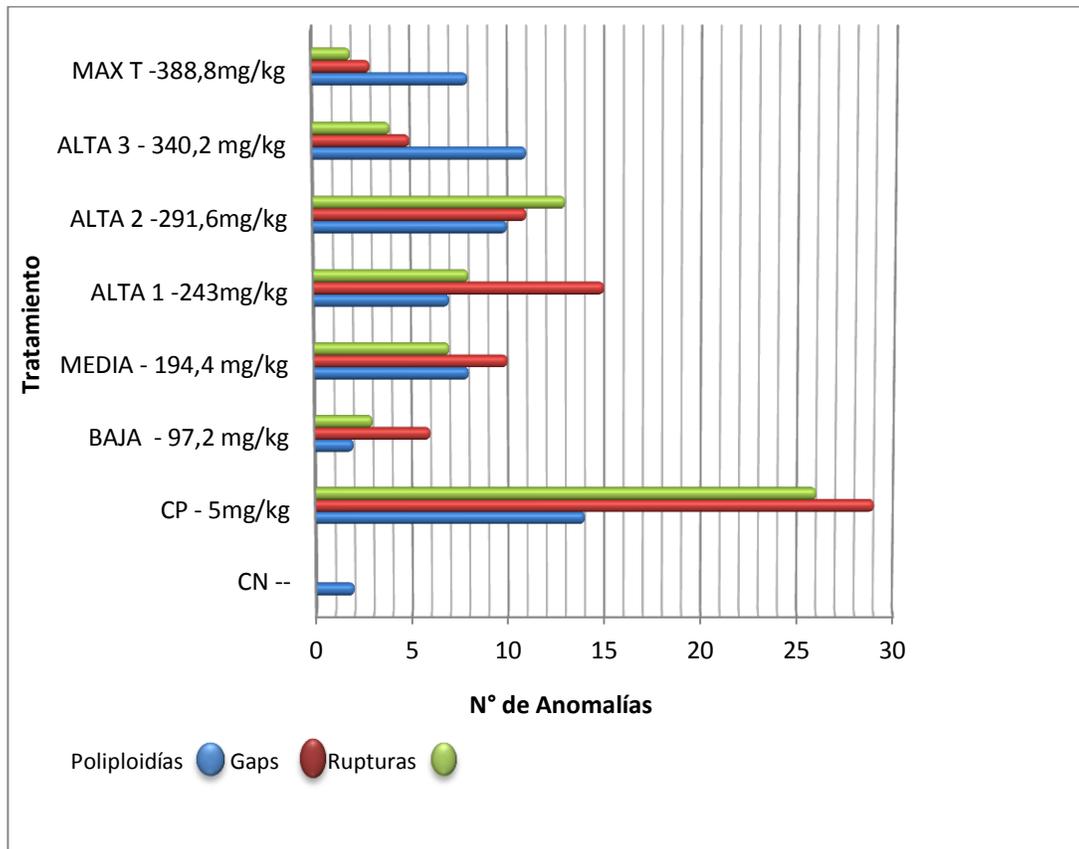


Gráfico 5. Proporción de tipo de anomalías según la dosis suministrada.

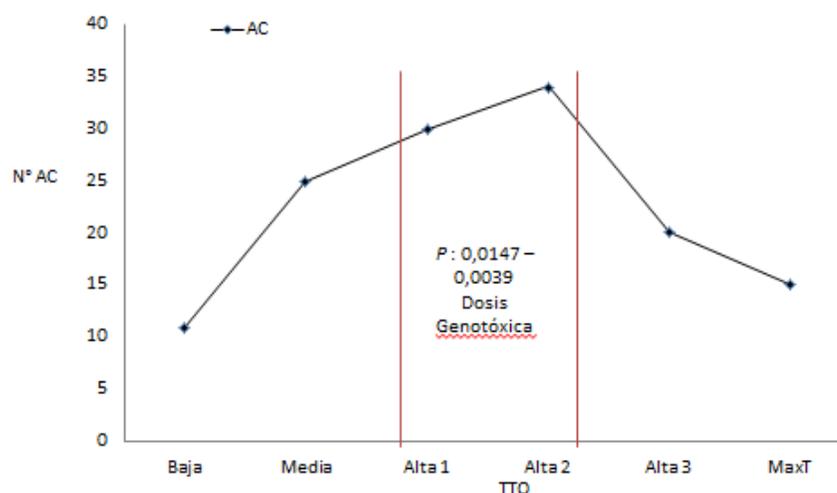


Gráfico 6. Curva dosis-efectiva en genotoxicidad para alteraciones cromosómicas, con respecto a valores significativos.

AC: alteraciones cromosómicas
 N°AC: número de alteraciones cromosómicas
 TTO: tratamiento

8.3 Citotoxicidad

Los datos observados en citotoxicidad mostraron diferencias significativas en los tratamientos bajo (97,2mg/kg), medio (194,4mg/kg), Alta 1 (243mg/kg), Alta 2 (291,6mg/kg), Alta 3 (240,2mg/kg), MaxT (388,8mg/kg) y CP/ciclofosfamida (5mg/kg), con respecto al Control negativo (CN), con un i.c. <0,0001 (Tabla 7, Gráfico 7); en el cual se estima que el herbicida FINALE tiene propiedades citotóxicas, en las células de la médula ósea.

Tabla 7. Comparaciones con diferencias significativas en términos de citotoxicidad.

Tratamientos vs CN	P-valor
CN-Alta 1	<0.0001
CN-Alta 2	<0.0001
CN-Alta 3	<0.0001
CN-Baja	<0.0001
CN-CP	<0.0001
CN-MáxT	<0.0001
CN-Media	<0.0001

CN: control negativo
 CP: control positivo

La relación entre las dosis suministradas por FINALE y el índice mitótico (IM) es marcada; donde hubo una disminución o daño celular considerable en todas las dosis respecto al CN (Tabla 5, gráfico 7), estimando que el herbicida FINALE es citotóxico para células de médula ósea de ratón. La evaluación citotóxica de compuestos relacionados con el GLA ha sido reportada en varios estudios, en diferentes tipos de células, iniciando con Ebert *et al.*, 1990 donde reporta que el GLA no es citotóxico para células hepáticas, sin embargo, Watanabe *et al.*, 1997 reportó que la exposición por GLA induce apoptosis en el neuroepitelio de los embriones y Herzine *et al.*, 2016 demostró que la exposición perinatal a dosis bajas de GLA induce alteraciones en la proliferación de neuroblastos. Cabe resaltar que este estudio es el primero en reportar citotoxicidad con la mezcla comercial FINALE, considerando la posible acción de los componentes que conlleva.

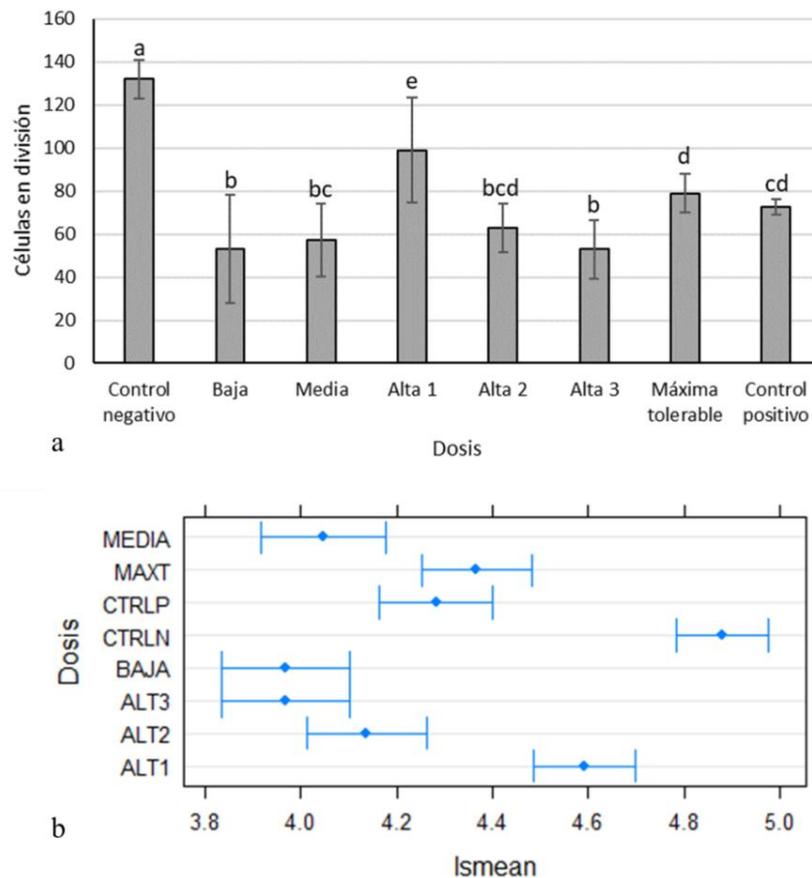


Gráfico 7. Efecto de las diferentes dosis de FINALE sobre las células de médula ósea de ratón. **a.** Promedio de células en división de un total de 2000 células contadas. Las barras representan el intervalo de confianza del 95%. **b.** Comparación del promedio de mínimos cuadrados obtenido con el paquete

Ismeans. Todas las dosis con respecto al control negativo, dieron valores significativos (tabla 7).

En conclusión, en esta investigación se reporta por primera vez La DL50 del herbicida FINALE, el cual, en términos de toxicidad aguda y sintomatología mostró similaridad a lo reportado para el compuesto activo, en este caso, GLA (ambos ubicados en la categoría toxicológica de ligeramente peligroso de acuerdo a los rango establecidos por la OMS), sin embargo; la DL50 del GLA tiende a ser ligeramente más tóxico que la mezcla comercial; en contraste se ha demostrado atribuciones tóxicas con respecto a efectos cardiovasculares al tensioactivo aniónico, polioxietileno alquil éter sulfato de sodio (AES/tensioactivo del herbicida FINALE), en lo cual es claro que los componentes de la mezcla comercial tienen su participación en los efectos tóxicos, por ende se requieren más estudios para poder determinar los componentes exactos que están influyendo en un posible efecto de los herbicidas que contengan GLA.

El herbicida FINALE tiene propiedades genotóxicas en un rango de dosis específico (dosis efectiva), no obstante, requiere de más investigación en este aspecto, además a nivel celular mostró tener efectos citotóxicos significativos en todas las dosis problema respecto al control negativo; de igual manera se concluye que bajo uso recomendado no representa un peligro para las personas.

9. CONCLUSIÓN

Se establece por primera vez la dosis letal cincuenta (DL50) para la mezcla comercial FINALE en ratones *Albino suizo* de la cepa ICR, con un valor de 486mg/kg de peso corporal de ratón. Donde se estima que con respecto al compuesto activo, en toxicidad aguda, tienen propiedades similares.

Los síntomas tóxicos del herbicida FINALE, coinciden con los reportados para el compuesto activo GLA, sin embargo se estima más investigación para determinar el rol de los tensio-activos presentes en la mezcla.

El herbicida FINALE mostró tener propiedades citotóxicas en células de médula ósea de ratón en todas las dosis experimentales, comparado con el control negativo, siendo este el primer reporte *in vivo* con la mezcla comercial FINALE.

El herbicida FINALE mostró tener un rango de dosis efectiva para genotoxicidad, en las dosis Alta 1; 243/kg y Alta 2; 291,6mg/kg en alteraciones cromosómicas, particularmente para rupturas y gaps. Estimando que se requiere de más investigación de la posible propiedad genotóxica de este herbicida.

10. RECOMENDACIONES

La investigación de productos con función pesticida debe ser continua, ya que día a día la sociedad y el medio ambiente está siendo expuesto a nuevos químicos, y por ende adquiriendo mayor susceptibilidad y vulnerabilidad, siendo cada vez más propensos a afección en la salud.

Se propone investigar el componente exacto que induce la citotoxicidad en células de médula ósea, y definir si los componentes a parte del compuesto activo (GLA) están influyendo en este efecto.

Se sugiere investigar los diferentes mecanismos que están conllevando a alteraciones cromosómicas y al daño celular, empezando con la técnica el cometa, para poder ratificar los daños primarios del ADN más reiterantes y contextualizar un posible mecanismo/causante.

Otra opción sería utilizar la técnica Microarray basada en hibridación genómica comparada (aCGH), la cual es una alternativa pertinente que podría detectar múltiples anomalías relacionadas a efectos teratogénicos y daños relacionados con enfermedades como el cáncer.

REFERENCIAS

- Abo-Zeid, MA, Abdel-Samie, NS, Farghaly, AA, y Hassan, EM (2018). La fracción flavonoide de *Cajanus cajan* prohibió las propiedades mutagénicas de la ciclofosfamida en ratones in vivo. *Investigación de mutaciones / Toxicología genética y mutagénesis ambiental*, 826, 1-5.
- Alexandratos, N., & Bruinsma, J. (2012). *World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision* (No. 12-03, p. 4). Rome, FAO: ESA Working paper.
- Alleva, R., Manzella, N., Gaetani, S., Bacchetti, T., Bracci, M., Ciarapica, V., ... & Tomasetti, M. (2018). Mechanism underlying the effect of long-term exposure to low dose of pesticides on DNA integrity. *Environmental toxicology*.
- Arambaši, M. B., & Randhawa, M. A. (2014). Comparison of the Methods of Finney and Miller-Tainter for the Calculation of LD Values. *World Applied Sciences Journal*, 32(10), 2167-2170.
- BAYER, FINALE <<https://www.backedbybayer.com/~media/BackedByBayer/Product%20Labels%20-%20pdf/Finale.ashx>> [Citado el 15 de abril del 2018]
- Bolognesi, C., & Holland, N. (2016). The use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for monitoring pesticide-exposed populations. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 770, 183-203.
- Bolognesi, C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 543(3), 251-272.
- Bonassi S., Norppa H., Ceppi M., Strongberg U., Vermeulen R., Znaor A., Cebulska-Wasilewska A., Fabianova E., Fucic A., Gundy S., Hansteen I.L., Knudsen L.E., Latzuka J., Rossner P., Sram R.J. y Boffeta P. (2008). Chromosomal aberrations frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: results from a pooled cohort study of 22,358 subjects in 11 countries. *Carcinogenesis* 29, 1178-1183.
- Brøgger, A. (1982). The chromatid gap—a useful parameter in genotoxicology?. *Cytogenetic and Genome Research*, 33(1-2), 14-19.
- Calixto, C. G., Godínez, M. E. M., Reducindo, M. M., Ochoa, M. I. H., Vega, M. B. Q., & Acosta, M. O. U. (2018). EL GLUFOSINATO DE AMONIO ALTERA LA CALIDAD Y EL ADN DE LOS ESPERMATOZOIDES DE RATÓN. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 34, 7-15.

- Carbonell E., Xamena N., Creus A. y Marcos R. (1993). Cytogenetic biomonitoring in a Spanish group of agricultural workers exposed to pesticides. *Mutagenesis* 8, 511- 517
- Castro, R., Ramìrez, V., & Cuenca, P. (2004). Micronúcleos y otras anormalidades nucleares en el epitelio oral de mujeres expuestas ocupacionalmente a plaguicidas. *Rev. bio. trop*, 611-621.
- Chandra, M., Raj, J., Dogra, T. D., & Raina, A. (17 de Julio de 2014). Determination of median lethal dose pf triazophos with in wistar rats. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical*, 7.
- Calas, A.-G., Perche, O., Richard, O., Perche, A., Pâris, A., Lauga, F., Montécot-Dubourg, C. (2016). Characterization of seizures induced by acute exposure to an organophosphate herbicide, glufosinate-ammonium. *NeuroReport*, 27(7), 532–541. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000578>
- Calas, A. G., Richard, O., M??me, S., Beloeil, J. C., Doan, B. T., Gefflaut, T., Mont??cot, C. (2008). Chronic exposure to glufosinate-ammonium induces spatial memory impairments, hippocampal MRI modifications and glutamine synthetase activation in mice. *NeuroToxicology*, 29(4), 740–747. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2008.04.020>
- Caracol Radio. (2016). Glufosinato de amonio, ¿ el químico que reemplazaría al glifosato para erradicar coca? <http://caracol.com.co/radio/2016/09/05/nacional/1473090018_131672.html> [Citado el 16 de marzo del 2018/ 11:52pm]
- Chaves, T. V. S., Islam, M. T., de Moraes, M. O., de Alencar, M. V. O. B., Gomes, D. C. V., de Carvalho, R. M., ... & Rolim, H. M. L. (2017). Occupational and life-style factors-acquired mutagenicity in agric-workers of northeastern Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-8.
- Cuenca P. y Ramìrez V. (2004). Aberraciones cromosómicas en trabajadoras expuestas a plaguicidas. *Rev. Biol. Trop.* 52, 623-628
- Duffus, J. (1993). Glossary for chemists of terms used in toxicology (IUPAC Recommendations 1993). *Pure and applied chemistry*, 65(9), 2003-2122.
- Chandra, M., Raj, J., Dogra, T. Das, Rajvanshi, A. C., & Raina, A. (2014). Determination of median lethal dose of triazophos with DMSO in wistar rats. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 7(4), 64–67.
- E. Ebert, K.-H., & Mayer, D. (1990). Sumamary of safety Evaluation Toxicity Studies of Glufosinate Ammonium. *Fd Chem. Toxic*, 339-349.
- Elias, D., & Bernot, M. J. (2017). Effects of Individual and Combined Pesticide Commercial Formulations Exposure to Egestion and Movement of Common

Freshwater Snails, *Physa acuta* and *Helisoma anceps*. *The American Midland Naturalist*, 178(1), 97-111.

- FINALE<<https://www.cropscience.bayer.co/es-CO/Productos-e-innovacion/Productos/Herbicidas/FINALE-SL.aspx>>[citado el 21-04-2018]
- Font, G., Fernandez, M., Ruiz, M. J., & Picò, Y. (2012). *Residuos de plaguicidas en alimentos: Toxicología alimentaria*. Madrid: Ediciones Días de Santos.
- Fabian, D., Bystriansky, J., Burkuš, J., Reháč, P., Legáth, J., & Koppel, J. (2011). The effect of herbicide BASTA 15 on the development of mouse preimplantation embryos in vivo and in vitro. *Toxicology in Vitro*, 25(1), 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.09.009>
- FAOSTAT (2013). Food and Agricultural Organization of the United Nations. <http://faostat.fao.org.site/339/default.aspx> 26/06/13
- Faro, L. R. F., Ferreira Nunes, B. V., Alfonso, M., Ferreira, V. M., & Durán, R. (2013). Role of glutamate receptors and nitric oxide on the effects of glufosinate ammonium, an organophosphate pesticide, on in vivo dopamine release in rat striatum. *Toxicology*, 311(3), 154–161. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2013.06.008>
- Fernando P. Cavalho, 2017. Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security*, Volume 6, Issue 2 May 2017, 48–60
- Finney, D.J., 1971. Probit Analysis, 3 ed., University Press, Cambridge
- Francesco D'Amato (1989) Polyploidy in Cell Differentiation, *Caryologia*, 42:3-4, 183-211, DOI: 10.1080/00087114.1989.10796966
- Galeano, & Guevara. (2007). Structural Chromosomal Alterations Induced by Dietary Bioflavonoids in Fanconi Anemia Lymphocytes. *Rev. Cienc. Salud*.
- Garcia, F. P., Ascencio, S. Y. C., Oyarzun, J. C. G., Hernandez, A. C., & Alavarado, P. V. (2012). Pesticides: classification, uses and toxicity. Measures of exposure and genotoxic risks. *Int. J. Environ. Sci. Toxic. Res*, 1, 279-293.
- García, J. E. 1997. Introducción a los plaguicidas. EUNED. San José. Costa Rica, 450 p.
- Gomez Arroyo, S., Martinez Valenzuela, C., Carbajal Lopez, Y., Martinez Arroyo, A., Calderon Seguro, M. E., Villalobos Pietrini, R., & WALISZEWSK, S. M. (2013). RIESGO GENOTÓXICO POR LA EXPOSICIÓN OCUPACIONAL A PLAGUICIDAS EN AMÉRICA LATINA. *Int. Contam. Ambie.* 29, 159-180.

- Gomez Arroyo, S., (2007). RIESGO GENOTÓXICO POR EXPOSICIÓN A PLAGUICIDAS EN TRABAJADORES AGRÍCOLAS. *Revista Internacional de contaminación Ambiental*, 7.
- Goto, K., Akematsu, T., Shimazu, H., & Sugiyama, T. (1975). Simple differential Giemsa staining of sister chromatids after treatment with photosensitive dyes and exposure to light and the mechanism of staining. *Chromosoma*, 53(3), 223-230.
- Gross, J. & U. Ligges. 2015. Package 'nortest'. Disponible en: <https://cran.r-project.org/web/packages/nortest/nortest.pdf>. [Consultado 14 abril 2018]
- G. Wolterink 1, C.M. Mahieu 1 and L. Davies. 2012. GLUFOSINATE-AMMONIUM [apps.who.int/pesticide-residues-jmpr-database/Document/61]
- Gutiérrez, J. B., & Salsamendi, A. L. (Junio de 2001). *Fundamentos de Ciencia Toxicológica*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos.
- Hernández, S. (2006). El modelo animal en las investigaciones biomédicas. *Biomedicina*, 2(3), 252-256.
- Hagmar I., Stromberg U., Bonassi S., Hansteen I., Knudsen I.E., Lindholm C. y Norppa H. (2004). Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italian cohorts. *Cancer Res.* 64, 2258-2263.
- Hoyos, Carvajal, & Cajas. (2002). Manual de pruebas citogenéticas y Letales dominantes en ratón. En U. d. Cauca. Popayan.
- Hothorn, T., Bretz, F., Westfall, P., Heiberger, R.M., Schuetzenmeister, A. & S. Scheibe. 2017. Package 'multcomp'. [Consultado 14 abril 2018]
- Inoue H (1982). Acute oral toxicity study in mice of Hoe 039866 technical. Code: Hoe 039866 0H AS 201. Unpublished report no. A28828 from Biosafety Research Center, Shizuoka-ken, Japan. Submitted to WHO by Bayer CropScience, Monheim, Germany.
- Inoque, Y., Onodera, M., Fujita, Y., & Fujino, Y. (2013). Factors associated with severe effects following acute. *Clinical Toxicology*, 1556-9519.
- Inoue, Y., Onodera, M., Fujita, Y., Fujino, Y., Kikuchi, S., & Endo, S. (2013). Factors associated with severe effects following acute glufosinate poisoning. *Clinical Toxicology*, 51(9), 846–849. <https://doi.org/10.3109/15563650.2013.841180>
- Obe, G., Pfeiffer, P., Savage, J. R. K., Johannes, C., Goedecke, W., Jeppesen, P., ... & Drets, M. E. (2002). Chromosomal aberrations: formation, identification

- and distribution. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 504(1), 17-36.
- Jaga K, Dharmani C. Sources of exposure to and public health implications of organophosphate pesticides. *Pan American journal of public health*. 2003;14(3):171-85
- Jacobsen-Pereira, C. H., dos Santos, C. R., Maraslis, F. T., Pimentel, L., Feijó, A. J. L., Silva, C. I., ... & Maluf, S. W. (2018). Markers of genotoxicity and oxidative stress in farmers exposed to pesticides. *Ecotoxicology and environmental safety*, 148, 177-183.
- Jung R. and Mayer D. (1986) Micronucleus test in male and female NMRI mice after oral administration. Hoechst Report no. 86.1307
- Kaioumova D. y Khabutdinova L. (1998). Cytogenetic characteristics of herbicide production workers in Ufa. *Chemosphere* 37, 1755-1759.
- Kausar A, Giri S, Roy P, Giri A (2014) Changes in buccal micronucleus cytome parameters associated with smokeless tobacco and pesticide exposure among female tea garden workers of Assam, India. *Int J Hyg Environ Health* 217:169–175. doi:10.1016/j.ijheh.2013.04.007
- Kim, K. H., Kabir, E., & Jahan, S. A. (2017). Exposure to pesticides and the associated human health effects. *Science of The Total Environment*, 575, 525-535.
- Lajmanovich, R. C., Cabagna-Zenklusen, M. C., Attademo, A. M., Junges, C. M., Peltzer, P. M., Bass??, A., & Lorenzatti, E. (2014). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty?? and glufosinate-ammonium. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 769, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.04.009>
- Laugeray, A., Herzine, A., Perche, O., Hébert, B., Aguillon-Naury, M., Richard, O., Mortaud, S. (2014). Pre- and postnatal exposure to low dose glufosinate ammonium induces autism-like phenotypes in mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 8(November), 390. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00390>
- Lenth. 2016. Least-Squared Means: The R Package lsmeans. *Journal of Statistical Software* 69(1): doi: 10.18637/jss.v069.i01
- Lipnick, R. L., Cotruvo, J. A., Hill, R. N., Bruce, R. D., Stitzel, K. A., Walker, A. P., Myers, R. C. (1995). Comparison of the up-and-down, conventional LD50, and fixed-dose acute toxicity procedures. *Food and Chemical Toxicology*, 33(3), 223–231. [https://doi.org/10.1016/0278-6915\(94\)00136-C](https://doi.org/10.1016/0278-6915(94)00136-C)
- London L, Bailie R. Challenges for improving surveillance for pesticide poisoning:

- policy implications for developing countries. *International Journal of Epidemiology*.2001;30(3):564-70.
- Mayer D, Weigand W (1980a). Acute oral toxicity to the male mouse of Hoe 39866 active ingredient. Code: Hoe 39866 0H AS201. Unpublished report no. A21787 from Hoechst AG, Frankfurt am Main, Federal Republic of Germany. Submitted to WHO by Bayer CropScience, Monheim, Germany.
- MAFF, 1990. Evaluation No. 33: HOE 399866 (Glufosinate-ammonium). Ministry of Agriculture Fisheries and Food, London. Manev,
- Mayer D, Weigand W (1980b). Acute oral toxicity to the female mouse of Hoe 39866 active ingredient. Code: Hoe 39866 0H AS201. Unpublished report no. A33167 from Hoechst AG, Frankfurt am Main, Federal Republic of Germany. Submitted to WHO by Bayer CropScience, Monheim, Germany.
- Mayer D, Weigand W (1980c). Acute oral toxicity to the male rat of Hoe 39866 active ingredient. Code: Hoe 39866 0H AS201. Unpublished report no. A21789 from Hoechst AG, Frankfurt am Main, Federal Republic of Germany. Submitted to WHO by Bayer CropScience, Monheim, Germany.
- Mañas, F., Peralta, L., Gorla , N., Bosh, B., & Aiassa, D. (2009). Aberraciones cromosómicas en trabajadores rurales de la Provincia de Córdoba expuestos a plaguicidas. *BAG, J. basic appl. genet.*
- Moon, J. M., & Chun, B. J. (2016). Serial ammonia measurement in patients poisoned with glufosinate ammonium herbicide. *Human & Experimental Toxicology*, 554-561.
- Najul, C., & Anzalone, A. (2006). Control de malezas con cobertura vegetal en el cultivo de la Caraota negra (*Phaseolus vulgaris* L.). *Bioagro*, 2.
- Ortega Ceseña, J., Espinosa Torres, F., & Lopez Carrilo, L. (1994). El control de los riesgos para la salud generados por los plaguicidas organofosforados en México: retos ante el tratado de libre comercio. *Salud Pública*, 624-632.
- Ortiz, G. G., Moisés, F. P., Macías-Islas, M. Á., Jiménez-Gil, F. J., Miranda-Díaz5, A. G., Flores-Alvarado, L. J., . . . Bitzer Quintero, O. (2011). Toxicidad de plaguicidas y su asociación con la enfermedad de Parkinson. *Arch Neurocién (Mex)*, 33-39.
- Ori, Y. H., Anaka, T. T., Ujisawa, M. F., & Himada, K. S. (2003). Toxicokinetics of DL -Glufosinate Enantiomer in Human BASTA ®. *Heart*, 26(4), 540–543.
- OMS (1990). Plaguicidas. Informe Técnico No. 12. Organización Mundial de la Salud. Ginebra

- Paumgarten, F., ve, O. O., Menezes, M., Fingola, F., Freitas, J., Carvalho, R., & Cunha, F. (1989). Comparison of five methods for the determination of lethal dose in acute toxicity studies. *Brazilian J Med Biol Res*.
- Peralta, L., Mañas, F., Gentile, N., Bosch, B., Mèndez, À., & Aiassa, D. (2011). Evaluación del daño genético en pobladores de Marcos Juárez expuestos a plaguicidas: estudio en un caso en Còrdoba, Argentina. *Revista Científica de Psicología, Ciencias Sociales, Humanidades y ciencias de la Salud*, 7-26.
- Procedures With Care < <http://www.procedureswithcare.org.uk/intraperitoneal-injection-in-the-mouse/>> [citado el 29-04-2018]
- POPULATION REFERENCE BUREAU. 2015. Available at www.prb.org/Publications/Lesson-Plans/HumanPopulati/PopulationGrowth.aspx. Accessed May 17, 2015
- Pirovano R. and Milone M. F. (1985) In vitro study of chromosome aberration in cultured human lymphocytes. Istituto di Ricerche Biomediche Report no. M 711. Rupprich
- Piotrowski, K. D. (2011). *Herbicides : Properties, Crop Protection, and Environmental Hazards*. New York: New York: Nova Science Publishers, Inc.
- Repetto, K. G. (2010). *Toxicología Fundamental (4a. ed.)*. Madrid: Ediciones Días de Santos.
- Schneider, E. L., Tice, R. R., & Kram, D. (1978). Bromodeoxyuridine differential chromatid staining technique: A new approach to examining sister chromatid exchange and cell replication kinetics. In *Methods in cell biology* (Vol. 20, pp. 379-409). Academic Press.
- Schulte-Hermann, R., Wogan, G. N., Berry, S. C., Brown, N. A., Czeizel, A., Giavini, E., Sullivan, F. M. (2006). Analysis of reproductive toxicity and classification of glufosinate-ammonium. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 44(3 SUPPL.). <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2006.01.008>
- Shadboorestan, A., Vardanjani, H. M., Abdollahi, M., Goharbari, M. H., & Khanjani, N. (2016). A systematic review on human exposure to organophosphorus pesticides in Iran. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 34(3), 187-203.
- Soltis, D. E., & Soltis, P. S. (1999). Polyploidy: recurrent formation and genome evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 14(9), 348-352.
- Suseela, M., Gokul, K., Rao, K. J., & Doss, P. J. (2015). SYNTHETIC PESTICIDE

ON ALBINO MICE, *I*(1), 5–11.

- Suseela, M., Gokul, k., Rao, K. J., & Doss, P. J. (2013). Estimation of Toxicity Evaluation (LD50) of Lambda Cyhalothrin, a synthetic pesticide on Albino mice. *Advance Research Journal of Biological Sciences and molecular Techniques*.
- Suratman S, Edwards JW, Babina K. Organophosphate pesticides exposure among farmworkers: pathways and risk of adverse health effects. *Rev Environ Health*. 2015;30(1):65–79.
- Sax, K. (1938) Induction by X-rays of chromosome aberrations in *Tradescantia microseopores*, *Genetics*, 23, 494-526.
- Stellman, J. M. (1998). Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales.
- Tiryaki, O., & Temur, C. (2010). The fate of pesticide in the environment. *Journal of Biological and Environmental Sciences*, 4(10), 29-38.
- Torres, D., & Capote, T. (2004). Agroquímicos un problema ambiental global: uso del análisis químico como herramienta para el monitoreo ambiental. *Revista Ecosistemas*, 13(3).
- TRAu'ri, M. S. (1971). Spontaneous Chromosomal Breakage and High Incidence of Leukemia in Inherited Disease. *BLOOD*, 37(1).
- Turrado, I. M. (2014). AGENTES GENOTÓXICOS: Mètodos de detecció n y evaluació n. *El rincon de la ciencia*.
- Tucker, J. D., & Preston, R. J. (1996). Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 365(1-3), 147-159.
- US Environmental Protection Agency (EPA). What is a pesticide? <http://www.epa.gov/opp00001/about/>, 2014.
- Vega, S. & I. Maroto.1984. Plaguicidas de uso restringido en Estados Unidos se importan libremente en Costa Rica. *Rev. Ciencias Amb., Costa Rica*. 5-6: 125-134.
- Vincent, K. (2008). Probit analysis. The San Francisco State University. Department of Biology Document Repository. Last Accessed on March, 2010. <http://userwww.sfsu.edu/efc/classes/biol710/probit/ProbitAnalysis.pdf>.

- Watts, M. (2016). Highly Hazardous Pesticides in the Pacific.
- Watanabe. (1997). Apoptosis induced by glufosinate ammonium in the neuroepithelium of developing mouse embryos in culture. *Neuroscience Letters*, 17-20.
- Watanabe, T. (1997). Apoptosis induced by glufosinate ammonium in the neuroepithelium of developing mouse embryos in culture. *Neuroscience Letters*, 222(1), 17–20. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(97\)13330-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(97)13330-4)
- Ximena Abrevaya. Genotóxicos o xenobióticos: ¿Qué es la genotoxicidad? <<http://www.intramed.net/contenido.asp?contenidoID=47111>>[citado el 10 de agosto de 2017]
- Zeljezic D., Vrdoljak A.L., Lucas J.N., Lasan R., Fucic A., Kopjar N., Katic J., Mladinic M. y Radic B. (2009). Effect of occupational exposure to multiple pesticides on translocation yield and chromosomal aberrations in lymphocytes of plant workers. *Environ. Sci. Technol.* 40, 6370-6377

ANEXOS

Anexo I. Cuadro de registro signos de toxicidad por efecto de FINALE, evaluado en ratón durante procedimiento de dl50

SIGNOS PRESENCIA (+) AUSENCIA (-)	RATÓN																		
	TIEMPO	2 horas				4 horas				6 horas				24 horas					
Siloreia																			
Piloerección																			
Sudoración general																			
Somnolencia																			
Priapismo																			
Taquipnea																			
Disnea																			
Cianosis																			
Pérdida del equilibrio																			
Tremor																			
Convulsiones																			
Lacrimación																			
Aumento de excreción																			
Alopesia																			
Epistaxis																			
Muerte																			

Anexo II. Aval ético



Universidad
del Cauca

Vicerrectoría de Investigaciones

**EL PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ETICA PARA LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE
LA UNIVERSIDAD DEL CAUCA**

CERTIFICA:

Que el proyecto titulado "Evaluación Tóxica, Citotóxica y Genotóxica *in vivo* del plaguicida Glufosinato de amonio en su forma comercial (Finale), en células de Médula ósea de Ratón Albino suizo", presentado por el semillero de investigación adscrito al grupo de investigación en Toxicología Genética y Citogenética, ha sido revisado por el Comité de Ética Para la Investigación Científica de la Universidad del Cauca se ajusta a los requerimientos bioéticos como lo estipula la Resolución 008430 de 1993 del Ministerio de Salud Nacional y la Ley 84 de 1989 y así como también lo establecido en el Decreto 1376 de 2013 del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. Los investigadores adicionalmente consideran realizar el manejo de reactivos, sustancias químicas y residuos, bajo los protocolos del Comité de Gestión Integral de Sustancias y Residuos Químicos (CGISRQ) de la Universidad del Cauca.

Por lo tanto, se le concedió el aval ético en reunión del Comité de Ética Para la Investigación Científica de la Universidad del Cauca, según consta en el acta N° 13 del día 4 de Septiembre de 2017.

Se expide la presente certificación en Popayán, a los cinco (5) días del mes de Septiembre de dos mil diecisiete (2017).

JIMMY ALEXANDER GUERRERO VARGAS
Presidente Comité de Ética Para la Investigación Científica en la Universidad del
Cauca

Carrera 2 No 1A - 25 Popayán Cauca Colombia
Teléfono: 57 2 820 9900 ext. 2830
Correo electrónico: vic@unicauca.edu.co
www.unicauca.edu.co

