

**EVALUACIÓN *IN VIVO* DEL EFECTO TÓXICO, CITOTÓXICO Y GENOTÓXICO
DEL PLAGUICIDA FINALE (*GLUFOSINATO DE AMONIO*) MEDIANTE LA
PRUEBA DE MICRÓNÚCLEOS EN ERITROCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA
DE RATÓN *ALBINO SUIZO***



JUAN CAMILO VIDAL OJEDA

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2018**

**EVALUACIÓN *IN VIVO* DEL EFECTO TÓXICO, CITOTÓXICO Y GENOTÓXICO
DEL PLAGUICIDA FINALE (*GLUFOSINATO DE AMONIO*) MEDIANTE LA
PRUEBA DE MICRONÚCLEOS EN ERITROCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA
DE RATÓN *ALBINO SUIZO***

Trabajo de Grado para optar al título de Biólogo

JUAN CAMILO VIDAL OJEDA

Directora:

Nohelia Cajas Salazar, Ph.D

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2018**

Nota de aceptación

Director _____
Nohelia Cajas Salazar Ph.D.

Jurado _____
Leidy Tatiana Arcos Ph.D.

Jurado _____
Willian Orlando Castillo Ph.D.

Lugar y fecha de sustentación: Popayán, 3 de Septiembre de 2018

*“ Todas las sustancias son venenosas; no hay ninguna que no lo sea.
La diferencia está en la dosis. ”
Paracelso*

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por guiarme por el buen camino, darme fortaleza para seguir adelante con mis sueños y metas y llenarme de bendiciones académicas y personales.

A mi madre Luz María y mi hermana Isabella, por brindarme su amor y apoyo incondicional a lo largo de mi trayectoria porque han sido un sustento para poder culminar mi carrera profesional, por estar siempre presentes y enseñarme a perseverar en mis objetivos hasta lograrlos.

A toda mi familia, en especial a mi abuelo Lauro Ojeda, por todos estos años de apoyo y preocupación, por su ayuda y su ejemplo.

A mis amigos de vida y mis compañeros, por compartir enriquecedoras experiencias, por las jornadas de estudio, por las risas y las preocupaciones, por sus consejos, por recorrer juntos este camino.

A la Ph.D. Luz Stella Hoyos, por inspirar en mí el rigor investigativo, por ser una maestra y profesional ejemplar, por su dedicación y exigencia, por sus aportes en la construcción de este trabajo y por las enseñanzas a todos los aspectos de la vida.

A la Ph.D Nohelia Cajas, por su guía, paciencia y aportes en la correcta realización de este trabajo.

Al M.Sc. Aldair Rosero y a la M.Sc. Mayra Alejandra Velasco, por sus aportes y asesoría durante el desarrollo del presente trabajo.

Al Grupo de Investigación en Toxicología, Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, por facilitarme el acceso a su laboratorio para la realización de toda la fase experimental del proyecto. A Ingrid Reyes, Vanesa Ramos y Elsa Velasco, por su instrucción, apoyo, conocimiento brindado y su amistad.

A la Veterinaria de Colombia (VECOL), por la donación de los animales de experimentación utilizados durante el desarrollo de este estudio.

A la Universidad del Cauca, por ser un segundo hogar, por todo el conocimiento y aprendizaje en sus aulas, pasillos e instalaciones.

Finalmente, a todas las personas que aportaron de alguna forma en la realización de este trabajo, tanto a nivel personal como profesional, muchas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	5
ÍNDICE DE TABLAS	9
ÍNDICE DE FIGURAS	10
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	11
RESUMEN	12
INTRODUCCIÓN	13
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
2. JUSTIFICACIÓN	17
3. OBJETIVOS	19
3.1 OBJETIVO GENERAL	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4. MARCO TEORICO	20
4.1 CONTROL DE PLAGUICIDAS QUÍMICOS EN COLOMBIA	20
4.2 LOS HERBICIDAS	20
4.3 FINALE	21
4.3.1 Información del componente activo del plaguicida Finale	21
4.3.2 Modo y mecanismo de acción del plaguicida Finale	22
4.4 ERITROPOYESIS EN RATONES	22
4.5 PRUEBAS BIOLÓGICAS	23
4.5.1 Dosis Letal 50 como prueba para evaluar toxicidad	23
4.5.2 Pruebas para evaluar citotoxicidad	24

4.5.3.	Pruebas para evaluar genotoxicidad	24
4.5.4	Micronúcleos como prueba para evaluar genotoxicidad	24
5.	ANTECEDENTES	26
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	28
6.1	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	28
6.2	QUÍMICOS	28
6.2.1	Finale	28
6.2.2	Ciclofosfamida	28
6.3	DISEÑO EXPERIMENTAL	28
6.4	DOSIS EXPERIMENTALES PARA LOS TRATAMIENTOS	30
6.5	PRUEBA MICRONÚCLEOS EN ERITROCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA DE RATÓN	30
6.6	DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD	31
6.7	DETERMINACIÓN DE DAÑO CITOTÓXICO	31
6.8	DETERMINACIÓN DE DAÑO GENOTÓXICO	31
6.9	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	31
7.	RESULTADOS	33
7.1	EFECTO TÓXICO	33
7.1.1	Síntomas locales y sistémicos de intoxicación durante el experimento de DL50	33
7.1.2	Dosis letal 50 (DL50)	34
7.2	DOSIS ADMINISTRADAS PARA LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS EN ERITROCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA	35
7.3	EFECTO CITOTÓXICO	36

7.4	EFFECTO GENOTÓXICO	38
8.	DISCUSION	42
9.	CONCLUSIONES	49
10.	RECOMENDACIONES	50
11.	BIBLIOGRAFIA	51
	ANEXO	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Grupos de estudio Dosis Letal 50	29
Tabla 2. Grupos de estudio citotoxicidad y genotoxicidad	30
Tabla 3. Síntomas locales y sistémicos de intoxicación evaluados por observación directa en ratones <i>Albino suizo</i> durante las 24 horas de tratamiento con dosis de Finale.	33
Tabla 4. Mortalidad acumulada de ratones <i>Albino suizo</i> en 24 horas expuestos por vía oral (gavage) a diferentes dosis de Finale (Mortalidad expresada en porcentaje y en probits).	34
Tabla 5. Promedio de EPC/ENC en 1000 células totales obtenidos al evaluar las muestras de sangre periférica de 7 ratones por tratamiento después de 24 horas desde la administración de la dosis.	37
Tabla 6. Promedio de MN en 1000 PCE obtenidos al evaluar las muestras de sangre periférica de 7 ratones por tratamiento después de 24 horas desde la administración de la dosis.	40

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Formula Estructural Glufosinato de Amonio. 22
- Figura 2.** Diagrama logaritmo de la dosis vs Probits de la Tabla 4 para el cálculo de LD50 del plaguicida Finale administrado por vía oral. La línea roja representa la interpolación del 50% correspondiente a la DL50. 35
- Figura 3.** Eritrocitos de sangre periférica de ratón Albino suizo: eritrocitos policromáticos (EPC) teñidos de morado y eritrocitos normocromáticos (ENC) teñidos de rosado. 36
- Figura 4.** Promedio total de EPC/ENC \pm DS en 1000 células totales inducido por las dosis en mg/kg de Finale durante 24 horas de tratamiento. El nivel de significancia $p \leq 0,01$ con respecto al grupo control negativo se denota como **. 38
- Figura 5.** Eritrocito policromático micronucleado de sangre periférica de ratón *Albino suizo*. 39
- Figura 6.** Promedio total de MN / 1000 PCE \pm DS inducidos por las dosis de Finale 24 horas después de administrado el tratamiento. El nivel de significancia $p \leq 0,05$ con respecto al grupo control negativo se denota como *. El nivel de significancia $p \leq 0,01$ con respecto al grupo control negativo se denota como **. 41

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- GLA:** Glufosinato de amonio
- EPC:** Eritrocitos policromáticos
- MN:** Micronúcleos
- EPA:** Agencia de Protección Ambiental
- DAR:** Draft Assessment Report
- AVAD:** Años de vida ajustados por discapacidad
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
- AC:** Alteraciones cromosómicas
- ICH:** Intercambio de Cromátidas Hermanas
- DL50:** Dosis Letal 50
- FAO:** Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación
- TC:** Ingrediente activo grado técnico
- PF:** Producto formulado
- ENC:** Eritrocito normocromático
- OECD:** Organización para la Cooperación y el Desarrollo
- HUMN:** Human MicroNucleus Project
- HPLC:** Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
- MHB:** 2-hydroxy-4-methylphosphinico-butanoic acid
- MPP:** 3-methylphosphinico-propionic acid
- EM:** Eritrocitos micronucleados
- VECOL:** Veterinaria de Colombia
- CP:** Ciclofosfamida
- DMT:** Dosis Máxima Tolerada
- SPSS:** Statistical Package for the Social Sciences
- RNA:** Ácido ribonucleico
- SD:** Desviación estándar
- SNC:** Sistema nervioso central
- ERO:** Especies reactivas de oxígeno

RESUMEN

La falta de aspersiones aéreas con glifosato para erradicar cultivos de uso ilícito a nivel nacional, ha llevado al gobierno Colombiano a plantear el glufosinato de amonio (GLA), componente activo del plaguicida Finale, como nuevo químico el cual lograría minimizar estos cultivos y no causaría los mismo efectos adversos que el glifosato. Los departamentos de Nariño, Cauca, Putumayo y Caqueta son zonas con mayor densidad de cultivos y por ende focos donde la población estaría expuesta a potenciales propiedades genotóxicas teniendo en cuenta el futuro uso masivo del plaguicida Finale. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto toxico, citotóxico y genotóxico del plaguicida Finale sobre un modelo *in vivo* en sangre periférica de ratón *Albino suizo* con el fin de establecer si existe un efecto negativo que impacte sobre la salud de la personas expuestas.

Para el desarrollo del trabajo se determinó experimentalmente la Dosis Letal 50 definiendo la toxicidad aguda del plaguicida Finale, posteriormente se organizaron grupos de 8 ratones a los cuales se les administro diferentes dosis del plaguicida (97, 194, 243, 291, 340 y 389 mg/kg) con el fin de evaluar los efectos citotóxicos y genotóxicos. Se utilizaron pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y pruebas post hoc de U Mann-Whitney y se realizó el análisis estadístico en el programa SPSS 22.0 para Windows. En las muestras tomadas se detectó la disminución en la frecuencia de eritrocitos policromáticos (EPC) y el aumento en la frecuencia de micronúcleos (MN) inducidos por las dosis del plaguicida Finale por lo que se determinó el plaguicida presenta propiedades genotóxicas.

Palabras Clave: Herbicida, cultivos de uso ilícito, Colombia, efectos adversos, micronúcleos, ratón.

INTRODUCCIÓN

La introducción de cultivos de uso ilícito produjo un aumento significativo a nivel mundial en el uso de diversos plaguicidas. En Colombia la siembra de coca, marihuana y amapola se ha incrementado a 209 mil hectáreas en el 2017 (UNODC, 2018), y el gobierno para erradicar estos cultivos ha usado por muchos años aspersiones aéreas con glifosato. Actualmente, por sus efectos nocivos para la salud se ha propuesto reemplazar el polémico glifosato por glufosinato de amonio, componente activo del plaguicida con nombre comercial Finale. Finale es un herbicida no selectivo, de contacto y de amplio espectro usado para el control post-emergente de malezas anuales y perennes en ambientes agrícolas, forestales y paisajísticos (Crop Science Colombia, 2017).

La existencia de posibles efectos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos y carcinogénicos por la exposición humana al plaguicida Finale no han sido lo suficiente documentados en la literatura científica y es aún tema de controversia, por otro lado los estudios sobre su componente activo (GLA) han arrojado resultados aún no concluyentes. La Agencia de Protección Ambiental de los EE.UU. (EPA), el Draft Assessment Report (DAR) y el Comité FAO/OMS sobre residuos de plaguicidas (JMPR) identificaron que el glufosinato de amonio no es mutagénico ni genotóxico (EPA, 2003; KEMI, 2002; Wolterink *et al.*, 2012). Sin embargo, varias investigaciones independientes empleando plaguicidas que contienen este compuesto activo demuestran efectos tóxicos en células neuronales, efectos hormonales y enzimáticos en la inhibición de la enzima glutamina sintetasa y efectos genotóxicos como la inducción de micronúcleos en renacuajos (Lajmanovich *et al.*, 2014; Mao *et al.*, 2011; Watanabe, 1997; Watanabe and Sano, 1998). Luego de realizar una revisión de literatura científica encontramos que es escasa la información disponible sobre los posibles efectos de la exposición al plaguicida Finale que puede causar daños en los seres vivos afectando por ejemplo, la integridad del ADN.

Motivados por la polémica y la brecha en el conocimiento es prioritario para el país y para el Grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética realizar estudios en sistemas biológicos que permitan comprender los posibles efectos del plaguicida Finale dado su componente activo (GLA) y en consecuencia el objetivo de este estudio fue evaluar *in vivo* el efecto tóxico, citotóxico y genotóxico del plaguicida Finale, mediante la prueba de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica de ratón *Albino suizo*. A los ratones se les administró seis dosis subletales (97, 194, 243, 291, 340 y 389 mg/kg) del plaguicida Finale, se evaluaron la frecuencia EPC y de MN y se compararon con el grupo control negativo. Los resultados indican que el plaguicida Finale presenta propiedades citotóxicas afectando el ciclo celular evidenciando reducción de EPC y propiedades genotóxicas incrementando la frecuencia de MN a medida que aumenta la dosis

por lo que se puede determinar que existe riesgo potencial en el desarrollo de enfermedades constituyendo este trabajo como una forma efectiva de poder hacer prevención temprana de los problemas de salud mediante la toma de decisiones y acciones tendientes a la reducción y eliminación de los riesgos.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La producción, transporte, venta y consumo ilegal de cultivos de uso ilícito se comercializan de manera informal en muchos países y en especial en países de Latinoamérica, siendo según el Instituto Latinoamericano de Investigaciones Sociales - ILDIS, (2006) un fenómeno internacional, que mueve entre el 20 y el 30% de la economía mundial, motivo por el cual hay un gran interés por parte de los gobernantes de plantear programas de control y erradicación de los mismos y generar alternativas lícitas de desarrollo. Plantaciones como coca, marihuana y amapola pueden según su transformación química, originar problemas como el narcotráfico y de ahí que se usen gran cantidad de herbicidas para controlar estos cultivos. El uso de herbicidas es cada vez mayor en todo el mundo. El valor del mercado de herbicidas a nivel mundial creció un 39% entre 2002 y 2011 y se prevé crezca en un 11% adicional en 2018 (Gianessi, 2016). Adicionalmente, el bienestar de la población humana expuesta se encuentra afectado presentando problemas de salud como la obstrucción pulmonar crónica (Boschetto *et al.*, 2013), anomalías congénitas (Wigle *et al.*, 2014), numerosos tipos de cáncer, incluidos pulmón, piel, hígado, riñón, próstata, médula ósea y vejiga (Clapp *et al.*, 2008; Henry *et al.*, 2002; Irigaray *et al.*, 2011) e intoxicaciones (Presgrave *et al.*, 2016) como efecto adverso del creciente uso de herbicidas, efecto que de no ser debidamente controlado puede acrecentar los índices de problemas de salud pública. Se estima que la carga de enfermedad atribuida a exposición ambiental y manejo de ciertas sustancias químicas asciende a 4.9 millones de muertes (8,3% de la carga global de enfermedad) y 86 millones de años de vida ajustados por discapacidad (AVAD) (5,7% del total); adicionalmente los plaguicidas involucrados en las intoxicaciones contribuyen con 375.000 muertes anuales (Prüss-Ustün, A., 2016). Según el Sistema de Vigilancia de Eventos en Salud Pública-Sivigila, durante los años 2010, 2011, 2012 y 2013 se notificaron 23.844, 27.126, 27.242 y 28.266 casos de intoxicaciones por sustancias químicas (plaguicidas, medicamentos, metanol, metales pesados, solventes, gases y otras sustancias químicas). Para el 2014, se notificaron 32.814 de los cuales el 28,67% corresponde a intoxicaciones por plaguicidas (Instituto Nacional de Salud, 2016).

En Colombia, el informe publicado por la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC) y el Ministerio del Interior y de Justicia, indica que el país pasó de tener un total de 146 mil hectáreas sembradas con cultivos de uso ilícito en el 2016, a 209 mil en el 2017 siendo actualmente los departamentos del sur de país (Nariño, Cauca, Putumayo y Caquetá) los focos de mayor densidad de cultivos (73%) (UNODC, 2018). Anexo a esta situación, en las últimas décadas en las aspersiones contra los cultivos de uso ilícitos se ha usado glifosato, herbicida no selectivo de amplio espectro. Para el año 2015, el Consejo Nacional de Estupefacientes anunció la suspensión de estas aspersiones a causa del efecto

negativo que esta sustancia ejerce sobre la salud humana, sin embargo, el gobierno Colombiano motivado por reanudar las aspersiones aéreas contra los cultivos de uso ilícito ha propuesto reemplazar el polémico glifosato por el glufosinato de amonio, componente activo del plaguicida Finale. En el caso de este plaguicida existe poca evidencia de la dosis letal 50 encontrando reportes en ratas (Bayer, 2014, 2002, 2012); además de efectos citotóxicos en células del neuroepitelio y del sistema inmune (Fujii *et al.*, 1996; Voccia *et al.*, 1999) y efectos genotóxicos en eritrocitos micronucleados de renacuajos (Lajmanovich *et al.*, 2014). Conocedores de esta situación, se realizó el presente estudio para dar respuesta a la pregunta ¿Cuál es el efecto tóxico, citotóxico y genotóxico del plaguicida Finale sobre un modelo *in vivo* en sangre periférica de ratón *Albino suizo*?, esto con el fin de obtener y compartir información detallada, actualizada y confiable que permita extrapolar los datos a humanos y que motiven al diseño de nuevos estudios y oriente en la ejecución de políticas y estrategias de prevención temprana de desarrollo de problemas de salud.

2. JUSTIFICACIÓN

El uso masivo de plaguicidas a nivel mundial es un problema preocupante que afecta la salud pública. Estos han sido ampliamente usados en el mundo entero a pesar que perjudican el medio ambiente y sus diferentes formas de vida. Colombia, país en desarrollo, cuyo principal ingreso económico es la agricultura, usa plaguicidas para cultivos agrícolas y en forma extensiva usaba glifosato para erradicación de cultivos de uso ilícito. La Policía Nacional ha realizado pruebas piloto con GLA, componente activo del plaguicida Finale, con el cual podría reanudarse la fumigación aérea de cultivos de uso ilícitos. Es de interés estudiar el plaguicida Finale porque existen pocos estudios (González Calixto *et al.*, 2018; Lajmanovich *et al.*, 2014) que relacionan plaguicidas que contienen GLA con efectos mutagénicos siendo este estudio una herramienta útil para estimar el riesgo de genotoxicidad, y con ello posibles enfermedades.

Los plaguicidas como Finale, así como otros plaguicidas organofosforados están relacionados con la inhibición de la actividad de enzimas que interaccionan en el sistema nervioso central, por lo tanto, la mayor parte de los estudios están dirigidos a evaluar los efectos neurotóxicos que usualmente estos provocan a dosis agudas (Fabian *et al.*, 2011; Watanabe and Sano, 1998) mientras que los daños a nivel genético 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 con información relacionada al ácido desoxirribonucleico (ADN).

Es pertinente para Colombia y especialmente para el departamento del Cauca realizar estudios sobre los efectos del Finale debido a que el Cauca es uno de los 4 departamentos con mayor número de hectáreas de cultivos de uso ilícito (UNODC, 2018) donde se presentaría la posible futura aspersión aérea con el plaguicida Finale y en donde se desconoce en realidad a que riesgos se enfrenta la población expuesta.

Los pruebas citogenéticas como micronúcleos (MN), alteraciones cromosómicas (AC) e intercambio de cromátidas hermanas (ICH) son importantes biomarcadores que permiten detectar y relacionar daños en el ADN respecto a una determinada exposición y de esta manera aplicar estrategias direccionadas a la prevención temprana de enfermedades por medio de la generación de datos confiables en función de la retroalimentación científica a nivel nacional y mundial, conforme a un contexto de bienestar social en pro de la salud de las personas que posiblemente tendrán algún tipo de exposición al plaguicida Finale.

La novedad científica se sustenta en la generación de nuevo conocimiento a partir de técnicas científicas como la prueba de micronúcleos que permita la futura concientización de la población expuesta y la capacitación para educar a las personas involucradas en el uso del plaguicida Finale. También dar a conocer los

efectos producido por la exposición tóxica aguda, para que las poblaciones vulnerables y en riesgo tengan estrategias de prevención temprana de enfermedades y un mejor diagnóstico y tratamiento de las intoxicaciones. Es importante la socialización, divulgación y difusión de esta información y brindarla a la comunidad científica, a las entidades de salud pública y a la población en general además de motivar al diseño y ejecución de programas educativos de vigilancia epidemiológica y a la intervención y prevención oportuna de los riesgos de salud, para una mejor calidad de vida de las poblaciones expuestas.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto tóxico, citotóxico y genotóxico del plaguicida Finale (*Glufosinato de amonio*) en eritrocitos de sangre periférica de ratón *Albino suizo*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar el efecto tóxico del plaguicida Finale mediante la prueba de la Dosis Letal 50 (LD50) en ratones Albino suizo.
- Determinar el efecto citotóxico del plaguicida Finale mediante la cuantificación de eritrocitos policromáticos/eritrocitos normocromáticos de sangre periférica de ratón Albino suizo.
- Evaluar el efecto genotóxico del Finale mediante la prueba de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica de ratón Albino suizo.

4. MARCO TEÓRICO

4.1 CONTROL DE PLAGUICIDAS QUÍMICOS EN COLOMBIA

Durante el proceso y control de un producto químico para uso agrícola, se siguen directrices internacionales en cuanto a desarrollo y evaluación de riesgos, orientados en los criterios para el registro de plaguicidas por la organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación (FAO) y el manual técnico andino para el registro y control de plaguicidas químicos de uso agrícola para su aplicación en los países miembros de la comunidad andina. Estos estudian detenidamente el destino y comportamiento tanto de los compuestos activos como los demás componentes de los plaguicidas químicos de uso agrícola.

Según el manual técnico andino para el registro y control de plaguicidas químicos de uso agrícola la evaluación, clasificación y control del riesgo ambiental de los plaguicidas químicos se hace con base en la información de los estudios presentados para el ingrediente activo grado técnico (TC) de la formulación. Cuando la autoridad nacional competente (ministerio de agricultura y desarrollo rural, a través del instituto colombiano agropecuario) lo requiera, con la información de los estudios realizados con el producto formulado (PF). La clasificación toxicológica de los plaguicidas químicos se hace con base a la información de los estudios de toxicología aguda del PF (DL50 oral, dermal, e inhalatoria) y la evaluación toxicológica del producto químico con los estudios del ingrediente activo y del producto formulado, según corresponda. Se exigen estudios de mutagenicidad para los plaguicidas químicos cuando existe un riesgo potencial de exposición, tomando como criterio selectivo que toda respuesta positiva "*in vitro*" debe ser confirmada con una prueba "*in vivo*". (Comunidad Andina, 2002).

Las metodologías más recomendadas son: ensayo de mutaciones reversas en *Salmonella typhimurium*, ensayo letal recesivo ligado al sexo en *Drosophila*, test de micronúcleos, ensayos citogenéticos de células germinales de mamíferos y ensayo de intercambio de cromátides hermanas (Comunidad Andina, 2002; OECD, 2014)

4.2 LOS HERBICIDAS

Los herbicidas son productos químicos que se utilizan para inhibir o interrumpir el desarrollo de plantas indeseadas, en terrenos que han sido o van a ser cultivados. Existen varias formas de clasificar los herbicidas, teniendo en cuenta sus propiedades químicas y su modo de acción (FAO, 2012).

Los herbicidas se pueden aplicar al follaje o al suelo. Los que se aplican al follaje y afectan solamente la parte tratada se describen como herbicidas de contacto, mientras que aquellos que se trasladan del follaje tratado hacia un punto de acción

en otro lugar de la planta se denominan herbicidas sistémicos (FAO, 2012). Los herbicidas de aplicación al suelo que generalmente afectan la germinación de las malezas, tienen que persistir por algún tiempo para ser efectivos y se denominan herbicidas residuales. Algunos herbicidas residuales tienen acción de contacto y afectan las raíces y los tallos en la medida en que emergen de la semilla, mientras que otros entran en la raíz y las partes subterráneas de la planta y se translocan a su punto de acción (Humburg *et al.*, 1989). El destino y la persistencia del herbicida en el suelo, su potencial para contaminar las aguas superficiales y subterráneas, son de importancia clave en relación con la fitotoxicidad para los cultivos y la calidad del agua de beber para la salud pública.

Tanto el tratamiento foliar como el tratamiento al suelo se describen en función del momento de aplicación y del desarrollo del cultivo encontrando tratamientos de pre-plantación, los cuales se aplican antes de la plantación del cultivo, tratamientos de pre-plantación incorporada que se refieren solamente a herbicidas activos en el suelo, aplicados antes de la plantación del cultivo y de la emergencia de las malezas e incorporados al suelo mediante labranza poco profunda, tratamientos de pre-emergencia que se realizan siempre antes de la emergencia de las malezas y que pueden o no ser antes de la emergencia del cultivo y tratamientos de post-emergencia que se aplican después que el cultivo y las malezas han emergido (Crop Science Department and North Carolina State University, 2007)

4.3 FINALE

Finale, es un herbicida de amplio espectro que pertenece al grupo químico fosfónico y registrado por la compañía Bayer S. A. con el nombre comercial Finale, formulado como concentrado soluble, que penetra a través de los tejidos verdes de las plantas susceptibles, donde actúa sobre la biosíntesis de glutamina. (Crop Science Colombia, 2017).

4.3.1 Información del componente activo del plaguicida Finale

Nombre Común: GLUFOSINATO DE AMONIO

Nombre Químico: amonio-(2RS)-2-amino-4-(metilfosfinato) ácido butírico

Formula Empírica: $C_5H_{15}N_2O_4P$

Grupo Químico: Ácido fosfónico.

Número de CAS: 77182-82-2

Formula Estructural:

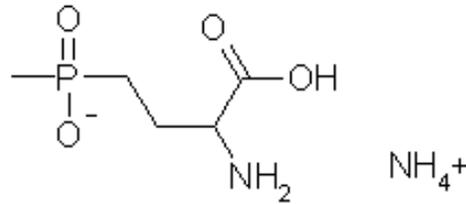


Figura 1. Formula Estructural Glufosinato de Amonio. Fuente: Department of Agriculture, Fisheries and Forestry, Canberra, Australia, 2015.

4.3.2. Modo y mecanismo de acción del plaguicida Finale: Finale es un herbicida foliar post-emergente, de contacto, ligeramente sistémico, que es absorbido principalmente por las hojas y en menor concentración por la parte verde de los tallos. La movilidad en la planta depende del estado hídrico de la misma, es más móvil en gramíneas que en hojas anchas. Finale promueve una inhibición indirecta de la fotosíntesis, inhibe la enzima cloroplástica glutamino sintetasa involucrada en la asimilación de amonio y la producción del aminoácido glutamina. La acumulación de amonio causa un rápido desacoplamiento de la fotofosforilación, así como inhibición de la fijación fotosintética de carbono y interrupción de la síntesis de aminoácidos (Crop Science Colombia, 2017). Es clasificado por la Herbicide Resistance Action and Committee, (2017) como un herbicida del grupo H, inhibidor de la síntesis de glutamina.

4.4 ERITROPOYESIS EN RATONES

En roedores el proceso de producción, proliferación y maduración de eritrocitos inicia con las unidades formadoras de blastos eritroides que se originan de una célula tronco hematopoyética. La célula de la serie roja más joven identificable por sus características morfológicas, en la médula ósea es el pre-eritroblasto, que madura a normoblasto, el cual pasa por tres estadios de maduración, el normoblasto basófilo, el PCE y el eritrocito normocromático (ENC)

El normoblasto ortocromático, 5 horas después de la última mitosis, expulsa su núcleo; proceso que incluye aproximación a la periferia y finalmente aislamiento y liberación del mismo. Los normoblastos pierden su núcleo al pasar de la médula ósea al torrente circulatorio, debido a que los poros entre las células endoteliales de los sinusoides medulares, tienen un diámetro menor que el núcleo del normoblasto por lo que al atravesar dichos poros, la membrana y el citoplasma, que son deformables, pasan fácilmente; pero el núcleo queda atrapado. El núcleo

expulsado queda en la médula y es fagocitado por los macrófagos del estroma medular. El normoblasto ortocromático, al perder su núcleo, se convierte en reticulocito (PCE), que es el eritrocito joven que sale a la circulación. Los PCE continúan su ciclo hasta convertirse en eritrocitos maduros (ENC) aumentando el contenido de hemoglobina, por lo que el citoplasma se vuelve menos azul y se torna más rojo (Tae *et al.*, 2009).

Durante la proliferación, un determinado agente puede ser suministrado a los roedores causando daño cromosómico ya sean fragmentos acéntricos o cromosomas rezagados, los cuales no serán adheridos a las fibras del huso mitótico y no se integraran a los núcleos de las células hijas, formando eventualmente MN. En los mamíferos, después que el normoblasto ortocromático expulsa su núcleo para convertirse en eritrocito, el micronúcleo permanece en el citoplasma de los eritrocitos jóvenes y es ahí cuando es posible visualizarlos tanto en medula ósea como en sangre periférica.

En la prueba de micronúcleos la relación EPC/ENC entre animales tratados con el agente de ensayo y los animales del grupo control proporciona información sobre citotoxicidad, mientras que la frecuencia de MN en EPC indica daño genotóxico por exposición de forma aguda aumentando el daño cromosómico observado en un incremento de MN. (Krishna and Hayashi, 2000).

4.5 PRUEBAS BIOLÓGICAS

4.5.1 Dosis Letal 50 como prueba para evaluar toxicidad: Determinar la toxicidad de una sustancia es importante para poder establecer la cantidad de esa sustancia a la que un organismo puede ser expuesto sin que se genere un efecto adverso (Repetto and Kuhn, 2009). Algunos organismos tienen con pequeñas cantidades un efecto positivo sobre el cuerpo y se vuelven peligrosas cuando se exponen en mayor concentración. Los efectos tóxicos son alteraciones nocivas de la función fisiológica causados por agentes externos. La toxicidad es una propiedad fisiológica que define la capacidad que tiene un producto químico para causar daño o producir lesión a un organismo vivo por medios que no son mecánicos; por lo tanto, la toxicidad de un producto químico depende del grado de exposición a éste ejerciendo sus acciones tóxicas en forma sistemática, o bien, en el lugar de contacto o en un sistema de órganos (Repetto, 2002).

Los estudios de toxicidad tienen como objetivo evaluar el riesgo global o peligro potencial que un agente químico puede ocasionar sobre la salud cuando es objeto de exposiciones agudas o crónicas. La Dosis Letal 50 (DL50) determina la cantidad en miligramos de un producto tóxico que al ser administrado en una población experimental, en un periodo de tiempo, causa la muerte al 50% de la población expuesta. Siendo la dosis letal 50 dependiente del peso corporal del animal, los

resultados se expresan en términos de miligramos de toxico por kilogramo en peso del animal.

4.5.2 Pruebas para evaluar citotoxicidad: Las pruebas citotóxicas permiten evaluar la capacidad de un agente químico, físico o biológico para causar daño a nivel celular expresado en cambios en la morfología, bloqueo de mecanismos de reparación celular o alterando la cinética del ciclo celular (Arencibia *et al.*, 2013). Dentro de estos se encuentran la integridad de la membrana y del citoesqueleto, metabolismo, síntesis y degradación, liberación de constituyentes celulares o productos, regulación iónica y división celular (Repetto, 2002). Para el análisis citotóxico *in vivo* a nivel de eritropoyesis se tiene en cuenta la relación EPC/ENC contando el número de EPC en 1000 células totales con respecto al grupo control negativo (agua) siendo esta la proporción normal que sirve como punto de partida para establecer que un incremento de EPC indica proliferación celular y un descenso indica inhibición del ciclo celular.

4.5.3 Pruebas para evaluar genotoxicidad: Los pruebas genotóxicas son importantes para detectar daño a nivel de material genético ocasionado por agentes físicos, químicos o biológicos que interactúan con la molécula de ADN de forma directa o indirecta e identificar potenciales agentes cancerígenos y mutagénicos. Para comprobar la actividad genotóxica de un agente se usan varias técnicas, como el test de Ames, reparación de roturas de ADN, no disyunción cromosómica, alteraciones cromosómicas y micronúcleos (OECD, 2014). La prueba de micronúcleos ha sido ampliamente utilizada para probar el efecto genotóxico de muchos productos químicos. Los micronúcleos son fácilmente visualizados en muestras de eritrocitos y son un importante indicativo de aberraciones cromosómicas (Flores and Yamaguchi, 2008). Para determinar el daño genotóxico *in vivo* del plaguicida Finale se tiene en cuenta la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica.

4.5.4 Micronúcleos como prueba para evaluar genotoxicidad: La prueba de micronúcleos fue relatada por primera vez en 1970 por Boller y Schmid y posteriormente fue usado por Heddle en 1977 (Evans HJ., 1997). El micronúcleo es un núcleo adicional, de menor tamaño, separado del núcleo principal de una célula durante la división celular y está compuesto por cromosomas enteros o por fragmentos cromosómicos que sobran de otros cromosomas terminada la mitosis y son visibles fácilmente al microscopio óptico (Fenech *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 1998). Los micronúcleos son el resultado de los cambios estructurales espontáneos o experimentalmente inducidos en el cromosoma, o el aparato mitótico, quedando

por tanto excluidos de los nuevos núcleos que son reformados en la telofase.(Ramírez and Saldanha, 1998).

El ensayo de micronúcleos en roedores está incluido actualmente dentro de la batería de estudios toxicológicos exigidos por las agencias reguladoras, tales como la Organización para la Cooperación y el Desarrollo (OECD) y la agencia estadounidense para la Protección del Medio Ambiente (EPA) (EPA, 1998; OECD, 2014, 2009) y es recomendada para los organismos reguladores de todo el mundo para ser llevado a cabo como parte de la evaluación de la seguridad de productos químicos dada su significancia biológica (Krishna and Hayashi, 2000). Es fácilmente reproducible y brinda información clara, permitiendo registrar *in vivo* la capacidad de las sustancias químicas de inducir rupturas cromosómicas o interferir la migración de los cromosomas metafásicos durante la mitosis de células somáticas, consolidándola como una técnica usada con éxito en los estudios de biomonitoreo (Larmarcovai *et al.*, 2008).

La técnica fue validada a nivel mundial en 1999, por el programa internacional de micronúcleos humanos (HUMN: Human MicroNucleus Project), con la participación de 42 laboratorios (aproximadamente 16500 persona de diferentes poblaciones del mundo). La prueba de micronúcleos se puede realizar en roedores analizando eritrocitos de sangre periférica procedentes de la médula ósea de mamíferos de laboratorio que fueron expuestos por vías apropiadas, a una sustancia determinada, estos eritrocitos han expulsado el núcleo principal en la etapa de eritrocito ortocromático mientras que el micronúcleo, en caso de haberse formado permanece en el citoplasma haciendo más fácil y rápida la identificación de estos. Para determinar daños cromosómicos originados por exposición aguda, se analizaron los MN presentes en EPC que al aun contener ácido ribonucleico (ARN), tienen carácter basófilo y se tiñen de color morado o azul con el colorante Giemsa.

5. ANTECEDENTES

En pruebas realizadas en laboratorio para evaluar la biotransformación del glufosinato de amonio, componente activo del plaguicida Finale, Stumpf (1993) y Maas and Braun (1999) trataron grupos de ratas administrando una única dosis de 21 mg/kg y 20 mg/kg de GLA por vía oral (gavage). Recogieron muestras de orina y heces y caracterizaron los metabolitos por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) estableciendo que el residuo predominante fue GLA y en menor proporción los metabolitos secundarios 2-hydroxy-4-methylphosphinico-butanoic acid (MHB) y 3-methylphosphinico-propionic acid (MPP) (8% MHB y \leq 1% MPP).

Estudios de toxicidad aguda reportan que el compuesto activo con ratones de la cepa ICR cuyos tratamientos fueron administrados por vía oral utilizando como vehículo solución salina presentaron una DL50 de 436 mg/kg en machos y 464 mg/kg en hembras (E. Ebert, 1990; Inoue, 1982). El plaguicida Fínale según Bayer (2012) reporta una dosis letal 50 oral en ratas hembras correspondiente a 1.730 mg/kg, mientras que los plaguicidas organofosforados Liberty y Basta cuyo componente activo también es glufosinato de amonio presentan DL50 en ratas de 1.910 mg/kg y 2000 mg/kg respectivamente (Bayer, 2014, 2002).

Las pruebas de genotoxicidad evaluando GLA, componente activo del plaguicida Fínale en pruebas *in vitro* utilizando el biomarcador de aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos, mutaciones puntuales en *Salmonella typhimurium* y mutaciones genéticas en locus de ratones (Ballantyne, 2001; Cifone, 1985; Mosesso, 1990), y pruebas *in vivo* como alteraciones cromosómicas en médula ósea de ratón (Jung and Weigand, 1986) no evidenciaron daño genotóxico en ninguna de las pruebas anteriores mientras que Lajmanovich *et al.*, (2014) evaluando la frecuencia de eritrocitos micronucleados (EM) en sangre de renacuajos de *Rhinella arenarum* expuestos a tres concentraciones sub-letales (3.75, 7.5 y 15 mg/l) de una formulación comercial de GLA establecieron que se induce un aumento en la frecuencia de EM dependiente de la concentración. Se resalta que los micronúcleos son un biomarcador ampliamente utilizado en estudios para determinar el riesgo genético asociado a la exposición a plaguicidas *in vitro* e *in vivo* (Bolognesi *et al.*, 2011).

Se han observado signos de neurotoxicidad en la mayoría de las especies de animales que han sido expuestos a glufosinato de amonio por vía oral incluyendo síntomas como convulsiones, temblor y respiración irregular en ratas (EPA., 1994a, 1994b), hiperactividad y agresividad en ratones (EPA., 1994c, 1994d) y tremor, diarrea, y pérdida del equilibrio en perros (EPA., 1994e). Estudios de neurotoxicidad describen varios casos de intoxicación humana por ingestión (suicida) de GLA observando síntomas como náuseas, vómitos, diarrea, dolor abdominal, temblor, hipotonía, bradicardia o taquicardia, somnolencia, pérdida de la

conciencia, convulsiones y paro respiratorio en un período de tiempo de 24 horas. (Mao *et al.*, 2011; Watanabe and Sano, 1998)

Los efectos del glufosinato de amonio en la reproducción de ratas y ratones han demostrado un aumento en la pérdida de la pre y post implantación del feto, muerte intrauterina de los animales, reabsorciones y abortos, partos prematuros y disminución del tamaño de la camada (KEMI, 2002) asociando la disminución en el número de fetos perdidos con el aumento en las dosis (EPA., 1993). Los animales que nacen después de administrarle una dosis de 10 mg/kg a la madre en gestación mostraron bajo desarrollo del riñón y el uréter y retraso en la osificación esquelética (Watanabe T, 1996). El GLA afecta específicamente el neuroepitelio de la vesícula cerebral y el tubo neural que conduce a la muerte de células neuroepiteliales y produce deformidades causando el subdesarrollo del prosencéfalo, labios hendidos, e inhibición de la diferenciación de las células del mesencéfalo en ratas (Toshiaki Watanabe, 1997). Además las espermátidas tempranas y los espermatozoides maduros son blancos de la exposición a glufosinato, ocasionando disminución significativamente los parámetros de calidad espermática e incremento en el porcentaje daño al DNA (González Calixto *et al.*, 2018).

Luego de hacer una revisión en bases de datos como Science Direct, Ebsco, Jstor y Web of Science, se evidencia que son pocos los estudios a nivel mundial utilizando plaguicidas que contengan GLA, por lo que resulta de gran interés la generación de nuevas investigaciones, además entendiendo los vacíos que aún se encuentran en el conocimiento del daño citogenético ocasionado por el plaguicida Fínale, el desarrollo del presente trabajo contribuye con la generación de nuevo conocimiento para la comunidad en general.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio de tipo experimental se realizó en las instalaciones del Grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca. Para cumplir los objetivos se ejecutaron protocolos teniendo en cuenta las buenas prácticas de laboratorio y todas las actividades se llevaron a cabo cumpliendo las normas de bioética y bioseguridad relacionadas con la experimentación animal según lo establecido por el Comité de Ética para la Investigación Científica de la Universidad del Cauca mediante Aval N°13 del 4 de septiembre de 2017.

6.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron ratones *Albino suizo* de la cepa ICR que fueron suministrados por la Veterinaria de Colombia (VECOL) los cuales fueron de sexo masculino con edad aproximada de 8 a 12 semanas. Los animales estuvieron en un periodo de aclimatación durante una semana, siendo distribuidos al azar en jaulas de aluminio con sustrato viruta seca de madera. Cada ratón y cada jaula fueron rotuladas y estuvieron bajo temperatura ambiente (18 a 24°C) en condiciones de luz natural (ciclos de luz y oscuridad (12:12)). Para su alimentación se les proporciono diariamente a la misma hora nutricubos para roedores (Rodent LabDiet código: 5010) y acceso *ad libitum* a agua para todos los grupos experimentales. Todos los días se realizó un adecuado mantenimiento de limpieza.

6.2. QUÍMICOS

6.2.1 Finale: Finale (Lot N° LB00010817) es un herbicida no selectivo, líquido y concentrado soluble con registro de venta ICA N° 2550 y de categoría toxicológica IV (Ligeramente tóxico); formulado y distribuido por Bayer CropScience el cual se adquirió en una división de Bayer S.A (Colombia). Finale fue vehiculizado en una mezcla a partes iguales con agua de grifo para preparar una solución de trabajo la cual se le administro una sola vez por vía oral (gavage) a cada grupo experimental en diferentes dosis que se expresan en mg/kg de peso de ratón.

6.2.2 Ciclofosfamida: Ciclofosfamida (CP) (C-0768; Lot N° 87H0207), con fórmula empírica $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P \cdot H_2O$, se adquirió de Sigma-Aldrich Corporation. La CP se disolvió en agua destilada para preparar una solución de trabajo a una concentración de 50 mg/ml que se le administro a cada animal por vía intraperitoneal en una dosis de 0.01 ml/g de peso de ratón y se utilizó como control positivo.

6.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se determinó la Dosis Letal 50 (DL50) conformando cuatro grupos experimentales y un grupo control negativo, a cada uno de los cuales le fue asignado aleatoriamente diez animales (ver tabla 1). A cada uno de los grupos experimentales se les administro la misma dosis de Finale (en mg/kg), mientras que a los del grupo control se les administro la solución vehículo (agua de grifo). Las dosis de Finale que fueron asignadas a cada grupo fueron: 386 mg/kg al grupo II, 436 mg/kg al grupo III, 486 mg/kg al grupo IV y 536 mg/kg al grupo V. Estas dosis fueron seleccionadas con base en ensayos preliminares y en la DL50 reportada en la literatura para el compuesto activo por E. Ebert (1990): 436 mg/kg de peso corporal por vía oral. Los datos obtenidos se analizaron mediante el modelo estadístico Probit. El valor establecido indico que al administrarse mediante ingesta esa dosis en una población de ratones puede esperarse que se produzca la muerte del 50% de los animales. Posteriormente se estableció la Dosis Máxima Tolerada (DMT) calculada a partir del 80% de la DL50, la cual fue el punto de referencia para establecer las otras dosis experimentales.

Tabla 1. Grupos de estudio DL50

Grupo	Nº animales	Dosis (mg/kg)
I (Control)	10	0
II	10	386
III	10	436
VI	10	486
VI	10	536

De acuerdo a la tabla 2, los ratones fueron marcados uno por uno y asegurando el azar fueron distribuidos en grupos de estudio con el mismo número de ratones por grupo. Se establecieron ocho grupos de estudio conformados de la siguiente manera: un control negativo el cual también será usado como disolvente del plaguicida, seis grupos experimentales de ratones que serán tratados con diferentes dosis de Finale y un grupo control positivo con ratones que serán tratados con CP. El número de ratones por grupo de estudio fue de 7 ratones y el volumen de dosis que se le administrará a cada ratón se calculó con base al peso de cada animal.

Tabla 2. Grupos de estudio citotoxicidad y genotoxicidad

Grupos de estudio	Tratamientos	Dosis	N° Ratones
Control negativo	Agua	-	7
	Finale	20% de la DL50	7
	Finale	40% de la DL50	7
	Finale	50% de la DL50	7
	Finale	60% de la DL50	7
	Finale	70% de la DL50	7
	Finale	80% de la DL50 = Dosis Máxima Tolerada (DMT)	7
Grupo experimental	Ciclofosfamida	-	7

6.4. DOSIS EXPERIMENTALES PARA LOS TRATAMIENTOS

Basados en los datos obtenidos de la Dosis Letal 50 (DL50) del plaguicida Finale se establecieron seis dosis de la siguiente manera:

Dosis 1: Será el 20% de la DL50

Dosis 2: Será el 40% de la DL50

Dosis 3: Será el 50% de la DL50

Dosis 4: Será el 60% de la DL50

Dosis 5: Será el 70% de la DL50

Dosis 6: Será el 80% de la DL50 equivalente a la Dosis Máxima Tolerada (DMT)

6.5. PRUEBA MICRONÚCLEOS EN ERITROCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA DE RATÓN

La prueba de micronúcleos fue llevada a cabo de acuerdo al Manual de Pruebas Citogenéticas y Letales Dominantes en ratón escrita por Hoyos *et al.*, (2002).

En la hora cero se administraron los tratamientos a cada uno de los ratones por vía oral (método gavaje). A la hora 24 se le extrajo una pequeña muestra de sangre periférica de la arteria ventral de la cola sobre un portaobjetos limpio y con un

cubreobjetos se realizó un extendido lo más fino posible con el fin de obtener una distribución uniforme sobre toda la superficie de la placa. Se realizó una prefijación sumergiendo las placas en metanol puro por 10 minutos y se dejó secar al aire libre por 24 horas. Posteriormente, en la fase de coloración se sumergieron las placas en metanol puro por 2 minutos y luego fueron pasadas al colorante Wright's filtrado por 15 minutos. Luego las placas fueron lavadas con agua destilada por 2- 5 segundos y sumergidas en el colorante Giemsa 6% por 30 minutos. Finalmente las placas se lavaron nuevamente dos veces con agua destilada y se dejaron secar al aire libre por 24 horas antes de montar de forma permanente con Entellan.

6.6. DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD

Para evaluar la toxicidad se determinó experimentalmente la DL50 oral del plaguicida Finale estableciendo la dosis del plaguicida que provoca la muerte del 50% de la población de ratones (Múnera *et al.*, 2000; Randhawa, 2009).

Para los síntomas locales y sistémicos de intoxicación producidos por el plaguicida Finale se registraron por observación directa durante el tiempo de determinación de la DL50.

6.7. DETERMINACIÓN DE DAÑO CITOTÓXICO

Para la evaluación citotóxica por exposición aguda se registró el número de EPC/ENC en 1000 eritrocitos totales en los ratones controles y tratados (Hoyos *et al.*, 2002)

6.8. DETERMINACIÓN DE DAÑO GENOTÓXICO

Para la evaluación genotóxica por exposición aguda se registró el número de MN en 1000 EPC (Hoyos *et al.*, 2002)

6.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En el estudio se tuvieron en cuenta dos tipos de variables, la variable dependiente (EPC/ENC, la frecuencia de MN y los signos locales y sistémicos de intoxicación) y la variable independiente (dosis del plaguicida).

Se realizó un diseño de bloques completos aleatorizados donde cada ratón era considerado como una unidad y cada jaula con ratones un bloque, para evitar variables intragrupos, se colocaron el mismo número de ratones por jaula (8 ratones) y fueron tomados al azar para la administración del tratamiento. Para el análisis estadístico, los datos fueron sometidos a pruebas de estadística descriptiva

como media y desviación estándar, para determinar si los datos se ajustan a la distribución normal se aplicó la prueba de Shapiro-Wilk. Se utilizaron pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis para comparar las medias del grupo de datos y establecer si existía diferencia entre ellas y posteriormente pruebas post hoc de U de Mann-Whitney para comparar las diferentes dosis con respecto al grupo control negativo. En todos los casos, se trabajó con un $p \leq 0,05$. Para la realización del análisis estadístico se utilizó el programa SPSS 22.0 para Windows.

7. RESULTADOS

7.1 EFECTO TÓXICO

7.1.1 Síntomas locales y sistémicos de intoxicación durante el experimento de DL50

Los animales fueron evaluados por observación directa durante 24 horas para detectar cualquier signo y síntoma de intoxicación. La tabla 3 reporta el comportamiento de los ratones ante el efecto tóxico durante el tiempo de observación posterior a la administración de las dosis del plaguicida Finale; en la tabla se encuentran los signos de intoxicación por plaguicidas más conocidos, y el porcentaje de animales afectados en cada dosis. Los síntomas de intoxicación más frecuentes en todas las dosis fueron hipersensibilidad y pérdida del equilibrio, con un porcentaje promedio del 92,5% y 52,5% respectivamente, algunos síntomas se presentaron en menor proporción como la somnolencia (30%), convulsiones (27,5%) y aumento en la excreción (21,2%), mientras que otros como la disnea (26,8%), taquipnea (10%) y lacrimación (5%) con bajos porcentajes solo se observan a dosis altas.

Tabla 3. Síntomas locales y sistémicos de intoxicación evaluados por observación directa en ratones *Albino suizo* durante las 24 horas de tratamiento con dosis de Finale.

Signos de intoxicación	Porcentaje de animales afectados			
	386 mg/kg	436 mg/kg	486 mg/kg	536 mg/kg
Hipersensibilidad	90,3	91,4	93,2	95,1
Perdida del Equilibrio	49,8	51,2	54	55
Somnolencia	20,5	33	28,5	38
Convulsiones	18	22	30	40
Aumento en Excreción	19,8	20,2	21,9	22,9
Tremor	15,7	17,9	19	22,2
Piloerección	10,8	12,5	12,5	14,2
Disnea	0	0	50,1	57,1
Taquipnea	0	0	15	25
Lacrimación	0	0	10	10

7.1.2 Dosis letal 50 (DL50)

Para establecer la Dosis Letal 50 del plaguicida Finale, se evaluaron cuatro dosis experimentales (386, 436, 486 y 536 mg/kg) y se compararon con un grupo control al cual se le administró agua; se utilizaron 50 ratones machos adultos en total donde cada grupo estuvo conformado por 10 ratones asignados aleatoriamente y a los cuales se les administró una dosis del plaguicida por gavaje. Se registró el número de individuos muertos en un período de 24 horas (a partir del momento de la administración del plaguicida).

Después de administrada la dosis de 386 mg/kg la letalidad fue de un individuo, en la dosis de 436 mg/kg murieron dos, en la tercera (486 mg/kg) murió la mitad de la población y en la dosis de 536 mg/kg murieron 7 ratones. Se calculó el porcentaje de mortalidad el cual se transforma a probit. Los valores probit (tabla 4) se trazan contra las dosis logarítmicas calculadas y luego la dosis correspondiente a probit 5, es decir el 50%; en el presente caso, el Log LD50 es 2,68 y por lo cual se determina que LD50 = 486 mg / kg con un error estándar del 0,139 (figura 2). La prueba de bondad de ajuste de Pearson da como resultado $\chi^2 = 0,125$ con 1 grado de libertad y $p = 0,024$ indicando que hay concordancia entre las frecuencias observadas y las esperadas.

Tabla 4. Mortalidad acumulada de ratones *Albino suizo* en 24 horas expuestos por vía oral (gavage) a diferentes dosis de Finale (Mortalidad expresada en porcentaje y en probits).

Grupo de estudio	Dosis (mg/kg)	Log Dosis	Porcentaje de mortalidad	Probits
I (Control)	0	0	0	-
II	386	2,58	10	3,72
III	436	2,63	20	4,16
IV	486	2,68	50	5
V	536	2,72	70	5,52

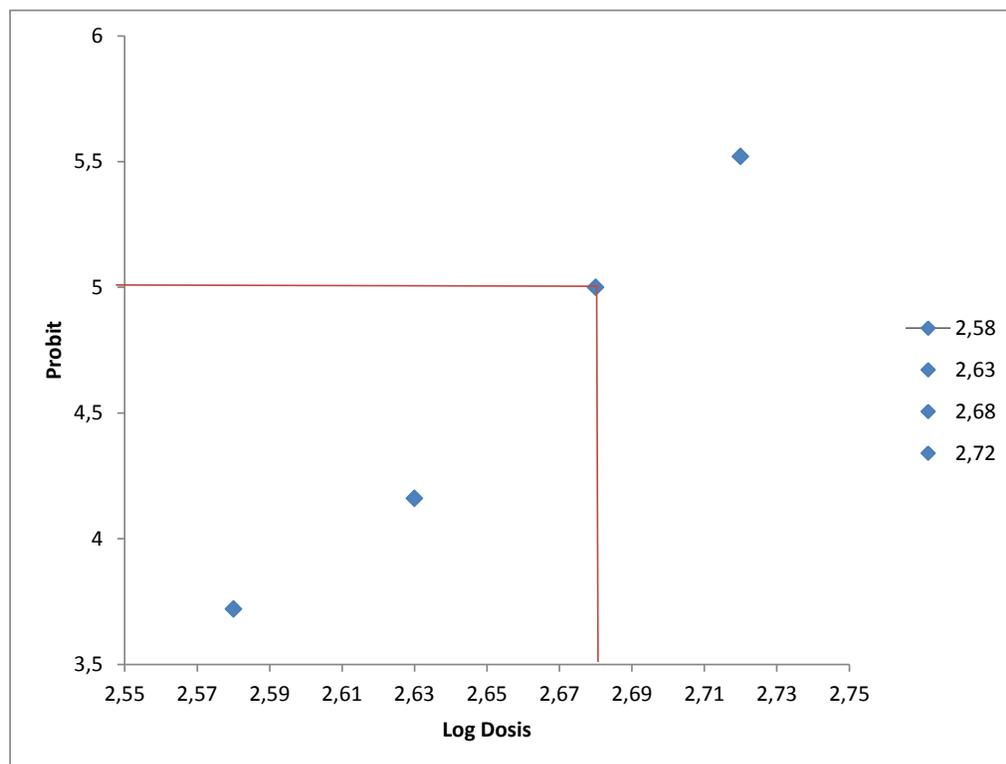


Figura 2. Diagrama logaritmo de la dosis vs Probits de la Tabla 4 para el cálculo de LD50 del plaguicida Finale administrado por vía oral. La línea roja representa la interpolación del 50% correspondiente a la DL50.

7.2 DOSIS ADMINISTRADAS PARA LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS EN ERITROCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA

Las dosis del Finale fueron administradas mediante una única dosis; en el tiempo cero se administró por vía oral (gavage) el plaguicida y 24 horas después se realizó el muestreo de sangre periférica. Estas dosis fueron calculadas a partir de la Dosis Letal 50 establecida (486 mg/kg) siendo la Dosis Máxima Tolerada – DMT el 80% de la LD50 (389 mg/kg), otra el 70% (340 mg/kg), el 60% (292 mg/kg) y el 50% (243 mg/kg), otra dosis el 40% (194 mg/kg) y una dosis del 20% (97 mg/kg). Adicionalmente el control positivo (CP) se administró en dosis de 50 mg/kg según lo reportado en estudios *in vivo* anteriores.

7.3 EFECTO CITOTÓXICO

La disminución en el porcentaje de los EPC sobre el número de células totales (EPC + ENC) indica un efecto citotóxico, con respecto al grupo control negativo. En la figura 3 se observa que los eritrocitos policromáticos (EPC) son eritrocitos jóvenes que contienen RNA y al ser basófilos tiñen de azul o morado con el colorante Giemsa mientras que los eritrocitos normocromáticos (ENC) son eritrocitos maduros, que perdieron el RNA y ganaron hemoglobina, tornandose acidófilo por lo que se tiñen de rosado con el colorante Wrigth.

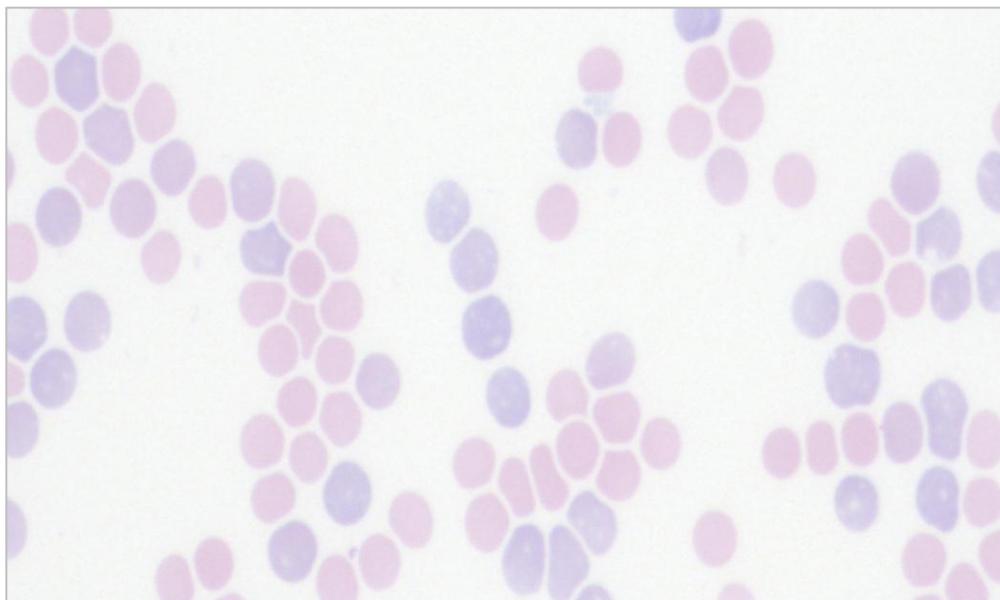


Figura 3. Eritrocitos de sangre periférica de ratón Albino suizo: eritrocitos policromáticos (EPC) teñidos de morado y eritrocitos normocromáticos (ENC) teñidos de rosado.

Debido a que los datos de citotoxicidad obtenidos no se ajustaron a la distribución normal (Shapiro-Wilk: $p \leq 0,05$) se usaron pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney.

Se determina que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,001$) en el número promedio de EPC/ENC en 1000 células totales (EPC + ENC) como resultado de la prueba de Kruskal-Wallis.

Mediante la prueba de comparaciones U de Mann-Whitney ($p \leq 0,05$) y la correlación no paramétrica de Spearman ($Rho = - 0.198$ y $p \leq 0,05$) se concluye que hay diferencia significativa en todos los tratamientos al compararlos con el

grupo control negativo, evidenciando una tendencia a la disminución de la frecuencia de eritrocitos policromáticos en el conteo total de células. También se observa que el efecto citotóxico es inversamente proporcional a la dosis, por lo que, a dosis más bajas mayor disminución de los EPC y a dosis más altas menor disminución de los EPC (figura 4).

En la tabla 5 se resume el número promedio de EPC registrados al analizar la sangre periférica de los ratones a las 24 horas después de administrado el tratamiento a las dosis 97, 194, 243, 291, 340 y 389 mg/kg y los respectivos controles (agua y CP) además de la desviación estándar para cada tratamiento así como la significancia determinada por la prueba post hoc de U de Mann-Whitney.

Tabla 5. Promedio de EPC/ENC en 1000 células totales obtenidos al evaluar las muestras de sangre periférica de 7 ratones por tratamiento después de 24 horas desde la administración de la dosis.

Tratamiento	Media	Desviación Estándar	p-valor ^a
Control negativo (Agua)	44,86	0,378	-
97 mg/kg	32,43	2,225	0,0014 **
194 mg/kg	32,86	3,671	0,0014 **
243 mg/kg	34,43	2,440	0,0014 **
291 mg/kg	35,14	3,185	0,0014 **
340 mg/kg	35,57	2,370	0,0014 **
389 mg/kg	36,71	2,138	0,0014 **
Control positivo (Ciclofosfamida)	30,71	0,488	0,0011 **

Media de EPC/ENC en 1000 células totales por cada tratamiento.

a = Prueba post hoc de U de Mann-Whitney

** = nivel de significancia $p \leq 0,01$ con respecto al grupo control negativo

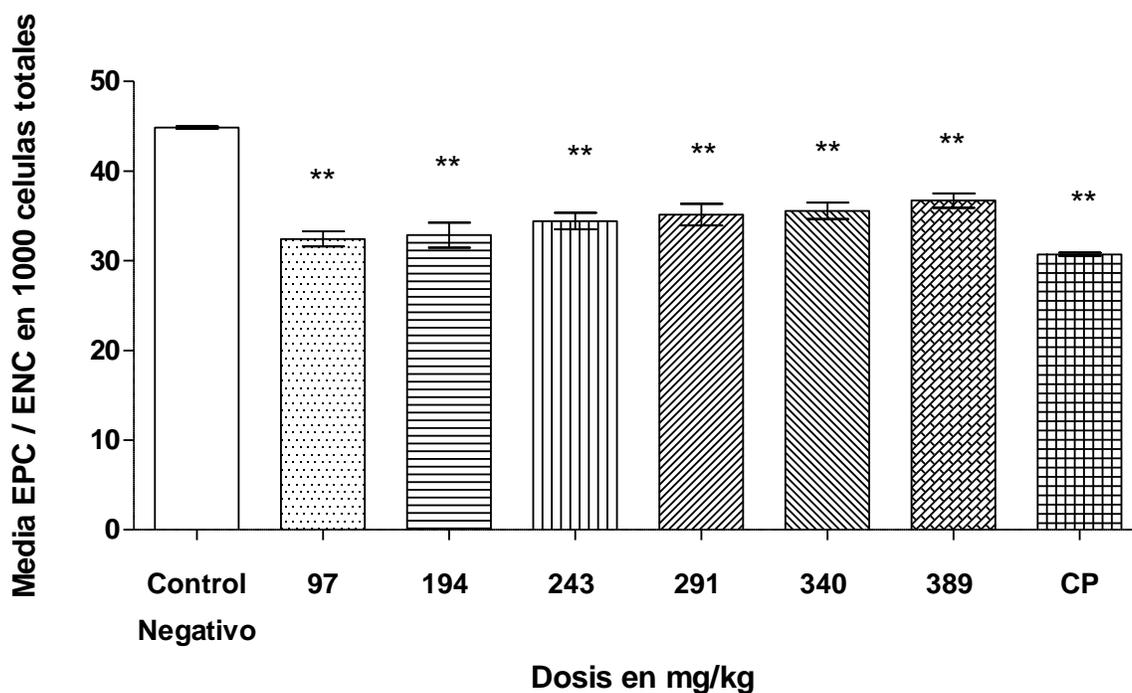


Figura 4. Promedio total de EPC/ENC \pm DS en 1000 células totales inducido por las dosis en mg/kg de Finale durante 24 horas de tratamiento. El nivel de significancia $p \leq 0,01$ con respecto al grupo control negativo se denota como **.

7.4 EFECTO GENOTÓXICO

En la prueba de micronúcleos la frecuencia de este biomarcador presentes en 1000 eritrocitos policromáticos por cada dosis con respecto al grupo control indica genotoxicidad. En la figura 5 se observa un micronúcleo en eritrocitos policromáticos muestreados 24 horas después de administrado el tratamiento del plaguicida.

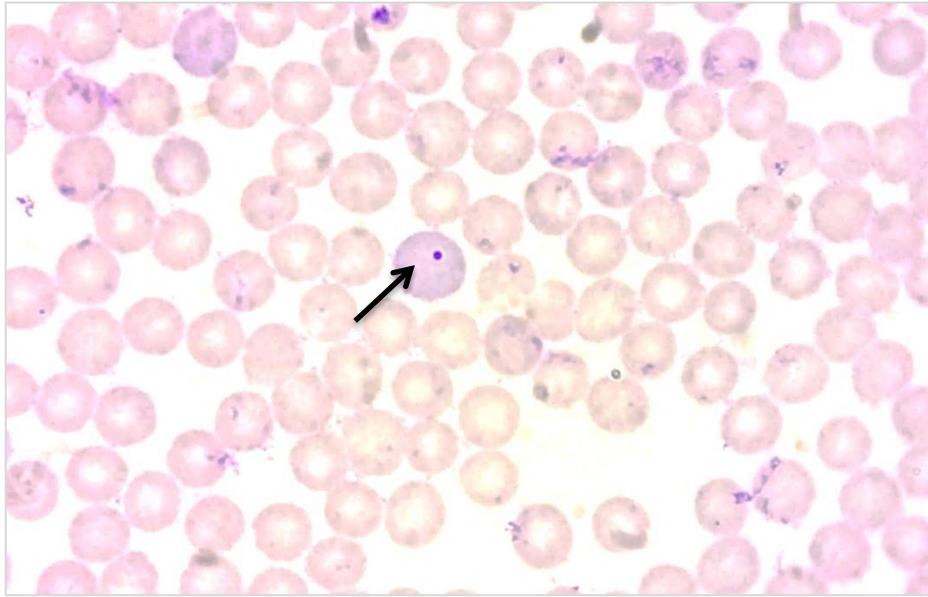


Figura 5. Eritrocito policromático micronucleado de sangre periférica de ratón *Albino suizo*.

Los datos obtenidos mediante la prueba de micronúcleos no se ajustaron a una distribución normal (Shapiro-Wilk: $p \leq 0,05$), motivo por el cual, se inició realizando el análisis estadístico mediante la aplicación de pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis para comparar tres o más categorías.

El resultado de la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis indica que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,007$) en la frecuencia de MN/1000 PCE.

Mediante la prueba U de Mann-Whitney para comparar las dosis del plaguicida respecto del control negativo se obtiene diferencia significativa ($p \leq 0,05$) además de la correlación no paramétrica de Spearman ($Rho = 0.916$ y $p \leq 0,05$) por lo cual todas las dosis del plaguicida Finale presentan propiedades genotóxicas al igual que el control positivo (CP) el cual causa genotoxicidad en los eritrocitos de sangre periférica de ratón. También se observa que a medida que se incrementa la dosis del plaguicida el número promedio de micronúcleos aumenta siendo el efecto genotóxico directamente proporcional al aumento de la dosis.

La tabla 6 muestra el número promedio de micronúcleos en 1000 EPC de sangre periférica de ratón a las 24 horas después de administrado el tratamiento a las dosis 97, 194, 243, 291, 340 y 389 mg/kg de peso corporal y los controles positivo y negativo, con sus respectivas desviaciones estándar para cada uno de los

tratamientos así como la significancia estadística determinada mediante la prueba de U de Mann-Whitney.

Tabla 6. Promedio de MN en 1000 PCE obtenidos al evaluar las muestras de sangre periférica de 7 ratones por tratamiento después de 24 horas desde la administración de la dosis.

Tratamiento	Media	Desviación Estándar	p-valor ^a
Control negativo (Agua)	1,86	0,378	-
97 mg/kg	2,71	0,488	0,0088 **
194 mg/kg	2,86	0,900	0,0251 *
243 mg/kg	2,86	0,690	0,0098 **
291 mg/kg	3,29	0,488	0,0011 **
340 mg/kg	3,57	0,976	0,0039 **
389 mg/kg	3,86	0,690	0,0012 **
Control positivo (Ciclofosfamida)	4,57	0,535	0,0012 **

Media de MN/1000 PCE por cada tratamiento.

a = Prueba de U de Mann-Whitney

* = nivel de significancia $p \leq 0,05$ con respecto al grupo control negativo

** = nivel de significancia $p \leq 0,01$ con respecto al grupo control negativo

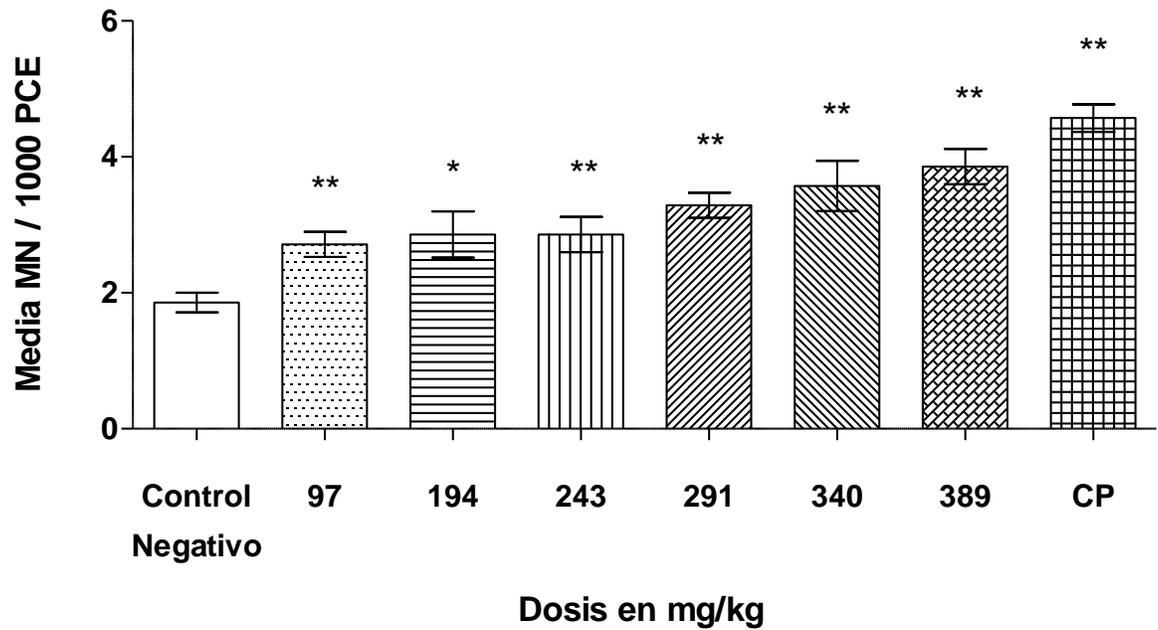


Figura 6. Promedio total de MN / 1000 PCE \pm DS inducidos por las dosis de Finale 24 horas después de administrado el tratamiento. El nivel de significancia $p \leq 0,05$ con respecto al grupo control negativo se denota como *. El nivel de significancia $p \leq 0,01$ con respecto al grupo control negativo se denota como **.

8. DISCUSIÓN

Los plaguicidas, de uso extensivo en la agricultura, se utilizan en todo el mundo para el control de plagas y de los vectores transmisores de enfermedades que afectan al hombre y a los animales ocupando estos un importante lugar dentro de las sustancias a las que el ser humano está expuesto. Existen más de 1500 principios activos que, en distintas mezclas y concentraciones, generan más de 50000 productos registrados en el mundo como plaguicidas (Gianessi, 2016). Estos a partir de los años 70, aumentaron su producción y consumo, especialmente en los países productores de granos, acrecentándose los riesgos de efectos adversos a largo plazo en la población en general, en los trabajadores y en el ambiente (Brunstein *et al.*, 2009).

Como el uso desenfrenado de plaguicidas continúa siendo causa de contaminación ambiental y poniendo en riesgo la vida del hombre, además el glufosinato de amonio es uno de los plaguicidas más utilizados debido a su acción inhibitoria en la síntesis de glutamina en plantas (Logusch *et al.*, 2011). El presente estudio determinó la LD50 del plaguicida Finale que corresponde a 486 mg/kg. Entre las dosis evaluadas de 386 y 436 mg/kg mostraron algunos síntomas de intoxicación como hipersensibilidad en un 90,3% y 91,4% respectivamente, pérdida del equilibrio en un 49,8% y 51,2% y somnolencia en un 20,5% y 33%. Los plaguicidas organofosforados producen toxicidad en las terminaciones nerviosas a través de la fosforilación de la zona esterásica de la enzima acetilcolinesterasa formando una unión estable, que si no se rompe mediante el tratamiento, se hace irreversible, quedando la enzima inhabilitada para su función normal (Brown *et al.*, 2010). La pérdida de la función enzimática causa la acumulación de acetilcolina en las uniones colinérgicas neuroefectoras, en las uniones mioneurales del esqueleto y los ganglios autónomos y en el sistema nervioso central (SNC) (Eddleston and Hillips, 2004; Riviere, 2006). Los animales tratados con la dosis 486 y 536 mg/kg de Finale mostraron también una tendencia muy similar en hipersensibilidad (93,2% y 95,1%) y pérdida del equilibrio (54% y 55%) mientras que otros síntomas como la disnea en un 50,1% y 57,1% respectivamente y convulsiones en un 30% y 40% provocarían una mayor mortalidad como consecuencia de la dificultad respiratoria y la contracción y distensión repetida y temblorosa de varios músculos de forma brusca y sin control, además del incremento de la tasa de latidos del corazón.

La muerte después de la intoxicación por el plaguicida durante el establecimiento de la LD50 se debe a la acción sinérgica e interacción global de los síntomas, ya que como menciona Mao *et al.*, (2012) la ingestión del herbicida glufosinato de amonio conduce a resultados clínicos graves; en casos severos la muerte como resultado de una falla cardiovascular así como del aumento en la frecuencia respiratoria y posterior paro respiratorio (Petricevich, 2010); además disnea, inconsciencia, temblor y convulsiones (Matsumura *et al.*, 2001), lagrimeo,

movimientos erráticos (Park *et al.*, 2006), aumento en la sensibilidad, agresividad, y letargo (Watanabe and Sano, 1998), todos estos observados en los ratones de este estudio, por lo cual, esta interacción produciría disfunción multiorgánica e insuficiencia cardiovascular, hematológica, hepática, neurológica, renal y respiratoria.

La DL50 del plaguicida Finale se determinó mediante la representación gráfica de probit frente a la dosis logarítmica a las 24 horas de administrados los tratamientos por dosis aguda oral calculándose como 486 mg/kg (con 95% intervalo de confianza) en el presente estudio; cabe resaltar que los trabajos experimentales publicados sobre DL50 del plaguicida Finale en ratas son limitados (Bayer, 2012; Crop Science Colombia, 2017) y no hay ningún trabajo experimental informando sobre la DL50 del mismo usando ratones como biomodelo. Se contrasta con las dosis reportadas para el componente activo en ratones, por Inoue, (1982) y E. Ebert., (1990) las cuales son de 436 mg/kg en machos y 464 mg/kg en hembras, además de Mayer and Weigand, (1991) quienes reportan LD50 de 431 mg/kg en machos y 416 mg/kg en hembras.

Esta diferencia en las dosis reportadas se atribuye al uso de una mezcla comercial compleja como lo es Finale y no a solo evaluar su compuesto activo, también a la cepa de los ratones empleados (ICR y NMRI), a la susceptibilidad de estos al plaguicida, además del uso de solución salina, agua desionizada y agua de grifo como solvente del plaguicida. También se debe tener en cuenta que los estudios anteriores utilizaron ratones de aproximadamente 6 semanas con un peso promedio de 22 gr, mientras que en el presente estudio, los ratones tratados tenían una edad de 10 semanas con un peso promedio de 35 gr y ya habían alcanzado una madurez sexual completa.

El uso de sistemas de mamíferos *in vivo* para evaluar el potencial genotóxico y citotóxico de sustancias químicas sospechosas ha aumentado dramáticamente durante los últimos años. Este incremento se debe a la necesidad de corroborar que los sistemas de prueba *in vitro* no pueden imitar la totalidad de los procesos e interacciones que ocurren en el animal vivo bajo condiciones de exposición aguda o crónicas (Tennant *et al.*, 1997). Entre las técnicas que se utilizan con mayor frecuencia para evaluar el daño genotóxico y citotóxico *in vivo*, están las pruebas de aberraciones cromosómicas, micronúcleos, intercambios de cromátides hermanas, cinética del ciclo celular e índice mitótico (Tice and Ivett, 2005). Entre las pruebas en células somáticas *in vivo*, la evaluación de la frecuencia de micronúcleos en los eritrocitos de sangre periférica de ratones ofrece la oportunidad de evaluar la dinámica de daño genotóxico y citotóxico inducido en la médula ósea bajo condiciones de exposición aguda (MacGregor *et al.*, 1980; Tice and Ivett, 2005). Además esta prueba es especialmente relevante cuando se requiere considerar factores como el metabolismo, la farmacocinética y los

procesos de reparación de ADN propios del organismo (Krishna and Hayashi, 2000) y si bien, dichos factores pueden variar según la especie y el órgano blanco, es pertinente recordar que los ratones comparten gran similitud con los humanos en muchos aspectos, como el metabolismo de sustancias xenobióticas y procesos de reparación genética (Gómez *et al.*, 2011) por lo que la ejecución de esta prueba *in vivo* es un valioso aporte en el conocimiento del comportamiento del plaguicida en los organismos.

El uso de grupos control positivo y negativo es recomendado en todas las pruebas de mutagenicidad. De acuerdo a Preston *et al.*, (1987) el control positivo se incluyen para establecer correctamente daños genéticos y para determinar que la prueba tenga los resultados esperados. Chorvatovicová and Sandula, (1995) recomiendan el uso de CP en pruebas de micronúcleos (MN) *in vitro* e *in vivo*. La CP es un agente alquilante clastogénico que induce gran variedad de cambios en el DNA, esta no es genotóxica por sí misma, pero por procesos de biotransformación metabólica se convierte en un conjunto de metabolitos con complejas funciones oxidativas las cuales atacan la molécula de DNA y otras biomoléculas (Anderson *et al.*, 1995). Como se observa en las figuras 4 y 6, la CP es altamente genotóxica y citotóxica difiriendo significativamente del grupo control negativo, lo que corrobora su efecto y valida la sensibilidad del diseño experimental empleado. En este estudio se usó agua como control negativo, por ser altamente afín con los tejidos animales, por otro lado no hay información que demuestre que esta tenga un efecto directo o indirecto sobre la molécula de DNA por lo cual la convierte en una opción ideal como control negativo en pruebas químicas, además fue el diluyente usado en el plaguicida.

El efecto citotóxico causado por el plaguicida Finale en las células de sangre periférica de ratón fue observado en la disminución del número de eritrocitos policromáticos en un total de 1000 células totales, con respecto al grupo control negativo. El análisis estadístico estableció que todas las dosis del plaguicida administrado (97, 194, 243, 291, 340 y 389 mg/kg) fueron citotóxicas en diferentes proporciones, evidenciado una mayor disminución en las dosis bajas comparando con las dosis altas (figura 4).

El componente activo del plaguicida Finale (glufosinato de amonio), es una sal de amonio que causa la muerte de forma eficiente a varios tipos de células, ya que es un análogo del ácido glutámico que inhibe la glutamina sintetasa por unión irreversible (Hoerlein, 1994). La enzima glutamina sintetasa es una enzima clave en la homeostasis celular por su papel en el control del uso de nitrógeno dentro de las células y además de ser utilizada para construir proteínas, dona átomos de nitrógeno a las enzimas que forman moléculas ricas en este elemento, como los nucleótidos del DNA y los aminoácidos (Eisenberg *et al.*, 2000). La inhibición de la glutamina sintetasa da como resultado una acumulación de amoniaco que altera

los sistemas de transporte de electrones e induce la producción de radicales libres (Krogmann *et al.*, 1969) los cuales a su vez causan peroxidación lipídica y muerte celular (Hess, 2000).

La peroxidación lipídica puede tener diversos efectos sobre las funciones celulares ya sea directamente, al reaccionar con proteínas, ácidos nucleicos o indirectamente a través de receptores de las vías de señalización. Así según Hess, (2000) la peroxidación lipídica de las membranas resulta en cambios de fluidez, aumento de permeabilidad, disminución del potencial de membrana que puede conllevar a la muerte celular, por lo tanto el plaguicida Finale habría ocasionando la disminución en la frecuencia de PCE aquí reportada.

La mayor disminución de eritrocitos policromáticos en dosis bajas puede deberse a que las dosis al ser tan bajas no son detectadas por el sistema metabólico del organismo lo que permitiría aparentemente una acumulación del plaguicida al ser afín con las membranas lipídicas, lo que en consecuencia no favorecería su excreción ni eliminación (Klaaseen and Eaton, 1991) y por ende conllevaría a los procesos de peroxidación lipídica.

Por otro lado, los eritrocitos como la mayoría de las células eucariotas superiores tienen la capacidad de auto destrucción por la activación de la apoptosis. La apoptosis es un tipo de muerte celular que usan los organismos multicelulares para eliminar células dañadas o no necesarias de una forma perfectamente controlada que minimiza el daño de las células vecinas. Los restos celulares resultantes, que están siempre rodeados de membrana plasmática, son eliminados mediante fagocitosis, evitando la inflamación en esa zona (Taylor *et al.*, 2008). Los reportes existentes sobre la acción apoptótica de plaguicidas especialmente organofosforados (Dutta and Bahadur, 2016; Esquivel-sentíes and Vega, 2012; Ilboudo *et al.*, 2014; Mesnage *et al.*, 2013) sugieren que la causa de la disminución de la frecuencia de eritrocitos policromáticos responde a la activación de señales apoptóticas al entrar el plaguicida en contacto con la célula corroborando lo reportado en este estudio.

También, el glufosinato de amino ha demostrado ser citotóxico en varios tipos de células, según Fujii *et al.*, (1996) y Watanabe, (1997) los embriones de ratón expuestos *in vitro* a glufosinato desarrollaron apoptosis en el neuroepitelio del cerebro y además los embriones tratados tenían defectos específicos, incluyendo retraso general del crecimiento, aumento de la muerte de embriones, hipoplasia del prosencéfalo a 10 µg / ml, y labios hendidos a 20 µg / ml. El examen histológico mostró la muerte celular en todo el neuroepitelio en la vesícula cerebral y el tubo neural. También Voccia *et al.*, (1999) describe que el plaguicida, puede alterar el intrincado equilibrio del sistema inmune causando disfunción sistémica incluyendo cambios histopatológicos de células y deterioro de órganos.

Asociar la problemática de los plaguicidas y los riesgos a nivel genético, permite determinar de manera eficiente, si existe la posibilidad de que estos químicos interactúen con el DNA alterándolo y causando mutaciones que sean a largo plazo, las causas del desarrollo de algún tipo de enfermedad, como el cáncer, el cual tiene grandes repercusiones en todo el mundo y es una de las causas principales de muerte a nivel mundial (NIH, 2016). Se prevé que el cáncer se convierta en la principal causa de muerte en todo el mundo, con un aumento de 21,6 millones nuevos casos por año pronosticados para 2030 (Ferlay *et al.*, 2013), además la pérdida de años de vida y productividad junto con la discapacidad que el cáncer representa aumenta el costo económico a escala global, en comparación con otras causas de muerte y por lo cual se deben tomar medidas urgentes para evitar sufrimiento y muertes innecesarias y reducir la gran carga económica y el impacto social de esta enfermedad.

Para evaluar los daños genotóxicos originados por la exposición aguda al plaguicida Finale, se analizó la existencia de lesiones cromosómicas inducidas no reparadas y cromosomas enteros rezagados que se expresan como alteraciones cromosómicas en sangre periférica y se observan como micronúcleos. Dado que por medio de esta prueba no se puede identificar si estos son causados por cromosomas enteros o por fragmentos cromosómicos, Morales (2004) aclara que si su origen fuese un cromosoma entero el plaguicida habría reaccionado con la tubulina, alterando la organización y dinámica microtubular y trastornando la formación del huso mitótico.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que el plaguicida Finale ejerce un efecto genotóxico *in vivo* en los eritrocitos policromáticos presentando diferencia significativa en cada una de las dosis del plaguicida al compararlas con el control negativo, notándose una tendencia creciente de daño genotóxico según el aumento de la dosis, llevando a un incremento de las lesiones primarias sobre el ADN, lo cual, está directamente relacionado con el aumento en las alteraciones genéticas celulares.

En este estudio el DNA estaría siendo afectado por los metabolitos del plaguicida generados durante el proceso de biotransformación que lleva a una conversión metabólica de los xenobióticos (plaguicida) presentes en el organismo o también a una metabolización deficiente de los mismos. Por regla general, el metabolismo convierte los xenobióticos liposolubles en grandes metabolitos hidrosolubles que pueden excretarse con facilidad (Repetto, 1997).

La biotransformación se realiza principalmente en el hígado mediante enzimas que conjugan el metabolito con un sustrato endógeno, de manera que la molécula se hace más polar, lo cual facilita la excreción. Pero entre biotransformación y toxicidad hay una relación compleja. Puede entenderse la biotransformación como un proceso necesario para la supervivencia, protege al organismo de la toxicidad

impidiendo que se acumulen en él sustancias nocivas. Sin embargo, en ese proceso pueden formarse, como productos intermedios, metabolitos reactivos que son potencialmente nocivos mediante la activación metabólica y de esta manera inducir toxicidad; los metabolitos intermedios oxidados que no se conjugan pueden unirse a estructuras celulares y dañarlas, induciendo lesiones primarias que al no ser reparadas o ser mal reparadas pueden generar lesiones pre malignas y desencadenar a largo plazo un posible proceso carcinogénico. También si el sistema de biotransformación está sobrecargado, puede producirse una destrucción masiva de proteínas esenciales o de membranas lipídicas y ello puede desembocar en muerte celular. (Trump and Arstila, 1971).

La activación del oxígeno es un fenómeno que pueden desencadenar los metabolitos de los xenobióticos. Pueden autooxidarse bajo la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO). Esas especies derivadas del oxígeno, entre las que figuran el superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo, pueden dañar el ADN, lípidos y proteínas de las células. Según Bernardi *et al*, (1999) y Circu and Aw, (2010) el daño oxidativo al ADN es de extrema importancia, debido a que las bases nitrogenadas dañadas pueden generar mutaciones que a su vez pueden resultar en carcinogénesis, apoptosis, necrosis y enfermedades hereditarias.

Existen mecanismos de reparación del DNA que se activan en el momento en que éste sufre modificaciones oxidativas. Cuando las ERO alcanzan el núcleo, estos mecanismos de reparación se activan y funcionan de manera eficiente, ya que continuamente revisan que exista una adecuada secuencia de bases en la molécula de ADN y en caso de existir alguna mutación (ya sea ruptura, entrecruzamiento o eliminación de bases) reparan el daño causado. Cuando el daño o lesión no son reparados o son reparados incorrectamente, los daños son fijados y expresados como mutaciones. Estas mutaciones ocurridas en células somáticas no se transmitirán a las siguientes generaciones pero si pueden constituirse en el paso inicial del proceso de transformación celular e iniciación del cáncer.

Esta interacción de las ERO con la molécula de DNA explica la razón por la cual se pudo dar el incremento en la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos policromáticos de ratón notándose una tendencia creciente de daño genotóxico según el aumento de la dosis (figura 6), siendo según Natarajan, (2002) la cantidad de alteraciones observadas proporcional al potencial carcinógeno del compuesto de prueba.

Este estudio por lo tanto concluye que las diferentes dosis del plaguicida Finale influyen significativamente la frecuencia de los biomarcadores de daño genético y citogenético generando un conocimiento que puede servir en el uso, diseño y ejecución de programas de vigilancia epidemiológica y a la intervención y prevención

oportuna de los riesgos de salud con el fin de mejorar la calidad de vida de las poblaciones expuestas.

9. CONCLUSIONES

La Dosis Letal 50 (DL50) establecida para el plaguicida Finale en ratones *Albino suizo* maduros sexualmente es de 486 mg/kg.

Los síntomas locales y sistémicos de intoxicación más frecuentes producidos por el plaguicida Finale en ratones Albino suizo fueron, hipersensibilidad y pérdida del equilibrio, con un 92,5% y 52,2% de ocurrencia, además de somnolencia, convulsiones y disnea entre otros.

El efecto citotóxico causado por el plaguicida Finale a las células de sangre periférica de ratón fue observado en la disminución del número de eritrocitos policromáticos en un total de 1000 células totales difiriendo todas las dosis significativamente con respecto al grupo control negativo.

El efecto genotóxico en los eritrocitos policromáticos de sangre periférica de ratón, presentó diferencia significativa en cada una de las dosis del plaguicida al compararlas con el control negativo, evidenciándose un incremento en la frecuencia de micronúcleos a medida que aumentaban las dosis.

Conociendo la relación exposición-efecto dada por las características genotóxicas presentadas por las dosis del plaguicida Finale se puede determinar que existe riesgo potencial en el desarrollo del enfermedades como el cáncer ocasionado por la interacción de este con el DNA y la posible fijación de mutaciones, constituyendo esta prueba como la forma más efectiva de poder hacer prevención temprana de los problemas de salud mediante la toma de decisiones y acciones tendientes a la reducción y eliminación de los riesgos.

10.RECOMENDACIONES

Se deben hacer estudios adicionales incorporando el uso de otros biomarcadores con el objetivo final de confirmar de forma más clara las propiedades genotóxicas del plaguicida sobre el DNA.

Se recomienda para la regulación y control de plaguicidas basarse en los diferentes conocimientos derivados no solo de estudios *in vivo*, sino también de estudios *in vitro* al igual que en registros de intoxicaciones accidentales o intencionales.

Ejecutar proyectos de monitoreo genético con pruebas *in vitro*, en donde se evalúen poblaciones humanas expuestas ocupacionalmente al plaguicida lo que permitiría predecir riesgos de salud a largo plazo y complementen las pruebas *in vivo* realizadas.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, D., Bishop, J.B., Garner, R.C., Ostrosky-Wegman, P., Selby, P.B., 1995. Cyclophosphamide: review of its mutagenicity for an assessment of potential germ cell risks. *Mutat. Res.* 330, 115–181.
- Arencibia, A., Rosario, D., Curveco, S., 2013. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. La Habana, Cuba.
- Ballantyne, M., 2001. Reverse mutation in four histidine-requiring strains of *Salmonella typhimurium* and one tryptophan-requiring strain of *Escherichia coli*. Unpublished report no. C012322 from Covance Laboratories Ltd, Harrogate, North Yorkshire, England.
- Bayer, C., 2014. Hoja Técnica de Seguridad Libety 2, 1–9.
- Bayer, C., 2002. Hoja de Datos de Seguridad Basta 1–3.
- Bayer, S.A., 2012. Hoja de Seguridad Finale de acuerdo a NTC4435. Bayer Crop. 1, 1–9.
- Bernardi, P., Scorrano, L., Colonna, R., Petronilli, V., Di Lisa, F., 1999. Mitochondria and cell death. *Eur. J. Biochem.* 264, 687–701.
- Bolognesi, C., Creus, A., Ostrosky-Wegman, P., Marcos, R., 2011. Micronuclei and pesticide exposure. *Mutagenesis* 26, 19–26. doi:10.1093/mutage/geq070
- Boschetto, P., Quintavalle, S., Miotto, D., Cascio, N., Zeni, E., Mapp, C., 2013. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and occupational exposures. *J Occup Med Toxicol* 11, 13–15.
- Brown, L., Blair, A., Gibson, R., Everett, G., Cantor, K., Schuman, L., 2010. Pesticide exposures and other agricultural risk factors for leukemia among men in Iowa and Minnesota. *Cancer Res* 50, 6585–91.
- Brunstein, L., Digón, A., Licastro, S., Moreno, I., 2009. Generalidades sobre plaguicidas y control de plagas., in: Departamento de Salud Ambiental (Ed.), *Plaguicidas. Información y Estrategias Para La Gestión Ecológicamente Racional de Plaguicidas de Uso Sanitario*.
- Chorvatovicová, D., Sandula, J., 1995. Effect of carboxymethyl-chitinglucan on cyclophosphamide induced mutagenicity. *Mutat. Res.* 346, 43–48.
- Cifone, M.A., 1985. Mutagenicity evaluation in the mouse lymphoma forward mutation assay of Hoe 039866 substance, technical. Unpublished report no. A30380 from Litton Bionetics. Submitted to WHO by Bayer CropScience, Monheim, Germany.

- Circu, M.L., Aw, T.Y., 2010. Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 48, 749–762.
- Clapp, R., Jacobs, M., Loechler, E., 2008. Environmental and occupational causes of cancer: new evidence 2005-2007. *Rev Env. Heal.* 23, 1–37.
- Comunidad Andina, 2002. RESOLUCION 630 Manual Técnico Andino para el Registro y Control de Plaguicidas Químicos de Uso Agrícola. Gac. Of. Acuerdo Cart. 810, 169.
- Crop Science Colombia, 2017. FINALE® SL [WWW Document]. URL <https://www.cropscience.bayer.co/es-CO/Productos-e-innovacion/Productos/Herbicidas/FINALE-SL.aspx> (accessed 8.16.17).
- Crop Science Department, North Carolina State University, 2007. HERBICIDE CLASSIFICATION AND MODE OF ACTION [WWW Document]. URL http://courses.cropsci.ncsu.edu/cs414/cs414_web/ch_6_2005.htm (accessed 1.26.17).
- Dutta, S., Bahadur, M., 2016. Cytogenetic analysis of micronuclei and cell death parameters in epithelial cells of pesticide exposed tea garden workers. *Toxicol. Mech. Methods* 26, 627–634. doi:10.1080/15376516.2016.1230917
- E. Ebert., K.-H.L.& D.M., 1990. Summary of safety evaluation toxicity studies of glufosinate ammonium. *Food Chem. Toxicol.* 28, 339–349.
- Eddleston, M., Hillips, M.R., 2004. Self Poisoning with Pesticides. *Br. Med. Journal.* 328, 42–4.
- Eisenberg, D., Gill, H., Pfluegl, G., Rothstein, S., 2000. Structure-function relationships of glutamine synthetases. *Biochim. Biophys. Acta* 1477, 122–145.
- EPA., U.S., 1994a. Acute oral toxicity of HOE 39866 to the male rat. Unpublished evaluation. (Sept. 25.).
- EPA., U.S., 1994b. Acute oral toxicity of HOE 39866 to the female rat. Unpublished evaluation. (Sept. 25.).
- EPA., U.S., 1994c. Acute oral toxicity of HOE 39866 to the male mouse. Unpublished evaluation. (Sept. 25.).
- EPA., U.S., 1994d. Acute oral toxicity of HOE 39866 to the female mouse. Unpublished evaluation. (Sept. 25.).
- EPA., U.S., 1994e. Acute oral toxicity of HOE 39866 to the male and female dog. Unpublished evaluation. (Sept. 24.).
- EPA., U.S., 1993. Response to Rfd/peer review report of glufosinate-ammonium (Ignite) re: Historical control data (rat). Memo from J.N. Rowe, Health Effects Div., to J. Miller, Registration Div. (Jan. 28.).

- EPA, 1998. Environmental Protection Agency. Toxic Substances (7101). Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. United States Government Printing Office Editions. Health Effects Test Guidelines Washington: IRL Press.
- EPA, U., 2003. Glufosinate Ammonium; Pesticide Tolerance. OPP-2003-0058; FRL-7327-9. Federal Register 68(188):55833-49. <http://www.regulations.gov> Accessed: 18/11/2016.
- Esquivel-sentíes, M.S., Vega, L., 2012. Organophosphorous Pesticides Metabolite Reduces Human T CD8 Homeostasis and Proliferation by Inducing Cellular Death. *J. Environ. Anal. Toxicol.* 20, 4–9. doi:10.4172/2161-0525.S4-004
- Evans HJ., 1997. Historical perspectives on the development of the in vitro micronucleus test: a personal view. *Mutat Res.* 392:5---10.
- Fabian, D., Bystriansky, J., Burku??, J., Reh??k, P., Leg??th, J., Koppel, J., 2011. The effect of herbicide BASTA 15 on the development of mouse preimplantation embryos in vivo and in vitro. *Toxicol. Vitro.* 25, 73–79. doi:10.1016/j.tiv.2010.09.009
- FAO, F. and A.O. of the U.N., 2012. Herbicidas [WWW Document]. URL <http://www.fao.org/docrep/T1147S/t1147s0e.htm> (accessed 8.18.18).
- Fenech, M., Holland, N., Chang, W.P., Zeiger, E., Bonassi, S., 1999. The HUman MicroNucleus Project--An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat. Res.* 428, 271–283. doi:10.1016/S1383-5742(99)00053-8
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., 2013. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. [WWW Document]. URL <http://globocan.iarc.fr>
- Flores, M., Yamaguchi, U., 2008. Micronucleus test: an evaluation for genotoxic screening. *J Heal. Res.* 337---40.
- Fujii, T., Ohata, T., Horinaka, M., 1996. Alternations in the response to kainic acid in rats exposed to glufosinate-ammonium, a herbicide, during infantile period. *Phys. Biol. Sci.* 72, 7–10.
- Gianessi, L.P., 2016. The Increasing Importance of Herbicides in Worldwide Crop Production. *Pest Manag. Sci.* 69, 1099–1105.
- Gómez, A., Ramirez, A., Cortes, J., 2011. Biomodelos animales y enfermedades infecciosas de importancia en salud pública veterinaria. *Rev. Sapuvet Salud Pública* N°2, 69–94.
- González Calixto, C., Moreno Godínez, M.E., Maruris Reducindo, M., Hernández Ochoa, M.I., Quintanilla Vega, M.B., Uriostegui Acosta, M.O., 2018. El Glufosinato De Amonio Altera La Calidad Y El Adn De Los Espermatozoides

De Ratón. Rev. Int. Contam. Ambient. 34, 7–15.
doi:10.20937/RICA.2018.34.esp01.01

Henry, S., Bosch, F., Bowers, J., 2002. Pesticides, hepatitis and worldwide liver cancer risks. *Adv Exp Med Biol* 504, 229–233.

Herbicide Resistance Action, Committee, 2017. Global Classification Herbicide Resistance Action Committee [WWW Document]. URL http://hracglobal.com/tools/classification-lookup?s=glufosinate&classGroup=toggle_hrac&classGroup=toggle_wssa (accessed 1.25.17).

Hess, F.D., 2000. Light-dependent herbicides: an overview. *Weed Sci.* 48, 160–170.

Hoerlein, G., 1994. Glufosinate (Phosphinothricin), a natural amino acid with unexpected herbicidal properties. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 138, 73–145.

Hoyos, L.S., Carvajal, S., Cajas, N., 2002. Manual de Pruebas Citogenéticas y Letales Dominantes en Ratón. Universidad del Cauca. FACNED. Departamento de Biología. Laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética. Popayán.

Humburg, N., Colby, S.R., Lym, R.G., Hill, E.R., McAvoy, W.J., Kitchen, L.M., Prasad, R.P., 1989. *Herbicide Handbook of the Weed Science Society of America*, 6th Editio. ed. Champaign, Illinois.

Ilboudo, S., Fouche, E., Rizzati, V., Toé, A.M., Gamet-Payraastre, L., Guissou, P.I., 2014. In vitro impact of five pesticides alone or in combination on human intestinal cell line Caco-2. *Toxicol. Reports* 1, 474–489. doi:10.1016/j.toxrep.2014.07.008

Inoue, H., 1982. Acute oral toxicity study in mice of Hoe 039866 technical. Code: Hoe 039866 OH AS 201. Unpublished report no. A28828 from Biosafety Research Center, Shizuoka-ken, Japan. Submitted to WHO by Bayer CropScience, Monheim, Germany.

Instituto Latinoamericano de Investigaciones Sociales - ILDIS, 2006. El circuito de la cocaína y sus implicaciones [WWW Document]. URL http://www.ildis.org.ve/website/p_index.php?ids=1 (accessed 8.5.16).

Instituto Nacional de Salud., 2016. Informe de intoxicaciones por sustancias químicas, in Sistema de Vigilancia de Eventos en Salud Pública. Instituto Nacional de Salud: Bogotá.

Irigaray, P., Newby, J., Clapp, R., Hardell, L., Howard, V., Montagnier, L., Epstein, S., D., B., 2011. Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: an overview. *Biomed Pharmacother* 31, 640–658.

Jung, R., Weigand, W., 1986. Chromosomal aberrations test in male and female

- NMRI mice after oral administration. Unpublished report no. A34419 from Hoechst AG, Frankfurt am Main, Federal Republic of Germany. Submitted to WHO by Bayer CropScience, Monheim, Germany.
- KEMI, 2002. Draft Assessment Report (DAR) – public version. Initial risk assessment provided by the rapporteur Member state Sweden for the existing active substance Glufosinate (based on the variant glufosinate-ammonium) of the second stage of the review programme re.
- Klaaseen, C.D., Eaton, D.L., 1991. Principles of toxicology, in: Pergamon, P. (Ed.), Casarett and Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons. New York, pp. 12–49.
- Krishna, G., Hayashi, M., 2000. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation 455, 155–166.
- Krogmann, D.W., Jagendorf, A.T., AVRON, M., 1969. Uncouplers of spinach chloroplast photosynthesis phosphorylation. *Plant Physiol.* 34, 272–277.
- 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. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 769, 7–12.
- Larmarcovai, G., Bonassi, S., Botta, A., Baan, R., Orsière, T., 2008. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. *Mutat Res*;658(3):215-33.
- Logusch, E., Walker, D., McDonald, J., Franz, E., 2011. Inhibition of plant glutamine synthetases by substituted phosphinothricins. *Plant Physiol* 95, 1057–62.
- Maas, J., Braun, R., 1999. Glufosinate-ammonium. Rat. Absorption, distribution and elimination, single oral intermediate dose (20 mg/kg body weight). Unpubl. Rep. no. C001926 from Hoechst Marion Roussel Deutschl. GmbH, DI A, Lead Optim. Frankfurt am Main, Ger. Submitt. to WHO by Bayer Crop. Monheim, Ger.
- MacGregor, J., Wehr, C., Gould, D., 1980. Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of an improved micronucleus test. *Environ. Mutagen.* 2, 509–514.
- Mao, Y.-C., Wang, J.-D., Hung, D.-Z., Deng, J.-F., Yang, C.-C., 2011. Hyperammonemia following glufosinate-containing herbicide poisoning: A potential marker of severe neurotoxicity. *Clin. Toxicol.* 49, 48–52. doi:10.3109/15563650.2010.539184
- Mao, Y., Hung, D., Wu, M., Tsai, W., Wang, L., Ger, J., Deng, J., Yang, C., 2012. Acute human glufosinate-containing herbicide poisoning. *Clin Toxicol* 50, 396–

402.

- Matsumura, N., Takeuchi, C., Hishikawa, K., Fujii, T., Nakaki, T., 2001. Glufosinate ammonium induces convulsion through N-methyl-D-aspartate receptors in mice. *Neurosci Lett* 304, 123–5.
- Mayer, D., Weigand, W., 1991. Acute oral toxicity to the male mouse of Hoe 39866 active ingredient. Federal Republic of Germany. Submitted to WHO by Bayer CropScience, Monheim, Germany.
- Mesnager, R., Gress, S., Defarge, N., Séralini, G., 2013. Human cell toxicity of pesticides associated to wide scale agricultural GMOs 17, 2010–2012.
- Miller, R.K., Heller, K.K., Frise, L., Wallack, D.L., Loayza, D., Gammie, A.E., Rose, M.D., 1998. The Kinesin-related Proteins, Kip2p and Kip3p, Function Differently in Nuclear Migration in Yeast 9, 2051–2068.
- Morales, P., Vallarino, T., Cruz, V., 2004. In vivo kinetics of micronuclei induction by bifunctional alkylating antineoplastics. *Mutagenesis* 19, 207–213.
- Mosesso, P., 1990. Chromosome aberrations in human lymphocytes cultured in vitro (final report). Unpublished report no. A42423 from Life Sciences Research, Italy. Submitted to WHO by Bayer CropScience, Monheim, Germany.
- Múnera, F., Martínez, M., Rojas, M., Mora, A., Moreno, C., 2000. Dosis letal 50 de lorazepam en ratón (*Mus musculus*) Albino , cepa suizo-ICR. *Rev. la Fac. Med. - Univ. Nac. Colomb.* 48, 190–194.
- Natarajan, A.T., 2002. Chromosome aberrations: past , present and future. *Mutat. Res.* 504, 3–16.
- NIH, I.N. del C., 2016. Estadísticas del cáncer - National Cancer Institute [WWW Document]. URL <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/estadisticas> (accessed 5.21.18).
- OECD, 2014. GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS [WWW Document]. URL http://www.nihs.go.jp/hse/chem-info/oecd/160603_sec4.pdf (accessed 8.18.18).
- OECD, 2009. Genetic Toxicology: In vivo Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, in bone marrow cells TG 474 (Annual Report 2009). Public Affairs and Communications Directorate Editions. Paris, France: OECD online Bookshop Editions; 2009:7-123. Disponible en: <http://>.
- Park, H., Lee, P., Shin, D., Kim, G., 2006. Anterograde amnesia with hippocampal lesions following glufosinate intoxication. *Neurology* 67, 914–5.
- Petricevich, V., 2010. Pesticides and the inflammatory response. *Mediators*

Inflamm. 10, 3–7.

- Presgrave, R., Camacho, L., Villas Boas, M., 2016. A profile of unintentional poisoning caused by household cleaning products, disinfectants and pesticides. *Cad Saude Publica* 24, 2901–2908.
- Preston, R.J., Dean, B.J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A.F., Shelby, M., 1987. Mammalian in vivo cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells. *Mutat. Res.* 189, 157–165.
- Prüss-Ustün, A., et al., 2016. Knowns and unknowns on burden of disease due to chemicals: a systematic review. *Environ. Heal.* 10, 12.
- Ramírez, A., Saldanha, P., 1998. Análise crítica de grupos controle no teste de micronúcleo na mucosa bucal. *Genet Mol Biol.* 21:140.
- Randhawa, M.A., 2009. CALCULATION OF LD50 VALUES FROM THE METHOD OF MILLER AND TAINTER. *Ayub Med Coll Abbottabad* 21, 184–185.
- Repetto, J., Kuhn, G., 2009. TOXICOLOGÍA FUNDAMENTAL. Sevilla.
- Repetto, M., 2002. Toxicología Fundamental. Métodos alternativos, Toxicidad in vitro. Sevilla, España: Ediciones Díaz de Santos, Enpses-Mercie Group .Tercera edición. p.303-305.
- Repetto, M., 1997. Toxicología Fundamental. España.
- Riviere, J., 2006. Dermal absorption/toxicity of organophosphates and carbamates., in: Press, E.A. (Ed.), *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compound.* New York.
- Stumpf, K., 1993. Metabolism in male and female rats following single oral administration of test substance at a dose level of 2 mg/kg body weight. Unpublished report no. A49981 from Hoechst AG, Bereich Landwirtschaft, Produktentwicklung Oekologie 1, Germany. Submitted to .
- Tae, H., Si, Y., Hae, J., Heon, O., Sung, K., Ki, S., Jong, C., Chang, M., HK., S., 2009. Measurement of micronuclei by cytokinesis-block method in human, cattle, goat, pig, rabbit, chicken and fish peripheral blood lymphocytes irradiated in vitro with gamma radiaton. *In vivo.* 17, 433–438.
- Taylor, R., Cullen, S., Martin, S., 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9, 231–241.
- Tennant, R., Margolin, B., Shelby, M., Zeiger, E., Haseman, J., Spalding, J., Caspary, W., Resnick, M., Stasiewicz, S., Anderson, B., Minor, R., 1997. Prediction of chemical carcinogenicity in rodents from in vitro genetic toxicity assays. *Science (80- .)* 236, 933–942.
- Tice, R.R., Ivett, J.L., 2005. Cytogenetic analysis of bone marrow damage, in:

- Toxicology of the Blood and Bone Marrow. NY, pp. 119–140.
- Trump, B., Arstila, A., 1971. Cell injury and cell death, in: Principles of Pathobiology. Nueva York:
- UNODC, 2018. Monitoreo de Cultivos de Coca 2017 Julio 2018. Colombia.
- Voccia, I., Blakley, B., Brousseau, P., Fournier, M., 1999. Immunotoxicity of pesticides: A review. *Toxicol. Ind. Heal.* 15, 119–132.
- Watanabe, T., 1997. Apoptosis induced by glufosinate ammonium in the neuroepithelium of developing mouse embryos in culture. *Neurosci. Lett.* 222, 17–20. doi:10.1016/S0304-3940(97)13330-4
- Watanabe, T., Sano, T., 1998. Neurological effects of glufosinate poisoning with a brief review. *Hum. Exp. Toxicol.* 17, 35–39. doi:10.1177/096032719801700106
- Watanabe T, I.T., 1996. Developmental and dysmorphogenic effects of glufosinate ammonium on mouse embryos in culture. *Teratog Carcinog Mutagen* 16(6):287-99.
- Wigle, D., Arbuckle, T., Turner, M., Bérubé, A., Yang, Q., Liu, S., Krewski, D., 2014. Epidemiologic evidence of relationships between reproductive and child health outcomes and environmental chemical contaminants. *J Toxicol Env. Heal. B Crit Rev* 11, 373–517.
- Wolterink, G., Mahieu, C.M., Davies, L., 2012. GLUFOSINATE-AMMONIUM. Australia.

ANEXO



Universidad
del Cauca

Vicerrectoría de Investigaciones

EL PRESIDENTE DEL COMITÉ DE ÉTICA PARA LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE LA UNIVERSIDAD DEL CAUCA

CERTIFICA:

Que el proyecto titulado “Evaluación in vivo del efecto tóxico, citotóxico y genotóxico del plaguicida Finale (Glufosinato de amonio) mediante la prueba de micronucleos en eritrocitos de sangre periférica 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
Teléfonos: 57 2 820 9900 ext. 2630
Correo electrónico: vri@unicauca.edu.co
vri.unicauca.edu.co

