

Efecto citotóxico y genotóxico del glifosato en formulación Roundup
sobre linfocitos humanos

Blanca Flor Almeida Sierra

Universidad Nacional Abierta y a Distancia
Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente (ECAPMA)
Ingeniería Ambiental
Pamplona
2018

Efecto citotóxico y genotóxico del glifosato en formulación Roundup
sobre linfocitos humanos

Blanca Flor Almeida Sierra

Trabajo de Grado para Obtener el Título de Ingeniera Ambiental

Asesor

MSc Luis Fabian Yañez Urbina

Universidad Nacional Abierta y a Distancia
Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente (ECAPMA)
Ingeniería Ambiental
Pamplona
2018

Dedicatoria

A Dios Por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi Familia, por estar conmigo, por enseñarme a crecer y a que si caigo debo levantarme, por apoyarme y guiarme, por ser las bases que me ayudaron a llegar hasta aquí.

A mi hija Danna Isabela, por ser el motor que me motiva y con lleva a superarme cada día más.

Agradecimientos

Le agradezco primeramente a Dios por guiarme y cumplir esta meta trazada, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizajes y experiencias junto con los compañeros y tutores que hicieron parte de este proyecto

Especialmente estoy agradecida y le doy mi reconocimiento al Dr. Luis Fabián Yáñez Urbina por guiarme y por el interés mostrado por mi trabajo el apoyo, las sugerencias y conocimiento transmitido.

A mi hija Danna Isabela que ha sido mi motor constante para llegar a cumplir esta meta, a mi familia por su apoyo insistente, ya que en momentos de dificultad estuvieron ahí presentes

Contenido

	Págs.
Resumen.....	10
Abstract	11
Capítulo I.....	12
Titulo	12
Introducción.....	12
Justificación.....	13
Planteamiento del problema	14
Objetivos.....	15
Objetivo general.....	15
Objetivos específicos	15
Capítulo II.....	16
Marco Referencial	16
Marco teórico.....	16
Capitulo III.....	20
Metodología.....	20
Diseño metodológico	20
Cultivo de Células Sanguíneas	20
Obtención de linfocitos	20
Comprobación de Viabilidad celular	20
Cultivo celular.....	21
Determinación del porcentaje de inhibición IC50	21
Método del Azul tripano	21
Método de la Sulforodamina B	21
Detección de daño del DNA por el ensayo cometa	22

Capítulo IV	23
Análisis estadístico.	23
Resultados.....	24
Discusión.....	31
Conclusiones	35
Referencias.....	36

Listado de Tablas

Págs.

Tabla 1. Valores de IC50 del Glifosato en formulación Roundup, hallados mediante la línea de regresión a partir de dos ensayos realizados por triplicado correspondientes a dos métodos de análisis de la viabilidad celular: método de exclusión por azul tripano y método de tinción con sulforodamina B.....	28
Tabla 2. Promedio de daño inducido en el ADN de linfocitos humanos por diferentes dosis de glifosato en su formulación Roundup.	29

Listado de figuras

Págs.

Figura 1. Porcentaje de inhibición calculado en cada ensayo para ambos métodos de análisis de la viabilidad celular.....	26
Figura 2. Variabilidad y mediana de los datos obtenidos del análisis de citotoxicidad del glifosato en su formulación Roundup en linfocitos de sangre periférica humana durante un periodo de exposición de 24 horas a 37°C.....	27
Figura 3. Porcentajes de supervivencia media obtenida al evaluar seis concentraciones de la formulación Roundup empleando dos métodos de análisis de viabilidad celular, la línea verde muestra los resultados obtenidos por el método de la sulforodamina B y la línea azul los resultados obtenidos con el azul tripano.	28

Listado de apéndices

Págs.

Apéndice A. Evidencia fotográfica..... 43

Resumen

El glifosato herbicida de amplio espectro empleado rutinariamente en sistemas agrícolas y no agrícolas, fue desarrollado como sustancia selectiva para garantizar la supervivencia de cultivos de interés comercial que fueron transformados genéticamente para resistir al herbicida, con el objetivo de mejorar la producción y la rentabilidad, que sumado a su rápida acción, incrementó su empleo, sin embargo, se ha detectado que el glifosato no solo afecta a plantas (malezas), sino que se han encontrado daños en otros grupos taxonómicos, incluyendo mamíferos y al hombre.

Al evaluar la posible citotoxicidad causada por el herbicida glifosato en su formulación comercial (Roundup) en linfocitos humanos cultivados *in vitro*, empleando el método de exclusión celular por azul tripano y el de tinción por sulforodamina B, la cual mide de forma indirecta la viabilidad celular por adherencia de la sulforodamina B a las proteínas de células viables, se encontró por ambos métodos valores similares de concentración inhibitoria del crecimiento del 50% de la población celular, estas concentraciones promedio fueron 63,08 µg/ml para el azul tripano y 58,69 µg/ml para sulforodamina B. En cuanto a la genotoxicidad se notó una tendencia creciente de daño genotóxico según el aumento de la concentración de las mismas, llevando a un incremento de las lesiones primarias sobre el ADN, lo cual, está directamente relacionado con el aumento en las alteraciones genéticas celulares.

Palabras clave: Citotoxicidad, sulforodamina B, glifosato, Roundup, genotoxicidad.

Abstract

The broad-spectrum herbicidal glyphosate routinely used in agricultural and non-agricultural systems, was developed as a selective substance to ensure the survival of crops of commercial interest that were genetically transformed to resist the herbicide, with the aim of improving production and profitability. added to its rapid action, increased its use, however, it has been detected that glyphosate not only affects plants (weeds), but that damage has been found in other taxonomic groups, including mammals and man.

When evaluating the possible cytotoxicity caused by the herbicide glyphosate in its commercial formulation (Roundup) in human lymphocytes cultured in vitro, using the method of cell exclusion by trypan blue and staining by sulforhodamine B, which indirectly measures cell viability by adherence of sulforhodamine B to the viable cell proteins, similar values of 50% growth inhibitory concentration of the cell population were found by both methods, these average concentrations were 63.08 μ g / ml for trypan blue and 58.69 μ g / ml for sulforhodamine B. As regards genotoxicity, an increasing tendency of genotoxic damage was observed according to the increase in their concentration, leading to an increase of the primary lesions on the DNA, which is directly related to the increase in cellular genetic alterations.

Key words: Cytotoxicity, sulforhodamine B, glyphosate, Roundup, genotoxicity

Capítulo I

Título

Efecto citotóxico y genotóxico del glifosato en formulación Roundup sobre linfocitos humanos.

Introducción

El aumento mundial por la demanda de alimentos ha llevado a los agricultores a implementar métodos de prevención y emergencia contra plagas que pudiesen afectar sus producciones, una de estas técnicas es el uso de plaguicidas.

El glifosato, el ingrediente activo de la herbicida Roundup®, ha sido el herbicida más ampliamente utilizado en los Estados Unidos y el mundo, en la producción de cultivos agrícolas desde 2001 (Grube *et al.*, 2011). El glifosato inhibe la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (p. Ej., Fenilalanina, tirosina y triptófano) y provoca varias alteraciones metabólicas, incluida la interrupción de la producción de proteínas, la biosíntesis del producto secundario y una alteración metabólica general de la vía fenilpropanoide debido a la reducción de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (Franz *et al.*, 1997).

Aunque inicialmente la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (EPA) indicó para el glifosato una toxicidad clase II, toxicidad aguda, varios son los estudios que muestran un mayor grado toxicidad, los más recientes publicados el año pasado por el profesor Séralini, demostraron que tanto los líquidos (por ejemplo, el agua del grifo contaminada con Roundup), como alimentos derivados de plantas rociadas por dicho herbicida son altamente tóxicos.

Recientes estudios de la Universidad de Caen (Francia), publicados por la revista científica “Toxicología”, demostraron como el glifosato al penetrar en el tejido de la planta puede disolver la superficie encerada de las plantas y las membranas de las células vivas. Por lo tanto, dichas “formulaciones” pueden afectar a todas las células vivas, incluyendo las humanas (Romano, *et al.*, 2010-2012; Souza, *et al.*, 2013).

Diferentes estudios han demostrado que el glifosato es nocivo para diferentes grupos taxonómicos, en el organismo humano, causa toxicidad en células humanas placentarias, actúa como un disruptor endocrino en la actividad de la aromatasas, y puede alterar la estructura del ADN, su formulación Roundup puede provocar toxicidad in vivo en células humanas así como provocar muerte de células hepáticas (Richard, et al., 2005; Monroy, et al., 2005; Gasnier, et al., 2009), siendo catalogado por la organización mundial de la salud (OMS), como un producto cancerígeno.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se buscó evaluar la viabilidad de las células (linfocitos), luego de someterlas a la exposición al glifosato en su formulación Roundup a diferentes concentraciones del xenobiótico, que permitan establecer el grado de citotoxicidad causada por la formulación, mediante dos distintos métodos de análisis, el primero, el método de exclusión por azul tripano, que permite cuantificar de forma directa las células que permanecen viables luego de ser expuestas al agente citotóxico, el segundo método, la tinción con sulforodamina B (SRB) desarrollada en el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos como una alternativa al empleo del método de reducción de MTT en el programa de tamizaje in vitro para el descubrimiento de nuevos agentes antineoplásicos (Skehan, et al., 1990).

La sulforodamina B (SRB) presenta afinidad con los aminoácidos básicos de las proteínas, se fija selectivamente en éstos, proporcionando un índice del contenido de proteína celular, al hacer la lectura fotométrica de su absorbancia a una densidad óptica (OD) de 564 nm (Skehan *et al.*, 1990). Los valores de OD se correlacionan con el contenido de proteína total y por lo tanto con el número de células, permitiendo determinar de forma indirecta el efecto del compuesto citotóxico sobre la viabilidad celular.

Justificación

El glifosato, el ingrediente activo de la herbicida Roundup, ha sido el herbicida más ampliamente utilizado en los Estados Unidos agrícola producción de cultivos desde 2001 (Grube, et al., 2011). El glifosato inhibe la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (es decir, la fenilalanina, tirosina y triptófano) y conduce a varios trastornos metabólicos, incluyendo la interrupción de la producción de proteínas, la biosíntesis de producto secundario, y una interrupción metabólica

general de la ruta fenilpropanoide, debido a la reducción en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (Franz, et al., 1997).

Actualmente es utilizado en Colombia en el proceso de erradicación de cultivos ilícitos principalmente mediante fumigación aérea en las zonas específicas debido al uso a gran escala e intensivo de glifosato y su acumulación en el medioambiente y productos comestibles, en los últimos años han surgido varias preocupaciones importantes sobre los efectos secundarios dañinos del glifosato para la calidad del suelo y el agua y la salud de las plantas, animales y humanos.

Con base en informes recientes sobre posibles efectos secundarios crónicos del glifosato (Battaglin, et al., 2014; Séralini, et al., 2014), la Organización Mundial de la Salud reclasificó el herbicida glifosato como probablemente carcinogénico para humanos en 2015 (Bai & Ogbourne, 2016; EFSA, 2015; Guyton, et al., 2015; IARC, 2015). Desde entonces, se han publicado muchos (aproximadamente 1000) documentos de investigación científica sobre el glifosato, especialmente sus efectos secundarios potenciales, en los últimos dos años, pero todavía falta una revisión exhaustiva.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se busca evaluar la viabilidad de las células (linfocitos), luego de someterlas a la exposición al glifosato en su formulación Roundup a diferentes concentraciones del xenobiótico, que permitan establecer el grado de citotoxicidad causada por la formulación, mediante dos distintos métodos de análisis, el primero, el método de exclusión por azul tripano, que permite cuantificar de forma directa las células que permanecen viables luego de ser expuestas al agente citotóxico, el segundo método, la tinción con sulforodamina B (SRB) desarrollada en el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos como una alternativa al empleo del método de reducción de MTT en el programa de tamizaje in vitro para el descubrimiento de nuevos agentes antineoplásicos (Skehan, et al., 1990).

Planteamiento del problema

El uso intensivo del herbicida Glifosato puede causar un alto riesgo en la salud humana, los cuales han sido ampliamente documentados pero no tenidos en cuenta a la hora de las decisiones y su utilización en Colombia. Actualmente no existe una política clara sobre la utilización de este

herbicida y sobre su problemática mundial ya que se afirma en diferentes estudios que hay evidencia científica que demuestra la relación entre la exposición a la química y el daño a los organismos biológicos en distintos grados y en distintas características.

Principalmente asociados con problemas de cáncer. Por este motivo se plantea realizar un estudio donde se evaluará la posible citotoxicidad causada por el herbicida glifosato en su formulación comercial (Roundup) sobre linfocitos humanos cultivados in vitro, empleando el método de exclusión celular por azul tripano y el de tinción por sulforodamina B, y para el daño genotóxico se evaluará mediante el ensayo de electroforesis alcalina conocido como el ensayo cometa.

Objetivos

Objetivo general.

Evaluar el efecto citotóxico y genotóxico del glifosato en formulación Roundup sobre linfocitos humanos.

Objetivos específicos.

Determinar la actividad citotóxica del glifosato en formulación roundup sobre linfocitos humanos mediante el método de exclusión de azul de tripano.

Determinar la actividad citotóxica del glifosato en formulación roundup sobre linfocitos humanos mediante el método tinción por sulforodamina B.

Identificar la actividad genotóxica inducida por del glifosato en formulación roundup sobre linfocitos humanos mediante el ensayo cometa.

Capítulo II

Marco Referencial

Marco teórico

El aumento mundial por la demanda de alimentos, ha llevado a los agricultores a implementar métodos de prevención y emergencia contra plagas que pudiesen afectar sus producciones, una de estas técnicas es el uso de plaguicidas.

El glifosato es un herbicida organofosforado ampliamente utilizado en la agricultura para controlar el crecimiento de malezas antes de la siembra y como un tratamiento desecante antes de la cosecha para acelerar y promover la maduración de los cultivos (Guyton, et al., 2014). Primero comercializado por Monsanto en 1974, la siembra de cultivos genéticamente modificados "tolerantes al glifosato" en las últimas dos décadas impulsó el glifosato a la posición del herbicida más ampliamente utilizado en el mundo. En los últimos años, siguiendo la clasificación de la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) como 2A 'probable carcinógeno para los humanos', el glifosato ha estado en la agenda de las agencias reguladoras en todo el mundo (Conrad *et al.*, 2017, OEHHA, 2017) La Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos (ECHA), la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), la Organización Común de Agricultura y Alimentación de las Naciones Unidas y muchas otras autoridades nacionales fuera de la UE (por ejemplo, Canadá, Japón, Australia, Nueva Zelanda) refutan la clasificación IARC . En 2017, la Comisión Europea renovó la aprobación del glifosato durante 5 años (Comisión Europea, 2018).

El glifosato, compuesto activo del Roundup, es el herbicida más usado en todo el mundo por la conocida multinacional Monsanto; se trata de un herbicida no selectivo, sistémico de acción foliar, es decir, que ingresa a la planta a través de las hojas para después migrar a otras partes del tejido vegetal donde será mínimamente metabolizado. El mecanismo de acción del glifosato es inhibir la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en las plantas (triptófano, fenilalanina y tirosina) mediante la inhibición de la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato-sintetasa (EPSPS), con lo que se reduce la producción de proteína y el desarrollo de la misma. (Cofepris, 2009; Eslava, et al., 2007).

Las formulaciones comerciales de Roundup® Bioforce (R) o Glifogan (G) Además son herbicidas no selectivos que contienen 360 g / l de glifosato (G) y formulantes tales como compuestos deterstersivos de petróleo polietoxilados como alquilaminas polietoxiladas (POEA) (Mesnage *et al.*, 2013). A ciertas concentraciones, Glifosato inhibe la vía del ácido shikímico implicada en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y, en consecuencia, induce la muerte de la planta. Los formulantes pueden ejercer actividad herbicida por sí mismos y ayudar con la solubilización de Glifosato, la penetración en las plantas y la estabilidad (Seralini, 2015).) G y su metabolito ácido aminometilfosfónico (AMPA), así como los formulantes, son los principales contaminantes de las aguas superficiales (IFEN, 2007; ANSES, 2013) y se encuentran en el aire, los alimentos y los alimentos (Székács & Darvas, 2012). También se ha detectado Glifosato en los tejidos, sangre y orina de humanos o animales expuestos directa o indirectamente a herbicidas a través de alimentos, agua o aire (Niemann, et al., 2015).

Aunque inicialmente la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (EPA) indicó para el glifosato una toxicidad clase II, toxicidad aguda, varios son los estudios que muestran un mayor grado toxicidad, los más recientes publicados el año pasado por el profesor Séralini, demostraron que tanto los líquidos (por ejemplo, el agua del grifo contaminada con Roundup), como alimentos derivados de plantas rociadas por dicho herbicida son altamente tóxicos.

Recientes estudios de la Universidad de Caen (Francia), publicados por la revista científica “Toxicology”, demostraron como el glifosato al penetrar en el tejido de la planta puede disolver la superficie encerada de las plantas y las membranas de las células vivas. Por lo tanto, dichas “formulaciones” pueden afectar a todas las células vivas, incluyendo las humanas (Romano, et al., 2010-2012; Souza, et al., 2013).

Diferentes estudios han demostrado que el glifosato es nocivo para diferentes grupos taxonómicos, en el organismo humano, causa toxicidad en células humanas placentarias, actúa como un disruptor endocrino en la actividad de la aromatasa, y puede alterar la estructura del ADN, su formulación Roundup puede provocar toxicidad in vivo en células humanas así como provocar

muerte de células hepáticas (Richard, et al., 2005; Monroy, et al., 2005; Gasnier, et al., 2009), siendo catalogado por la organización mundial de la salud (OMS), como un producto cancerígeno.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se busca evaluar la viabilidad de las células (linfocitos), luego de someterlas a la exposición al glifosato en su formulación Roundup a diferentes concentraciones del xenobiótico, que permitan establecer el grado de citotoxicidad causada por la formulación, mediante dos distintos métodos de análisis, el primero, el método de exclusión por azul tripano, que permite cuantificar de forma directa las células que permanecen viables luego de ser expuestas al agente citotóxico, el segundo método, la tinción con sulforodamina B (SRB) desarrollada en el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos como una alternativa al empleo del método de reducción de MTT en el programa de tamizaje in vitro para el descubrimiento de nuevos agentes antineoplásicos (Skehan, et al., 1990).

La sulforodamina B (SRB) presenta afinidad con los aminoácidos básicos de las proteínas, se fija selectivamente en éstos, proporcionando un índice del contenido de proteína celular, al hacer la lectura fotométrica de su absorbancia a una densidad óptica (OD) de 564 nm (Skehan, et al., 1990). Los valores de OD se correlacionan con el contenido de proteína total y por lo tanto con el número de células, permitiendo determinar de forma indirecta el efecto del compuesto cito tóxico sobre la viabilidad celular.

El ensayo de cometa se considera una herramienta ideal en estudios toxicológicos que se destaca por su rapidez, sencillez, sensibilidad y bajo costo. Es una herramienta ideal para la detección y el análisis de roturas en el ADN en células individuales. Además, el ensayo cometa permite calificar y cuantificar la gravedad de los daños en el ADN mediante el análisis de la fragmentación originada por su ruptura (Brendler, Hartmann, Pfuhler, & Speit, 2005). Una de las ventajas del ensayo Cometa es su sensibilidad para detectar el daño del ADN en el nivel más bajo (0,1 rupturas de ADN por 10 (9) daltons) en comparación con las pruebas de aberración cromosómica y el ensayo de micronúcleos (Gedik & S. Ewen, 1992). Además, el requisito de un pequeño número de células (~ 10.000) por muestra, la flexibilidad para utilizar la proliferación, así como las células no proliferantes, de bajo costo, la fácil aplicación y la corta duración del ensayo (Tice, et al., 2000).

Según (Muchut, Simoniello, Scagnetti, Poletta, & Kleinsorge, 2011) el Ensayo Cometa, también llamado Electroforesis en gel de células individuales, permite evaluar los niveles de lesión y reparación del ADN en cualquier población celular, sin necesidad de que la misma se encuentre en proliferación. El Ensayo Cometa es un método versátil y sensible para medir roturas de simple y doble cadena del ADN y sitios álcali-lábiles. El mismo se basa en montar las células de interés sobre un portaobjeto, embebidas en un gel de agarosa, lisarlas para liberar el material genético y permitir la relajación y expansión de la cromatina, exponiendo de esta manera las lesiones previamente generadas por el agente genotóxico.

Al someter a los nucleoides a un campo electroforético, los fragmentos migran hacia el ánodo (Collins, Dobson, Dusinska, Kennedy, & Stetina, 1997), dando como resultado la aparición de pequeños “cometas” que pueden observarse al microscopio, preferentemente de fluorescencia. A mayor daño inducido a la doble hélice de ADN, mayor longitud del cometa. La versión alcalina del ensayo es capaz de detectar rupturas de simple cadena, sitios álcali-lábiles, entrecruzamientos ADN-ADN/ ADN-proteína y rupturas de cadena simple asociadas con sitios de reparación por escisión incompletos (Tice, et al., 2000.). El Ensayo cometa es aplicable a casi todos los grupos de organismos y a pequeñas muestras de células. También se ha adoptado en varios pasos para que sea adecuado para el estudio fundamental daños y reparación el ADN. Es una herramienta ideal para pruebas de estudio de genotoxicidad, y biomonitorización ambiental (Cortes-Gutierrez, Davila-Rodríguez, Fernandez, C. Lopez- Fernandez, & A. Gosalbez, 2011)

Capítulo III

Metodología

Diseño metodológico

Cultivo de Células Sanguíneas.

Obtención de linfocitos.

La obtención de células mononucleares de sangre periférica se realizó mediante gradiente de densidad con Ficoll, para ello se tomaron 3 ml de sangre y 2 ml de Ficoll en un tubo Falcón de 15 ml, el cual se llevó a centrifugación a 2500 rpm durante 25 minutos, terminado el tiempo con ayuda de una micropipeta se recoge el contenido del anillo formado y se deposita en un nuevo tubo con 5 ml de Medio RPMI (Sigma), este se llevó nuevamente a centrifugación a 2500 rpm por 15 minutos para luego descartar el sobrenadante y re suspender el pellet en medio RPMI previamente suplementado con suero fetal bovino al 10 % y 0.05 % del antibiótico ampicilina.

Comprobación de Viabilidad celular.

La viabilidad inicial de las células mononucleares se determinó adicionando 20 µl de suspensión celular y 80 µl del colorante Azul Tripano a un tubo Eppendorf, a partir de 10 µl de esta dilución se realizó el conteo en cámara de Neubauer para establecer el número de células viables por mililitro de suspensión celular, el conteo se hace teniendo en cuenta el número de células viables y no viables en las cuatro esquinas de la cámara, y se calcula en células por mililitro (cel/ml)= (N° de células viables x 10⁴ x FD)/4 , donde, 10⁴ corresponde a la equivalencia volumétrica de la cámara de Neubauer y FD corresponde al factor de dilución. También se determinó el porcentaje de viabilidad celular por mililitro donde:

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \frac{[\text{Número de células vivas} / \text{Número de células Totales (vivas + muertas)}] \times 100.}$$

Cultivo celular.

Las células se sembraron en una placa multipozo (24 pozos), a una densidad final de 0.05×10^5 células por pozo, para un volumen final de 1ml de medio RPMI suplementado, El cultivo celular fue sometido a un monitoreo mediante microscopia de placa en microscopio invertido para evaluar la presencia y adherencia celular, posteriormente se incubo a 37°C en condiciones de anaerobiosis con una saturación atmosférica de CO₂ equivalente al 95%, durante 24 horas.

Posterior a la incubación, se retiró el medio de cultivo y las células fueron puestas con nuevo medio RPMI al que se adiciona el agente citotóxico, glifosato en formulación Roundp, a diferentes concentraciones 14 µg/ml, 28 µg/ml, 56.4 µg/ml, 70.4 µg/ml, 84 µg/ml y 100 µg/ml). Se realizaron controles positivos del crecimiento dejando pozos del cultivo celular sin exposición al tratamiento (medio sin el agente químico). La placa fue nuevamente incubada en las condiciones descritas anteriormente durante 24 horas.

Determinación del porcentaje de inhibición IC₅₀.

Los datos de la inhibición del crecimiento (IC₅₀) de cultivo celular de linfocitos de sangre periférica humana son brindados como el valor de la concentración en microgramos por mililitro (µg/ml) del producto que causa una inhibición del crecimiento del 50% del cultivo con relación al control negativo.

Método del Azul tripano.

Para determinar el número de células viables después de la exposición al compuesto toxico, se preparó una dilución de cada tratamiento en tubos Eppendorf tomando las células cultivadas y precipitándola mediante centrifugación, Posteriormente se adicionó 5µl de azul tripano y 5 µl de medio RPMI (Sigma), y se homogeniza la suspensión, los 10µl se llevan a la cámara de Neubauer como se describió anteriormente.

El procedimiento anterior se repitió mínimo dos veces, los datos obtenidos se promediaron para cada uno de los seis tratamientos y el control.

Método de la Sulforodamina B.

El método de inoculación e incubación fue idéntico al del azul tripano, al final, después de las 24 horas de exposición de los cultivos celulares al tratamiento con la formulación Roundp a las concentraciones descritas anteriormente, se retiró el medio de cada uno de los pozos y las células se fijaron a 4°C con 100µL de ácido tricloroacético al 10% durante una hora, luego la placa se lavó y se dejó secar a temperatura ambiente, posteriormente se adiciona a cada pozo 50µL de la solución de SRB al 0,4% disuelta en ácido acético al 1%, durante 30 minutos.

Luego se extrae el excedente de SRB y se lava cinco veces cada cultivo con ácido acético al 1%, finalmente se solubiliza el SRB adicionando 100 µL de Tris Base al 10 mM (pH 10,5) por 5 minutos en agitación suave y se hizo la lectura de la densidad óptica a 564 nm en un espectrofotómetro “**Thermo Spectronic**” Genesys 20, registrándose los valores obtenidos para las absorbancias.

Las absorbancias son corregidas con respecto al blanco de lectura y son transformadas mediante la siguiente fórmula para establecer el % de supervivencia = (Absorbancia del pozo con tratamiento/ Absorbancia del pozo control del tratamiento) x100, y el porcentaje de inhibición, IC= (1- % supervivencia).

Detección de daño del DNA por el ensayo cometa.

Se trataron 40.000 células o linfocitos con tres (3) dosis (28 µg/ml, 70.4 µg/ml y 100 µg/ml) de Roundp, se incubaron por un periodo de 1 hora a 37°C, posteriormente se tomaron 20µL de suspensión celular para re suspenderla con 80µL de agarosa de bajo punto de fusión (Sigma) 0,5% a 37°C y se depositó sobre un portaobjetos previamente recubierto con una capa de agarosa de punto de fusión normal (Sigma) al 1%. La suspensión celular se cubrió con cubreobjetos y se llevó a refrigeración 4°C por 6 minutos. Luego se removió cuidadosamente el cubreobjetos y se adiciono una segunda capa de agarosa de bajo punto de fusión, se volvió a cubrir con un cubreobjetos y se llevó nuevamente a refrigeración a 4°C por otros 6 minutos.

Después de la solidificación, las placas se sumergieron en solución de lisis (sarcosinato de Na 1%, NaCl 2.5 M; Na₂ - EDTA, 100 mM, tris 10mM; pH 10 y triton x100, 1%) por 2 horas a 4°C.

Las placas se lavaron con PBS y se colocaron en una unidad de electroforesis horizontal con un buffer pH>13 (H₂O, EDTA 1mM y NaOH 300 mM) y se incubaron por 30 minutos para la desnaturalización del ADN y optimizar la ruptura de los sitios apurínicos (AP) ocasionados por los genotóxicos, luego se corrió a 25V y 300 mA por 30 minutos. Después de la electroforesis, las placas se lavaron con un buffer neutralizante (tris 0,4 M pH 7,5) por 5 minutos y posteriormente fijados con metanol, se tiñeron con 50 µl de Bromuro de etidio (0.02mg/mL) y se colocaron un cubreobjetos.

Las observaciones se realizaron en un microscopio de fluorescencia (Olimpus Cx41) equipado con filtro de 515-560 nm y un filtro de barrera de 590 nm. Para medir la reproducibilidad de los resultados se realizaron tres experimentos por cada tratamiento y en cada uno se contaron 100 células. Como control negativo se utilizó PBS, más células tratadas.

La ocurrencia de daño en el DNA se basó midiendo la longitud total del cometa haciendo uso del software (Tritek Comet Score™ freeware v1.5). Si su longitud mide más de 39 µm que es la longitud total producida por otros factores diferentes a ruptura es porque se generaron colas la cual es producto de rupturas en el ADN.

Capítulo IV

Análisis estadístico.

Los ensayos fueron realizados por triplicado para establecer las IC₅₀ de ambos métodos de cuantificación de la viabilidad celular y analizar mediante las medidas de tendencia central la

sensibilidad de ambos métodos empleando los programas estadísticos InfoStat/libre vs 2015I y SPSS Statistics vs 21 (IBM Corporation). Los datos obtenidos por cada método son comparables entre sí a partir de su correspondiente valor en porcentaje de inhibición, los cuales fueron analizados mediante una ANOVA con comparación de medias de Tukey para definir grupos homogéneos, es decir, establecer diferencias significativas entre los grupos; la diferencia se consideró significativa para valores de $p < 0.05$.

El cálculo de los valores IC_{50} para cada método se determinó empleando el análisis de regresión mediante el programa InfoStat/libre.

Resultados

La extracción de linfocitos mediante gradiente de densidad de Ficoll, permitió obtener una concentración promedio de 7.468.750 y de 20'601.565 células viables por mililitro para el ensayo con azul tripano y sulforodamina B respectivamente, En ambos ensayos se obtuvo una alta viabilidad celular superior al 90% en todos los recuentos; la viabilidad celular estimada en ambos casos, se realizó mediante el método de exclusión por azul tripano, el cual penetra en las células muertas, permitiendo distinguirlas claramente de las células vivas por la fuerte coloración azul que toman.

La sulforodamina B (SRB), es un colorante de aminoxantano, rosado brillante, que posee dos grupos sulfónicos $-SO_3^-$ cargados negativamente, capaces de unirse electrostáticamente a cationes. En condiciones ácidas (disuelta en ácido acético 1%), la SRB aumenta su afinidad por los aminoácidos básicos de las proteínas, y se fija selectivamente a éstos, proporcionando un índice del contenido de proteína celular, si las células son previamente fijadas con ácido tricloroacético, y después de eliminar el colorante no fijado, el colorante unido a las células viables se extrae con medio alcalino (Solución de Tris pH 10,5), permitiendo obtener una medida indirecta de la concentración celular midiendo la absorbancia a 564nm.

A partir de la concentración de 1×10^5 células viables por mililitro se realizaron los cultivos celulares con los que se evaluó el efecto del glifosato en su formulación Roundup, durante 24 horas, donde las células fueron expuestas a seis distintas concentraciones. Los resultados

obtenidos para cada ensayo permitieron estimar el porcentaje de inhibición del crecimiento celular para cada ensayo, los cuales se presentan en el gráfico 1; donde el cultivo celular analizado por azul tripano muestra una menor sensibilidad al glifosato a una concentración menor a la de IC_{50} de 56,4 $\mu\text{g/ml}$ estimado por Martínez A. y colaboradores (2007) a diferencia del resultado obtenido con sulforodamina B, donde el cultivo celular de linfocitos humanos muestra una mayor sensibilidad al glifosato.

El análisis estadístico realizado mediante una ANOVA de una vía permitió determinar que existen diferencias significativas para ambos métodos, entre las diferentes concentraciones a las que fueron expuestas las células linfocitarias de sangre humana, encontrándose en el caso del azul tripano, mediante la prueba de Tuckey cuatro grupos homogéneos, es decir, que entre las concentraciones menores o iguales a 56,4 $\mu\text{g/ml}$ se presentan diferencias significativas en el porcentaje de inhibición del crecimiento celular ($p < 0.05$), mientras que a concentraciones superiores no se encontraron diferencias significativas en el crecimiento, dado que a estas concentraciones el porcentaje de inhibición varía entre el 52% y 60%.

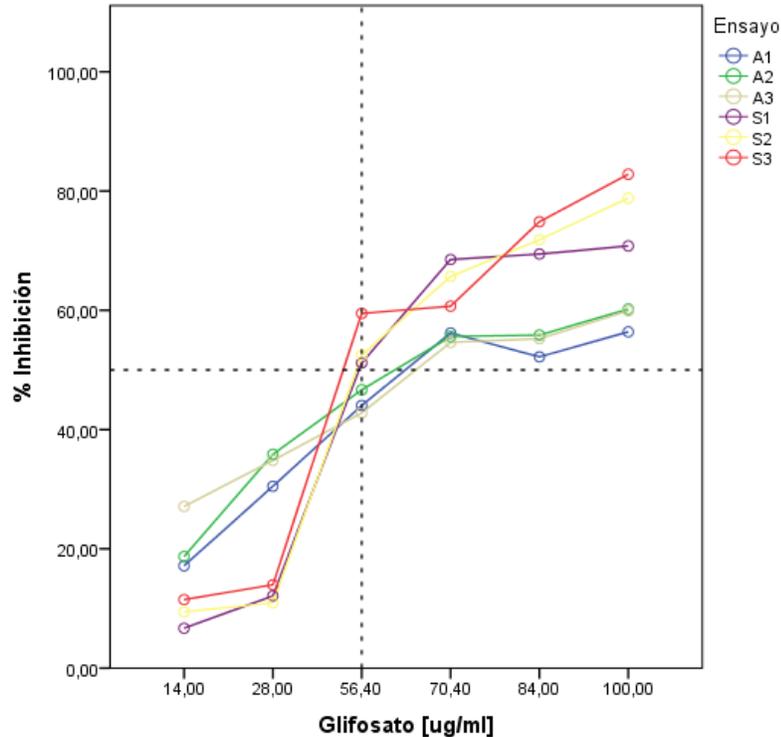


Figura 1. Porcentaje de inhibición calculado en cada ensayo para ambos métodos de análisis de la viabilidad celular. (Almeida, B., 2018)

Los ensayos nombrados como A1, A2, A3 corresponden al método de exclusión por azul tripano, y los ensayos nombrados como S1, S2, S3, corresponden al método de tinción con Sulforodamina B. La línea punteada perpendicular al eje X, muestran el valor de referencia de la concentración inhibitoria del 50% del crecimiento celular para el glifosato en formulación Roundup hallado por Martínez A. y colaboradores (2007), en células mononucleares de sangre periférica humana y la línea punteada perpendicular al eje Y, muestra el porcentaje de inhibición del 50% de la población celular.

Similarmente ocurre con el método de tinción con Sulforodamina B, entre las concentraciones de 14 y 28 $\mu\text{g/ml}$ no hubo diferencias significativas, mostrando un efecto similar sobre el crecimiento celular, que se refleja en un rango de inhibición que varía entre 6,69% y 11,49%, a diferencia del efecto del glifosato a una concentración de 56,4 $\mu\text{g/ml}$, donde el porcentaje de inhibición varía entre el 51% y 60% aproximadamente, a su vez el porcentaje de inhibición de la formulación Roundup, es significativamente diferente entre estas concentraciones con las demás

concentraciones evaluadas, hallándose solo diferencias significativas entre 70 y 100 $\mu\text{g/ml}$, más no entre estas y la concentración de 84 $\mu\text{g/ml}$.

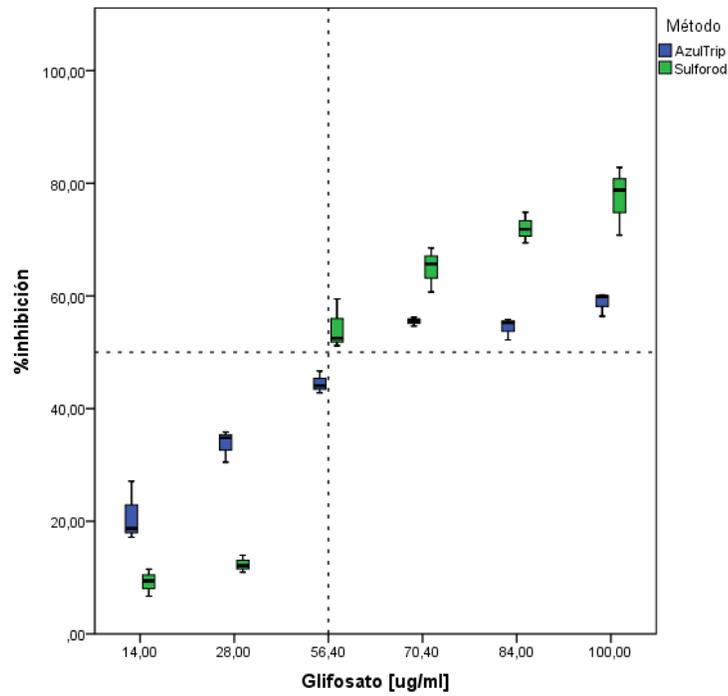


Figura 2. Variabilidad y mediana de los datos obtenidos del análisis de citotoxicidad del glifosato en su formulación Roundup en linfocitos de sangre periférica humana durante un periodo de exposición de 24 horas a 37°C. (Almeida, B., 2018)

Las barras muestran la variabilidad hallada entre los triplicados de cada ensayo. La línea de referencia perpendicular al eje X, muestra el valor de la concentración inhibitoria del 50% del crecimiento celular para el glifosato en formulación Roundup hallado por Martínez A. y colaboradores (2007), en células mononucleares de sangre periférica humana y la línea punteada perpendicular al eje Y, muestra el porcentaje de inhibición del 50% de la población celular.

Mediante el análisis de ajuste matemático a modelos de regresión efectuados para cada ensayo correspondiente a la evaluación de las seis concentraciones de glifosato en formulación Roundup, se logró establecer los valores de IC_{50} para ambos métodos, los cuales se presentan en la tabla 1.

El ajuste a un modelo matemático muestra una línea de regresión que eleva la concentración a la cual se presenta la sensibilidad del cultivo celular para un IC_{50} , por lo que los valores de la

concentración promedio inhibitoria del 50% del crecimiento es equivalente a 64,31 μ g/ml, mediante el método del azul tripano y de 58,69 μ g/ml para la sulforodamina B.

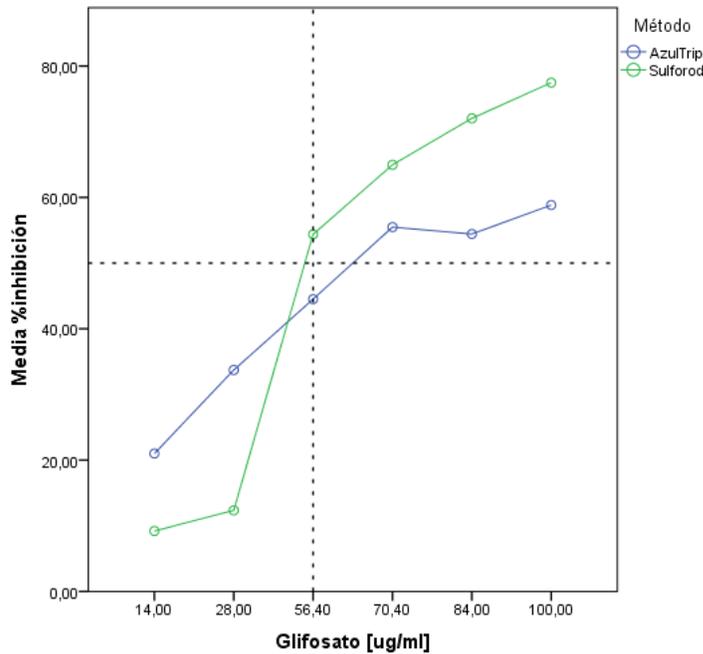


Figura 3. Porcentajes de supervivencia media obtenida al evaluar seis concentraciones de la formulación Roundup empleando dos métodos de análisis de viabilidad celular, la línea verde muestra los resultados obtenidos por el método de la sulforodamina B y la línea azul los resultados obtenidos con el azul tripano.

(Almeida, B., 2018)

La línea punteada perpendicular al eje X, muestran el valor de referencia de la concentración inhibitoria del 50% del crecimiento celular para el glifosato en formulación Roundup hallado por Martínez A. y colaboradores (2007), en células mononucleares de sangre periférica humana y la línea punteada perpendicular al eje Y, muestra el porcentaje de inhibición del 50% de la población celular.

Tabla 1. Valores de IC₅₀ del Glifosato en formulación Roundup, hallados mediante la línea de regresión a partir de dos ensayos realizados por triplicado correspondientes a dos métodos de

análisis de la viabilidad celular: método de exclusión por azul tripano y método de tinción con sulforodamina B.

Ensayos	IC₅₀ Azul Tripano (µg/ml)	IC₅₀ Sulforodamina B (µg/ml)
1	68,75	60,29
2	60,04	59,32
3	60,45	56,48
Promedio IC₅₀	63,08	58,69

Almeida, B., 2018.

El ajuste matemático no refleja la sensibilidad del cultivo celular obtenida empíricamente, subvalorando el efecto del glifosato en su formulación Roundup sobre los linfocitos obtenidos de sangre periférica humana.

Tabla 2. Promedio de daño inducido en el ADN de linfocitos humanos por diferentes dosis de glifosato en su formulación Roundup.

	Longitud cometa (µm)	Diámetro cabeza (µm)	%DNA cabeza	Longitud cola (µm)	%DNA cola
PBS	27.3	42.7	98.6	5.9	1.4
H2O2	80.7	38.7	94.9	47.3	4.4
100 µM					
28 µg	32.6	38.1	98.2	20.4	2
70 µg	56.9	36.4	96.1	27.6	3.5
100 µg	78.3	33.5	90.2	66.6	4

Almeida, B., 2018.

En la tabla 2 se muestra la detección de Daño del ADN mediante el ensayo cometa evidenciando la genotoxicidad en linfocitos humanos expuestos glifosato en su formulación Roundup detectado por el ensayo cometa. Los resultados indican que existe un efecto genotóxico (longitud del cometa), dependiente de la concentración utilizada, con un $P < 0.05$ según la prueba

Tukey. Se observa que a medida que se aumenta la dosis los valores analizados aumentan comparados con el control negativo.

Las células tratadas con PBS (Control negativo) muestran un daño espontáneo, de 27.3 μm de longitud, de igual manera, las células tratadas con H_2O_2 100 μM (control positivo) llegan a un valor de 80.7 μm , casi superando el triple en longitud del cometa al control negativo (Tabla 2).

Como se puede evidenciar los linfocitos humanos expuestos glifosato en su formulación Roundup la dosis utilizada de 28 μg , comparada con el control negativo no muestra *: Diferencia estadísticamente significativa $P > 0.05$. Si observamos la concentración de 70 μg en comparación con el control negativo, nos damos cuenta de que se genera incremento moderado del daño genético de las células expuestas al extracto. De igual manera la concentración de 100 μg supera 2.5 la respuesta del control negativo, indicando que a esta concentración genera un daño *: estadísticamente significativo $P > 0.05$.

Se observa una clara tendencia en cuanto al análisis del diámetro de la cabeza, que disminuye a medida que aumenta la longitud del cometa, así mismo el porcentaje de ADN en cola aumenta a medida que disminuye el porcentaje de ADN en cabeza. La longitud de cola aumenta a media del aumento de la longitud total del cometa. A mayor dosis, mayor daño genotóxico en comparación con el control negativo.

Se evidencia que en la concentración de 28 μg se presenta un Diámetro cabeza de 38.1 (μm), en la de 70 μg un diámetro de 36.4 (μm), y en la de 100 μg un diámetro de 33.5, a medida que se aumenta la concentración de las dosis de glifosato el diámetro de la cabeza del linfocito disminuye y a la vez disminuye su porcentaje de ADN en cabeza el de 28 μg , un porcentaje de cabeza de ADN 92.2, el de 70 μg , de 96.1 y el de 100 μg , 90.2.

Discusión

El glifosato originalmente patentado en 1964 como un agente quelante metálico con el código US Patent No. 3,160,632 (Gress *et al.*, 2014) fue empleado como herbicida debido a su papel inhibidor altamente selectivo de la enzima enolpiruvil-fosfoshiquimato-sintetasa, formada desde el fosfoenolpiruvato (PEP) y la shikimato-3-fosfato, la cual es responsable de la biosíntesis del corismato, un intermediario en la ruta de biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano (Gress *et al.*, 2014), cuya expresión se presenta en las plantas interviniendo en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y dado que esta enzima no se expresa en animales, hicieron suponer que su empleo era inocuo tanto para animales como para humanos; lo cual explica la relativa baja toxicidad sistémica del glifosato siendo la dosis letal media LD₅₀ por ingestión para ratas de 4,320 mg/kg, y en Conejos de 3,800 mg/kg (Gress, et al., 2014).

Esta supuesta inocuidad, facilitó la promoción del glifosato como un producto seguro para la salud y el ambiente, que sumado a su rápida efectividad en malezas, incremento rápidamente su aceptación y por ende su distribución en más de 100 países; los herbicidas a base de glifosato representan el 30% de todos los herbicidas usados en la agricultura (Romano, et al., 2012) siendo el grupo Monsanto el mayor generador de patentes de propiedad sobre este producto y sus formulaciones.

Las formulaciones construidas con glifosato incluyeron, además de este compuesto activo, tensioactivos como el POEA (por su nombre en inglés polyethoxylated tallow amine) al cual se le atribuyen efectos tóxicos y deletéreos propios.

Varios estudios sobre los efectos del glifosato han arrojado resultados de muy difícil interpretación debido a que analizan la exposición, por diferentes métodos, de células y mamíferos pequeños de forma directa al glifosato puro, a sus formulaciones, o metabolitos producto de su degradación como el aminometilfosfonato (AMPA) que permanece de forma residual en los suelos, semillas inmaduras y acuíferos, (Solomon, et al., 2007; Shehata, et al., 2014) y la Sarcosina que se degrada posteriormente a Glicina (Solomon, et al., 2007).

Las afirmaciones de investigaciones privadas realizadas por la multinacional Monsanto, donde se presentan una baja tasa de inhibición y mortalidad por el glifosato, hacen parte de varios estudios que fueron efectuados y no publicados por la multinacional, por lo que no han podido ser comprobados. Sin embargo, en los últimos años se han realizado diversos estudios donde se compara el nivel toxicológico del glifosato y sus formulaciones, encontrándose que el nivel de toxicidad del compuesto activo en su estado puro, es sustancialmente menor al de las formulaciones comerciales a base de glifosato (Benachour, et al., 2007; Solomon, et al., 2007; Souza, et al., 2013; Gress, et al., 2014) donde se atribuye un alto grado de toxicidad a los surfactantes o tensioactivos en comparación a la forma salificada del Glifosato.

La formulación Roundup presenta entre 40 y 50% de compuesto activo en su forma de sal isopropilamina, N-(fosfonometil) glicina, en asociación a un tensioactivo o surfactante no descrito en su ficha de seguridad, donde advierte de efectos negativos en los ecosistemas acuáticos a largo plazo. Entre los tensoactivos puros o mezclados con otras sales que se han encontrado en el Roundup están: el sulfato de amonio, benzisotiazolona, 5-cloro-2-metil 3(2H)-isotiazolona, FD&C Blue No. 1, glicerina, 3-iodo-2-propinil butilcarbamato, isobutano, isopropilamina, petróleo aromático destilado, metil p-hidroxibenzoato, metil pirrolidinona, ácido pelargonico, polyethoxylated tallowamine or alquila mina (POEA), hidróxido de potasio, propilen-glicol, sulfito de sodio, benzoato de sodio, sal de sodio o fenilfenol y ácido sórbico. Los surfactantes empleados junto al glifosato, por si mismos han sido catalogados como citotóxicos, cada uno con diferente grado de toxicidad, existiendo un efecto sinérgico que incrementa el potencial toxicológico de las formulaciones del glifosato, estos surfactantes tienen el papel funcional de permitir la penetración del glifosato a través de las membranas plasmáticas, potencializando no solo su acción y sino su bio-acumulación potencial (Benachour, et al., 2007).

La dosis letal media LD_{50} del Roundup sobre células embrionales humanas es del 0,3% después de 1 hora, en medio libre de suero y está disminuye alcanzando 0,06% (conteniendo entre otros compuestos 1,27mM de glifosato luego de 72h en presencia de suero. En estas condiciones las células embrionales son 2 - 4 veces más sensibles que las células placentarias, generalmente usado en agricultura al 1-2% es decir a 21-42 mM de glifosato, el cual es más eficiente que su compuesto activo glifosato, sugiriendo un efecto sinérgico provocado por adyuvantes presentes en

el Roundup (Benachour, et al., 2007) La potencialización del efecto del glifosato mediante surfactantes se debe a que el glifosato en sí mismo, no es un herbicida, sino un inhibidor de una ruta biosintética.

Según (Benachour, et al., 2007) observaron que el Roundup actúa sobre las líneas celulares embrionarias de riñón y placenta a niveles menores a las concentraciones tóxicas, inhibiendo la síntesis de estrógenos, la acción directa del glifosato a nivel celular sobre la aromatasa causa disrupción endocrina (, afecta el desarrollo sexual, gonadal y nivel hormonal de testosterona en ratones juveniles (Romano et al 2010), de igual forma puede afectar a mujeres gestantes y su descendencia cuando son expuestas a glifosato (Romano *et al.*, 2012), alterando el sistema cardiovascular provocando arritmias y paro cardíaco; además, deteriora el ADN siendo el Roundup el de mayor efecto genotóxico y mutagénico (Souza, et al., 2013).

En cuanto a (Gress, et al., 2014) mostraron que el Roundup a una concentración de 360ppm causa un influxo de iones calcio, contrariamente a 36 ppm que conlleva a una toma de iones calcio, causando una disrupción en la homeostasis del calcio, lo que induce a un efecto tóxico como quelador, afectando la condición electrofisiológica normal de las células cardíacas *in vivo* cuando se presenta en concentración de 734 a 1000 mg/L en el flujo sanguíneo, concentración altamente elevada en comparación con los análisis *in vitro* efectuados en este estudio, donde el porcentaje de inhibición del crecimiento leucocitario superior al 50% de la población con ambos métodos de análisis oscila entre el 58,69% y 63,08%, tal diferencia podría estar relacionada con compuestos sanguíneos y celulares con capacidad inhibidora o reparadora de la acción del glifosato y de los tensioactivos que constituyen al Roundup,

(Koller, et al., 2012) determinaron que la formulación Roundup induce efecto citotóxico agudo a concentraciones de 40 mg/l después de 20 minutos en células epiteliales humanas, evidenciándose daño en nivel de membrana y de forma no permanentemente, alteración en las funciones mitocondrias a concentraciones de 10 mg/L, detectándose daño membranal e interferencia en la síntesis de proteína, lo que podría explicar la disminución de la viabilidad celular, el cual fue superior al 5% a concentraciones de 14 µg/ml, siendo el alcance máximo de daño observado a ésta concentración cercano al 30% mediante el método del azul tripano.

El estudio realizado sobre la formulación Roundup, permitió establecer que la concentración media responsable de un IC₅₀ corresponde a un 63,08 µg/ml para el azul tripano y 58,69 µg/ml para sulforodamina B, valores cercanos a los obtenidos por Martínez y colaboradores (2007) en células sanguíneas mononucleares (56,4 µg/ml), existiendo una relación entre el porcentaje de inhibición y el aumento gradual de la concentración del agente tóxico, fenómeno observado con mayor claridad mediante el método de la SRB.

Similarmente a los resultados obtenidos en este estudio, varios investigadores han establecido que los estudios de citotoxicidad subestiman el alcance toxicológico, entendido como el efecto perjudicial del compuesto tóxico o su impacto sobre las células, pues se han encontrado daños en rutas metabólicas sobre líneas celulares a concentraciones menores al IC₅₀, al evaluar los datos empíricos, es decir, sin ser sometidos al ajuste matemático por modelamiento del comportamiento celular bajo la acción de compuestos citotóxicos como el Roundup.

En los resultados obtenidos en cada una de las dosis de Roundup y comparados con el control negativo, se notó una tendencia creciente de daño genotóxico según el aumento de la concentración de las mismas, llevando a un incremento de las lesiones primarias sobre el ADN, lo cual, está directamente relacionado con el aumento en las alteraciones genéticas celulares. Resultados similares han sido reportado por (Idris, Ambali, & Ayo, 2012), quienes encontraron que los pesticidas inducen daño oxidativo en el ADN a través de especies reactivas de oxígeno. Estas especies reactivas de oxígeno (ROS) están implicadas en la toxicidad de diversos plaguicidas incluidos los plaguicidas organofosforados. Se sabe que ROS induce varios tipos de lesiones en el ADN incluidas rupturas simples y dobles, sitios lábiles alcalinos y oxidación de purinas y pirimidinas que son detectados fácilmente por el ensayo de cometa (Collins, Dobson, Dusinska, Kennedy, & Stetina, 1997).

En estudios realizados por (Meléndez, Martínez, & Quijano, 2012), observaron que las dosis en la que se induce mayor frecuencia de células con daño en el ADN, también muestran mayor longitud de migración del ADN.

Conclusiones

Los análisis citotoxicológicos empleados en esta investigación, reflejan el efecto de los ajustes matemáticos en la estimación de los valores límites de las concentraciones de letalidad de los cultivos *in vitro*, ajustes que ofrece un valor de menor sensibilidad para la formulación Roundup a un IC_{50} para ambos métodos, por lo que debería considerarse un modelo que refleje el promedio empírico hallado, debido a que el ajuste lineal no refleja el grado de toxicidad real de la formulación, esta subvaloración en el IC_{50} , podría conducir a un rango mayor de daño celular y de afectación a la salud, en las personas expuestas al glifosato.

La acción toxicológica de la formulación Roundup, con concentración letal para el 50% de la población celular a partir de $40\mu\text{g/ml}$, en ensayos con distintos tipos celulares humanos *in vitro*, según lo referenciado por otros autores y lo encontrado empíricamente en esta investigación, indicando un grado de toxicidad mayor al presentado por los productores y comercializadores de éste producto, poniendo en riesgo el estado de salud y de desarrollo de las personas que manipulan o entran en contacto con ésta formulación. Cabe resaltar que el efecto teratógeno, cancerígeno y contaminante no solo de la formulación Roundup, sino de su compuesto activo, el glifosato, conducen a un deterioro medioambiental de todo el sistema biológico y físico donde se emplea, prolongándose en el tiempo debido a la presencia de compuesto residuales de su degradación.

El Roundup tiene la capacidad de inducir la actividad genotóxica en linfocitos humanos, lo cual podría constituir un factor de riesgo para la población expuesta, teniendo en cuenta la relación que existe entre daño genotóxico y aparición de enfermedades tales como el cáncer

Referencias

- A. Conrad, C. Schröter-Kermani, H.W. Hoppe, M. Rütther, S. Pieper, M. Kolossa-Gehring
Glyphosate in German adults – Time trend (2001 to 2015) of human exposure to a widely
used herbicide *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 220 (2017), pp. 8-16.
- A. Székács, B. Darvas (2012). Forty years with glyphosate M.N. Hasaneen (Ed.), *Herbicides-
properties, Synthesis and Control of Weeds*, Elsevier, Burlington, MA, USA
- A.H. Grube, D. Donaldson, T. Kiely, L. Wu. (2011). *Pesticides Industry Sales and Usage: 2006
and 2007 Market Estimates* U.S. Environmental Protection Agency, Office of Chemical
Safety and Pollution Prevention, Washington, DC.
- Benachour, N.; Sipahutar, H.; Moslemi, S.; Gasnier, C.; Travert, C.; Seralini, G. E. (2007). Time-
and Dose-Dependent Effects of Roundup on Human Embryonic and Placental Cells.
Archives Environmental Contamination and Toxicology. 53, 126–133.
- Bernardi, Maria Martha; Nunes, Maria Tereza; Alvarenga de Oliveira, Claudio. (2012).
Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin
expression. *Archives of Toxicology* 86:663–673.
- Brendler, S. S., Hartmann, A., Pfuhler, S., & Speit, G. (2005). The in vivo comet assay: use and
status in genotoxicity testing *Mutagenesis*. (Vols. 13-30). Obtenido de
[https://academic.oup.com/mutage/article/20/4/245/1069223/The-in-vivo-comet-assay-
use-and-status-in](https://academic.oup.com/mutage/article/20/4/245/1069223/The-in-vivo-comet-assay-use-and-status-in).
- COFEPRIS. (2009). Catálogo de Plaguicidas. <http://www.cofepris.gob.mx/> web/cfp/catálogo_de_
plaguicidas (Página visitada el 07-07-2015).

- Collins, A. (2004). The comet assay for DNA damage and repair *Mol. Biotechnol.* (Vol. 12.).
- Collins, A., Dobson, V., Dusinska, M., Kennedy, G., & Stetina, R. (1997). The comet assay: what can it really tell us. *Mutat.* 375 : .183–193.
- Cortes, Gutierrez, E., Davila, Rodríguez, M., Fernandez, J., C. Lopez- Fernandez, & A. Gosalbez, J.G. (2011). New application of the comet assay: chromosome-comet assay, *J. Histochem. Cytochem.* 59. 655–660.
- De Souza Filho, José; Neves Sousa, Caio César, Da Silva, Claudio Carlos; De Saboia-Morais; Simone Maria Teixeira; Koppe Grisolia, Cesar. (2013). Mutagenicity and Genotoxicity in Gill Erythrocyte Cells of *Poecilia reticulata* Exposed to a Glyphosate Formulation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 91:583–587
- EFSA (European Food Safety Authority) (2015), Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance glyphosate *EFSA J.*, 13 (11) (2015), p. 4302 (107 pp).
- Eslava, P., Ramírez, W. y Rondón, I. (2007). Sobre los efectos del glifosato y sus mezclas: impacto en peces nativos. Instituto de Acuicultura de los Llanos. Instituto de Investigaciones de la Orinoquia Colombiana. pp34-43.
- European Commission, 2018. Glyphosate - Food Safety <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/glyphosate_en>.
- G.E. Seralini Why 2015. Glyphosate is not the issue with Roundup. A short overview of 30 years of our research *J. Biol. Phys. Chem.*, 15 (3) (2015), pp. 111–119.
- Gasnier, Céline; Dumont, Coralie; Benachour, Nora; Clair, Emilie; Chagnon, Marie-Christine; Séralini, Gilles-Eric. (2009). Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology* 262:184–191

- Gedik, C., & S. Ewen, A. C. (1992). Gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells, *Int. J. Radiat. Biol.* 62. 313–320.
- Gress, Steeve; Lemoine, Sandrine; Seralini, Gilles-Eric; Puddu, Paolo Emilio 2014. Glyphosate-Based Herbicides Potently Affect Cardiovascular System in Mammals: Review of the Literature. *Cardiovascular Toxicology*. DOI 10.1007/s12012-014-9282-y.
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (2015). Evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides IARC Monographs, vol. 112, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France (2015).
- Idris, S., Ambali, S., & Ayo, J. (2012). Cytotoxicity of chlorpyrifos and cypermethrin: the ameliorative effects of antioxidants. . *Afr J Biotechnol.*, 99(11), 16461-16467.
- J.E. Franz, M.K. Mao, J.A. (1997). *Sikorski Glyphosate: A Unique Global Herbicide* American Chemical Society, Washington, DC.
- K.Z. Guyton, D. Loomis, Y. Grosse, F. El Ghissassi, L. Benbrahim-Tallaa, N. Guha, C. Scoccianti, H. Mattock, K. (2014). Street Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate *Lancet*.
- Koller, Verena J.; • Fürhacker, Maria; Nersesyanyan, Armen; Misik Miroslav; Eisenbauer, Maria; Knasmueller, Siegfried. (2012). Cytotoxic and DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells. *GENOTOXICITY AND CARCINOGENICITY Arch. Toxicol* 86:805–813.
- L. Niemann, C. Sieke, R. Pfeil, R. Solecki . (2015). A critical review of glyphosate findings in human urine samples and comparison with the exposure of operators and consumers *J. Verbr. Lebensm.*, 10 (2015), pp. 3–12.

- Martínez, Adriano; Reyes, Ismael; Reyes, Niradiz. (2007). Citotoxicidad del glifosato en células mononucleares de sangre periférica humana. *Biomédica*, 27:594-604.
- Meléndez, G. I., Martínez, M. M., & Quijano, P. A. (2012). Actividad mutagénica y genotóxica en el material particulado fracción respirable MP2.
- Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paul K, Vistica D, et al. (1991) .Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen using a diverse panel of cultured human tumour cell lines. *J Natl Cancer I*. Jun 1; 83(11): 757-766.
- Monroy, C.M., Cortés, A.C., Sicard, D.M. y Groot de Restrepo, H. (2005). Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato. *Biomédica*. 25(3): 335-345.
- R. Mesnage, B. Bernay, G.E. Seralini. (2013). Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principals of human cell toxicity *Toxicology*, 313 (2–3) (2013), pp. 122–128.
- Richard, S., Moslemi, S., Sipahutar, H., Benachour, N. y Seralini, G.E. (2005). Differential effects of glyphosate and Roundup on human placental cells and aromatase. *Environmental Health Environmental Health Perspectives*. 113(6): 716-20.
- Richard, S., Moslemi, S., Sipahutar, H., Benachour, N. y Seralini, G.E. (2005). Differential effects of glyphosate and Roundup on human placental cells and aromatase. *Environmental Health Environmental Health Perspectives*. 113(6): 716-20.
- Romano, Marco Aurelio; Romano, Renata Marino; Dalazen Santos, Luciana; Wisniewski, Patricia; Campos, Daniele Antonelo; Bargi de Souza, Paula; Viau, Priscila; Bernardi, Maria Martha; Nunes, Maria Tereza; Alvarenga de Oliveira, Claudio. (2012). Glyphosate impairs

- male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. *Archives of Toxicology* 86:663–673.
- Romano, R. M.; Romano, M. A.; Bernardi, M. M. Furtado, P. V.; Oliveira, C. A. (2010). Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. *Archives of Toxicology* 84:309–317
- Romano, R. M.; Romano, M. A.; Bernardi, M. M. Furtado, P. V.; Oliveira, C. A. (2010). Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. *Archives of Toxicology* 84:309–317
- S.H. Bai, S.M. (2016). Ogbourne Glyphosate: environmental contamination, toxicity and potential risks to human health via food contamination. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 23 (2016), pp. 18988-19001.
- Shehata, Awad A.; Kühnert, Manfred; Haufe, Svent; Krüger, Monika. (2014). Neutralization of the antimicrobial effect of glyphosate by humic acid in vitro. *Chemosphere* 104: 258–261
- Simoniello, M., Kleinsorge, E., Scagnetti, J., Grigolato, R., & Poletta, G. C. (2008). DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures. (Vol. 28). *J. Appl. Toxicol.*
- Simoniello, M.F, Kleinsorge, E., Scagnetti, J., Grigolato, R., Poletta, G., & Carballo, M. (2008). DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures. *J. Appl. Toxicol.*
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, et al. (1990). New Colorimetric Cytotoxicity Assay for AnticancerDrug Screening. *J Natl Cancer I.* Jul 4; 82 (13): 1107-1112
- Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, et al. (1990). New Colorimetric Cytotoxicity Assay for AnticancerDrug Screening. *J Natl Cancer I.* Jul 4; 82 (13): 1107-1112.

Solomon, Keith R.; Cerdeira, Antonio L.; Anadón, Arturo; Carrasquilla, Gabriel.; Marshall, Jhon; Sanin, Luz Helena. (2007). Coca and Poppy Eradication in Colombia: Environmental and Human Health Assessment of Aerially Applied Glyphosate Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 190:43–125.

W.A. Battaglin, M.T. Meyer, K.M. Kuivila, J.E. (2014), Dietze Glyphosate and its degradation product AMPA occur frequently and widely in U.S. soils, surface water, groundwater, and precipitation J. Am. Water Resour. Assoc., 50 (2014), pp. 275-290.

Apéndices

Apéndice A. Evidencias fotográficas



Pruebas realizadas en el laboratorio de investigación de la Universidad de pamplona.