



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO

Trabajo para optar por el título de

Doctor en Ciencias Naturales

**“Genotoxicidad de herbicidas de importancia agroeconómica en
Argentina”**

Lic. Noelia Nikoloff

Directores de Tesis: Dres. Sonia Soloneski y Marcelo L. Larramendy

2013

Mi más sincero agradecimiento:

A mis Directores los Dres. Sonia Soloneski y Marcelo Larramendy quienes me brindaron la oportunidad de continuar avanzando en mi formación académica y de quienes he aprendido numerosos aspectos de la investigación experimental. Además de acompañarme, confiar en mí y ayudarme en todo.

A mis compañeros de trabajo y laboratorio Josefina, Juan Pablo, Juan Manuel, Gabriela, Guillermo y Celeste de quienes he aprendido, compartido muchas horas de trabajo, recibido afecto, apoyo y ayuda desinteresada.

Al Dr. Miguel Reigosa por su predisposición a enseñarme numerosos aspectos de la parte experimental de mis investigaciones y su continua transferencia de conocimientos.

A mis amigas de la vida Vero, Eva, Ana, Nora, Caro, Meli, Maga y Mari por ser incondicionales.

A mi mamá y mis hermanos, por su afecto y su continuo estímulo.

A mi papá y mi abuela Elisa, aunque ya no estén, desde algún lugar me siguen guiando en la vida.

A Mati y a Dante, a quienes les dedico especialmente este trabajo principalmente por compartir sus vidas conmigo.

ÍNDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	10
LISTA DE PUBLICACIONES	14
ABREVIATURAS	15
1. INTRODUCCIÓN	17
1.1. Plaguicidas: concepto, situación en Argentina.....	21
1.2. Clasificación toxicológica de los plaguicidas	24
1.3. Herbicidas	26
1.3.1. Clasificación de los herbicidas.....	26
1.3.2. Herbicida Flurocloridona	30
1.3.3. Formulaciones comerciales de Flurocloridona	34
1.3.3.a. Formulación comercial Twin Pack Gold®	35
1.3.3.b. Formulación comercial Rainbow®	35
1.4. Biomarcadores: una herramienta para evaluar toxicidad. Conceptos y generalidades.....	36
1.4.1. Bioensayos de efecto genotóxico y citotóxico	38
1.5. Matrices bióticas empleadas como niveles de estudio.....	41
1.5.1. Estudios <i>in vitro</i> : concepto, ventajas y desventajas del uso de líneas celulares.....	43
1.5.2. Estudios <i>in vivo</i> : Los anfibios en estudios de toxicidad.....	45
2. HIPÓTESIS	49
3. OBJETIVOS	50
4. MATERIALES Y MÉTODOS	52

4.1. Compuestos químicos empleados	52
4.2. Modelos experimentales empleados	54
4.2.1. Líneas celulares	54
4.2.2. Organismo modelo	55
4.3. Exposición de los modelos experimentales a los compuestos	56
4.3.1. Exposición de los cultivos celulares	56
4.3.2. Exposición de <i>R. arenarum</i>	57
4.4. Ensayos de genotoxicidad	57
4.4.1. Estudio de la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICHs) ...	57
4.4.2. Estudio de la inducción de rupturas de cadena simple en el ADN	60
4.4.3. Estudio de la frecuencia de micronúcleos (MN).....	63
4.5. Ensayos de citotoxicidad.....	68
4.5.1. Estudio de la progresión del ciclo celular (PCC) e índice mitótico (IM).....	68
4.5.2. Estudio de la viabilidad celular	70
4.5.3. Estudio de la actividad lisosomal	71
4.5.4. Estudio de la actividad mitocondrial.....	72
4.5.5. Estudio de muerte celular no programada (apoptosis)	73
4.6. Ensayos de letalidad	75
4.6.1. Determinación de la concentración letal media (CL50)	75
4.7. Estudio del efecto de la vitamina E (α -tocoferol)	76
4.8. Análisis estadístico.....	76
5. RESULTADOS	79
5.1. Estudios <i>in vitro</i>	79
5.1a. Línea celular CHO-K1	79

5.1a.1. Estudio de la frecuencia de ICHs	79
5.1a.2. Estudio de la progresión del ciclo celular (PCC) e índice mitótico (IM)....	80
5.1a.3. Estudio de la actividad lisosomal	83
5.1a.4. Estudio de la actividad mitocondrial.....	84
5.1a.5. Estudio de la frecuencia de MN, <i>buds</i> nucleares, puentes de cromatina y viabilidad celular	85
5.1a.6. Estudio del EC, IDG y viabilidad celular.....	90
5.1a.7. Estudio del efecto de la vitamina E (α -tocoferol)	93
5.1b. Línea celular HepG2	94
5.1b.1. Estudio de la actividad lisosomal.....	94
5.1b.2. Estudio de la actividad mitocondrial.....	95
5.1b.3. Estudio de la frecuencia de MN.....	96
5.1b.4. Estudio del EC, IDG y viabilidad celular	98
5.1b.5. Estudio de muerte celular por apoptosis	101
5.2. Estudios <i>in vivo</i>	103
5.2.1. Estudios de la toxicidad aguda. Determinación de la CL50 _{96 h}	103
5.2.2. Estudio de la frecuencia de MN	103
5.2.3. Estudio del daño en el ADN mediante el EC	106
6. DISCUSIÓN	110
6.1. Estudios <i>in vitro</i>	113
6.2. Estudios <i>in vivo</i>	132
7. CONSIDERACIONES FINALES	145
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	151

RESUMEN

Los estudios llevados a cabo en el presente trabajo de Tesis Doctoral, tuvieron como objetivo general, evaluar la capacidad deletérea del herbicida flurocloridona y de dos de sus formulaciones comerciales Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] empleadas en el agro de nuestro país conteniendo un 25% del principio activo. Estos formulados se emplean en el tratamiento de cultivos agrícolas como algodón, apio, arveja, avena, cebada, centeno, lenteja, perejil, zanahoria, caña de azúcar, girasol, papa y trigo, entre otros. Para evaluar la toxicidad del mencionado herbicida y de sus formulaciones comerciales, se emplearon como modelo de estudio *in vitro* dos líneas celulares de mamífero (CHO-K1 y HepG2) y como modelo *in vivo* larvas del anfibio anuro *Rhinella arenarum*. Los efectos genotóxicos de dichos herbicidas, fueron investigados mediante el estudio de biomarcadores de efecto, analizando la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICHs) y los ensayos cometa (EC) y de micronúcleos (MN).

En la línea celular CHO-K1 todos los compuestos ensayados fueron capaces de inducir ICHs con concentraciones de 0,25-15 µg/ml. La capacidad de los compuestos para inducir ICHs fue: Twin Pack Gold[®] > FLC > Rainbow[®]. El formulado comercial Twin Pack Gold[®] fue el único compuesto capaz de incrementar la frecuencia de MN con la concentración de 5 µg/ml. Además, las mayores concentraciones ensayadas de ambos formulados (10-15 µg/ml) resultaron ser citotóxicas tal cual fue evidenciado a través de cambios morfológicos, pérdidas de la integridad de la membrana plasmática y alteraciones nucleares que no permitieron monitorear la frecuencia de MN. Todos los compuestos fueron capaces de inducir rupturas de cadena simple y/o sitios álcali sensibles en el ADN, evidenciado mediante la variante alcalina del EC con todas las

concentraciones ensayadas. En células HepG2, al igual que en las células CHO-K1, sólo el formulado Twin Pack Gold[®] fue capaz de incrementar la frecuencia de MN a la concentración de 5 µg/ml, no pudiéndose monitorear la frecuencia de MN con las concentraciones de 10-15 µg/ml de ambos formulados comerciales debido a la aparición de alteraciones celulares como ocurrió en el sistema celular CHO-K1. El análisis de los compuestos estudiados evidenció que fueron capaces de inducir rupturas de cadena simple y/o sitios álcali sensibles en el ADN con todas las concentraciones ensayadas lo cual fue evidenciado mediante el análisis de los nucleoides obtenidos en el EC.

Los efectos citotóxicos fueron evaluados mediante el análisis del índice de proliferación celular (IPC), el índice mitótico (IM), el índice de división nuclear (IDN), los ensayos colorimétricos de captación de Rojo Neutro y MTT (RN y MTT, respectivamente) y el estudio de muerte celular programada o apoptosis. En la línea celular CHO-K1 los resultados revelaron que el IPC decrece en función de la concentración empleada de todos los compuestos ensayados y para una concentración dada, la capacidad de ambas formulaciones comerciales de inducir un retraso en la progresión del ciclo celular siempre fue mayor que la inducción producida por el principio activo FLC. Asimismo, se observó actividad mitodepresiva ejercida tanto por el principio activo como por los formulados comerciales. Asimismo, se observó una marcada reducción de la actividad mitocondrial con las mayores concentraciones ensayadas de todos los compuestos. Cuando se realizó el ensayo de RN únicamente la formulación comercial Rainbow[®] ejerció efecto citotóxico a nivel lisosomal. El estudio de la viabilidad celular evidenció que los formulados comerciales resultaron ser más citotóxicos que el principio activo FLC. En células HepG2 se observó que

solamente los formulados comerciales fueron capaces de inducir una alteración de la actividad mitocondrial y lisosomal. Además, se observó inducción de apoptosis cuando las células fueron expuestas durante 24 h a todos los compuestos.

En sistemas *in vivo*, de larvas de *R. arenarum*, se determinó una CL₅₀_{96 h} con valores de 2,96 mg/L para Twin Pack Gold[®] y de 2,85 mg/L para Rainbow[®]. Sólo el formulado Rainbow[®] fue capaz de incrementar a las 48 h de exposición la frecuencia de MN en eritrocitos circulantes con la concentración de 0,71 mg/L. Por el contrario, ambos formulados fueron capaces de inducir efecto genotóxico con todas las concentraciones empleadas tanto a las 48 como a las 96 h de exposición evaluadas mediante el EC.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se propuso que la respuesta diferencial encontrada en cada modelo de estudio frente a los compuestos podría deberse a la presencia de xenobióticos de naturaleza desconocida presentes en el excipiente de las formulaciones comerciales, así como a variaciones en la sensibilidad diferencial de los modelos en estudio.

Los resultados de los estudios de mortalidad, genotoxicidad y citotoxicidad de FLC, Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] obtenidos en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, representan una evidencia concreta de que el herbicida FLC debe ser tenido en cuenta como un agente inductor de daño genotóxico y citotóxico, y debería ser clasificado, según los valores de toxicidad aguda CL₅₀_{96 h} obtenidos mediante la exposición de larvas de *R. arenarum* a Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®], como compuesto tóxico (categoría II), siguiendo la clasificación propuesta por Instituciones reguladoras tales como OECD y UN. Asimismo, se sugiere la necesidad de una correcta evaluación toxicológica de FLC y de las formulaciones comerciales existentes

del herbicida antes que continúen siendo aplicadas masivamente en nuestro país y en el mundo, representando un factor de riesgo para los organismos expuestos, incluyendo al ser humano.

ABSTRACT

The current Doctoral Thesis was aimed to evaluate the deleterious effects of the herbicide flurochloridone (FLC) and two of its commercial formulations Twin Pack Gold[®] and Rainbow[®], both containing 25% FLC, usually employed in Argentinean agriculture. These compounds are mostly used in the treatment of several agricultural crops, e.g., cotton, celery, peas, oats, barley, rye, lentils, parsley, carrots, sugarcane, sunflower, potato, and wheat, among others. FLC-induced toxicity was evaluated in two different biotic matrices both *in vitro* employing two mammalian cell lines, namely CHO-K1 and HepG2, and *in vivo* using amphibian *Rhinella arenarum* tadpoles. The frequency of sister chromatid exchanges (SCEs), single cell gel electrophoresis or comet assay (SCGE), and micronuclei induction (MN) were employed as end-points for genotoxicity.

In CHO-K1 cells, an increased frequency of SCEs was observed after treatment with all test compounds within the 0.25-15 µg/ml FLC concentration-range. The ability of compounds to induce ICHs was in the following order: Twin Pack Gold[®] > FLC > Rainbow[®]. Twin Pack Gold[®] was the only compound capable of increasing the frequency of MN when 5 µg/ml of FLC was assayed. In addition, higher concentrations of both formulations (10-15 µg/ml of FLC) induced cytotoxicity evidenced by morphological cellular changes, ruptures of the plasma membrane and nuclear alterations that did not allow MN frequency to be scored. All compounds were able to induce single-strand breaks and/or alkali sensitive sites into DNA, revealed by the SCGE assay regardless of the concentration. A similar scenario was observed when HepG2 cells were employed as targets. As in CHO-K1 cells, only the FLC-based commercial formulation Twin Pack Gold[®] was able to increase the frequency of

MN when the concentration of 5 µg/ml was assayed. On the other hand, higher concentrations of both technical formulations (10-15 µg/ml of FLC) induced morphological cellular changes, ruptures of the plasma membrane and nuclear alterations, enabling the analysis of MN frequency. All compounds were able to induce single strand breaks and/or alkali sensitive sites in DNA of HepG2 cells with all concentrations, as revealed by the increased frequency of damaged cells when the SCGE assay was employed as end-point for genotoxicity.

Cytotoxic effects were evaluated by analyzing the cell proliferation index (CPI), the mitotic index (MI), the nuclear division index (NDI), the MTT and Neutral Red uptake colorimetric assays (MTT and NR, respectively), and the programmed cell death or apoptosis. In CHO-K1 cell line, results revealed that the CPI decreased for all compounds tested, depending upon the concentration used. Furthermore, results demonstrated that, at a given concentration, the ability of both commercial formulations to induce a delay in cell-cycle progression was always greater than that produced by the active principle FLC. A decrease was also observed, a decrease in the mitotic activity exerted by both the active ingredient FLC as well as both commercial formulations. Additionally, the results revealed a marked reduction of mitochondrial activity with the highest concentrations of all compounds tested. When the NR assay was performed, only the commercial formulation Rainbow[®] exerted a cytotoxic effect at lysosomal level. The cell viability analysis showed that the commercial formulations were more cytotoxic than the active principle FLC. In HepG2 cells was possible to observe that only the commercial formulations were able to induce an altered mitochondrial and lysosomal activity but not FLC. Additionally, induction of

apoptosis was observed after 24 h of cell exposure to FLC, Rainbow[®] as well as Twin Pack Gold[®].

In *in vivo* systems, LC50_{96 h} values of 2.96 mg/L and 2.85 mg/L were determined for Twin Pack Gold[®] and Rainbow[®], respectively. Results demonstrated that only the FLC-based commercial formulation Rainbow[®] was able to increase the frequency of MN in circulating erythrocytes in tadpoles exposed to 0.71 mg/L during 48 h. However, when the SCGE assay was employed, both formulations at all concentrations employed were able to induce genotoxic damage either at 48 and 96 h of exposure.

Moreover, it was proposed that the differential response found in our study between FLC and the FLC-based commercial formulations Twin Pack Gold[®] and Rainbow[®] when employing different bioassays, may be committed to the presence of unknown xenobiotic(s) present within the excipient of the commercial formulations or to a differential sensitivity of the models under study.

The results on lethal, genotoxic and cytotoxic FLC, Twin Pack Gold[®], and Rainbow[®] obtained in the current Doctoral Thesis represent a concrete evidence that the herbicide FLC must be considered as an agrochemical agent with lethal, genotoxic and cytotoxic properties. Furthermore, according to the acute toxicity LC50_{96 h} values obtained by exposing larvae of *R. arenarum* to Twin Pack Gold[®] and Rainbow[®], it should be classified as a toxic compound (category II) following the classification proposed by regulatory International Agencies such as the OECD and UN. Additionally, the results strongly suggest the requirement for proper toxicological evaluation of FLC and its based-commercial formulations before continue being

applied massively in our country and worldwide, since the herbicide FLC clearly represents a risk factor for exposed organisms, including humans.

LISTA DE PUBLICACIONES

Este trabajo de Tesis Doctoral está basado principalmente en los siguientes trabajos publicados. Los mismos se encuentran contenidos en el Anexo I.

Trabajos publicados

1. **Nikoloff, N.**, Soloneski, S. and Larramendy, M.L. 2012. Genotoxic and cytotoxic evaluation of the herbicide flurochloridone on Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *Toxicology In Vitro* 26, 157-163.
2. **Nikoloff, N.**, Larramendy, M.L. and Soloneski, S. 2012. Comparative evaluation *in vitro* of the herbicide flurochloridone by cytokinesis-block micronucleus cytome and comet assays. *Environmental Toxicology* doi: 10.1002/tox.21816. En prensa.
3. **Nikoloff, N.**, Natale, G.S., Marino, D., Soloneski, S. and Larramendy, M. L. 2014. Flurochloridone-based herbicides induced genotoxicity effects on *Rhinella arenarum* tadpoles (Anura: Bufonidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 100, 275-281.
4. **Nikoloff, N.**, Larramendy, M.L. and Soloneski, S. 2014. Assessment of DNA damage, cytotoxicity, and apoptosis in human hepatoma (HepG2) after flurochloridone herbicide exposure. *Food and Chemical Toxicology* 65, 233-241.

ABREVIATURAS

A lo largo de la presente Tesis Doctoral aquellas abreviaturas correspondientes a Instituciones internacionales al igual que acrónimos internacionalmente aceptados han sido adoptadas en su idioma original y no por su traducción al español.

χ^2 : chi cuadrado

ADN: ácido desoxirribonucleico

ACTN: acetona

APFB: agarosa de punto de fusión bajo

APFN: agarosa de punto de fusión normal

BLM: bleomicina

BrdUrd: 5-bromo-2'-deoxiuridina

CASAFE: Cámara Argentina de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes

CASRN: *Chemical Abstracts Service Registry Number* (Servicio de Resúmenes Químicos)

CL50: concentración letal 50

CHO-K1: células de ovario de hámster chino

CP: ciclofosfamida

ha: hectárea

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato

DMSO: sulfóxido de dimetilo

EE. UU.: Estados Unidos de Norte América

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EFSA: *The European Food Safety Authority* (Agencia Europea de Seguridad Alimentaria)

ES: error estándar

ERO: especies reactivas de oxígeno

ETOH: etanol

FAO: *Food and Agriculture Organization* (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación)

FLC: flurocloridona

h: hora/s

HepG2: células de hepatocarcinoma humano

IARC: *International Agency for Research on Cancer* (Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer)

ICHs: intercambio/s de cromátidas hermanas

IDG: índice de daño genético

IDN: índice de división nuclear

IM: índice mitótico

IP: yoduro de propidio

IPC: índice de proliferación celular

M₁: células en primera división

M₂: células en segunda división

min: minuto/s

MN: micronúcleo/s

MTT: ensayo bromuro de dimetildifeniltetrazolio

N₁: células con un núcleo

N₂: células con dos núcleos

N₃₊: células con tres o más núcleos

OECD: *Organization for economic co-operation and development* (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico)

OGM: organismo genéticamente modificado

p.a.: principio activo

RN: ensayo Rojo Neutro

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

Tn: toneladas

UN: *United Nations* (Naciones Unidas)

USEPA: *The United States Environmental Protection Agency* (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos)

Vit. E: vitamina E (α -tocoferol)

WHO: *World Health Organization* (Organización Mundial de la Salud)

1. INTRODUCCIÓN

Es sabido que la disponibilidad limitada del uso de tierra confinada para la producción agrícola y ganadera así como la disminución en el rendimiento de los principales cultivos, son motivo de preocupación mundial, principalmente de los países en desarrollo debido a sus consecuencias o repercusiones, no sólo desde el punto de vista económico local sino para asegurar un correcto abastecimiento alimentario a nivel global. Según las proyecciones mundiales para el año 2020, el crecimiento de la toda la población superará los 7.500 millones de habitantes. La disminución de la fertilidad del suelo y el cambio climático han planteado, asimismo, la preocupación de la sostenibilidad en la productividad agrícola mundial actual. Las estrategias futuras para el aumento de la productividad agrícola tendrán que centrarse en una utilización más eficiente y sostenible de los recursos nutricionales disponibles para la población global (Grunh y *col.*, 2000).

El crecimiento demográfico junto con el aumento de consumo de alimentos por incremento simultáneo tanto del ingreso *per capita* como de la elevada tasa de urbanización, hace que exista la necesidad de incrementar la producción de alimentos. La inversión en agricultura constituye una de las estrategias más eficaces para reducir la pobreza y el hambre y promover la sostenibilidad. La innovación tecnológica aparece como una posible solución que estas demandas plantean ante “la necesidad de producir más alimentos en cada vez menos superficie agrícola” (FAO, 2012). Bajo este contexto, una de las principales innovaciones se centra en el sector de los agroquímicos, dónde se incluyen a los plaguicidas y a los fertilizantes. Por otra parte, es dable destacar que una de las consecuencias más graves del proceso de intensificación de la agricultura es su impacto negativo sobre el ambiente, lo que ha

desencadenado la destrucción del hábitat, el deterioro del recurso suelo y el uso masivo e indiscriminado de diversos agroquímicos con las consecuencias negativas que estos producen en la biota y el ambiente.

El uso de agroquímicos ha aumentado de manera continua a escala mundial. Sin embargo, se observa una tendencia actual a la reducción del empleo de los mismos en los países desarrollados y a un aumento intensivo de aplicación en los países en desarrollo (Torres y Capote, 2004). Estos últimos países representan los consumidores más importantes de agroquímicos, ya que utilizan un 75% de la producción mundial de los mismos. Esto se debe a que su productividad está limitada debido a la aparición frecuente de plagas y enfermedades que afectan a los cultivos, por lo que el uso y la calidad de los agroquímicos se ha convertido en un área prioritaria en respuesta a las demandas del mercado consumidor (López y col., 2012). Si nos situamos particularmente en el caso de los países sudamericanos, el modelo de agricultura intensiva basado en OGM es el que actualmente se está aplicando, especialmente en países tales como Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay y Uruguay. Sin embargo, este modelo no cuenta con una crítica evaluación, ni con estrictas regulaciones, ni con adecuada información disponible por parte de los países que lo utilizan. Todas estas deficiencias conllevan a una situación de alerta vinculada con el posible impacto negativo en organismos expuestos, entre ellos el hombre, así como en el medio ambiente, causado por el uso de agroquímicos (López y col., 2012). Por otra parte, debido a las condiciones socio-económicas en los países en desarrollo, los habitantes pueden verse altamente expuestos a los agroquímicos si tenemos en cuenta circunstancias en las cuales la salud se ve alterada por otros factores como la desnutrición. Asimismo, el problema se agrava más aún si mencionamos el manejo

inadecuado de los agroquímicos y el tratamiento inadecuado de sus envases (Ministerio de Salud, 2007).

Si nos situamos particularmente en nuestro país, la República Argentina no permanece ajena a esta tendencia incremental en el uso indiscriminado de agroquímicos. Durante los últimos 20 años, el área sembrada se extendió cerca del 35% y la producción de trigo, maíz, girasol y soja aumentó de 40 a 67 millones de tn, representando por consiguiente alrededor del 66% de la superficie territorial total, mientras que el consumo de agroquímicos ascendió a un 600% (Satorre, 2005). Además, podemos mencionar otros eventos ocurridos en nuestro país durante los últimos años; entre los mismos se encuentran la expansión del cultivo sojero, la adopción de la siembra directa, el ingreso a la producción argentina de la soja RR (resistente a glifosato) y la subsecuente aparición de malezas con mayor resistencia a este herbicida. Por otra parte, la República Argentina posee el 20% de todas las superficies cultivadas en siembra directa del planeta (Pengue y col., 2004) y actualmente, la extensión de cultivo de soja transgénica alcanza los 20 millones de ha, empleándose 200 millones de litros de glifosato para producir 50 millones de tn de soja por año (Teubal y col., 2005; López y col., 2012). Dentro del mercado de los plaguicidas en Argentina, según lo comunicado por el CASAFE, los herbicidas lideran el volumen de ventas (CASAFE, 2011). Cabe señalarse, asimismo, que mientras los fungicidas e insecticidas representan un 15% y 17% del total de plaguicidas, respectivamente, el volumen total de herbicidas comercializado asciende al 59% (INTA, 2012). Dentro de los herbicidas más utilizados en todo el mundo, el glifosato se encuentra a la cabeza de las ventas, situación que también se observa en Argentina. De la misma manera, con el incremento de los cultivos sojeros se viene fomentado el

uso de otros tipos de herbicidas alternativos. Durante el período 2007/08, en nuestro país, el consumo de otros herbicidas, distintos del glifosato, se incrementó un 30%, donde la utilización del herbicida 2,4-D aumentó en un 10%, el herbicida imazetapir lo hizo en un 15%, el herbicida haloxifop en un 12% y el herbicida flurocloridona mostró valores de incremento cercanos al 45% (CASAFE, 2009).

Por otra parte, debemos tener en cuenta que sólo un 0,1% de la cantidad de plaguicida aplicada llega a la plaga, mientras que el restante circula en el ambiente y se convierte en contaminantes emergentes para los sistemas bióticos (animales y plantas principalmente) y abióticos (suelo, aire, agua) amenazando su estabilidad y representando un peligro no sólo para los ecosistemas sino para la salud pública (Donald, 2004; Peruzzo y *col.*, 2008). La contaminación del ambiente por plaguicidas puede producirse por aplicación directa de los mismos en los cultivos, derrames accidentales, lavado inadecuado de tanques contenedores, filtraciones en los depósitos de almacenamiento y por residuos descargados en el suelo. La contaminación de cursos y masas de agua por plaguicidas puede ocurrir, por mencionar algunos ejemplos, por la descarga de agua del lavado de equipos, por su aplicación directa al agua, por el desplazamiento de plaguicidas arrastrados por las lluvias hacia los cauces, por las aplicaciones aéreas cercanas a los ríos y lagos y por el arrojado de bolsas o envases vacíos con remanentes de producto en su interior, entre otros. Por este motivo, la evaluación del grado de contaminación del suelo por plaguicidas es de particular importancia debido a que estos contaminantes pueden ser transferidos, en última instancia, a los alimentos. La aplicación aérea no controlada puede ocasionar la contaminación del aire y causar intoxicaciones en poblaciones que se encuentran próximas a zonas agrícolas. El uso y manejo inadecuado de los plaguicidas durante su

almacenamiento, transporte o aplicación en el campo, conlleva al riesgo de intoxicación o de contaminación del ambiente. El destino final de los plaguicidas en el ambiente es sumamente complejo y depende de numerosos factores interrelacionados, entre los que caben incluirse las propiedades de los compuestos, las del suelo, las condiciones ambientales y las características del sitio contaminado (Plenge-Tellechea y col., 2007).

1.1. Plaguicidas: concepto, situación en Argentina

Por definición de la WHO, “los plaguicidas son aquellas sustancias o mezcla de sustancias, destinadas a prevenir la acción de controlar o destruir directamente malezas, insectos, hongos, ácaros, moluscos, bacterias, roedores y otras formas de vida animal o vegetal que puedan resultar perjudiciales tanto para la salud pública como para la agricultura, donde estas especies son consideradas plagas durante la producción, el almacenamiento, el transporte, distribución y elaboración de productos agrícolas y/o sus derivados” (CASAFE, 2009).

Los plaguicidas pueden ser de origen sintético o biológico y se clasifican de acuerdo a la maleza, enfermedad o plaga contra la que actúan. Dentro de ellos encontramos a los herbicidas, que controlan las especies vegetales que invaden a los cultivos, a los insecticidas, que controlan insectos perjudiciales, y a los acaricidas, fungicidas y bactericidas que se destinan a combatir ácaros, hongos y enfermedades bacterianas. También existen productos hormonales (reguladores de crecimiento y feromonas) y fertilizantes que proveen nutrientes para los vegetales en suelos deficitarios, y/o mejoran el crecimiento y desarrollo de los cultivos (CASAFE, 2011). Las malezas, los insectos, los ácaros y las enfermedades atacan a los cultivos causando grandes pérdidas económicas con la consecuente disminución significativa en los

rendimientos. La FAO estima que las pérdidas en la producción agrícola mundial causadas por diferentes plagas son mayores al 40%, y que los plaguicidas reducen un 10-15% las pérdidas en los cultivos, permitiendo mayores rendimientos productivos (<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/i0142s/i0142S06.pdf> ; <http://www.fao.org>).

En la República Argentina, los plaguicidas son comercializados por distintas empresas nacionales y multinacionales. Existe una mínima producción de principios activos que alcanza sólo el 16,6%, mientras que el 43,6% de agroquímicos utilizados en el país tienen su origen en el extranjero incluyendo a los denominados países BRIC, economías emergentes tales como Brasil, Rusia, India y China y el 39,8% restante es formulado en nuestro país con elementos importados y sólo algunos son de producción nacional (Pengue, 2005).

De los procesos industriales que existen en el país, la mayoría corresponden a la etapa de formulación en adelante, por lo que en la República Argentina operan dos tipos diferentes de empresas relacionadas: aquellas que producen los principios activos y otras que los importan y sólo hacen la formulación localmente. Los plaguicidas normalmente se comercializan como formulados complejos que incluyen al principio activo (p.a.), sustancia que posee la propiedad de matar a la plaga, junto a otros ingredientes inertes (solventes, emulsionantes, tensioactivos, entre otros) que facilitan la aplicación y la eficacia del principio activo. Se sabe que además de la toxicidad inherente al principio activo, se han publicado numerosas evidencias donde la toxicidad de los compuestos “inertes” presentes en la formulación comercial resulta ser mayor que la del principio activo, trayendo aparejado un incremento en la toxicidad del plaguicida. Muchos de estos efectos tóxicos podrían estar asociados a interacciones químicas que resultan en efectos sinérgicos, antagónicos o potenciales

que comúnmente pueden ocurrir al combinar dos o más sustancias químicas (Soloneski y *col.*, 2001; González y *col.*, 2006, 2007; Molinari y *col.*, 2009, 2010). Sin embargo, en nuestro país, debido a la competencia comercial entre las empresas productoras, no se da a conocer a los usuarios los nombres de estas sustancias auxiliares o inertes y se consideran a las mismas como secreto industrial o como información de carácter confidencial (Petrelli y *col.*, 1993; Cox, 1999).

En Argentina, el registro y uso de los diferentes principios activos y/o productos formulados y fertilizantes esta regulado mediante la Resolución SENASA 350/99. Las normas establecen que todo producto previo a su producción y comercialización debe ser inscripto mediante un certificado de uso y comercialización que los habilita de manera formal a ser empleados en todo el territorio nacional para el control de diferentes tipos de plagas en los cultivos para los que se encuentran autorizados. La legislación argentina relativa al registro, comercialización y aplicación de plaguicidas es incompleta, permisiva y obsoleta. Existen legislaciones que resultan insuficientes, falta de sistemas de vigilancia, falta de capacitación y falta de sistemas de protección de los operarios, por mencionar solo algunas. Como ya hemos mencionado, existen serias deficiencias en el registro y uso de los plaguicidas pero lo más preocupante es la falta de conocimiento e información por parte de los trabajadores y la comunidad en general (Souza Casadinho, 2007).

Esta falta de regulación y control del empleo masivo de agroquímicos en nuestro país ha traído aparejado un incremento en la incidencia de intoxicaciones, que ya ha sido catalogado como un problema grave de salud pública en toda América Latina por la WHO (WHO-FAO, 2004). En Argentina en particular, un estudio pormenorizado que fue llevado a cabo por el Ministerio de Salud de la Nación destaca la problemática

local sobre el uso de agroquímicos y la elevada tasa de intoxicación registrada tanto por exposición directa como indirecta. Es así que se ha observado que la incidencia de intoxicaciones por exposición a plaguicidas tanto de uso agrícola como doméstico ha revelado que los herbicidas produjeron el 26,83% de las mismas, los insecticidas fosforados el 24,39% y los insecticidas carbamatos el 11,85 %, entre otros. Cabe aclarar, que dentro del registro de las personas que se han visto intoxicadas se incluyen hombres, mujeres y niños con un variado rango etario (García y *col.*, 2003).

1.2. Clasificación toxicológica de los plaguicidas

Según el grado de riesgo que presentan los plaguicidas y dentro de estos en nuestro interés los herbicidas, podemos resumir cuatro clasificaciones de amplia difusión y aplicación mundial generadas por organismos competentes en el tema.

- Clasificación según el criterio de la **USEPA**. Se basa en la toxicidad aguda en ratas, referida a los efectos inmediatos (0-7 días) tras la exposición a un plaguicida. La clasificación de los plaguicidas sobre la base de su toxicidad toma en cuenta la DL50 para las rutas de exposición oral o dérmica, mientras que en la exposición por inhalación se emplea la CL50. (http://www.pesticideinfo.org/Docs/ref_toxicity2.html#Acute).

Clase	Toxicidad aguda en ratas		
	oral DL50 (mg/kg)	dérmica DL50 (mg/kg)	inhalación CL50 (mg/l)
I Altamente tóxico	menor a 50	menor a 200	menor a 0,05
II Moderadamente tóxico	50-500	200-2000	0,05-0,5
III Ligeramente tóxico	500-5000	2000-20000	0,5-2,0
IV Levemente tóxico	mayor a 5000	mayor a 20000	mayor a 2,0

Fuente: (http://www.pesticideinfo.org/Docs/ref_toxicity2.html#Acute)

- Clasificación según el criterio de la **WHO**. En este caso la clasificación se realiza de acuerdo a la peligrosidad del plaguicida, entendiendo esta como su capacidad de producir daño agudo a la salud cuando se producen una o múltiples exposiciones en un tiempo relativamente corto (WHO, 2009).

Clase	DL50 en ratas (mg/kg de peso corporal)	
	Vía oral	Vía dérmica
Ia Extremadamente peligroso	<5	<50
Ib Altamente peligroso	5-50	5-200
II Moderadamente peligroso	50-2000	200-2000
III Ligeramente peligroso	mayor a 2000	mayor a 2000
U Improbable de presentar riesgo agudo	5000 o superior	

Fuente: (WHO, 2009)

- Clasificación según el criterio de la **OECD**. En este caso la clasificación se realiza según los valores de CL50 obtenidos en estudios de toxicidad aguda (Mazzatorta y col., 2002).

Categoría	Valor CL50 (mg/L) en organismos acuáticos
Muy tóxico	< 1
Tóxico	1-10
Perjudicial	1-100
Efectos adversos a largo plazo	> 100

Fuente: (Mazzatorta y col., 2002)

- Clasificación según el criterio de la **UN**. El criterio de clasificación empleado es el mismo que usa la OECD (UN, 2011).

Categoría	Valor CL50 (mg/L) en organismos acuáticos
Categoría 1 muy tóxico	≤ 1
Categoría 2 tóxico	> 1 pero ≤ 10
Categoría 3 nocivo	> 10 pero ≤ 100

Fuente: (UN, 2011)

1.3. Herbicidas

Los herbicidas son productos fitosanitarios utilizados para controlar especies vegetales no deseadas debido a que las mismas causan un impacto negativo en la producción y en el rendimiento en los cultivos de importancia económica. Seguidamente podemos resumir algunos daños causados por las malezas:

- Las malezas compiten con el cultivo, se benefician de alimentos y disminuyen la luz solar que debiera aprovechar el cultivo.
- Existe contaminación por semillas de malezas en la cosecha de granos y tubérculos disminuyendo su calidad, incluso anulando su valor para la siembra posterior o venta directa.
- Dificultan las labores en los cultivos.
- Son huéspedes temporales de plagas y enfermedades que pueden ser transmitidas luego, a los cultivos.
- Algunas son venenosas para el ganado, animales silvestres e inclusive para el hombre.

1.3.1. Clasificación de los herbicidas

Los herbicidas pueden ser agrupados según su naturaleza química, su mecanismo de acción o el momento de aplicación, aunque no existe una única clasificación.

Podemos clasificarlos brevemente de la siguiente manera:

Según el momento de aplicación

- Preemergentes: Se aplican al suelo luego de la siembra pero antes de la emergencia del cultivo.
- Postemergentes: Se aplican después de la nacencia del cultivo.

Según su movilidad

- De contacto: Destruyen solo el tejido vegetal en contacto con el químico. No se traslocan por el floema por lo que sólo afectan a las zonas de la planta en contacto con el herbicida.
- Sistémicos: Son trasladados a través de la planta por el floema, ya sea por aplicación foliar a las raíces, o aplicación en el suelo hasta las hojas.

Según su acción dentro de la planta

- Totales: Eliminan todo tipo de vegetal con el que entren en contacto.
- Selectivos: Eliminan las hierbas indeseadas respetando al cultivo indicado.

Según su mecanismo de acción: La siguiente tabla resume la clasificación de los herbicidas según su modo de acción (Tabla 1).

Tabla 1: Clasificación de los herbicidas según su modo de acción

Grupo	Modo de acción	Familia química	p.a.
A	Inhibición de la acetil coenzima carboxilasa (ACCase)	Aryloxfenoxipropionatos	clodinafop-propargil, butil-cihalofop, metil-diclofop, etil-p-fenoxaprop
		Cyclohexanodionas	cletodim, cloxidim, tralkoxidim
B	Inhibición de la acetolactato sintetasa (ALS)	Sulfanilureas	amidosulfuron, azimsulfuron, metil-bensulfuron, clorsulfuron
		Imidazolinonas	metil-imazametabenz, imazamox, imazaquin
		Triazolpirimidinas	metil-cloransulam, diclosulam, flumetsulam, metosulam
		Pirimidinil	bispiribac, piribenzoxim,

		tiobenzatoos	perithiobac-na, metil-priminobac
C1	Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II	Triazinas	ametrina, atrazina, cianazina, desmetrina, prometrina
		Triazonas	hexazinona, metamitrona, metribuzina
		Urazilos	ienacilo, terbacilo
		Piridazinona	pirazona = cloridazona
		Fenil-carbamatos	desmedifam, fenmedifam
C2	Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II	Ureas	clortoluron, diuron, fluometuron (ver F3), isoproturon, linuron
		Amida	propanil
C3	Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II	Benzonitrilos	bromoxinil (también en grupo M), ioxinil (también en grupo M)
		Benzotiadiazol	bentazona
		Fenil-piridazina	piridato
D	Desviación del flujo electrónico en el fotosistema	Bipiridilos	dicuat, paracuat
E	Inhibición de la protoporfirinógeno oxidasa (PPO)	Difeniléteres	acifluorfen-na, aclonifen, bifenox, etil-fluoroglicofen, fomesafen, oxifluorfen
		N-fenil-ítalimidias	flumioxazin
		Tiadiazoles	tidiazimina
		Oxadiazol	oxadiazon

		Triazolinona	carfentrazona, sufentrazona
F1	Decoloración: inhibición de la síntesis de los carotenoides a nivel de la fitoeno desaturasa (PDS)	Nicotiananlida	diflufenican
		otros	fluridona, flurocloridona , flurtamone
F2	Decoloración: inhibición de la 4-hidroxiifenil-piruvato-dioxigenasa (4-HPPD)	Triketona	sulcotriona
		Ixosazol	Isoxaflutol
		Pirazol	pirazolinato, pirazoxifen
F3	Decoloración: inhibición de la síntesis de los carotenoides (punto desconocido)	Isoxazolidiona	clomazona
		Urea	fluometuron (ver C2)
		Triazol	amitrol
G	Inhibición de la EPSP sintetasa	Glicinas	fliosato, sulfosato
H	Inhibición de la glutamino sintetasa	Ácido fosfórico	flufosinato-amonio, bialafos = bilanafos
I	Inhibición del dihidropteroatosintetasa	Carbamatos	asulam
K1	Inhibición de la unión de los microtúbulos en la mitosis	Dinitroanilinas	benefin=benfluralina, etalfluralina, pendimetalina
		Fosforoamidatos	metl-amiprofos
		Piridazdina	ditiopir, tiazopir
		Acido benzoico	DCPA = clortal
K2	Inhibición de la mitosis	Carbamatos	clorprofam
K3	Inhibición de la división	Cloroacetamidas	acetacloro, atacloro, butacloro

	celular	Carbamato	carbetamida
		Acetamida	napropamida
		Benzamida	propizamida = pronamida
L	Inhibición de la síntesis de la pared celular (celulosa)	Benzonitrilos	diclobenil, clortiamida
		Benzamida	isoxaben
N	Inhibición de la síntesis de los lípidos (no ACCasa)	Tiocarbamatos	molinato, prosulfocarb, tiobencarb=bentiocarb, trialato
		Benzofurano	etofumesato
O	Auxinas sintéticas (como la acción del ácido indolacético AIA)	Ácidos fenoxicarboxílicos	2,4-D, 2,4-DB, diclorprop, 2,4-DP, MCPA
		Ácido benzoico	dicamba
		Ácidos picolinico	clopiralida, fluroxipir, picloram
		Ácidos quinolin carboxílicos	quinclorac, quinmerac
P	Inhibición del AIA	Ftalamato diflufenzopir	naptalam
Z	Desconocido	Acido arilamino propionico y otros	metil-flamprop/-isopropil flurenol

Fuente: (Yagüe González y Yagüe Martínez de Tejada, 2013)

1.3.2. Herbicida Flurocloridona

El herbicida flurocloridona (3RS,4RS;3RS,4SR)-3-chloro-4-chloromethyl-1-(α,α,α -trifluoro-m-tolyl)-2-pyrrolidone) se caracteriza por ser un compuesto de fórmula empírica $C_{12}H_{10}Cl_2F_3NO$ (Fig. 1). Es un herbicida usado mundialmente y en particular en nuestro país para controlar un gran número de malezas. Pertenece al

grupo químico de las pirrolidonas (CASAFE, 2009). Está clasificado por la WHO como un compuesto ligeramente tóxico (clase III), peligroso si es absorbido a través de la piel (WHO, 2009) y se encuentra dentro de la lista de compuestos aun no clasificados por la USEPA de acuerdo al grado de toxicidad (http://iaspub.epa.gov/sor_internet/registry/substreg/searchandretrieve/advancedsearch/externalSearch.do?p_type=CASNO&p_value=61213-25-0).

El modo de acción de FLC se vincula con la inhibición de la síntesis de carotenos en aquellas plantas susceptibles (Devlin y *col.*, 1979; Lay y Niland, 1983) causando también la estimulación de la producción de etileno (Lay y *col.*, 1985). La acción fitotóxica solo ocurre en presencia de iluminación. El herbicida es absorbido por las raíces y traslocado a los tejidos foliares causando clorosis en hojas de plantas susceptibles. La clorosis está relacionada con la reducción de clorofila, de β -carotenos y con la acumulación de fitoeno, que es el precursor de β -carotenos. La acumulación foliar ocurre en plantas susceptibles y la acumulación radicular predomina en especies tolerantes. El mecanismo de clorosis lleva a la necrosis del tejido conduciendo a la muerte del vegetal. La FLC causa un incremento en los niveles de ACC (ácido 1-aminociclopropanocarboxílico). Esto sugiere que FLC quizá actúe controlando los niveles de ACC sintetasa, la enzima clave en la regulación de la formación de etileno (Lay y *col.*, 1985).

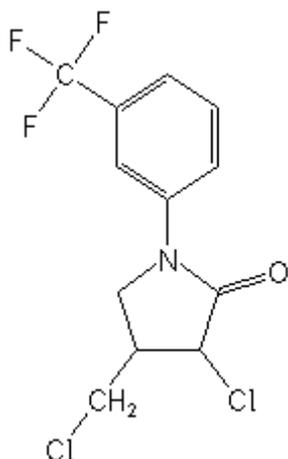


Fig. 1. Fórmula estructural de flurocloridona

Fuente: (http://www.alanwood.net/pesticides/class_herbicides.html)

Podemos agregar que es un compuesto con persistencia en el suelo moderada-alta, presenta media a baja movilidad en aguas subterráneas y durante su degradación se generan dos metabolitos denominados R406639 y R42819. Hasta el presente, para el caso de humanos, no hay evidencia publicada sobre posibles efectos adversos para la salud de los trabajadores expuestos. Del mismo modo, no se han informado en la literatura casos de intoxicación ni estudios epidemiológicos disponibles luego de la exposición a FLC. Sin embargo, dentro de las especificaciones de uso del herbicida se remarca que dentro de los posibles riesgos para la salud humana FLC resulta ser nociva en caso de ingestión, es irritante para ojos y mucosas, presenta posible riesgo durante el proceso de fertilidad y el desarrollo fetal y puede causar daño pulmonar si el mismo es ingerido accidentalmente (EFSA, 2010).

En nuestro agro, el herbicida FLC es utilizado para controlar malezas principalmente en cultivos de algodón, apio, arveja, avena, cebada, centeno, lenteja, perejil, zanahoria, caña de azúcar, girasol, papa y trigo. Controla las malezas durante la germinación y también en los primeros estadios de crecimiento. Una vez en el suelo,

la FLC es fijada por las arcillas y la materia orgánica y se activa por escasa humedad del mismo. Es considerado un herbicida persistente, debido a que el periodo de control de las malezas se extiende por más de 90 días (CASAFE, 2009). Se lo considera como un compuesto de alta a moderada toxicidad para organismos acuáticos como algas (*Scenedesmus ubspicatus*), plantas acuáticas (*Lemna minor*), invertebrados acuáticos (*Daphnia magna*) y peces (*Oncorhynchus mykiss*), entre otros. Asimismo, resulta ser levemente tóxico para aves (*Colinus virginianus*) pero moderadamente tóxico para abejas y lombrices (<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/Reports/346.htm>).

La información toxicológica sobre FLC en ensayos de toxicidad aguda indica que en ratas, la DL50 oral es 1685 mg/kg y >4000 mg/kg para la toxicidad dermal. De manera semejante, la toxicidad dermal en conejos es ≥ 4000 mg/kg (CASAFE, 2009). Además, FLC es capaz de producir atrofia testicular y anormalidades espermáticas en ratas expuestas así como toxicidad general en la función reproductiva de monos y conejos (Killinger y col., 1986; Wilczynski y col., 1986). Estudios recientes informados por la Asociación Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, 2010) demostraron que FLC presenta una baja toxicidad aguda en mamíferos expuestos por vía cutánea e inhalación, causando sensibilidad en ojos y piel. En ratas expuestas, los órganos blancos de acción del herbicida son principalmente el testículo y el epidídimo. Asimismo, ha sido demostrado en ratas expuestas que FLC aumenta la incidencia de espermatozoides anormales y disminuye los niveles de esperma causando también vacuolización en células de Sertoli. Las últimas están involucradas en el control hormonal de la función reproductora masculina, lo que sugeriría que este compuesto podría ser considerado como un potencial disruptor endocrino (EFSA, 2010). Finalmente, cabe señalarse que FLC es un compuesto con capacidad de generar

posibles riesgos, alterando el mecanismo de fertilidad y produciendo malformaciones en fetos de ratas expuestas (EFSA, 2010).

Otros estudios han demostrado que el corazón, los grandes vasos y el sistema hematopoyético también son órgano blanco en ratas, perros y conejos expuestos a FLC. Sin embargo, hasta el presente, no se le atribuye potencial genotóxico, carcinogénico ni neurotóxico (EFSA, 2010).

En cuanto a los efectos genotóxicos y citotóxicos, son escasos los estudios realizados empleando FLC en diferentes matrices bióticas. Hasta el presente, una revisión bibliográfica permite evidenciar la existencia de solo un estudio referido a la temática empleando el modelo vegetal de *Allium cepa*. En el mismo, cuando los bulbos fueron expuestos a 20, 40 y 80 mg/L de FLC durante 12, 24, y 48 h se evidenció disminución del índice mitótico y un incremento significativo del porcentaje de anormalidades durante la mitosis como la presencia de C-metafasas, cromosomas con extremos pegajosos, puentes cromatínicos, fragmentos acéntricos, poliploidías y anafases multipolares (Yüzbaşıoğlu y col., 2003). Además, los autores pudieron observar la presencia de células micronucleadas en interfase luego de la exposición al herbicida (Yüzbaşıoğlu y col., 2003).

1.3.3. Formulaciones comerciales de Flurocloridona

Según los datos informados por el SENASA, durante el año 2012 se aprobaron para su comercialización en Argentina nueve marcas comerciales registradas conteniendo en su formulación el principio activo FLC. Dichas formulaciones comerciales son producidas por distintas empresas comercializadoras locales e importadas principalmente de países como China e Israel

(http://www.senasa.gov.ar//Archivos/File/File4719-ACTIVOS_Web%20Dic%202012.xls).

Para el desarrollo de este trabajo de Tesis Doctoral se seleccionaron dos formulaciones comerciales las cuales representan las marcas más utilizadas en nuestro agro. Ambas presentaciones se caracterizan por incluir en su composición 25% de p.a. Ellas son Twin Pack Gold[®], comercializada por la empresa Syngenta Agro S.A. (V. López, Argentina) y Rainbow[®], comercializada por la empresa Magan Argentina S.A. (Buenos Aires, Argentina).

1.3.3.a. Formulación comercial Twin Pack Gold[®]

Es un herbicida selectivo preemergente usado principalmente para controlar el cultivo de girasol. Actúa sobre malezas de hoja ancha y gramíneas. Controla un amplio espectro de malezas, permitiendo al cultivo crecer sin competencia durante la primera etapa de su desarrollo.

Se presenta como un formulado emulsionable compuesto por dos partes líquidas:

Parte líquida 1: FLC 25 g + solventes y emulsionantes c.s.p en 100 cm³

Parte líquida 2: S-metolacoloro: 96 g + inertes y humectantes c.s.p en 100 cm³

Según la información toxicológica del producto se sitúa en la clase II, moderadamente peligroso según USEPA (CASAFE, 2011). En su etiqueta se lo describe como un producto moderadamente tóxico para peces y organismos acuáticos, prácticamente no tóxico para aves y virtualmente no tóxico para abejas.

1.3.3.b. Formulación comercial Rainbow[®]

Es un herbicida selectivo, preemergente para controlar los cultivos de girasol, maíz, papa, algodón, trigo, avena, cebada, centeno, arveja, lenteja, zanahoria, apio, perejil y caña de azúcar, que no requiere ser incorporado al suelo. Se absorbe por

raíces y órganos aéreos juveniles. Controla un amplio espectro de malezas durante la germinación y primeros estadios de crecimiento. Se presenta como un formulado emulsionable. Según el membrete del producto se sitúa dentro de la categoría toxicológica II, moderadamente peligroso basándose en la clasificación establecida por la USEPA (CASAFE, 2011). Es levemente tóxico para mamíferos, aves, peces y no tóxico para abejas. El producto es metabolizado rápidamente en el suelo y en las plantas, por lo tanto se considera que no es acumulable en el medio ambiente.

1.4. Biomarcadores: una herramienta para evaluar toxicidad

Conceptos y generalidades

Existen diferentes maneras de estudiar a los agentes con potencial de toxicidad en los seres vivos. Una manera de abordar la problemática es mediante el empleo de diferentes tipos de indicadores biológicos.

Los indicadores o marcadores biológicos representan cambios tanto a nivel de organismo como a nivel celular que pueden ser medidos en diferentes sistemas biológicos, permitiendo detectar eventos relacionados con su fisiología de manera cuali o cuantitativa. Son utilizados para detectar una exposición, determinar las consecuencias biológicas de la misma, detectar los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico, identificar los individuos sensibles de una población y fundamentar la decisión de intervenir tanto a nivel individual como ambiental (Mudry y Carballo, 2006).

Los biomarcadores se clasifican en tres clases, aunque se reconoce que muchas veces no es posible la distinción entre ellos:

Biomarcador de exposición: Señala la presencia de un xenobiótico, que se define como cualquier sustancia extraña o sus metabolitos que ingresa en un organismo. El mismo

puede ser medido en fluídos o tejidos y su presencia es señal de que el organismo ha estado expuesto al mismo.

Biomarcador de susceptibilidad: Es un indicador de que un individuo posee una determinada capacidad, inherente o adquirida, que lo hace particularmente sensible al efecto de un xenobiótico. Es un indicador del incremento del riesgo en cualquier etapa del proceso patológico.

Biomarcador de efecto: Es un indicador de alteración bioquímica, fisiológica, genética o de otro tipo. Dependiendo de su magnitud pueden ser reconocidos como un daño o como una patología potencial o ya establecida. Los biomarcadores pueden o no ser específicos. Los biomarcadores de efecto se constituyen como señales de advertencia temprana, permitiendo de este modo poder intervenir oportunamente antes de la aparición de un daño irreversible.

Para evaluar o caracterizar agentes inductores de daño al material genético se realizan estudios de genotoxicidad y citotoxicidad en células germinales y/o somáticas. Estos ensayos son capaces de detectar distintos tipos de alteraciones relevantes, incluyendo micro y macromutaciones, como así también potenciales carcinógenos. Las Agencias internacionales de regulación, entre las que se incluyen a la OECD, la IARC, la USEPA entre otras, han seleccionado una batería de bioensayos con el propósito de detectar alteraciones genéticas y lograr una mejor y más segura caracterización del daño inducido, evaluando tanto *in vitro* como *in vivo* la genotoxicidad potencial de un compuesto (OECD, 1986, 1992, 1997b, a, 2010; ICH, 2011). Estos marcadores son capaces de detectar respuestas biológicas tempranas y pueden ser útiles para correlacionar la exposición a mutágenos, teratógenos o carcinógenos potenciales con las etapas iniciales del proceso de carcinogénesis.

También existen otros biomarcadores tempranos como son los de citotoxicidad y citoestaticidad que son capaces de detectar daño celular ya sea metabólico, en organelas específicas o incluso procesos apoptóticos, entre otros.

1.4.1. Bioensayos de efecto genotóxico y citotóxico

Bioensayos de genotoxicidad

Intercambio de cromátidas hermanas: El fenómeno de ICHs fue observado accidentalmente y descrito por primera vez por Taylor en 1958, utilizando timidina tritiada para su detección en células meristemáticas de *Vicia faba* (Taylor, 1958). Posteriormente, Perry y Wolff en el año 1974 desarrollaron la metodología de fluorescencia-Giemsa para evidenciar los ICHs empleando otros análogos de bases nitrogenadas del ADN no tritiadas, por ejemplo la bromodeoxiuridina (Perry y Wolff, 1974). El fenómeno representa un intercambio simétrico y recíproco de las cadenas complementarias de ADN entre las cromátidas de un cromosoma. Estos intercambios son detectados en preparados cromosómicos de células que hayan atravesado dos veces el ciclo celular desde el inicio de la marcación. Cabe destacar que un incremento en su frecuencia de ICHs representa un indicio de inestabilidad cromosómica espontánea o inducida por un tipo de agente determinado.

Test de micronúcleo: El MN es un indicador indirecto de daño cromosómico que se origina durante la división celular, tanto por fragmentos acéntricos (evento clastogénico) o por cromátidas enteras o cromosomas rezagados (evento aneugénico) que no han sido incorporados en los núcleos hijos al momento de la citocinesis y que requieren de una división celular para expresarse. Fue utilizado en sus comienzos por Thoday (1951) quien analizó el efecto de radiaciones ionizantes en raíces de *V. faba*. Posteriormente el ensayo fue adaptado por Evans y col. (1959) empleando también

raíces de *V. faba* y en estudios *in vivo* en células de medula ósea de ratón por Von Ledebur (1973). Gracias a su versatilidad, este bioensayo puede llevarse a cabo en diferentes modelos tanto animales como vegetales así como en distintos tipos celulares dependiendo del modo de acción del agente a caracterizar y del objeto en estudio (Mudry y Carballo, 2006). Debido a su simplicidad, constituye una de las metodologías más empleadas para la identificación de alteraciones en el material genético utilizando diferentes matrices bióticas. Esta técnica está validada internacionalmente y se ha constituido como una herramienta de estudio obligatoria durante el proceso de admisión para productos farmacéuticos y químicos, entre otros. Actualmente la metodología es ampliamente utilizada y no sólo involucra el recuento de la frecuencia de MN, sino que ha evolucionado hacia un estudio más completo denominado ensayo del citoma, el cual a través de diferentes biomarcadores permite evaluar de manera simultánea la inestabilidad cromosómica, el estatus mitótico y la viabilidad celular en una misma célula (Fenech, 2007).

Electroforesis en gel de una célula única o Ensayo Cometa: Permite evaluar distintos niveles de daño ejercido en la molécula de ADN y también de su reparación sin la necesidad de trabajar con células en proliferación. La técnica consiste en lisar las células de interés para liberar al ADN del sistema de endomembranas, luego las mismas son embebidas en un gel de agarosa y sometidas a un campo electroforético. Si hay daño, se formarán fragmentos de ADN capaces de migrar hacia el ánodo del campo eléctrico al cual se encuentra sometido. Esta técnica fue implementada por primera vez en el año 1984 por Ostling y Johanson bajo condiciones de pH neutro, el cual fue una limitante de las utilidades del ensayo ya que solo permitía detectar roturas de cadena doble (Ostling y Johanson, 1984). Posteriormente, en el año 1988 Singh y

colaboradores introdujeron una variante del procedimiento original en microgeles de agarosa donde la electroforesis se realizaba en condiciones alcalinas, con lo cual además de roturas de cadena doble, fue posible detectar roturas de cadena simple, sitios sensibles al álcali, uniones entre ADN-ADN y ADN-proteína, al igual que roturas de cadena simple asociadas con mecanismos de reparación inefficientes (Singh y *col.*, 1988). En los últimos años el EC ha cobrado una gran relevancia por su alta sensibilidad y por resultar ser, además, un ensayo rápido, reproducible y de gran aplicación en diferentes modelos experimentales tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo* (Jha, 2008).

Bioensayos de citotoxicidad

Índice mitótico: Es la medida del porcentaje de células que se encuentran atravesando la fase M (mitosis) del ciclo celular en un tiempo determinado y cuyo registro se realiza en preparados cromosómicos. Este porcentaje puede alterarse por sustancias con capacidad de interferir con la división celular ya sea por interacción directa con el ADN o por alteración de factores de regulación del ciclo celular (Herrera y *col.*, 1991; Carballo y *col.*, 2006). Este ensayo es altamente reproducible y sensible para la detección de agentes citotóxicos (Rojas y *col.*, 1993).

Cinética de proliferación celular: Este biomarcador permite conocer cuantas veces una célula determinada ha atravesado por la fase S del ciclo celular en un tiempo dado. Permite establecer si un agente es capaz de inducir variaciones en la cinética del ciclo celular. Para su análisis citogenético, básicamente las células detenidas en metafase deben ser sometidas a un determinado tratamiento que permita a sus cromosomas mostrar una diferenciación longitudinal que sea representativa del número de ciclos celulares que la misma ha realizado desde el tratamiento con el xenobiótico.

Viabilidad celular: El fundamento de la técnica es utilizar colorantes que permitan detectar si la célula sometida al agente bajo estudio se encuentra viva o muerta después de un tiempo dado de exposición a un determinado agente. Podemos nombrar como ejemplo, el ensayo de captación exclusión de azul de tripán, el ensayo de Rojo Neutro y el ensayo de bromuro de dimetildifeniltetrazolio o MTT, entre otros.

Muerte celular programada: El mecanismo de apoptosis fue descrito por primera vez en los años 70 por Kerr y colaboradores (1972), quien se fundó en la observación de las características morfológicas que presentan las células al atravesar este proceso. Actualmente, existen varias técnicas para cuantificar y determinar el fenómeno apoptótico, una de las más empleadas por su sensibilidad y eficacia es la técnica de marcación de membrana plasmática con Anexina V-FITC. Esta metodología se basa en los eventos tempranos de la apoptosis, en los cuales se pierde la asimetría de la membrana celular debido a que la fosfatidilserina se externaliza y bajo ciertas concentraciones de calcio, la molécula de Anexina V tiene afinidad específica por este fosfolípido. La Anexina V se emplea acoplada a un fluorocromo clásico como es el isotiocianato de fluoresceína (FITC), a la vez que se emplea yoduro de propidio (IP) como colorante de exclusión. Esta metodología permite la diferenciación entre las células apoptóticas (aquellas que captan Anexina V y excluyen IP) de las necróticas (aquellas que captan Anexina V e IP) (Sánchez-Torres y Vargas, 2003).

1.5. Matrices bióticas empleadas como niveles de estudio

Los estudios de daño en el ADN son llevados a cabo utilizando diferentes biomarcadores y son desarrollados en niveles diferentes de complejidad considerando el sistema experimental aplicado.

Básicamente, existen cuatro niveles de evaluación o de análisis del daño genético de complejidad creciente, incluyendo tanto estudios *in vitro* como *in vivo* (Mudry y Carballo, 2006).

- **Nivel primario (bacteriano, viral):** permite la detección de mutaciones, retromutaciones, no disyunción y recombinación por medio de estudios a corto plazo en células procariontes. Como ejemplo podemos citar al test de Ames en *Salmonella typhimurium* y el ensayo REC en *Bacillus subtilis*.
- **Nivel secundario (cultivo celular):** permite la detección de micro y macromutaciones por medio de estudios *in vitro* empleando cultivos celulares en suspensión o en monocapa. Incluye la determinación de aberraciones cromosómicas, intercambios de cromátidas hermanas, test de micronúcleos y ensayo cometa, entre otros.
- **Nivel terciario (organismo entero):** permite la detección de micro y macromutaciones por medio de estudios *in vivo* que comprenden diferentes tipos de análisis realizados en organismos completos ya sean plantas o animales. Se emplean los mismos biomarcadores propuestos para el nivel secundario, con la particularidad que en este caso, se induce experimentalmente una exposición del organismo modelo *in vivo*.
- **Nivel cuaternario (epidemiológico):** Comprende estudios epidemiológicos *in vivo* prospectivos y retrospectivos de poblaciones expuestas de manera ambiental, accidental, ocupacionalmente o como consecuencia de los diferentes estilos de vida de las mismas. Se emplean los mismos biomarcadores utilizados en el nivel secundario y terciario y el estudio se realiza por un período más extendido en el tiempo, inclusive comprendiendo lapsos medidos en meses, años o décadas.

Nuestros experimentos realizados en el marco del presente trabajo de Tesis Doctoral se focalizaron en el estudio de los niveles de complejidad secundario y terciario.

1.5.1. Estudios *in vitro*: concepto, ventajas y desventajas del uso de líneas celulares

Actualmente los ensayos con líneas celulares son usados rutinariamente en las evaluaciones genotóxicas y desempeñan un importante papel en la determinación de la mutagenicidad potencial de los agentes químicos y físicos que rodean al hombre. La línea celular CHO-K1 obtenida por Puck y colaboradores (1958) a partir de ovario de hámster chino (*Crisetulus griseus*) es sin lugar a dudas la de mayor difusión en los estudios de daño genético. La misma se caracteriza por ser aneuploide, con un número modal cromosómico de 20-21, su cariotipo es heteromórfico, por lo que se hace fácil la individualización de los tipos cromosómicos que la integran. Asimismo, como material de laboratorio es de fácil manejo y su mantenimiento es relativamente económico. Los ensayos con esta línea celular han sido ampliamente validados tanto por su predictividad con relación a la carcinogenicidad al igual que por su sensibilidad para detectar daño genético (Sanchez-Lamar, 1999). Por otra parte, otra línea celular que actualmente es muy utilizada en ensayos de genotoxicidad por sus características particulares es la línea celular HepG2 obtenida en el año 1979 a partir de un hepatocarcinoma celular de un niño argentino de 11 años (Uhl y *col.*, 2000). Las células HepG2 se caracterizan por presentar actividades enzimáticas funcionales de la fase I y II hepáticas, en las que sus enzimas cumplen un rol muy importante en las actividades de detoxificación de drogas. Dichas enzimas, por consiguiente, usualmente no están presentes en la mayoría de los sistemas *in vitro*, por lo tanto es concebible que los ensayos de genotoxicidad que emplean este tipo celular reflejan más

adecuadamente los riesgos que pueden ocasionar los agentes genotóxicos que necesitan metabolizarse para inducir daño genético (Uhl y col., 2000).

Ventajas de la utilización de cultivos celulares

A continuación mencionaremos algunas ventajas de la utilización de líneas celulares como modelo de estudio:

- Son métodos alternativos a la utilización de animales de laboratorio
- Se evitan todos los problemas relacionados a la utilización de animales para pruebas de laboratorio (costos, regulaciones legales, entre otros)
- Permiten realizar pruebas rápidas y directas para evaluar toxicidad de nuevos productos
- Costos relativamente bajos
- Posibilidad de detección de efectos a largo plazo
- Se pueden controlar eficazmente muchas de las condiciones experimentales tales como pH, concentración de CO₂, temperatura, osmolaridad, entre otros.

Limitaciones de la metodología *in vitro*

Los estudios *in vitro* presentan una serie de limitaciones que deben ser tenidas en cuenta al momento de extrapolar los resultados. Podemos mencionar algunas de las desventajas más frecuentes de los mismos:

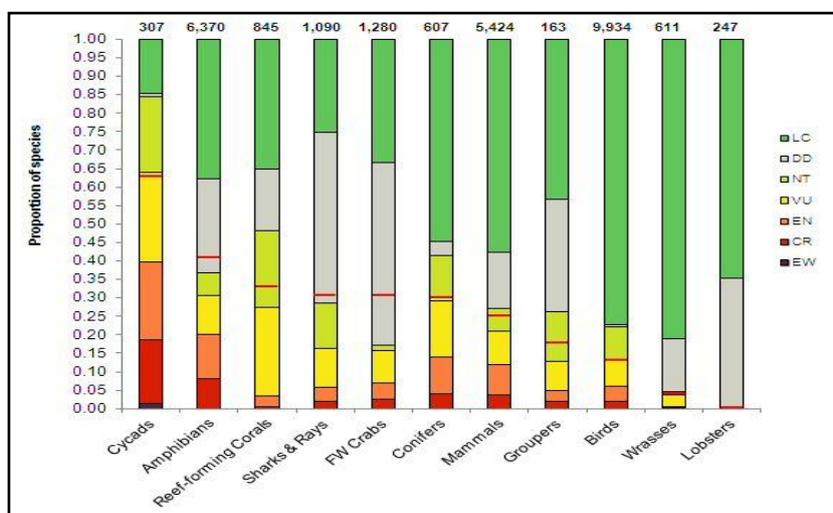
- En los cultivos *in vitro* no están presentes las interacciones con otros tejidos del organismo
- Muchas sustancias no son tóxicas originalmente sino a través de derivados surgidos por su metabolización (promutágenos) y contrariamente, sustancias tóxicas *in vitro* pueden ser detoxificadas por enzimas hepáticas.

1.5.2. Estudios *in vivo*: Los anfibios en estudios de toxicidad

En la actualidad, los anfibios representan el grupo de vertebrados que se encuentra más amenazado, con un 41% de las especies en peligro de extinción según la lista roja de especies amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (Fig.2) y un 43% en situación de disminución poblacional (Stuart y *col.*, 2004). Dentro de las posibles causas que pueden conducir a esta declinación, la intensificación de la agricultura es una de las mayores problemáticas dado que la expansión de la frontera agrícola indudablemente redujo el hábitat natural utilizable de estas poblaciones (Mann y *col.*, 2009).

Fig. 2: Proporción de especies presentes en la lista roja de especies amenazadas de la UICN

Fuente: (http://www.iucnredlist.org/about/summary-statistics#Fig_2)



Los taxones están ordenados de acuerdo a las líneas horizontales rojas, que indican la proporción de especies existentes consideradas en peligro. Las estimaciones de las especies amenazadas porcentuales (con estimaciones inferiores y superiores) para cada grupo son: cícadas 63% (63-64%), anfibios 41% (30-56%), arrecifes de corales de 33% (27-44%), tiburones y rayas 31% (16-63%), cangrejos de agua dulce 31% (16-65%), coníferas 30% (29-33%), mamíferos 25% (21-36%), meros 18% (12 - 43%), aves 13% (13-14%), lábridos 5% (4-18%) y langostas <1% (0-35%). Los números por encima de cada barra representa el número total de especies existentes evaluadas para cada grupo. CR - En Peligro Crítico, EN - En Peligro, VU - Vulnerable, NT - Casi Amenazado, DD - Datos Insuficientes, LC - Preocupación Menor

Además, está bien documentada la problemática que ocasiona el empleo masivo de agroquímicos en correlación con la disminución de las poblaciones de anfibios próximos a zonas agrícolas, ya sea por su interacción directa con los mismos o con otros factores deletéreos del hábitat natural (Davison, 2004; Mann y col., 2009).

Los anfibios como modelos experimentales inicialmente fueron empleados en estudios embriológicos y fisiológicos (Burggren y Warburton, 2007). Sin embargo, desde hace algunos años han comenzado a utilizarse en estudios toxicológicos, principalmente ecotoxicológicos, por ser considerados organismos bioindicadores de relevancia. Es así que, en los últimos años se ha incrementado el uso de estos organismos como modelos experimentales en ensayos de toxicidad aguda (efectos letales y subletales, incluyendo a los genotóxicos) debido a la alta sensibilidad que los caracteriza frente a los cambios ambientales (Hopkins, 2007; Unrine y col., 2007). La sensibilidad en todas sus fases de vida podría explicarse por su alta eficiencia de conversión y alta tasa de bioacumulación comparada con otros animales de su misma posición trófica (Unrine y col., 2007). Dentro del ciclo de vida de estos organismos, la fase larval, resulta ser la más empleada para realizar estudios toxicológicos. Se encuentra bien documentado que las larvas son más sensibles que los adultos frente a los cambios ambientales (Ralph y col., 1996; Clements y col., 1997; Hopkins, 2007). Además, el material de estudio es homogéneo, de fácil obtención, económico en cuanto al mantenimiento en laboratorio y el número de individuos obtenidos por muestreo es alto y suficiente para encarar un estudio genotoxicológico.

***Rhinella arenarum* como modelo de estudio**

Rhinella arenarum (Anura: Bufonidae) es una especie de anfibio que pertenece a la familia Bufonidae. Esta familia se caracteriza por tener aspecto deprimido y piel

verrugosa en el estado adulto, con notorias glándulas paratoides y la presencia en los machos de una estructura situada en el extremo anterior de los testículos que es el órgano de Bidder, que consiste en una masa de oocitos inmaduros rodeados por una cavidad ovárica rudimentaria y atrofiada (Natale, 2006). Esta especie presenta una amplia distribución en la Región Neotropical, incluyendo Argentina, Bolivia, Brasil, Uruguay y Paraguay. Habita en pequeñas lagunas o pantanos de aguas estancadas, principalmente en áreas abiertas. La reproducción está asociada con cuerpos de agua temporarios tales como charcas de lluvia y ocurre en primavera-verano, los huevos son pigmentados y están dentro de cordones gelatinosos. Investigaciones previas realizadas en esta especie han considerado a la misma como un modelo *in vivo* válido y eficaz para estudiar efectos letales y subletales inducidos por diversos xenobióticos, incluyendo agroquímicos. Como algunos ejemplos podemos mencionar a Vera Candiotti y col. (2010) quienes emplearon a esta especie para estudiar la genotoxicidad inducida por el insecticida pirimicarb mediante el ensayo de MN. Bosh y col. (2011) utilizaron el mismo ensayo para estudiar la toxicidad ejercida por glifosato y ciclofosfamida. Brodeur y col. (2009) estudiaron la susceptibilidad en distintos estadios de la metamorfosis de la especie, inducidos por atrazina mientras que Lascano y col. (2011b) utilizaron a la especie para analizar diversos insecticidas organofosforados, entre otros. Si bien la especie ha sido ampliamente utilizada en ensayos de toxicidad, pocos son los datos existentes del uso de *R. arenarum* como modelo de estudio en ensayos específicamente de genotoxicidad, empleando tanto el ensayo de MN como al EC como biomarcadores de análisis. Por este motivo, decidimos iniciar nuestras investigaciones empleando a la especie *R. arenarum*, representante autóctono de Argentina, distribuida en zonas abiertas en todo el territorio

argentino con excepción de las provincias de Corrientes, Formosa, Misiones y Santa Cruz así como en zonas de intensiva actividad agrícola (Lavilla y *col.*, 2000; Vaira y *col.*, 2012). Su amplia distribución nos permite obtener fácilmente individuos de estudio. Más aún, cabe mencionar que *R. arenarum* es una especie de la familia Bufonidae, la cual tiene representantes en todos los continentes. Por este motivo, nuestros resultados podrían ser utilizados y comparados con otros laboratorios a nivel mundial. Otra ventaja es que *R. arenarum* es una especie muy resistente a la manipulación y ha sido empleada satisfactoriamente con anterioridad por nuestro grupo de trabajo (Vera Candiotti y *col.*, 2010). Por último, debemos mencionar los datos del estado de conservación de *R. arenarum*. La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y la Asociación de Herpetología Argentina consideran a esta especie no amenazada, de preocupación menor y sin riesgo de extinción, de modo que su empleo no generaría conflictos en cuanto a la conservación de su biodiversidad (Vaira y *col.*, 2012; www.iucnredlist.org, 2012).

2. HIPÓTESIS

El herbicida Flurocloridona ya sea en forma aislada o presente en sus formulaciones comerciales, produce efectos genotóxicos y citotóxicos en diferentes matrices bióticas, incluyendo tanto sistemas *in vitro* como *in vivo*.

3. OBJETIVOS

- Evaluar la genotoxicidad *in vitro* ejercida por flurocloridona y dos formulaciones comerciales disponibles en Argentina en líneas celulares de mamíferos mediante análisis de:
 - ✓ Frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas.
 - ✓ Frecuencia de micronúcleos.
 - ✓ Daño en el ADN mediante la variante alcalina del ensayo cometa.

- Evaluar la citotoxicidad *in vitro* ejercida por flurocloridona y dos formulaciones comerciales disponibles en Argentina en líneas celulares de mamíferos mediante:
 - ✓ Determinación de la cinética de proliferación celular.
 - ✓ Determinación del índice mitótico.
 - ✓ Determinación de la inhibición del crecimiento utilizando técnicas colorimétricas de captación de Rojo Neutro y reducción de MTT.
 - ✓ Determinación de procesos apoptóticos/necróticos utilizando metodologías de fluorescencia (Anexina V-FITC).
 - ✓ Comparación de la capacidad de ejercer daño por el principio activo y los formulados comerciales herbicidas en las diferentes matrices bióticas seleccionadas.

- Evaluar el posible mecanismo(s) de acción involucrado(s) en la producción del efecto deletéreo ejercido por flurocloridona mediante el estudio de la incorporación de un agente antioxidante.

- Determinar concentración letal 50 (CL50) para el herbicida flurocloridona en larvas de *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) expuestas en condiciones experimentales de laboratorio.
- Evaluar la genotoxicidad ejercida por diferentes formulaciones comerciales del principio activo flurocloridona mediante el análisis de la frecuencia de micronúcleos y ensayo cometa en larvas de *R. arenarum* expuestas en condiciones experimentales de laboratorio.
- Determinar si los excipientes presentes en las formulaciones comerciales podrían estar potenciando la toxicidad del principio activo presente en las mismas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Compuestos químicos empleados

Los compuestos químicos empleados para el desarrollo de estas investigaciones se presentan en la siguiente Tabla:

Compuesto	CASRN / Número de catálogo	Origen
Ácido acético	64-19-7	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.)
Acetona	67-64-1	Merck KGaA (Darmstadt, Alemania)
Anexina V-FITC	A13199	Invitrogen (Eugene, Oregon, EE.UU)
Agarosa bajo punto de fusión	A9414	Sigma Chemical Co.
Agarosa normal punto de fusión	A9539	Sigma Chemical Co.
Bleomicina	9041-93-4	Laboratorios Gador S.A. (Buenos Aires, Argentina)
5-Bromo-2'- deoxiuridina	59-14-3	Sigma Chemical Co.
Bromuro de etidio	1239-45-8	Sigma Chemical Co.
Ciclofosfamida	6055-19-2	Sigma Chemical Co.
Cloruro de potasio	7447-40-7	Sigma Chemical Co.

Cloruro de sodio	7647-14-5	Sigma Chemical Co.
Colchicina	64-86-8	Sigma Chemical Co.
Dicromato de potasio	7778-50-9	Merck KgaA
4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato	47165-04-8	Vector Laboratories (Burlingame, CA, EE.UU.)
Sulfóxido de dimetilo	67-68-5	Sigma Chemical Co.
Etanol	64-17-5	Merck KgaA
Estreptomicina	3810-74-0	Gibco (Grand Island, NY, EE.UU.)
Fluorocloridona	61213-25-0	Sigma Chemical Co.
Giemsa	HX933732	Merck KgaA
H ₂ O ₂	UN2014	Merck KgaA
Ham F10	N6635	Sigma Chemical Co.
Hidróxido de sodio	B0002198	Merck KgaA
Hoescht 33258	23491-45-4	Sigma Chemical Co.
Ioduro de propidio	P-4170	Sigma Chemical Co.
Metanol	K39504909	Merck KgaA
MEM	41500-018	Gibco
MTT	57360-69-7	Sigma Chemical Co.

Na ₂ EDTA	6381-92-6	Sigma Chemical Co.
Naranja de acridina	10127-02-3	Sigma Chemical Co.
Penicilina	69-57-8	Gibco
Rainbow [®]	31389	Magan Argentina S.A. (Buenos Aires, Argentina)
Rojo Neutro	553-24-2	Sigma Chemical Co.
Sarcosinato de sodio	4316-73-8	Sigma Chemical Co.
Suero fetal bovino	16000-069	Gibco
Tris pH 10,0	T1378	Sigma Chemical Co.
Twin Pack Gold [®]	33702	Syngenta Agro S. A. (Vicente López, Argentina)
Trizma [®] - ácido clorhídrico	T3253	Sigma Chemical Co.
Vitamina E (α-tocoferol)	10191-41-0	Sigma Chemical Co.

4.2. Modelos experimentales empleados

4.2.1. Líneas celulares

Se emplearon las siguientes líneas celulares como modelo de estudio:

- línea celular transformada **CHO-K1** (ATCC[®] CCL-61), derivada de ovario de hámster chino adulto, proveniente de la *American Type Culture Collection* (Rockville, MD, EE.UU.).

- línea celular transformada **HepG2** (ATCC[®] HB-8065), derivada de carcinoma hepatocelular humano, proveniente de la *American Type Culture Collection*.

Cultivo de las líneas celulares CHO-K1 y HepG2

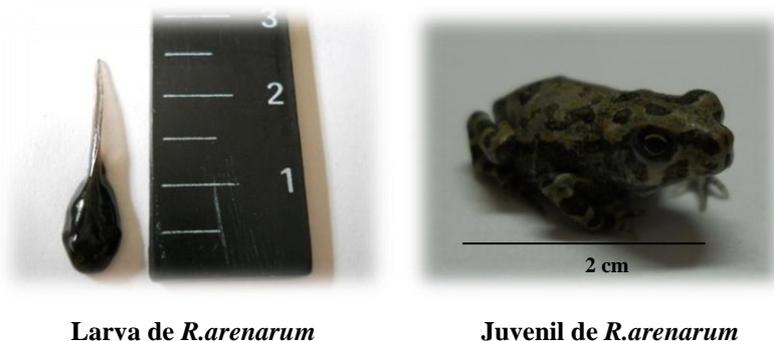
Las células CHO-K1 se cultivaron en medio de cultivo Ham F10 y las células HepG2 fueron mantenidas en medio de cultivo MEM. Ambos medios de cultivos fueron suplementados con 10% de suero fetal bovino, 100 unidades/ml de penicilina y 10 µg/ml de estreptomina y las células fueron mantenidas a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO₂.

Todos los ensayos fueron realizados usando células en su fase de crecimiento exponencial.

4.2.2 Organismo modelo

Como organismo modelo para los estudios *in vivo* se emplearon larvas en estadio 37 ± 2 provenientes del anfibio *R. arenarum* (Anura, Bufonidae), las mismas fueron recolectadas del ambiente en estadio 9 según la clasificación propuesta por Gosner (1960). Las puestas fueron colectadas en las cercanías de la ciudad de La Plata (Buenos Aires, Argentina) en zonas ausentes de actividad agrícola, el día 30/09/11 a las 00.00 h; Latitud -34° 59' 53.3538"; Longitud -57° 52' 27.8646". Las mismas fueron trasladadas al laboratorio y aclimatadas en acuarios con agua de red declorinada, fotoperiodo 16:8 h luz/oscuridad, temperatura 25 °C, aireación artificial y alimentadas diariamente con *Lactuca sativa* procesada hasta el comienzo de los bioensayos. El tiempo de exposición de las larvas a los herbicidas dependió del ensayo empleado, los que describiremos en detalle posteriormente. Los parámetros físicos y químicos del agua utilizada en los ensayos fueron: temperatura 21.0 ± 1 °C; pH 7.5 ± 0.1; oxígeno

disuelto $6.3 \pm 0.3 \text{ mg L}^{-1}$; conductividad $994 \pm 8.5 \text{ } \mu\text{S cm}^{-1}$, y dureza del agua $143 \pm 23.5 \text{ mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$.



4.3. Exposición de los modelos experimentales a los compuestos

Los herbicidas empleados en estas investigaciones fueron: el principio activo FLC y dos de sus variantes comerciales Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] ambas conteniendo 25% de FLC más solventes y emulsionantes según lo informado por las empresas productoras de los mismos.

4.3.1. Exposición de los cultivos celulares

Preparación de las concentraciones ensayadas de FLC

El principio activo FLC fue disuelto en ACTN, cuya concentración final en el medio de cultivo celular no superó el 1% para todos los tratamientos.

Se obtuvieron luego concentraciones de ensayo por dilución de la solución inicial en medio de cultivo sin suero. Las concentraciones ensayadas fueron las siguientes: 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 15 $\mu\text{g/ml}$. Cabe aclarar que las concentraciones seleccionadas fueron obtenidas a partir de ensayos previos de toxicidad realizados en nuestro laboratorio y teniendo en cuenta los datos reportados en la bibliografía (Yüzbasioğlu y *col.*, 2003).

Preparación de las concentraciones ensayadas de Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®]

Las formulaciones comerciales Twin Pack Gold® y Rainbow® se disolvieron directamente en medio de cultivo. Se obtuvieron luego las concentraciones de ensayo por dilución de la solución inicial en medio de cultivo sin suero. Las concentraciones ensayadas fueron equimolares con el principio activo y fueron las siguientes: 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 15 µg/ml contenidas en las presentaciones comerciales.

4.3.2. Exposición de *R. arenarum*

Preparación de las concentraciones ensayadas de Twin Pack Gold® y Rainbow®

Las soluciones de ensayo se prepararon añadiendo cantidades determinadas de la solución madre de cada agroquímico a evaluar al agua de dilución antes de su transferencia a los recipientes de ensayo. La solución madre de cada agroquímico se preparó mediante la dilución de una cantidad determinada del mismo en agua de red previamente declorinada mediante burbujeo constante durante 48 h. Las concentraciones empleadas en los ensayos de genotoxicidad fueron las siguientes: 0,74; 1,48; 2,22 mg/L para Twin Pack Gold® y 0,71; 1,42, 2,13 mg/L para Rainbow®, correspondientes a concentraciones subletales 25, 50 y 75% de la CL50_{96 h}. Las concentraciones ensayadas a fin de determinar la CL50_{96 h} de los herbicidas fueron las siguientes: 1; 2; 2,33; 2,66; 3; 3,33; 6 mg/L.

4.4. Ensayos de genotoxicidad

4.4.1 Estudio de la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICHs)

Diseño experimental

Línea celular CHO-K1: Se sembraron 35000 células/ml en frascos de poliestrieno TC25 (volumen final 10 ml) por 24 h. Luego se procedió a realizar el tratamiento con diferentes concentraciones (0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 15 µg/ml) tanto del principio activo

como de ambas formulaciones comerciales de manera continua durante 24 h siguiendo el diseño experimental anteriormente recomendado por nuestro grupo de trabajo (González y *col.*, 2006; Molinari y *col.*, 2009; Soloneski y Larramendy, 2010). Paralelamente fueron procesados un control negativo, un control de solvente (ACTN, 0,5%) y un control positivo (BLM, 1 µg/ml) en forma simultánea a los tratamientos con los herbicidas. Se realizaron tres réplicas por punto experimental.

Metodología

El diseño experimental seguido para el empleo de la línea celular CHO-K1 fue el oportunamente propuesto por Larramendy y *col.* (1989). Brevemente, junto con el tratamiento con los diferentes xenobióticos, 10 µg/ml de BrdUrd fueron incorporados a cada cultivo. Finalmente, se adicionó 1 µg/ml de colchicina 3 h antes de finalizado el tiempo de exposición (ver Fig.1). Al finalizar el mismo (24 h de tratamiento), las células CHO-K1 fueron cosechadas por centrifugación y sometidas a un tratamiento hipotónico utilizando una solución de KCl 0,075 M (10 min, 37 °C). Posteriormente, las células fueron fijadas en una mezcla de metanol: ácido acético (3:1). Los extendidos cromosómicos fueron obtenidos utilizando la técnica de secado al aire (Larramendy y Knuutila, 1990). Para lograr la coloración diferencial de los cromosomas, los extendidos celulares fueron procesados empleando un método clásico de coloración de fluorocromo-Giemsa (Korenberg y Freedlender, 1974; Perry y Wolff, 1974). Brevemente, las preparaciones fueron inmersas en una solución buffer de fosfatos (0,1 M, pH 6,8) conteniendo 1 µg/ml de Hoechst 33258 durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las mismas fueron colocadas en un campo de luz fluorescente durante 1 h en presencia de la misma solución buffer. Pasado el tiempo establecido, los extendidos fueron retirados de la fuente lumínica, lavados con

agua destilada y secados a temperatura ambiente. Seguidamente, las preparaciones fueron tratadas en una solución 1 M de Na_2HPO_4 (pH 8,2, 86 °C, 7 min), lavadas con agua destilada y finalmente teñidas con solución de Giemsa al 5% durante 12 min. Por cada punto experimental se obtuvo la frecuencia de ICHs a partir del análisis de 50 células en segunda división. Los resultados fueron expresados como valores medios de ICHs \pm ES por célula.



Fig. 1. Protocolo de cultivo realizado en el ensayo de ICHs



Metafase de una célula CHO-K1 en su segundo ciclo de duplicación en presencia de BrdUrd mostrando coloración diferencial de las cromátidas hermanas de sus cromosomas y la existencia de ICHs entre las mismas (flecha)

4.4.2. Estudio de la inducción de rupturas de cadena simple en el ADN

Diseño experimental

Línea celular CHO-K1: Se sembraron 35000 células /ml en placas de Petri de 3 ml de diámetro. Al finalizar la siembra se realizaron los tratamientos con diferentes concentraciones del principio activo y sus dos formulaciones comerciales (1, 5, 15 µg /ml) durante un pulso de 80 min. Del mismo modo, fueron procesados en forma paralela y simultánea un control negativo, un control de solvente (ACTN 0,5%) y un control positivo (BLM, 1 µg/ml). Al finalizar el tratamiento las muestras fueron centrifugadas a 1000 rpm durante 10 min y se procedió con la metodología luego descripta. Se realizaron al menos tres réplicas por punto experimental.

Línea celular HepG2: Se sembraron 200000 células en tubos de 1 ml. Luego se realizó el tratamiento con diferentes concentraciones del principio activo y de ambas formulaciones comerciales (1, 5, 15 µg/ml) durante un pulso de 2 h. Paralelamente fueron procesados un control negativo, un control de solvente (ACTN 0,5%) y un control positivo (CP 0,2 mg/ml). Al finalizar el tratamiento las muestras fueron centrifugadas a 1000 rpm durante 10 min y se procedió con la metodología luego descripta. Se realizaron al menos tres réplicas por punto experimental.

R.arenarum. En cada experimento se expusieron 5 ejemplares en un volumen final de 1 L de agua declorinada a 3 concentraciones diferentes de los compuestos en estudio durante 96 h de exposición continua, según lo propuesto por Ali y colaboradores (2008a; 2008b). De manera simultánea, se ensayaron controles negativos utilizando agua de red declorinada (pH 7,5 ± 0,1; 23,5 mg CaCO₃/L; temperatura 21 ± 1 °C) y controles positivos empleando ciclofosfamida (40 mg/L) (Vera Candiotti y col., 2010). Las soluciones de ensayo fueron preparadas inmediatamente antes de su uso y

renovadas cada 24 h. Las larvas no fueron alimentadas durante el tiempo de exposición. Para evaluar la inducción de daño, los ejemplares fueron procesados a las 48 y 96 h de tratamiento. Los individuos fueron adormecidos por inmersión en agua a 2-4 °C y una muestra de sangre de aproximadamente 2-3 µl fue obtenida de cada ejemplar mediante un corte transversal realizado a nivel del opérculo. Las muestras de sangre fueron diluidas en 1 ml de PBS y centrifugadas a 2000 rpm durante 9 min para concentrar el material de estudio y luego se continuó con la metodología. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

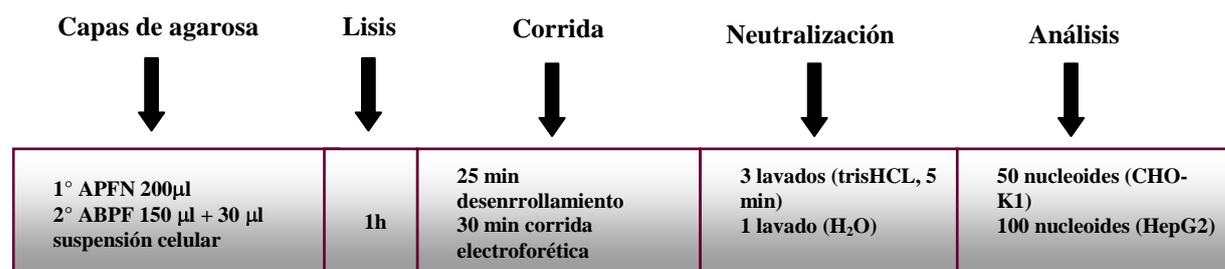
Metodología

Para analizar la genotoxicidad de los herbicidas a nivel del ADN se empleó la metodología de electroforesis en gel de células únicas o EC en su variante alcalina descrita por Singh y colaboradores (1988) con modificaciones menores. De esta manera, una vez concluidos los tratamientos para los distintos modelos experimentales, se procedió a cosechar y procesar las células siguiendo el protocolo que se describe sintéticamente a continuación. Se realizaron las soluciones de agarosa al 0,5% de ABPF y APFN, las cuales fueron preparadas en agua destilada. Posteriormente, la capa de APFN fue extendida sobre portaobjetos y colocados en estufa (37 °C, 20 min) hasta su gelificación. Seguidamente, se realizó la otra capa de ABPF junto con la suspensión celular y dicha mezcla fue esparcida homogéneamente sobre la capa de APFN, cubierta posteriormente con un cubreobjetos y luego incubados a 4 °C durante 10 min. Si fuera necesario se realizó una tercera capa de ABPF. Seguidamente, las preparaciones fueron inmersas en una solución de lisis (4 °C, 1 h, 1% sarcocinato de Na, 2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris pH 10, 1% Triton X-100, 10% DMSO). Luego de la incubación, las preparaciones fueron colocadas en una cuba de electroforesis horizontal

conteniendo el buffer de electroforesis (4 °C, 25 min, 1 mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH) para permitir el desenrollamiento del ADN. Finalizada la etapa de desenrollamiento, las preparaciones fueron ubicadas en un campo eléctrico (25 V, 250 mA con velocidad de corrida equivalente a 0,8 V/cm). Finalizada la electroforesis, los extendidos fueron retirados de la cuba y lavados tres veces con un buffer de neutralización (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5) y enjuagados con agua destilada. Por último, las preparaciones fueron teñidas con DAPI (Laboratorios Vector Inc., Burlingame, CA, USA) y analizadas utilizando un fotomicroscopio de fluorescencia (Olympus BX50) equipado con un objetivo 100X y una combinación de filtros adecuada. El análisis de los mismos fue al azar siguiendo la clasificación en categorías de daño propuesta por Cavaş y Konen (2007). Los resultados obtenidos fueron expresados como porcentaje de células sin daño (cometas tipo 0 y I), daño leve (cometas tipo II), daño intermedio (cometas tipo III) y daño alto (cometas tipo IV) (Ver Fig.2). Asimismo, se calculó el IDG por cada punto experimental según lo recomendado por Pitarque y colaboradores (1999) mediante la siguiente fórmula: $IDG = (clase\ I + 2 \times clase\ II + 3 \times clase\ III + 4 \times clase\ IV) / (clase\ 0 + I + II + III + IV)$.

A modo de síntesis se graficaron los pasos previamente mencionados con sus modificaciones en cada modelo de estudio:

Líneas celulares:



R. arenarum

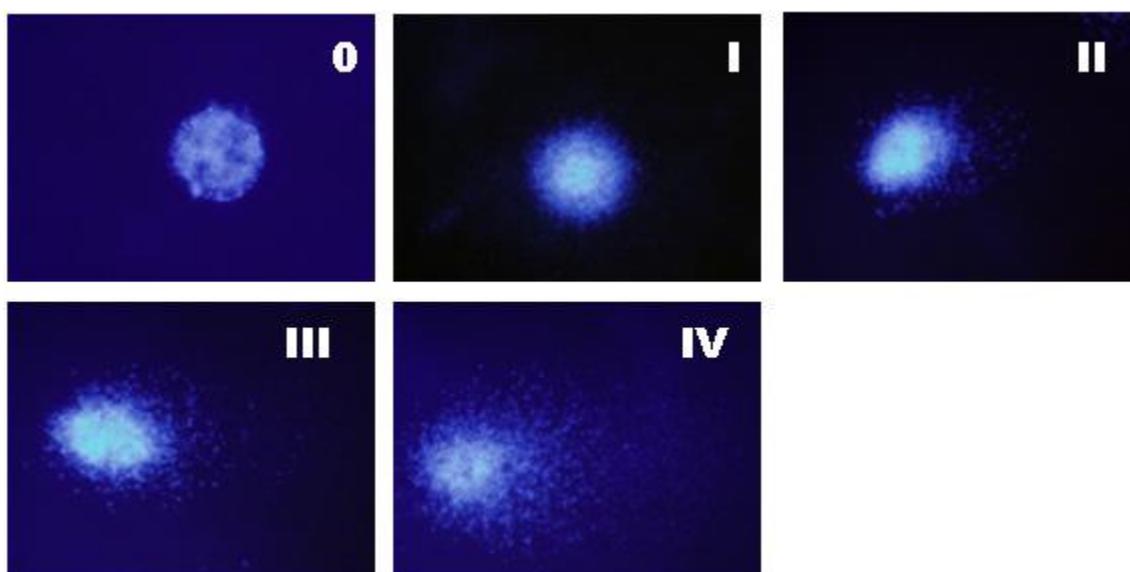
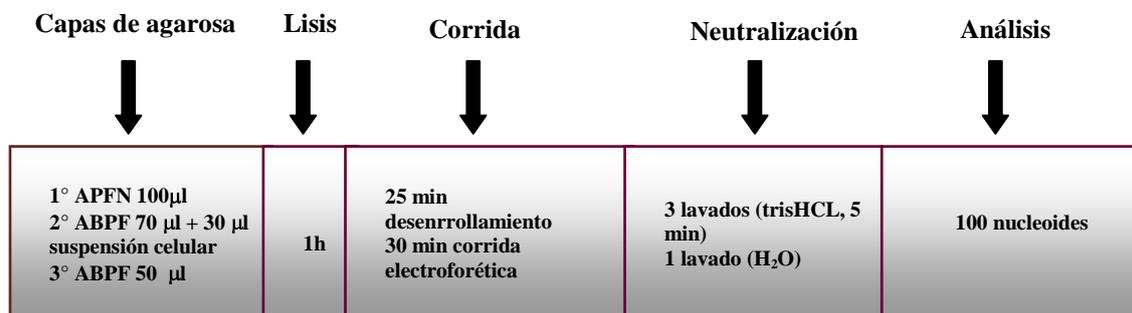


Fig.2. Categorías de daño visualizadas en el EC

4.4.3. Estudio de la frecuencia de micronúcleos (MN)

Diseño experimental

Líneas celulares: Se sembraron 4000 células CHO-K1/ml y 50000 células HepG2/ml en cubreobjetos de 22 x 22 en placas de Petri de 3 ml durante 24 h. Luego se realizó el tratamiento con diferentes concentraciones del principio activo y ambas formulaciones comerciales (0,25; 1; 5; 10; 15 µg/ml) en forma continua por 24 h. Paralelamente para cada experimento se procesaron un control negativo, un control de solvente (ACTN

0,5%) y un control positivo (1 µg/ml BLM; 0,2 mg/ml CP, para células CHO-K1 y HepG2, respectivamente) fueron procesados por experimento. Se realizaron al menos tres réplicas por punto experimental.

R. arenarum. Se realizó el mismo diseño experimental detallado en la sección 4.4.2.

Metodología

Línea celular CHO-K1: El ensayo de MN fue desarrollado siguiendo la técnica descrita por Fenech (2007). Para analizar la frecuencia de MN en células CHO-K1, una vez finalizado el período de exposición a los compuestos en presencia de citocalasina B (3 µg/ml), las células fueron prefijadas en una solución fresca de metanol: ácido acético glacial 6:1 (15 min, 4 °C). Seguidamente, las células se fijaron en 2 ml de metanol-ácido acético glacial 6:1 (15 min). Posteriormente, las células fueron secadas al aire y finalmente teñidas con solución de colorante Giemsa al 3% y las preparaciones fueron colocadas en medio de montaje sintético (Permunt™, Fisher Scientific, EEUU) (ver Fig. 3).

Línea celular HepG2: Para analizar la frecuencia de MN en células HepG2 se siguió el protocolo propuesto por Chiang y colaboradores con modificaciones menores (2011). Luego del tratamiento con los distintos compuestos, las células fueron lavadas con PBS y posteriormente expuestas a citocalasina B (3 µg/ml) por aproximadamente 16 h. Luego de finalizado el tratamiento, las células fueron sometidas a un tratamiento hipotónico con KCl 0,075 M por 5 min, prefijadas y fijadas con metanol (-20 °C, 20 min). Posteriormente, las preparaciones fueron secadas al aire, teñidas con solución acuosa de Giemsa al 3% (10 min) y montadas sobre portaobjetos con medio de montaje sintético (Permunt™, Fisher Scientific, EEUU) (ver Fig. 4).

R. arenarum: Los individuos fueron adormecidos por inmersión en agua a 2-4 °C y se

extrajo una muestra de sangre de aproximadamente 2-3 μl de cada ejemplar, mediante un corte transversal realizado a nivel del opérculo. Se realizaron dos extendidos celulares sobre portaobjetos por ejemplar y los mismos fueron secados a temperatura ambiente durante 18-24 h, siguiendo la técnica citogenética convencional de secado al aire. Posteriormente, los preparados fueron fijados en metanol (100%v/v, 4° C) durante 20 min y coloreados posteriormente con solución acuosa de Giemsa al 5% durante 12 min (ver Fig. 5).

En todos los casos, las preparaciones fueron analizadas utilizando un microscopio de campo claro (Olympus BX50/CX35) equipado con un objetivo 100X. El análisis de MN en las líneas celulares se realizó siguiendo los criterios propuestos por Fenech (2007) para la selección de células binucleadas. De acuerdo a estos criterios, una célula binucleada debe presentar intacta la membrana celular y ser fácilmente distinguible de otras células; los dos núcleos de una célula binucleada deben presentar intacta la membrana nuclear y ubicarse centralmente en el citoplasma celular; deben exhibir el mismo patrón e intensidad de tinción así como también un tamaño equivalente y no deben solaparse entre sí. Para la identificación de los MN tanto en los análisis *in vitro* como *in vivo*, las preparaciones fueron examinadas adoptando los criterios propuestos por Countryman y Heddle (1976), Heddle (1978) y Fenech (2000; 2007). De acuerdo a estos autores, los MN deben presentar una serie de condiciones para ser considerados como tales, a saber: diámetro menor a 1/3 respecto al núcleo principal, no ser refringentes, exhibir una coloración igual o más pálida que el núcleo principal, no estar en contacto con el núcleo principal y no existir más de cuatro MN asociados con un núcleo principal. La frecuencia de células con MN se determinó por análisis de por lo menos 1000 células binucleadas por punto experimental en ambas

líneas celulares y por evaluación de 1000 eritrocitos circulantes por cada individuo.

El análisis en la línea celular CHO-K1 se cumplimentó determinando el índice de división nuclear (IDN) según lo establecido por Fenech (2007), el cual representa el número de ciclos celulares medios realizados por las células desde el momento en que fue incorporada la citocalasina B en el cultivo hasta su procesamiento. El IDN fue evaluado mediante el análisis de un total de 500 células viables por punto experimental y expresado según la fórmula $IDN = (M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4))/N$, donde M1-M4 representa la frecuencia de células con 1, 2, 3 y 4 núcleos y N corresponde al número total de células viables analizadas (Fenech, 2007).

Asimismo en ambas líneas celulares, se contabilizó la presencia de puentes nucleares de cromatina y *buds* nucleares en 1000 células binucleadas. El registro de los puentes nucleares de cromatina se efectuó de acuerdo a los criterios establecidos por Fenech (2000; 2007). Los mismos son conexiones entre los núcleos de una célula binucleada; sus características tintoriales deben ser similares a los núcleos principales; el ancho de los puentes nucleares generalmente es menor a 1/4 del diámetro de los núcleos principales. Los resultados se expresaron como frecuencia de puentes nucleares de cromatina en 1000 células binucleadas.

La identificación de *buds* nucleares se realizó aplicando los criterios propuestos por Fenech (2007). Se caracterizan por presentar una apariencia similar a los MN en la intensidad de tinción; su conexión con el núcleo principal es a través de un tallo de material nuclear cuyo ancho puede ser ligeramente menor al del *bud* o ser mucho más delgado, esto depende del momento del proceso de extrusión. Los resultados se expresaron como frecuencia de *buds* nucleares en 1000 células binucleadas.

Adicionalmente las siguientes anomalías nucleares como: puentes de cromatina, *buds* nucleares, hendiduras nucleares y células binucleadas fueron analizados en 1000 eritrocitos circulantes por punto experimental por cada experimento usando una magnificación de 100X en *R. arenarum*. El criterio de análisis seguido fue realizado según recomendación previa de Cavaş y Ergene-Gözükara (2003) y Strunjak-Perovic (2009).

CHO-K1:

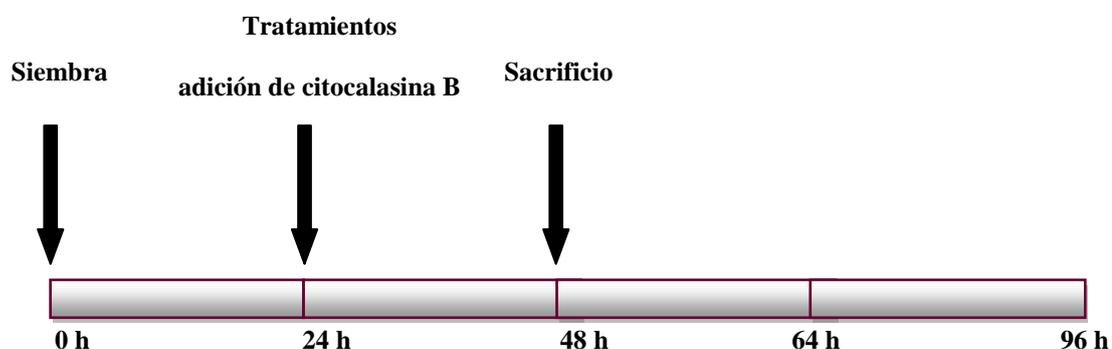


Fig.3 Protocolo de cultivo realizado en el ensayo de MN empleando células CHO-K1

HepG2:

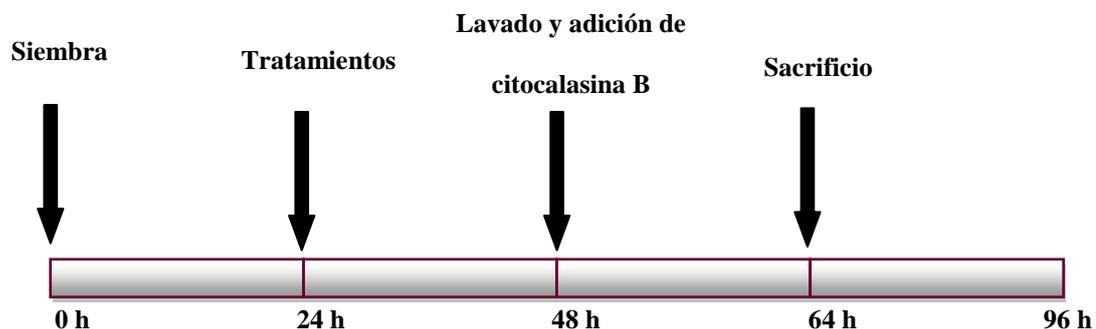


Fig.4 Protocolo de cultivo realizado en el ensayo de MN empleando células HepG2

R. arenarum

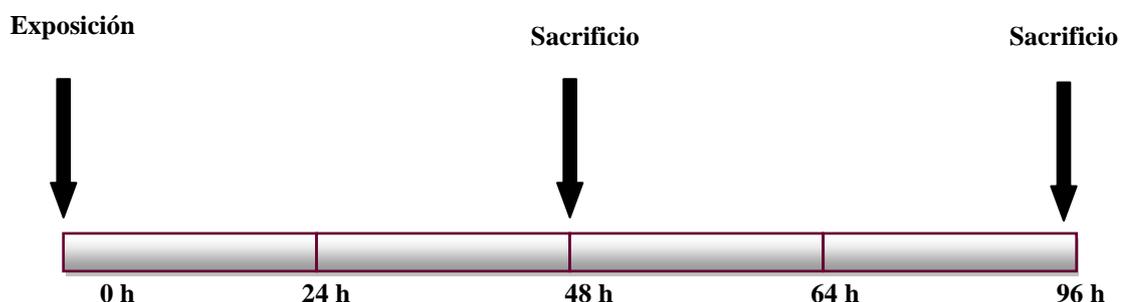
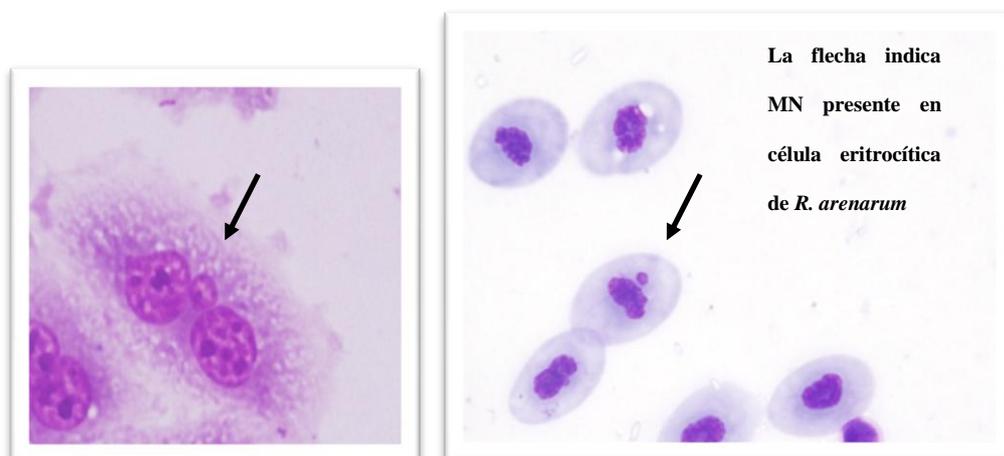


Fig.5 Protocolo de trabajo realizado en el ensayo de MN en *R. arenarum*



La flecha indica MN presente en una célula CHO-K1 binucleada

La flecha indica MN presente en célula eritrocítica de *R. arenarum*

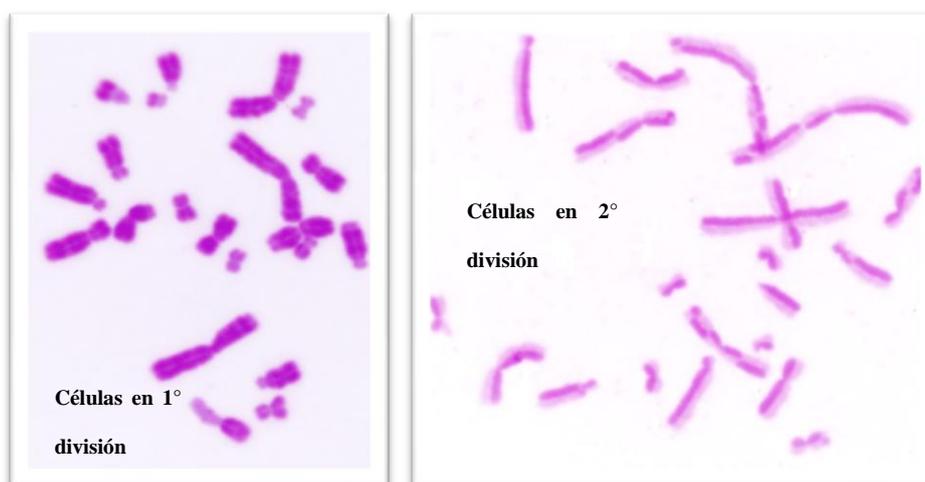
4.5. Ensayos de citotoxicidad

4.5.1 Estudio de la progresión del ciclo celular (PCC) e índice mitótico (IM)

Línea celular CHO-K1: Se siguió el mismo diseño experimental descrito en la sección 4.4.1 y se obtuvieron las preparaciones citogenéticas como se indicó en la misma sección. Para llevar a cabo el análisis de la PCC se analizaron un total de 100 células en metafase por punto experimental y se determinó el porcentaje de células que se

encontraban en primera (M1), segunda (M2) y tercera (M3) división mitótica. El análisis de la PCC se cumplimentó al determinar el índice de proliferación celular (IPC) según la fórmula $IPC = (\%M1) + 2(\%M2) + 3(\%M3)/100$, el cual indica la cantidad de ciclos celulares medios realizados por las células en el cultivo desde el momento en que fue incorporada la BrdUrd hasta su procesamiento (Lamberti y *col.*, 1983).

El IM fue evaluado mediante el análisis de un total de 1000 células por punto experimental y expresado como la frecuencia de mitosis observadas en 1000 células analizadas. La relación existente entre el IM de los tratamientos respecto al control fue establecida mediante el factor f de la siguiente manera: $f = IM_t/IM_c$, donde IM_t corresponde al IM de los cultivos tratados y el IM_c corresponde al IM obtenido de los cultivos controles (Miller y Adler, 1989).



Metafases de células CHO-K1 en su primer y segundo ciclo de duplicación en presencia de BrdUrd

4.5.2 Estudio de la viabilidad celular

Líneas celulares: La viabilidad fue determinada en las células CHO-K1 a los 80 min y 24 h de tratamiento, y en las células HepG2 a las 2 h (ver Fig. 6). Para la determinación de la misma, una alícuota de 10 μ l de suspensión celular en estudio fue mezclada con 10 μ l de una solución 1:1 de bromuro de etidio (100 μ g/ml): naranja de acridina (100 μ g/ml). Se procedió siguiendo el método propuesto por McGahon y *col.* (1995). Se analizaron al menos 500 células por punto experimental utilizando un fotomicroscopio de fluorescencia (Olympus BX50) equipado con un objetivo 40X y una combinación de filtros adecuada. Las células viables fueron identificadas por el color verde brillante de sus núcleos y las no viables por el color naranja intenso de los mismos (Fig. 7). Los resultados fueron expresados como porcentaje de células viables sobre el total de células analizadas. Se realizaron al menos tres réplicas por punto experimental.

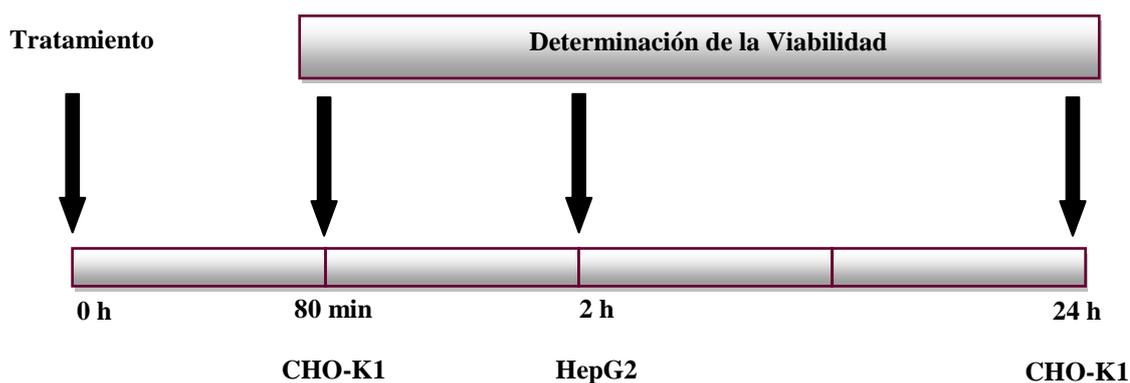


Fig.6. Protocolo de trabajo empleado en el estudio de viabilidad celular

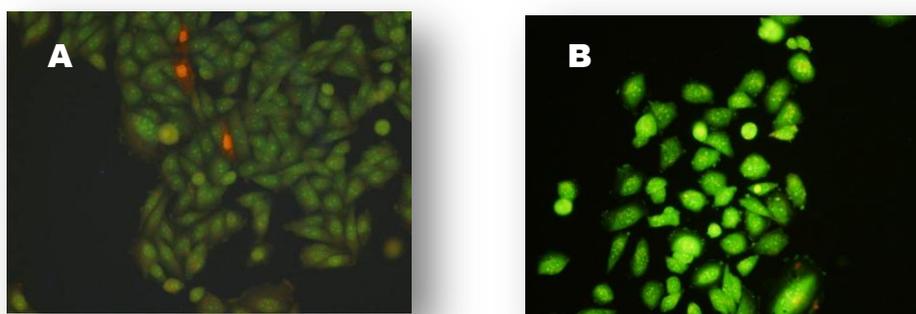


Fig. 7. A-B: células viables: núcleos verde brillante; células no viables: núcleos naranja intenso

4.5.3 Estudio de la actividad lisosomal

Diseño experimental

Líneas celulares: Las células fueron sembradas en una concentración de 10000 células/ml en placas de 96 pocillos y cultivadas durante 24 h hasta su tratamiento con los distintos xenobióticos. Al finalizar este lapso, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones del principio activo y ambas formulaciones comerciales en forma continua por 24 h (0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 15 μg /ml). Paralelamente un control negativo, un control de solvente (ACTN 0,075%) y un control positivo (ETOH 5%) fueron procesados simultáneamente con los cultivos tratados por experimento. Se realizaron al menos tres réplicas por punto experimental.

Ensayo de rojo neutro

El ensayo de RN se desarrolló en base al protocolo inicialmente descrito por Borenfreud y Puerner (1985). El colorante fue adicionado 3 h antes de finalizado el período de exposición a los xenobióticos, el medio de cultivo fue removido por inversión de la placa y se adicionó el RN disuelto en PBS en una concentración final de 0,33% (3 h, 37 °C) (Ver Fig.8). Finalizada la incubación, se realizó un lavado con

PBS y posteriormente se adicionó 100 µl de solución de extracción (1% ácido acético glacial, 50% etanol y 49% agua destilada) en cada pocillo y las placas fueron agitadas durante 10 min. Por último, se procedió a realizar la lectura espectrofotométrica del sobrenadante utilizando un lector de microplacas para la medición de la absorbancia a 540 nm (Sunrise-Basic Tecan, Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria). Los resultados fueron expresados como porcentaje de actividad lisosomal.

4.5.4. Estudio de la actividad mitocondrial

Diseño experimental

Se siguió el mismo diseño experimental desarrollado en la sección 4.5.3.

Ensayo de MTT

La metodología de MTT fue desarrollada siguiendo la técnica descrita en detalle por Kosmider y colaboradores (2004). Antes de finalizar el período de exposición el medio de cultivo fue removido por inversión de la placa. Seguidamente, una solución de 20 µl de MTT (5 mg/ml) fue adicionada a cada pocillo y la placa fue mantenida a 37 °C durante un período adicional de 3 h (Ver Fig.8). Finalizada la incubación con MTT, se realizó un lavado con PBS y seguidamente se adicionó 100 µl de DMSO (solvente de extracción) durante un período de 10 min en agitación constante. Por último, se procedió a realizar la lectura espectrofotométrica utilizando un lector de microplacas para la medición de la absorbancia a 550 nm (Sunrise-Basic Tecan, Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria). Los resultados fueron expresados como porcentaje de actividad mitocondrial.

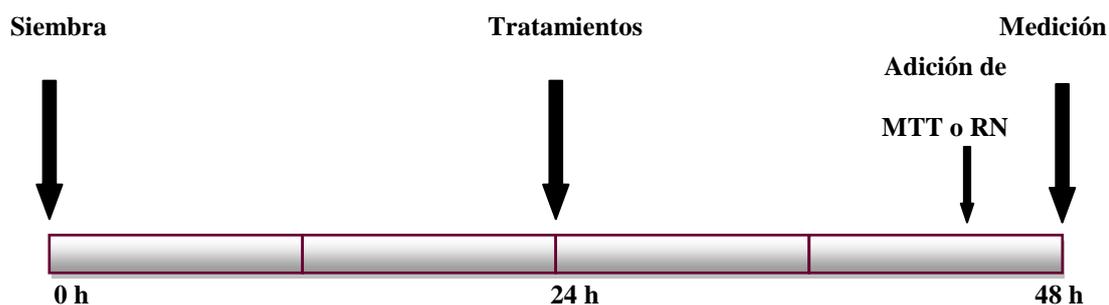


Fig. 8. Protocolo de trabajo empleado en el ensayo de RN y MTT tanto en células CHO-K1 como en HepG2

4.5.5. Estudio de muerte celular no programada (apoptosis)

Diseño experimental

Línea celular HepG2: Las células fueron sembradas en tubos de 1 ml en una concentración de 500000 células/ml. Las mismas fueron tratadas con la mayor concentración del principio activo y de ambas formulaciones comerciales (15 µg/ml) empleada para los ensayos de MN y EC (ver puntos 4.4.2-4.4.3) durante 2 y 24 h. Paralelamente un control negativo, un control de solvente (ACTN 0,5%) y un control positivo (H_2O_2 , 125 µM y ETOH, 5% para 2 y 24 h, respectivamente) fueron procesados por experimento. Se realizaron al menos tres experimentos independientes.

Metodología Anexina V-FITC

Finalizado el tiempo de exposición a los xenobióticos, las células fueron lavadas con PBS y resuspendidas en 250 µl de una solución tampón compuesta por 10 mM Hepes, 140 mM NaCl y 2,5 mM $CaCl_2$. Posteriormente, se adicionó a cada muestra 1 µl de Anexina V-FITC por un período de incubación de 15 min a temperatura ambiente y protegido de la luz. Al finalizar el período de conjugación de la Anexina V, las

muestras fueron lavadas nuevamente con el mismo buffer de tratamiento. Finalmente, las células fueron expuestas a IP (0,1 µg/ml) durante 7 min. Se analizaron al menos 500 células por punto experimental utilizando un fotomicroscopio de fluorescencia (Olympus BX50) equipado con un objetivo 40X y una combinación de filtros adecuada. Los resultados fueron expresados como porcentaje de células viables (células Anexina V/FITC-negativo y PI-negativo), apoptóticas tempranas (células Anexina V/FITC-positivo y PI-negativo), apoptóticas tardías (células Anexina V/FITC-positivo y PI-positivo), necróticas (células Anexina V/FITC-negativo y PI-positivo) sobre el total de células analizadas (ver Fig.9).

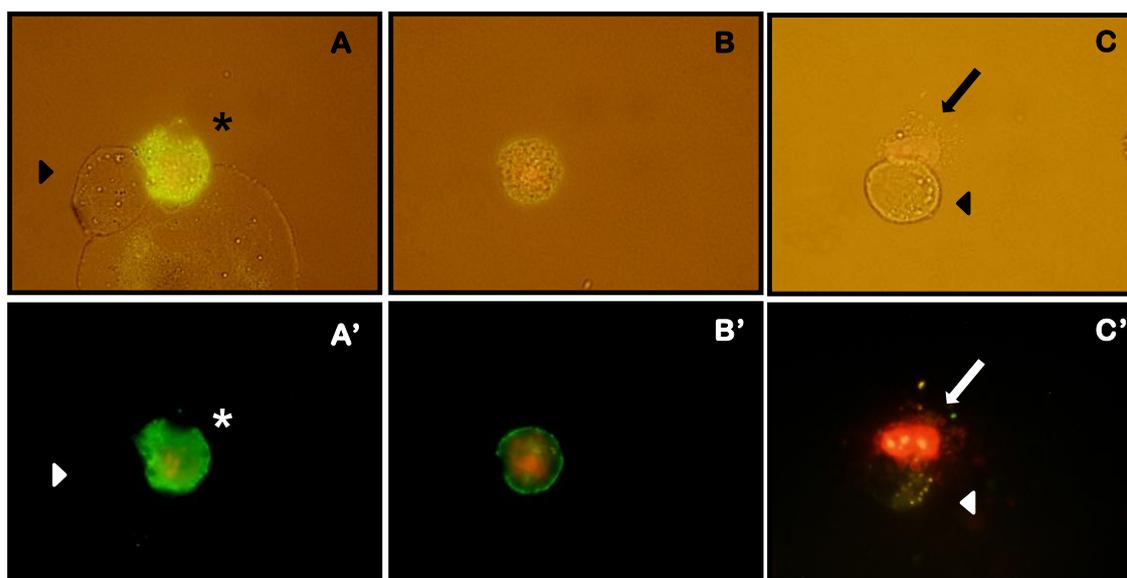


Fig.9. A-A' * células apoptóticas tempranas, ► célula viable; B-B' apoptóticas tardías; C-C' ►► necróticas, ► célula viable.

4.6. Ensayos de letalidad

4.6.1. Determinación de la concentración letal media (CL50)

Los ensayos de toxicidad aguda fueron realizados según los métodos estandarizados para organismos acuáticos de acuerdo a lo propuesto por la USEPA (USEPA, 1975) con modificaciones menores reportadas para especies nativas (Natale, 2006).

Cada experimento consistió en exponer 30 ejemplares de estadio de desarrollo 37 ± 2 (Gosner, 1960) por cada punto experimental, expuestos a 7 concentraciones de los compuestos en estudio (1; 2; 2,33; 2,66; 3; 3,33; 6 mg/L) durante 96 h en un volumen final de 1 L de agua de red declorinada. Junto a los ensayos con formulados comerciales, se llevaron a cabo en simultáneo, controles negativos con agua de red declorinada ($\text{pH } 7,5 \pm 0,1$; 23,5 mg CaCO_3/L) y controles positivos con dicromato de potasio (23 mgCr(VI)/L). Las mediciones de cromo en las soluciones de ensayo se llevaron a cabo por espectrofotometría de absorción atómica mediante aspiración directa en llama aire-acetileno (Método 3111 B) (APHA y col., 1998). El fotoperíodo en todos los ensayos fue de 16:8 h luz/oscuridad y la temperatura de 21 ± 1 °C bajo condiciones controladas mediante una fuente de calor artificial. Las soluciones de ensayo fueron preparadas inmediatamente antes de su uso y renovadas cada 24 h. Las larvas no fueron alimentadas durante el tiempo requerido por el diseño experimental. Para evaluar la mortalidad, los ejemplares fueron examinados visualmente cada 24 h y considerados muertos tanto en ausencia de movimientos respiratorios como en ausencia de movimientos natatorios en respuesta a toques suaves con una varilla plástica. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Se determinaron los valores de $\text{CL}_{50_{96 \text{ h}}}$ de exposición para cada formulado, a fin de obtener un rango de concentraciones subletales para poder realizar posteriormente los ensayos agudos y

permitir evaluar genotoxicidad. El cálculo de las CL50 se realizó mediante el empleo del programa de análisis Probit versión 1.5 (<http://www.epa.gov>).

4.7. Estudio del efecto de la vitamina E (α -tocoferol)

Linea celular CHO-K1: Las células fueron sembradas en placas de 3 ml en una concentración de 350000 células/ml. Las mismas fueron preincubadas durante 2 h con 50 μ g/ml de vitamina E siguiendo el protocolo previamente propuesto por Lazarova y colaboradores (2004). Luego los cultivos fueron tratados con la mayor concentración del principio activo y de ambas formulaciones comerciales (15 μ g/ml) durante un pulso de 80 min. Finalizado el tiempo de exposición se procedió a realizar la metodología del EC y viabilidad celular (ver sección 4.4.2; 4.5.2). Se realizaron al menos tres experimentos independientes.

4.8. Análisis estadístico

Se emplearon los siguientes test estadísticos:

Estudios *in vitro*

- La prueba paramétrica “*t*” de Student se utilizó para realizar las comparaciones de las medias entre los cultivos controles y los cultivos tratados con FLC, Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] en los ensayos de ICHs, MTT y RN.
- La prueba no paramétrica de χ^2 se utilizó para realizar las comparaciones entre los valores de los cultivos controles y los observados en los cultivos expuestos a los herbicidas utilizados para el análisis de la PCC, del IM, el análisis de la viabilidad celular, el IDN y el análisis de la frecuencia de puentes nucleares de cromatina y *buds* nucleares.
- La prueba de análisis de varianza simple (ANOVA) seguida de una prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para la comparación de medias

se aplicaron para determinar la significancia de las diferencias encontradas en los valores frecuencia de ADN dañado (EC) y MN entre cultivos controles y cultivos expuestos a xenobióticos. La homogeneidad de varianzas entre grupos se evaluó con la prueba de Levene y la normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

- El análisis de correlación lineal de Pearson fue empleado para medir la relación entre los niveles del incremento de daño en el ADN encontrados en los cultivos controles y cultivos tratados.
- El nivel de significación elegido fue del 0,05 en todos los casos, salvo indicación en contrario.

Estudios *in vivo*

- Las comparaciones estadísticas de los resultados obtenidos de los análisis de MN y EC entre grupos controles y grupos tratados se realizó mediante la prueba de análisis de varianza simple (ANOVA) seguida de una prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para la comparación de medias. La homogeneidad de varianzas entre grupos se evaluó con la prueba de Levene y la normalidad mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov.
- La descripción de las relaciones entre mortalidad, CL50, frecuencia de MN, frecuencia de células dañadas, IDG, tanto con las concentraciones de agroquímicos empleados como con el tiempo de exposición, fue realizada mediante un análisis de correlación lineal de Pearson.
- La prueba paramétrica de muestras pareadas a dos colas, de “t” de Student se utilizó para realizar la comparación del potencial de las formulaciones en la exposición aguda considerando todos los ensayos evaluados.

- El nivel de significación elegido fue del 0,05 en todos los casos, salvo indicación en contrario.

5. RESULTADOS

En el presente capítulo de esta Tesis Doctoral, tanto las Figuras como las Tablas referidas en cada uno de los apartados corresponden a las de los trabajos publicados (incluidos en el Anexo I). Sin embargo, las mismas han sido graficadas nuevamente para facilitar la lectura y análisis del capítulo.

5.1. Estudios *in vitro*

5.1a. LÍNEA CELULAR CHO-K1

5.1a.1. Estudio de la frecuencia de ICHs (ver Publicación 1)

Los resultados obtenidos tras 24 h de tratamiento continuo mostraron que el control positivo, BLM (1 µg/ml), indujo un incremento significativo de la frecuencia de ICHs respecto de los valores controles ($P < 0,001$) (Fig. 1). Cuando los cultivos fueron tratados con los compuestos en estudio se observó una frecuencia de ICHs significativamente mayor en comparación con los valores control con concentraciones de 0,25-10 µg/ml de FLC ($P < 0,001$), 0,25-5 µg/ml de Twin Pack Gold[®] ($P < 0,001$) y 2,5-10 µg/ml de Rainbow[®] ($P < 0,05$; $P < 0,001$) (Fig. 1). En los cultivos expuestos a 15 µg/ml de FLC y Rainbow[®] al igual que en los expuestos a 10-15 µg/ml de Twin Pack Gold[®] no pudo medirse la frecuencia de ICHs debido a un aumento de las células M₁ llegando a representar el 88-100% de la población celular (Fig. 1). Los incrementos hallados en la frecuencia de ICHs no resultaron ser dependientes de las concentraciones ensayadas de FLC y Twin Pack Gold[®] ($r = 0,62$; $P > 0,05$ y $r = 0,42$; $P > 0,05$, respectivamente). Por el contrario, los incrementos de la frecuencia de ICHs encontrados con las concentraciones ensayadas de Rainbow[®] resultaron ser

dependientes de la concentración del formulado incorporado a los cultivos ($r=0,97$; $P<0,05$).

La capacidad de los compuestos para inducir ICHs fue en el siguiente orden: Twin Pack Gold[®] > FLC > Rainbow[®].

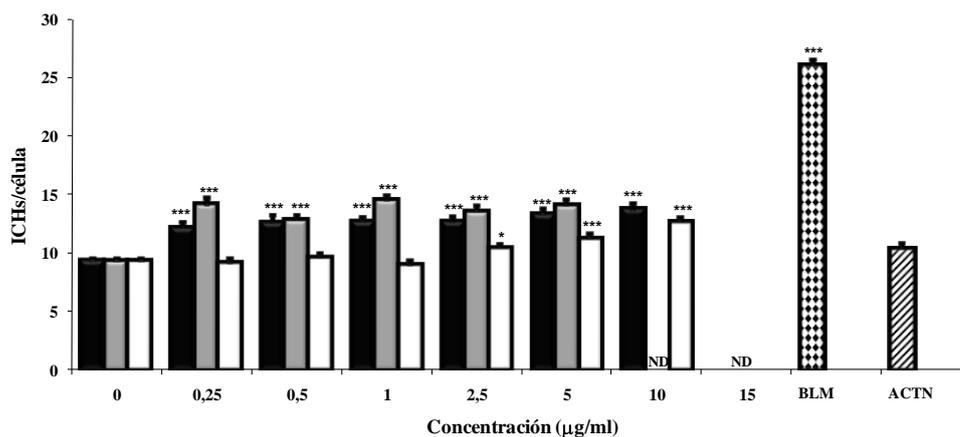


Fig. 1. Frecuencia de ICHs en células CHO-K1 expuestas a FLC (barras negras), Twin Pack Gold[®] (barras grises) y Rainbow[®] (barras blancas) durante 24 h. Bleomicina (BLM, 1 µg/ml): control positivo. ACTN 0,5%: control de solvente. ND: no determinado. * $P<0,05$; *** $P<0,001$

5.1a.2. Estudio de la progresión del ciclo celular (PCC) e índice mitótico (IM) (ver Publicación 1)

Los cultivos celulares fueron tratados de manera continua con FLC, Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] durante 24 h. El control positivo BLM (1 µg/ml) indujo una significativa reducción del IPC, como así también del IM y del factor f con respecto a los valores control ($P<0,001$) (Tabla 1). Se observó una reducción significativa del IPC en los cultivos tratados con 15 µg/ml de FLC ($P<0,001$) (Tabla 1). Los cultivos también mostraron una significativa reducción del IPC cuando fueron expuestos a 5-15 µg/ml de Twin Pack Gold[®] ($P<0,05$; $P<0,001$) y Rainbow[®] ($P<0,001$) (Tabla 1). Mediante una prueba de correlación se determinó que la reducción del IPC ocurrió en función de

la concentración ensayada de FLC ($r=-0,91$; $P<0,01$), así como la de Twin Pack Gold[®] ($r=-0,98$; $P<0,001$) y Rainbow[®] ($r=-0,97$; $P<0,001$). Para una concentración dada, la habilidad de ambas formulaciones comerciales de inducir retraso en la progresión del ciclo celular siempre fue mayor que la inducción producida por el principio activo FLC.

La evaluación de los cambios en el IM y del factor f mostró una inhibición progresiva de estos parámetros dependiente de la concentración empleada de FLC y Twin Pack Gold[®]. Se observó una inhibición de la actividad mitótica cuando se emplearon concentraciones de 0,25 $\mu\text{g/ml}$ y mayores a 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de FLC y a 5 $\mu\text{g/ml}$ para Twin Pack Gold[®] ($P<0,05$; $P<0,001$) (Tabla 1). Por otra parte, la formulación comercial Rainbow[®] causó inhibición de la actividad mitótica con todas las concentraciones ensayadas ($0,05>P<0,001$) (Tabla 1). Mediante un análisis de correlación se determinó que la inhibición de la actividad mitótica ocurrió en función de la concentración de FLC ($r=-0,96$; $P<0,01$) y Twin Pack Gold[®] ($r=-0,98$; $P<0,001$) pero no de Rainbow[®] ($r=-0,44$; $P>0,05$) incorporadas a los cultivos. La capacidad de la formulación comercial Rainbow[®] de inducir inhibición de la actividad mitótica en una concentración dada siempre fue más alta que la inducida por FLC o Twin Pack Gold[®] en el sistema celular empleado. La concentración de 15 $\mu\text{g/ml}$ de todos los compuestos ensayados produjo una disminución significativa de la actividad mitótica respecto de los valores control ($P<0,001$) con un valor promedio de $f = 0,46 \pm 0,06$; $f = 0,51 \pm 0,08$; $f = 0,61 \pm 0,07$ para FLC, Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®], respectivamente, respecto de los valores control ($f=1,00$) (Tabla. 1).

Compuesto	Concentración (µg/ml)	IPC	IM	f
	0	1,97 ± 0,88	85 ± 5,93	1,00 ± 0,00
FLC	0,25	1,94 ± 0,67	61 ± 2,65 *	0,86 ± 0,06
	0,5	1,91 ± 1,00	74 ± 4,26	0,87 ± 0,10
	1	1,91 ± 1,20	72 ± 5,04	0,85 ± 0,06
	2,5	1,91 ± 1,19	66 ± 7,00 *	0,78 ± 0,08
	5	1,86 ± 1,76	66 ± 8,00 *	0,78 ± 0,11
	10	1,70 ± 1,33	53 ± 7,26 ***	0,63 ± 0,04
	15	1,03 ± 0,85 ***	39 ± 7,17 ***	0,46 ± 0,06
Twin Pack Gold®	0,25	1,93 ± 0,33	75 ± 3,33	0,88 ± 0,09
	0,5	1,91 ± 1,33	83 ± 6,67	0,98 ± 0,12
	1	1,90 ± 0,93	79 ± 8,37	0,94 ± 0,10
	2,5	1,84 ± 0,96	76 ± 2,96	0,89 ± 0,08
	5	1,68 ± 1,01 *	67 ± 3,71 *	0,79 ± 0,08
	10	1,12 ± 0,53 ***	56 ± 2,60 ***	0,65 ± 0,03
	15	1,00 ± 0,33 ***	43 ± 7,33 ***	0,51 ± 0,08
Rainbow®	0,25	1,84 ± 0,86	57 ± 3,71 **	0,67 ± 0,02
	0,5	1,71 ± 0,19	53 ± 3,28 ***	0,62 ± 0,06
	1	1,78 ± 0,19	62 ± 2,08 *	0,73 ± 0,03
	2,5	1,77 ± 0,19	52 ± 2,91 **	0,62 ± 0,08
	5	1,60 ± 1,03 ***	46 ± 2,60 ***	0,55 ± 0,07
	10	1,21 ± 0,88 ***	51 ± 2,31 ***	0,60 ± 0,06
	15	1,06 ± 1,03 ***	52 ± 2,52 ***	0,61 ± 0,07
BLM	1	1,60 ± 0,02 ***	35 ± 0,30 ***	0,35 ± 0,03 ***
ACTN		1,86 ± 0,33	82 ± 4,17	0,96 ± 0,03

Tabla 1. Valores IPC, IM, y f ± ES, obtenidos en células CHO-K1 expuestas a FLC, Twin Pack Gold® y Rainbow® durante 24 h. Bleomicina (BLM 1 µg/ml): control positivo. ACTN 0,5%: control de solvente.

* P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001

5.1a.3. Estudio de la actividad lisosomal (ver Publicación 1)

La alteración en la integridad de la membrana celular de los lisosomas inducida por FLC y sus variantes comerciales fueron evaluadas mediante el ensayo de captación de Rojo Neutro luego de 24 h de tratamiento continuo. El control positivo, ETOH (5%), indujo una disminución significativa de la actividad lisosomal respecto de los valores control ($P < 0,001$) (Fig. 2). Una disminución de la viabilidad celular fue evidenciada cuando los cultivos fueron tratados con 10-15 $\mu\text{g/ml}$ de Rainbow[®] ($P < 0,05$) (Fig. 2). Mediante un análisis de correlación se determinó que la inhibición de la actividad lisosomal ocurrió en función de la concentración de Rainbow[®] presente en los cultivos ($r = -0,88$; $P < 0,01$). Opuestamente, no se observaron cambios en la actividad lisosomal cuando los cultivos fueron expuestos a FLC y Twin Pack Gold[®] ($P > 0,05$) (Fig. 2). El ensayo de RN demostró que la formulación comercial Rainbow[®] ejerció un efecto citotóxico mayor a nivel lisosomal de las células CHO-K1 que los otros compuestos, sea tanto el principio activo como su formulación Twin Pack Gold[®].

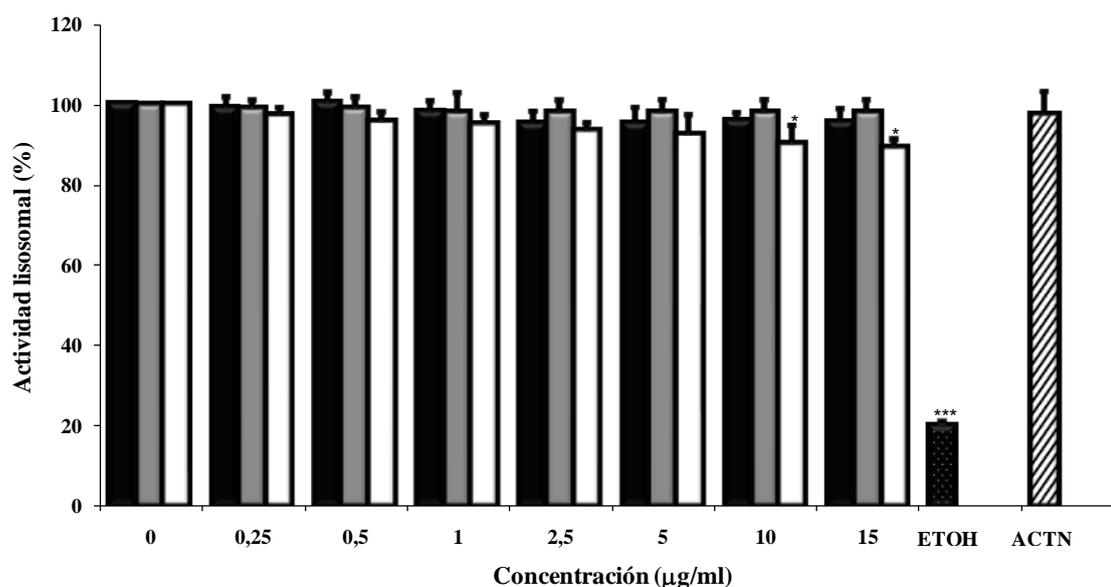


Fig. 2. Porcentaje de actividad lisosomal obtenido en células CHO-K1 expuestas a FLC (barras negras), Twin Pack Gold® (barras grises) y Rainbow® (barras blancas) durante 24 h. ETOH 5%: control positivo. ACTN 0,075%: control de solvente. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

5.1a.4. Estudio de la actividad mitocondrial (ver Publicación 1)

La alteración en el metabolismo energético inducido por FLC y sus variantes comerciales fue evaluada mediante el ensayo de MTT luego de 24 h de tratamiento continuo. El control positivo, ETOH (5%), indujo una disminución significativa de la actividad mitocondrial respecto de los valores control ($P < 0,001$) (Fig. 3). Los resultados mostraron una disminución de la actividad mitocondrial estadísticamente significativa cuando los cultivos fueron expuestos a 5-15 µg/ml de FLC ($0,01 > P < 0,001$), 2,5-15 µg/ml de Twin Pack Gold® ($0,05 > P < 0,001$) y 5-15 µg/ml de Rainbow® ($0,01 > P < 0,001$) (Fig. 3). Mediante un análisis de correlación se determinó que la inhibición de la actividad mitocondrial ocurrió en función de la concentración de FLC ($r = -0,76$; $P < 0,05$), de Twin Pack Gold® ($r = -0,87$; $P < 0,01$) como la de

Rainbow[®] ($r=-0,97$; $P<0,001$) presentes en los cultivos tratados. El ensayo de MTT demostró que ambas formulaciones comerciales fueron capaces de ejercer un mayor efecto citotóxico a nivel mitocondrial que el principio activo FLC.

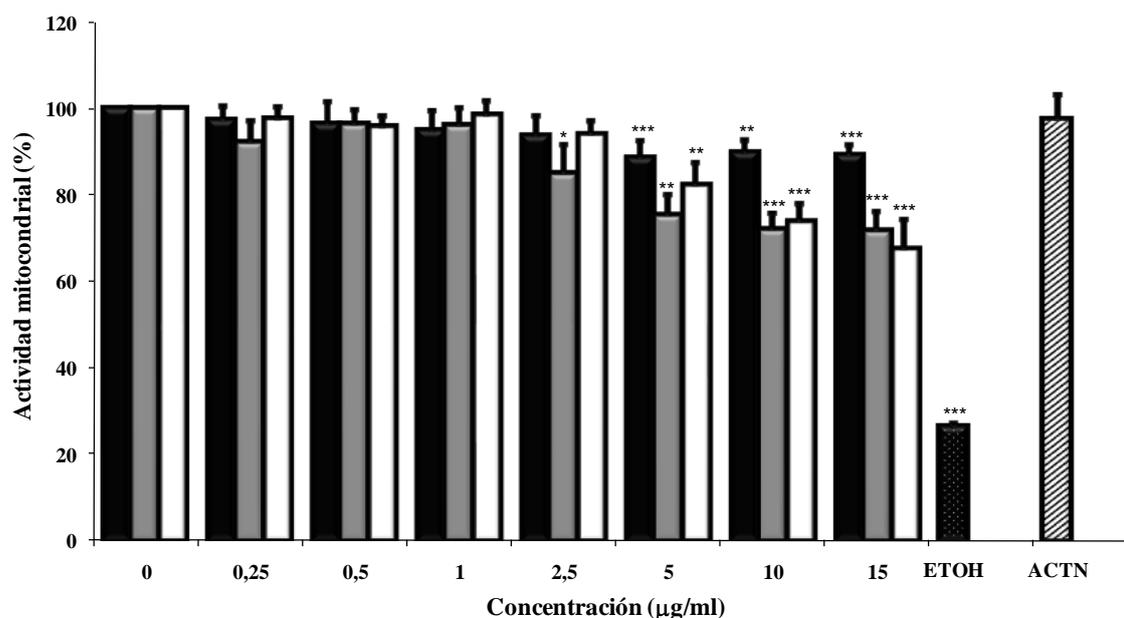


Fig. 3. Porcentaje de actividad mitocondrial obtenido en células CHO-K1 expuestas a FLC (barras negras), Twin Pack Gold[®] (barras grises) y Rainbow[®] (barras blancas) durante 24 h. ETOH 5%: control positivo. ACTN 0,075%: control de solvente. * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P<0,001$

5.1a.5. Estudio de la frecuencia de MN, *buds* nucleares, puentes de cromatina y viabilidad celular (ver Publicación 2)

Luego de 24 h de exposición continua, el análisis de la frecuencia de MN mostró un aumento significativo en los tratamientos efectuados con el control positivo, BLM (1 µg/ml), comparado con el control ($P<0,001$) (Tabla 2). El tratamiento con FLC y Rainbow[®] no modificó la frecuencia de MN respecto de los valores control en la línea celular empleada ($P>0,05$) (Tabla 2). Sin embargo, la formulación comercial Twin

Pack Gold[®] indujo un incremento significativo en la frecuencia de MN cuando la concentración de 5 µg/ml fue ensayada ($P < 0,001$) (Tabla 2). Las mayores concentraciones ensayadas, 10-15 µg/ml, de los formulados comerciales indujeron alteraciones morfológicas en los cultivos celulares que no permitieron el monitoreo de los MN. Los resultados demuestran que para una concentración dada, la capacidad de inducir MN en células CHO-K1 fue mayor para el formulado Twin Pack Gold[®] que para los otros compuestos ensayados, sea tanto el principio activo como su formulación comercial Rainbow[®].

Los resultados del IDN también se presentan en la Tabla 2. Los datos mostraron un alargamiento en la progresión del ciclo celular y una reducción del IDN cuando los cultivos fueron tratados con 15 µg/ml de FLC ($P < 0,05$) y 5 µg/ml de Twin Pack Gold[®] ($P < 0,01$). Un análisis de correlación demostró que la disminución del IDN fue dependiente de la concentración cuando los cultivos fueron tratados tanto con FLC ($r = -0,99$; $P < 0,01$) como con Twin Pack Gold[®] ($r = -0,98$; $P < 0,05$).

Los resultados del ensayo de viabilidad celular a las 24 h de exposición se presentan en la Tabla 2. No se encontraron alteraciones en la viabilidad celular cuando los cultivos fueron expuestos a FLC ($P > 0,05$). Sin embargo, se observó una disminución de más del 35% en la viabilidad celular cuando los cultivos fueron tratados con 15 µg/ml de ambos formulados comerciales ($P < 0,001$) (Tabla 2).

Compuesto	Concentración (µg/ml)	Frecuencia de MN (MN/1000 células)	Número de células micronucleadas (%)			IDN	Viabilidad (%)
			1 MN	2 MN	3 MN		
			Control		39,7 ± 2,9		
FLC	0,25	40,7 ± 5,0	32,0 ± 2,1	1,7 ± 0,9	1,3 ± 0,3	2,2 ± 0,1	99,3 ± 0,6
	1	38,3 ± 3,2	29,3 ± 0,9	2,7 ± 0,7	1,0 ± 0,6	2,2 ± 0,1	97,0 ± 2,5
	5	38,0 ± 3,8	33,3 ± 3,7	1,7 ± 0,7	0,7 ± 0,7	2,0 ± 0,1	99,0 ± 0,3
	10	44,0 ± 1,2	34,3 ± 2,1	3,0 ± 0,0	1,3 ± 0,3	1,9 ± 0,1	99,0 ± 0,3
	15	42,7 ± 0,9	34,3 ± 4,1	2,7 ± 1,2	1,0 ± 0,6	1,8 ± 0,1 *	97,0 ± 0,3
Control		35,7 ± 3,0	28,0 ± 1,7	3,3 ± 0,7	0,6 ± 0,2	2,1 ± 0,0	99,0 ± 0,3
Twin Pack Gold®	0,25	31,3 ± 1,5	26,3 ± 1,5	2,0 ± 1,2	0,3 ± 0,3	2,2 ± 0,1	100,0 ± 0,0
	1	41,0 ± 4,5	30,3 ± 4,2	4,3 ± 0,3	1,0 ± 0,6	2,0 ± 0,1	99,0 ± 1,3
	5	66,3 ± 5,6***	58,3 ± 4,4***	3,0 ± 0,6	0,7 ± 0,7	1,7 ± 0,1 **	99,0 ± 2,5
	10	ND	ND	ND	ND	ND	95,0 ± 0,3
	15	ND	ND	ND	ND	ND	0,0 ± 0,0***
Control		41,0 ± 5,3	34,0 ± 3,4	2,0 ± 0,6	1,0 ± 0,3	2,1 ± 0,0	100,0 ± 0,0

Genotoxicidad de herbicidas de importancia agroeconómica en Argentina

Rainbow®	0,25	44,1 ± 5,8	33,0 ± 4,2	4,0 ± 1,2	1,0 ± 0,3	2,1 ± 0,0	100,0 ± 1,6
	1	37,3 ± 4,4	33,0 ± 4,8	2,0 ± 0,9	0,0 ± 0,0	2,1 ± 0,1	99,5 ± 0,5
	5	47,0 ± 5,5	41,3 ± 4,9	3,0 ± 0,7	0,0 ± 0,0	1,9 ± 0,1	89,6 ± 6,0
	10	ND	ND	ND	ND	ND	90,0 ± 6,0
	15	ND	ND	ND	ND	ND	65,3 ± 6,0 ^{***}
ACTN		40,0 ± 6,0	30,7 ± 5,2	2,6 ± 0,3	1,3 ± 1,3	2,1 ± 0,1	99,0 ± 0,6
BLM		62,3 ± 1,8 ^{***}	48,3 ± 1,4 ^{***}	5,0 ± 0,0 [*]	1,0 ± 0,8 ^{***}	2,1 ± 0,1	97,0 ± 0,2

Tabla 2. Valores de frecuencia de MN, IDN y viabilidad celular obtenidos en células CHO-K1 expuestas a FLC, Twin Pack Gold® y Rainbow® durante 24 h. Bleomicina (BLM 1 µg/ml): control positivo. ACTN 0,5%: control de solvente. ND: no determinado. * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001

Los resultados del análisis de los *buds* nucleares se presentan en la Fig. 4. Se observó un incremento en la frecuencia de *buds* nucleares en los cultivos tratados con BLM ($P < 0,001$) comparado con los valores control. No se observó inducción de *buds* nucleares cuando las células fueron tratadas con 0,25-1 $\mu\text{g/ml}$ de Twin Pack Gold[®] y 0,25-5 $\mu\text{g/ml}$ de Rainbow[®] ($P > 0,05$) (Fig.4). Sin embargo, se observó un incremento en la frecuencia de *buds* nucleares cuando los cultivos fueron tratados con 1-15 $\mu\text{g/ml}$ de FLC ($P < 0,05$; $P < 0,001$) y 5 $\mu\text{g/ml}$ de Twin Pack Gold[®] ($P < 0,05$) (Fig.4). Un análisis de correlación determinó que el incremento de *buds* observado fue independiente de la concentración ensayada de FLC ($r = 0,56$; $P > 0,05$). Las mayores concentraciones ensayadas de los formulados comerciales, 10-15 $\mu\text{g/ml}$, produjeron alteraciones morfológicas en los cultivos celulares que no permitieron el monitoreo de los *buds* nucleares.

Ninguno de los compuestos produjo un incremento en la frecuencia de puentes de cromatina con respecto a los valores control ($P > 0,05$) (dato no mostrado).

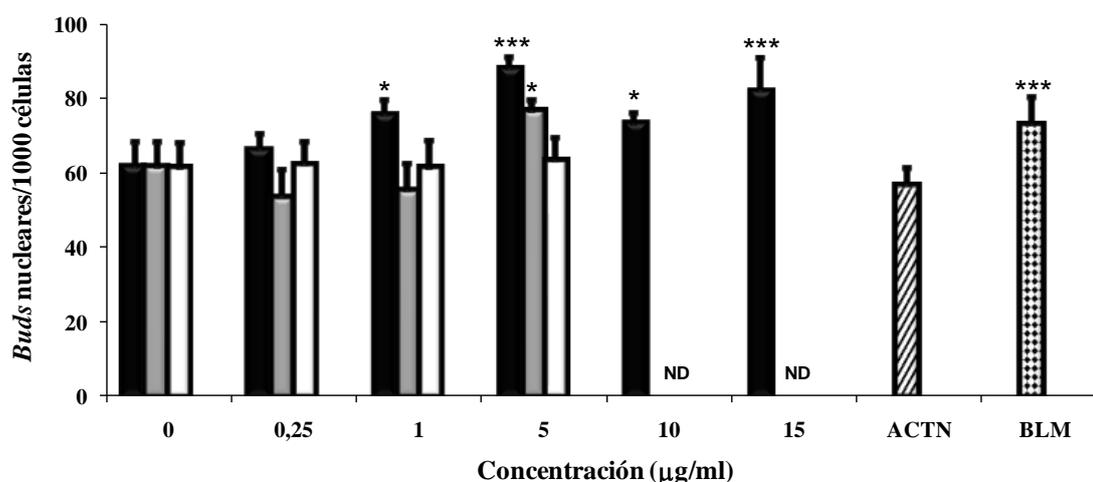


Fig. 4. Frecuencia de *buds* nucleares obtenidos en células CHO-K1 expuestas a FLC (barras negras), Twin Pack Gold® (barras grises) y Rainbow® (barras blancas) durante 24 h. Bleomicina (BLM 1 µg/ml): control positivo. ACTN 0,5%: control de solvente. ND: no determinado. * P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

5.1a.6. Estudio del EC, IDG y viabilidad celular (ver Publicación 2)

Las células CHO-K1 fueron expuestas a un pulso de 80 min a concentraciones de 1, 5 y 15 µg/ml, para luego someterlas a una electroforesis en microgeles de agarosa de acuerdo al protocolo convencional de la variante alcalina del EC. Los resultados de proporción de nucleoides dañados, IDG y viabilidad celular son presentados en la Tabla 3. Los datos mostraron un incremento en la frecuencia de nucleoides dañados con respecto al control cuando las concentraciones de 1-15 µg/ml de FLC fueron adicionadas a los cultivos. Se pudo evidenciar que este daño ocurrió por un incremento de la frecuencia de cometas tipo III (P<0,01) y una disminución de nucleoides tipo I (P<0,05) (Tabla 3). Por otra parte, Twin Pack Gold® indujo un aumento en la frecuencia de células dañadas con respecto a los valores control, dado por el aumento de cometas tipo IV sólo cuando se ensayó la concentración de 15 µg/ml (P<0,001) (Tabla 3). Cuando las células fueron tratadas con 5 y 15 µg/ml de Rainbow®, también

se incrementó la frecuencia de células dañadas respecto a los valores control. Pudo observarse un incremento de los cometas tipo IV ($P < 0,001$) y una disminución de los tipo I ($P < 0,05$) (Tabla 3). Un análisis de correlación demostró que el número total de células dañadas se correlacionó directamente con la concentración de Rainbow[®] ensayada ($r = 0,96$; $P < 0,05$), pero no en los cultivos tratados con FLC y Twin Pack Gold[®] ($r = 0,86$; $P > 0,05$ y $r = 0,93$; $P > 0,05$, respectivamente).

Los resultados de IDG también se encuentran descriptos en la Tabla 3. En los cultivos tratados con todas las concentraciones de FLC puede observarse un aumento del IDG con respecto a los valores control ($P < 0,05$; $P < 0,001$) (Tabla 3). El formulado Twin Pack Gold[®] produjo un aumento del IDG con respecto al control sólo en los cultivos tratados con 15 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0,001$) (Tabla 3). El formulado Rainbow[®] indujo un aumento del IDG con respecto al control en los cultivos tratados con 5 y 15 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0,001$) (Tabla 3). Un análisis de correlación demostró que la magnitud del daño en el ADN es directamente proporcional a la concentración empleada de ambos formulados comerciales Twin Pack Gold[®] ($r = 0,99$; $P < 0,001$) y Rainbow[®] ($r = 0,96$; $P < 0,05$), pero no para el principio activo FLC ($r = 0,78$; $P > 0,05$).

Los compuestos FLC y Rainbow[®] no alteraron la viabilidad celular con respecto al control cuando los cultivos fueron tratados durante un pulso de 80 min ($P > 0,05$) (Tabla 3). Sin embargo, se pudo observar una disminución de la viabilidad celular cuando los cultivos fueron tratados con 15 $\mu\text{g/ml}$ del formulado Twin Pack Gold[®] ($P < 0,05$) (Tabla 3). Este formulado ejerció mayor efecto citotóxico que el principio activo FLC y que la formulación Rainbow[®] después de un pulso de tratamiento de 80 min.

Compuesto	Concentración (µg/ml)	Proporción de nucleoides (%)				% de células dañadas		Viabilidad (%)
		Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV	(II+III+IV)	IDG	
Control		80 ± 0,96	13 ± 0,64	4 ± 0,51	3 ± 0,44	20	1,35	100 ± 0,33
FLC	1	72 ± 5,85	14 ± 3,51	13 ± 2,02 **	1 ± 0,66	28	1,64 *	100 ± 0,33
	5	61 ± 2,40	20 ± 3,78	15 ± 3,17 **	4 ± 1,15	39 ***	1,89 ***	99 ± 1,33
	15	57 ± 3,17 *	26 ± 2,08	15 ± 2,60 **	2 ± 0,57	43 ***	1,92 ***	99 ± 0,88
Twin Pack Gold®	1	83 ± 1,45	9 ± 0,33	5 ± 0,88	3 ± 1,20	17	1,34	99 ± 0,58
	5	81 ± 1,33	8 ± 0,67	5 ± 0,67	6 ± 1,15	19	1,43	96 ± 3,00
	15	67 ± 2,33	12 ± 2,00	7 ± 0,33	14 ± 0,58 ***	33 **	1,79 ***	85 ± 3,00*
Rainbow®	1	80 ± 1,52	12 ± 0,57	7 ± 0,66	1 ± 0,66	20	1,38	100 ± 0,33
	5	67 ± 2,33	15 ± 1,33	11 ± 1,20	7 ± 0,33	33 **	1,76 ***	99 ± 1,00
	15	57 ± 1,85 *	15 ± 1,85	10 ± 0,00	18 ± 3,21 ***	43 ***	2,09 ***	91 ± 3,06
ACTN		83 ± 1,85	12 ± 2,00	3 ± 0,33	2 ± 0,33	17	1,16	99 ± 0,67
BLM		58 ± 1,53 **	17 ± 1,45 *	12 ± 1,20 *	13 ± 0,33 ***	42 ***	2,05 ***	98 ± 1,00

Tabla 3. Valores de proporción de células dañadas, IDG y porcentaje de viabilidad obtenidos en células CHO-K1 expuestas a FLC, Twin Pack Gold® y Rainbow® durante un pulso de 80 min. Bleomicina (BLM 1µg/ml): control positivo. ACTN 0,5%: control de solvente. * P<0,05; ** P<0,01; * P<0,001**

5.1a.7. Estudio del efecto de la vitamina E (α - tocoferol)

Los resultados del análisis del efecto de la Vit.E como compuesto con capacidad antioxidante luego de 2 h de preincubación con el mismo y 80 min de tratamiento con la mayor concentración empleada de FLC, Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] (15 μ g/ml), evaluando luego el daño ejercido mediante la metodología del EC y viabilidad celular, se presentan en la Tabla 4. No se observaron diferencias significativas en los resultados obtenidos en el EC entre los cultivos tratados y los cultivos previamente incubados con Vit.E ($P>0,05$). No obstante, se observó un efecto protector de la Vit.E cuando se analizó la viabilidad celular en aquellos cultivos tratados con el formulado Twin Pack Gold[®] ($P<0,05$) (Tabla 4). La Vit. E no fue capaz de revertir el efecto genotóxico ejercido por los compuestos estudiados, en cambio fue capaz de revertir el efecto citotóxico ejercido por el formulado Twin Pack Gold[®] en las células CHO-K1.

Compuesto	Concentración (mg/ml)	% de células dañadas ^a		% Viabilidad	
		(-) Vit. E	(+) Vit. E ^c	(-) Vit. E	(+) Vit. E ^c
Control negativo	0	20,86 \pm 1,28	24,08 \pm 0,62	99,40 \pm 0,49	98,6 \pm 1,56
ACTN ^b		21,00 \pm 1,22	24,24 \pm 2,45	98,50 \pm 1,54	98,33 \pm 1,45
FLC	15	35,33 \pm 3,84 ***	41,00 \pm 4,49 ***	99,5 \pm 0,56	97,33 \pm 2,60
Twin Pack Gold [®]	15	40,67 \pm 2,03 ***	38,00 \pm 4,04 ***	83,45 \pm 8,63 *	97,17 \pm 1,50
Rainbow [®]	15	52,00 \pm 3,51 ***	49,33 \pm 2,73 ***	97,37 \pm 2,66	98,12 \pm 1,03

Tabla 4. Análisis del daño de ADN medido mediante el ensayo cometa en células CHO-K1 expuestas 80 min a Flurocloridona (FLC), Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] con y sin preincubación con Vit. E. ^a, % de células dañadas = (nucleoides tipo II + III+ IV). ^bACTN, 0,1%: control de solvente. ^c, Las células CHO-K1 fueron preincubadas 2 h con Vit. E (50 μ g/ml) antes del tratamiento. * $P<0,05$; *** $P<0,001$

5.1b. LINEA CELULAR HepG2

5.1b.1. Estudio de la actividad lisosomal (ver Publicación 4)

La alteración en la integridad de la membrana celular de los lisosomas inducida por FLC y sus variantes comerciales fueron evaluadas mediante el ensayo de captación de Rojo Neutro luego de 24 h de tratamiento continuo. El control positivo, ETOH (5%), indujo una disminución significativa de la actividad lisosomal respecto de los valores control ($P < 0,001$) (Fig. 5). Se evidenció una disminución de la actividad lisosomal con respecto al control cuando los cultivos fueron tratados con 2,5-15 $\mu\text{g/ml}$ de Twin Pack Gold[®] ($P < 0,01$; $P < 0,001$) y con 5-15 $\mu\text{g/ml}$ de Rainbow[®] ($P < 0,001$) (Fig. 5). Por el contrario, no se observaron cambios en la viabilidad celular cuando los cultivos fueron expuestos a FLC ($P > 0,05$) (Fig. 5). Mediante un análisis de correlación se determinó que la inhibición de la actividad lisosomal ocurrió en función de las concentraciones de Twin Pack Gold[®] ($r = -0,93$; $P < 0,001$) y de Rainbow[®] ($r = -0,98$; $P < 0,001$) empleadas. El ensayo de RN demostró que ambos formulados comerciales fueron capaces de ejercer un efecto citotóxico mayor que el principio activo FLC en la línea celular HepG2.

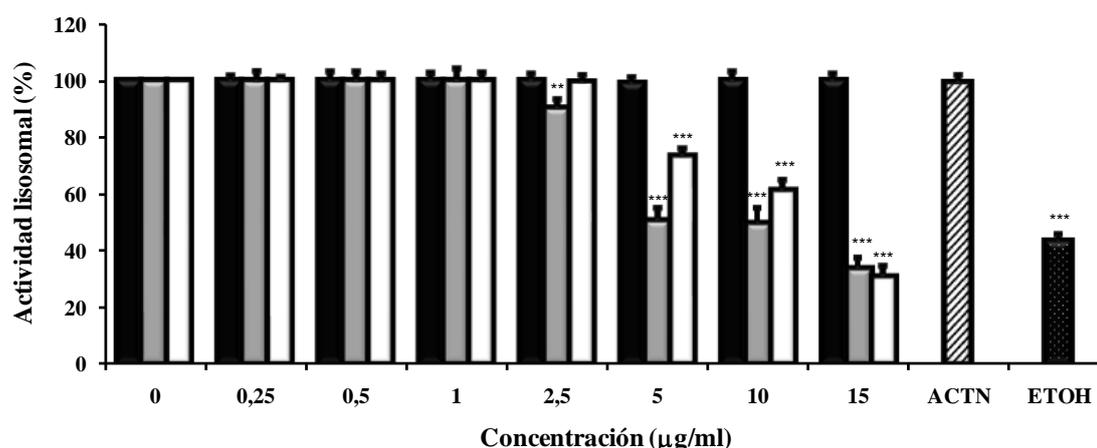


Fig. 5. Porcentaje de actividad lisosomal obtenido en células HepG2 expuestas a FLC (barras negras), Twin Pack Gold® (barras grises) y Rainbow® (barras blancas) durante 24 h. ETOH 5%: control positivo. ACTN 0,075%: control de solvente. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

5.1b.2. Estudio de la actividad mitocondrial (ver Publicación 4)

La alteración en el metabolismo energético inducido por FLC, Twin Pack Gold® y Rainbow® en la línea celular HepG2 se describe en la Fig. 6. El control positivo, ETOH (5%), indujo una disminución significativa de la actividad mitocondrial respecto de los valores control ($P<0,001$) (Fig. 6). Los resultados mostraron una disminución en el metabolismo celular cuando las células fueron expuestas a 5-15 µg/ml de Twin Pack Gold® ($P<0,001$) y a 15 µg/ml de Rainbow® ($P<0,001$) (Fig. 6). No se observó alteración estadísticamente significativa de la actividad mitocondrial cuando se ensayaron todas las concentraciones de FLC ($P>0,05$) (Fig. 6). Mediante un análisis de correlación se determinó que la inhibición de la actividad mitocondrial en los cultivos tratados ocurrió en función de las concentraciones de Twin Pack Gold® ($r=-0,89$; $P<0,01$) y Rainbow® ($r=-0,79$; $P<0,05$) empleadas. El ensayo de MTT puso de manifiesto que ambos formulados comerciales fueron capaces de ejercer un efecto citotóxico mayor que el principio activo FLC en la línea celular HepG2.

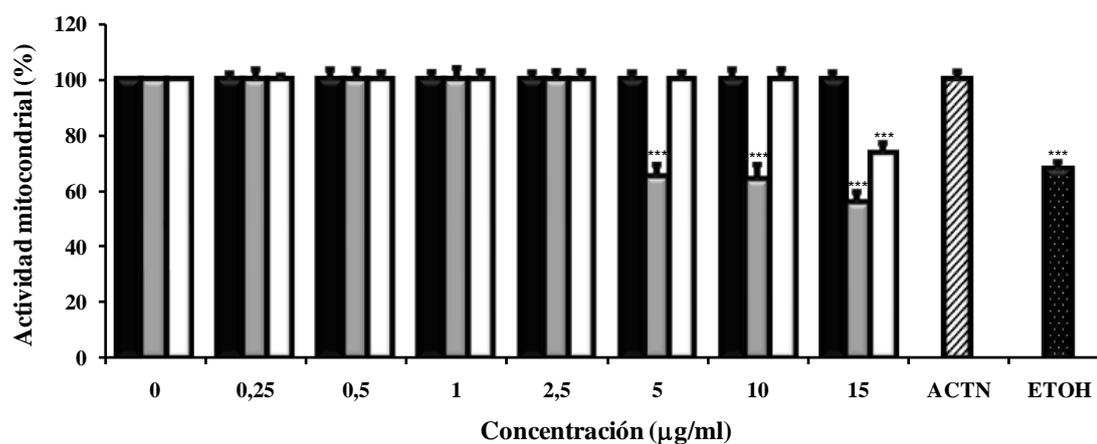


Fig. 6. Porcentaje de actividad mitocondrial obtenido en células HepG2 expuestas a FLC (barras negras), Twin Pack Gold® (barras grises) y Rainbow® (barras blancas) durante 24 h. ETOH 5%: control positivo. ACTN 0,075%: control de solvente. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

5.1b.3. Estudio de la frecuencia de MN (ver Publicación 4)

Los resultados obtenidos demuestran que el control positivo ciclofosfamida (0,2 mg/ml) indujo un aumento significativo de la frecuencia de MN en los cultivos tratados con respecto a los valores control ($P<0,001$) (Tabla 5). Tanto el principio activo FLC como su formulación comercial Rainbow® fueron incapaces de modificar la frecuencia de MN respecto de los valores control ($P>0,05$) (Tabla 5). Por el contrario, el formulado Twin Pack Gold® incrementó significativamente la frecuencia de MN con respecto a los valores control cuando los cultivos de células HepG2 fueron expuestos a 5 µg/ml ($P<0,05$) (Tabla 5). Cabe señalar que cuando los cultivos fueron tratados con concentraciones de 10-15 µg/ml de los formulados comerciales, se evidenciaron alteraciones morfológicas que no permitieron el monitoreo de la frecuencia de MN. Los resultados demostraron que, para una concentración dada, la capacidad de inducir MN en células HepG2 fue mayor para el formulado Twin Pack Gold® que para el principio activo FLC como para su formulación comercial Rainbow® ($P<0,05$).

Compuesto	Concentración (µg/ml)	Frecuencia de MN	Número de células micronucleadas (%)		
			1 MN	2 MN	3 MN
Control negativo	0	30,78 ± 1,88	26,56 ± 1,23	1,78 ± 0,49	0,22 ± 0,22
ACTN		29,50 ± 3,50	25,00 ± 4,00	1,50 ± 0,50	0,50 ± 0,50
FLC	0,25	33,00 ± 5,77	29,00 ± 4,62	2,00 ± 0,58	0,00 ± 0,00
	1	28,00 ± 5,29	26,67 ± 4,67	0,67 ± 0,33	0,00 ± 0,00
	5	29,33 ± 2,60	27,00 ± 1,15	0,67 ± 0,33	0,33 ± 0,33
	10	31,33 ± 2,67	26,33 ± 1,45	3,33 ± 2,33	0,33 ± 0,33
	15	35,50 ± 6,94	26,00 ± 4,90	2,50 ± 0,41	1,50 ± 0,41
Twin Pack Gold®	0,25	27,50 ± 3,67	26,50 ± 2,85	0,50 ± 0,40	0,00 ± 0,00
	1	33,30 ± 4,84	29,00 ± 1,73	1,67 ± 1,20	0,33 ± 0,33
	5	37,30 ± 5,78 *	31,33 ± 5,23	3,00 ± 1,52	0,00 ± 0,00
	10	ND			
	15	ND			
Rainbow®	0,25	24,67 ± 2,40	20,33 ± 3,28	1,67 ± 0,88	1,00 ± 3,28
	1	24,67 ± 0,88	22,67 ± 0,33	1,00 ± 0,58	0,00 ± 0,00
	5	27,00 ± 4,08	24,00 ± 4,90	1,50 ± 0,41	0,00 ± 0,00
	10	ND			
	15	ND			
CP		51,50 ± 4,50 ***	39,50 ± 3,50 **	4,50 ± 0,50	1,00 ± 0,00

Tabla 5. Valores de frecuencia de MN/1000 células expuestas a FLC, Twin Pack Gold® y Rainbow® durante 24 h. Ciclofosfamida (CP 0,2 mg/ml): control positivo. ACTN 0,5%: control de solvente. ND: no determinado. * P<0,05; ** P<0,01; *** P<0,001

5.1b.4. Estudio del EC, IDG y viabilidad celular (ver Publicación 4)

Las células HepG2 fueron expuestas a un pulso de 2 h de tratamiento tanto del principio activo como de sus dos formulaciones comerciales en concentraciones de 1, 5 y 15 µg/ml para luego someterlas a electroforesis en microgeles de agarosa, de acuerdo al protocolo convencional de la variante alcalina del EC. Los resultados de las proporciones de núcleos dañados, IDG y viabilidad celular se describen en la Tabla 6. La ciclofosfamida (0,2 mg/ml) fue capaz de incrementar la frecuencia de células dañadas como así también el IDG con respecto al control negativo, resultado dado principalmente por un aumento en la frecuencia de cometas tipo IV ($P < 0,001$) (Tabla 6). El principio activo FLC indujo un aumento en el IDG con todas las concentraciones ensayadas ($P < 0,001$). Cuando se realizaron análisis estadísticos se pudo demostrar que el incremento del IDG cuando se ensayó la concentración de 1 µg/ml de FLC fue debido principalmente al aumento de la frecuencia de cometas tipo IV ($P < 0,05$) y a la disminución de nucleoides tipo I ($P < 0,01$) (Tabla 6). De igual modo, el incremento del IDG cuando se ensayó la concentración de 5 µg/ml de FLC fue debido a un aumento en la frecuencia de cometas tipo IV ($P < 0,01$) y a una disminución de nucleoides tipo I ($P < 0,01$) (Tabla 6). Sin embargo, no se observaron diferencias en la proporción de los distintos tipos de cometas cuando la concentración de 15 µg/ml de FLC fue ensayada ($P > 0,05$) (Tabla 6). Ambos formulados comerciales indujeron un aumento en el IDG cuando se ensayaron las concentraciones de 1 ($P < 0,05$; $P < 0,01$), 5 ($P < 0,001$) y 15 µg/ml ($P < 0,05$; $P < 0,001$). Un análisis de la proporción de células dañadas pudo demostrar que sólo cuando la concentración de 5 µg/ml de ambos formulados fue ensayada se produjo un incremento de cometas tipo IV ($P < 0,05$) y una disminución de nucleoides tipo I ($P < 0,05$; $P < 0,01$) (Tabla 6). Un análisis de correlación demostró que

el número total de células dañadas inducido por FLC, Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] es independiente de la concentración empleada de los mismos (FLC, $r = 0,21$, $P > 0,05$; Twin Pack Gold[®], $r = 0,37$, $P > 0,05$; Rainbow[®], $r = 0,38$, $P > 0,05$).

Los resultados del estudio de viabilidad celular también se describen en la Tabla 6. FLC, Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] no alteraron la viabilidad celular con respecto al control cuando los cultivos de células HepG2 fueron tratados durante un pulso de 2 h ($P > 0,05$).

Genotoxicidad de herbicidas de importancia agroeconómica en Argentina

Compuesto	Concentración (µg/ml)	Proporción de nucleoides (%)				ADN dañado (%) (II+III+IV)	IDG	Viabilidad (%)
		Tipo I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV			
Control negativo	0	79,00 ± 3,60	14,00 ± 4,33	3,00 ± 0,33	4,00 ± 1,45	21,00 ± 3,61	1,34	90,66 ± 0,67
ACTN		80,50 ± 5,50	12,00 ± 5,00	4,50 ± 4,50	3,00 ± 0,00	19,50 ± 4,50	1,3	88,50 ± 6,94
FLC	1	37,00 ± 5,37 **	24,00 ± 4,53	17,00 ± 5,02	22,00 ± 6,32 *	63,00 ± 6,00 ***	2,24 ***	88,33 ± 4,18
	5	41,33 ± 6,77 **	22,67 ± 3,17	11,33 ± 2,40	24,67 ± 5,20 **	58,67 ± 5,00 ***	2,19 ***	87,00 ± 6,35
	15	51,00 ± 4,35	27,67 ± 3,75	7,67 ± 2,72	13,66 ± 2,33	49,00 ± 4,35 ***	1,84 ***	91,33 ± 2,33
Twin Pack Gold®	1	63,33 ± 6,76	22,67 ± 6,93	5,67 ± 2,33	8,33 ± 4,40	36,67 ± 6,76 **	1,59 *	91,66 ± 1,20
	5	29,33 ± 5,46 *	21,33 ± 6,00	15,67 ± 6,35	33,67 ± 7,63 *	70,67 ± 6,00 ***	2,54 ***	88,16 ± 3,00
	15	54,00 ± 4,16	21,67 ± 1,85	7,00 ± 3,00	17,33 ± 5,78	46,00 ± 4,50 ***	1,88 ***	80,66 ± 3,00
Rainbow®	1	63,33 ± 2,96	20,00 ± 2,64	3,67 ± 0,88	13,00 ± 5,56	36,67 ± 2,96 **	1,66 **	88,16 ± 5,53
	5	40,33 ± 4,42 **	19,33 ± 5,66	10,67 ± 2,33	29,67 ± 6,78 *	59,67 ± 4,27 ***	2,30 ***	99,00 ± 4,09
	15	64,67 ± 4,33	19,00 ± 4,16	5,33 ± 1,45	11,00 ± 4,50	35,33 ± 4,33 **	1,63 *	86,00 ± 4,51
CP		30,50 ± 5,5 **	23,50 ± 1,50	14,00 ± 2,00	32,00 ± 6,00 **	69,50 ± 5,50 ***	2,48 ***	88,00 ± 2,33

Tabla 6. Valores de proporción de células dañadas, IDG y porcentaje de viabilidad obtenidos en células HepG2 expuestas a FLC, Twin Pack Gold® y Rainbow® durante un pulso de 2 h. Ciclofosfamida (CP 0,2 mg/ml): control positivo. ACTN 0,5%: control de solvente. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

5.1b.5. Estudio de muerte celular por apoptosis (ver Publicación 4)

Los resultados del análisis de células apoptóticas medido mediante el ensayo de Anexina V-FITC, luego de 2 y 24 h de tratamiento con la mayor concentración empleada de FLC, Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] ensayada en los estudios previos realizados en este tipo celular (15 µg/ml), se presentan en la Tabla 7. El tratamiento con ACTN no modificó la frecuencia de células vivas, apoptóticas (tempranas y tardías) y necróticas a las 2 y 24 h de exposición a los compuestos ($P > 0,05$). En cambio, cuando se ensayaron los controles positivos mediante tratamiento con H₂O₂ y ETOH se observó un aumento en el porcentaje de células apoptóticas totales ($P < 0,001$).

Cuando los tratamientos fueron realizados al cabo de 2 h de exposición, no se observaron diferencias significativas con respecto al control negativo en el porcentaje de células apoptóticas y necróticas luego del tratamiento de células HepG2 con los compuestos en estudio ($P > 0,05$). Sin embargo, cuando las células fueron analizadas al cabo de 24 h de tratamiento continuo pudimos observar un incremento de células necróticas ($0,05 > P < 0,001$) y apoptóticas totales ($P < 0,05$; $P < 0,001$) respecto al control negativo en todos los cultivos tratados con FLC y ambos compuestos comerciales, aumento debido a un incremento de las células apoptóticas tempranas ($P < 0,001$) y una disminución de la frecuencia de células vivas sólo en Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] ($0,01 > P < 0,001$) (Tabla 7).

Sin embargo, no se observaron diferencias significativas con respecto al control negativo en la cuantificación de células apoptóticas tardías presentes en todos los tratamientos ($P > 0,05$) (Tabla 7).

Compuesto	Tiempo de exposición (h)	Porcentaje de células (%) ^a				
		vivas	apoptóticas tempranas	apoptóticas tardías	apoptóticas totales ^d	necróticas
Control negativo	2	91.25 ± 4.22	2.33 ± 0.94	3.54 ± 1.37	5.87 ± 2.31	2.88 ± 0.95
ACTN^b	2	93.50 ± 2.00	2.51 ± 0.32	2,31 ± 0,20	4,82 ± 0,24	2.68 ± 0.10
FLC	2	90,91 ± 0,61	1,97 ± 0,20	4,82 ± 1,07	6,80 ± 0,90	2.30 ± 0.51
Twin Pack Gold[®]	2	87,85 ± 2,17	1.11 ± 0.20	6.80 ± 2.90	7,92 ± 2,38	4.24 ± 0.56
Rainbow[®]	2	88,04 ± 1,87	2,05 ± 1,04	5,71 ± 1,68	7,76 ± 1,36	4.20 ± 0.67
H₂O₂^c	2	77,67 ± 2,05	2.23 ± 0.21	17.07 ± 2.58 ***	19.30 ± 2.78 ***	3.03 ± 0.73
Control negativo	24	87.10 ± 3.42	4.85 ± 0.82	4.55 ± 1.32	9.41 ± 1.09	3.49 ± 1.21
ACTN^b	24	87.82 ± 2.00	0.00 ± 0.00	10.00 ± 1.00	10.00 ± 0.24	2.17 ± 0.10
FLC	24	72.53 ± 2.23	5.46 ± 0.26 ***	11.68 ± 1.95	17.15 ± 1.45 *	10.32 ± 2.16 ***
Twin Pack Gold[®]	24	57.32 ± 3.77 **	28.17 ± 3.53 ***	7.09 ± 1.04	35.26 ± 2.59 ***	7.42 ± 0.97 *
Rainbow[®]	24	38.60 ± 2.95 ***	44.60 ± 3.60 ***	7.19 ± 0.89	51.80 ± 1.47 ***	9.59 ± 1.32 **
ETOH^e	24	73.14 ± 2.18	11.71 ± 2.18 **	10.33 ± 1.65 **	22.04 ± 2.77 ***	4.82 ± 1.69

Tabla. 7. ^a, Porcentaje de células vivas, apoptóticas y necróticas obtenido mediante el ensayo de Anexina V-FITC luego de la exposición de células HepG2 a 15 µg/ml de FLC, Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] durante 2 y 24 h. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

^b, ACTN 0,5%: control de solvente

^c, H₂O₂ (125 µM): control positivo 2 h

^d, apoptóticas totales: apoptóticas tempranas + apoptóticas tardías

^e, ETOH (5%): control positivo 24 h

5.2. Estudios *in vivo*

LARVAS DE *R. arenarum*

5.2.1. Estudios de la toxicidad aguda. Determinación de la CL50 (ver Publicación 3)

Los valores de CL50 obtenidos mediante el análisis de mortalidad con el método Probit fueron para las 48 h: 3,46 mg/L (IC95%, 3,34-4,09) para Twin Pack Gold[®] y 4,05 mg/L (IC95%, 3,54-8,41) para Rainbow[®] y para las 96 h: 2,96 mg/L (IC95%, 2,89-3,03) para Twin Pack Gold[®] y 2,85 mg/L (IC95%, 2,74-2,97) para Rainbow[®]. La mortalidad de los individuos expuestos en cada concentración fue estadísticamente significativa para ambos compuestos ($P < 0.05$).

5.2.2. Estudio de la frecuencia de MN (ver Publicación 3)

Los resultados del análisis de la frecuencia de MN en eritrocitos circulantes de larvas de *R. arenarum* expuestas a Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] se presentan en la Tabla 8. Los individuos tratados con el control positivo ciclofosfamida (40 mg/L) presentaron en los eritrocitos circulantes un aumento de la frecuencia de MN significativa con respecto al control negativo, tanto a las 48 como a las 96 h de exposición ($P < 0,001$). En cambio, las larvas tratadas con Twin Pack Gold[®] no mostraron diferencias en la frecuencia de MN con respecto al control con ninguna concentración ni tiempo de exposición ($P > 0,05$) (Tabla 8). Cuando los individuos fueron expuestos al formulado comercial Rainbow[®], la frecuencia de MN se incrementó con respecto a los valores obtenidos para el control negativo sólo con la menor concentración empleada (0,71 mg/L) a las 48 h de exposición ($P < 0,001$) (Tabla 8). Un análisis de correlación demostró que el aumento de la frecuencia de MN dada por el tratamiento con Rainbow[®] a las 48 h decrece como una función lineal dependiente de la concentración empleada ($r = -0,62$, $P < 0,001$).

Junto con el análisis de la frecuencia de MN se llevó a cabo el análisis de la frecuencia de anormalidades nucleares. Los eritrocitos circulantes de las larvas tratadas con las formulaciones Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] no presentaron diferencias significativas con respecto al control en la frecuencia de anormalidades nucleares encontradas a las 48 y 96 h de exposición con los compuestos en estudio ($P > 0,05$) (Dato no mostrado).

Compuestos	Concentración de exposición (mg/L)	Tiempo de exposición (h)	Número de animales observados	Número de células observadas	MN/1000 eritrocitos ± ES
Control negativo		48	15	15000	7,64 ± 1,24
		96	15	15000	7,00 ± 1,24
Twin Pack Gold®	0,74	48	15	15000	8,84 ± 1,39
		96	15	15000	9,89 ± 1,38
	1,48	48	15	15000	11,10 ± 0,99
		96	15	15000	11,20 ± 2,98
	2,22	48	15	15000	11,22 ± 1,77
		96	15	15000	11,88 ± 1,88
Rainbow®	0,71	48	15	15000	19,05 ± 1,84 ***
		96	15	15000	11,27 ± 1,10
	1,42	48	15	15000	9,13 ± 1,28
		96	15	15000	10,69 ± 1,81
	2,13	48	15	15000	11,03 ± 0,86
		96	15	15000	8,07 ± 0,80
CP	40	48	15	15000	17,50 ± 2,13 ***
		96	15	15000	17,42 ± 1,79 ***

Tabla 8. Valores de frecuencia de MN ± ES obtenidos en eritrocitos de larvas de *R.arenarum* expuestas a Twin Pack Gold® y Rainbow® durante 48 y 96 h. Ciclofosfamida (CP 40 mg/L): control positivo. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001

5.2.3. Estudio del daño en el ADN mediante el EC (ver Publicación 3)

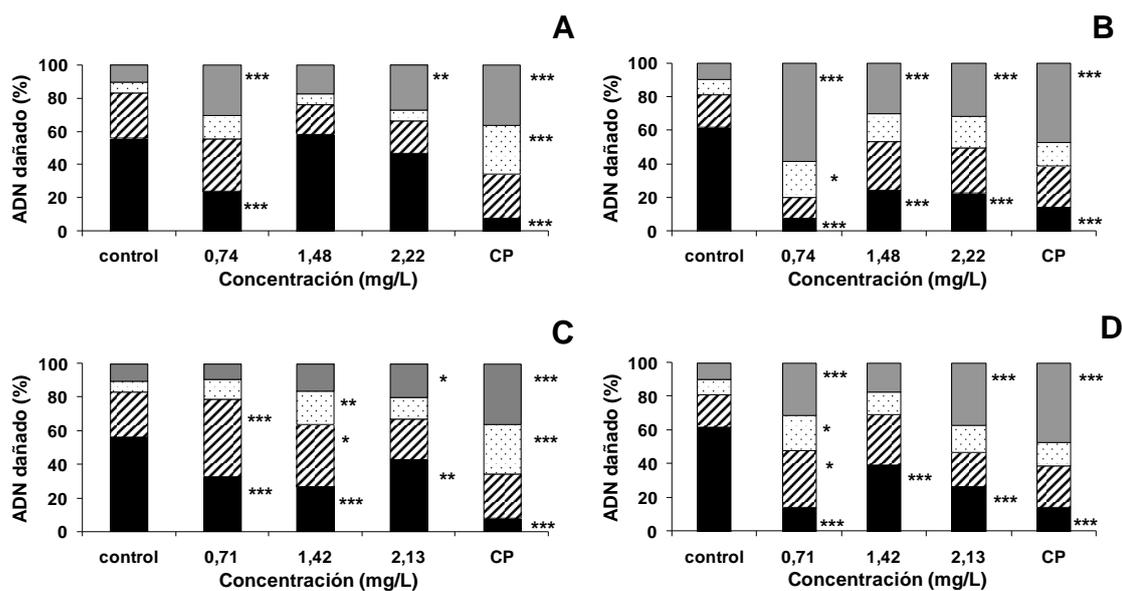
Los resultados del porcentaje de células dañadas y del IDG luego de la exposición de los individuos a los compuestos y la realización del EC se presentan en la Tabla 9. Los resultados de la proporción de células sanguíneas para cada tipo de daño se presentan en la Fig 7. Los individuos tratados con el control positivo ciclofosfamida (40 mg/L) presentaron un incremento en sus células sanguíneas circulantes del IDG, como así también en la frecuencia de células dañadas a las 48 y 96 h de exposición con respecto al control negativo ($P < 0,001$). En los individuos expuestos a 0,74 mg/L y 2,22 mg/L de Twin Pack Gold[®] se incrementó el IDG a las 48 h de exposición con respecto a los valores control ($P < 0,001$ y $P < 0,01$, respectivamente). Cuando el análisis se realizó en los individuos luego de 96 h de exposición, todas las concentraciones empleadas indujeron un aumento en el IDG, como así también en la frecuencia de células dañadas ($P < 0,001$). Un análisis de correlación demostró que el IDG varía como una función negativa de la concentración empleada de Twin Pack Gold[®] durante las primeras 48 h de exposición ($r = -0,43$, $P < 0,01$), pero no a las 96 h ($r = 0,05$, $P > 0,05$). Los individuos tratados con el formulado Rainbow[®] presentaron un aumento significativo del IDG y de la frecuencia de células dañadas con todas las concentraciones ensayadas y en ambos tiempos de exposición ($P < 0,05$; $P < 0,001$). Un análisis de correlación demostró que el IDG varía como una función negativa de la concentración empleada de Rainbow[®] a las 48 ($r = -0,44$, $P < 0,01$) y a las 96 h de exposición ($r = 0,40$, $P < 0,05$).

Compuestos	Dosis de exposición (mg/L)	Tiempo de exposición(h)	Número de animales observados	% de células dañadas (II+III+IV) ± ES	IDG
Control negativo		48	15	43,64 ± 3,93	1,70
		96	15	38,13 ± 5,04	1,66
Twin Pack Gold®	0,74	48	15	76,00 ± 5,42 ***	2,51 ***
		96	15	91,92 ± 4,00 ***	3,30 ***
	1,48	48	15	41,87 ± 5,19	1,83
		96	15	75,38 ± 3,82 ***	2,52 ***
	2,22	48	15	52,86 ± 5,24	2,13 **
		96	15	77,08 ± 5,16 ***	2,59 ***
Rainbow®	0,71	48	15	66,92 ± 3,51 ***	1,98 *
		96	15	85,77 ± 4,73 ***	2,69 ***
	1,42	48	15	72,85 ± 3,58 ***	2,25 ***
		96	15	60,46 ± 4,30 **	2,08 **
	2,13	48	15	57,08 ± 5,13 *	2,10 **
		96	15	73,14 ± 2,70 ***	2,63 ***
CP	40	48	15	92,00 ± 1,58 ***	2,93 ***
		96	15	85,88 ± 3,22 ***	2,94 ***

Tabla 9. Valores de proporción de células dañadas e IDG obtenidos a partir de eritrocitos de *R.arenarum* expuestas a Twin Pack Gold® y Rainbow® durante 48 y 96 h. Ciclofosfamida (CP 40 mg/L): control positivo. * P<0,05; ** P<0,01; * P<0,001**

La Fig.7 grafica la distribución del daño del ADN en las categorías de daño establecidas para el análisis del EC. Podemos apreciar que en aquellos casos en los que hubo un incremento del IDG, el mismo estuvo dado por un incremento de células dañadas tipo II, III y IV en detrimento de una disminución de nucleoides normales tipo I. Además, podemos ver que esta distribución no es homogénea y depende del compuesto, la concentración y el tiempo de exposición ensayado. Sin embargo, podemos confirmar que independientemente del tipo de daño, los dos compuestos fueron capaces de incrementar de manera significativa ($P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$) la frecuencia de rupturas de cadena simple en el ADN de los eritrocitos circulantes luego del tratamiento.

Podemos afirmar que los formulados comerciales Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] son capaces de producir daño en el ADN de células circulantes sanguíneas de larvas de *R. arenarum* expuestas durante 48 y 96 h a las concentraciones ensayadas en condiciones controladas de laboratorio.



6. DISCUSIÓN

Las investigaciones llevadas a cabo durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, aportan información sobre los efectos deletéreos ejercidos por el herbicida flurocloridona y dos de sus variantes comerciales empleadas actualmente en el agro argentino como son Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®], ambas conteniendo 25% del principio activo en su formulación. Nuestros estudios fueron llevados a cabo en modelos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo* mediante el uso de biomarcadores de genotoxicidad y citotoxicidad. Asimismo, se realizaron ensayos orientados a esclarecer cuales serían los posibles mecanismos de acción responsables de ejercer el efecto genotóxico y citotóxico por parte de dichos compuestos en los sistemas biológicos empleados.

Los efectos genotóxicos ejercidos por los compuestos mencionados fueron analizados mediante el empleo de biomarcadores de efecto tales como el análisis de la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas (ICHs), la variante alcalina del ensayo cometa (EC) y el ensayo de micronúcleos (MN).

Los resultados *in vitro* demostraron que en la línea celular CHO-K1 todos los compuestos ensayados con concentraciones de 0,25-15 µg/ml fueron capaces de incrementar la frecuencia basal de ICHs. En síntesis, la capacidad de los compuestos para inducir ICHs fue en el siguiente orden: Twin Pack Gold[®] > FLC > Rainbow[®]. Es de destacar que el formulado comercial Twin Pack Gold[®] fue el único compuesto capaz de incrementar la frecuencia de MN cuando se empleó la concentración de 5 µg/ml. Cabe mencionar que las mayores concentraciones ensayadas (10-15 µg/ml) de ambos formulados resultaron ser citotóxicas para este modelo de estudio, produciendo

cambios morfológicos celulares, rupturas de la membrana plasmática y alteraciones nucleares que no permitieron determinar la frecuencia de MN. Finalmente, todos los compuestos fueron capaces de inducir rupturas de cadena simple y/o sitios álcali sensibles en el ADN de las células CHO-K1, evidenciados mediante la variante alcalina del EC, independientemente de las concentraciones ensayadas.

Los resultados obtenidos en la línea celular de hepatocarcinoma humano HepG2 mostraron, al igual que en las células CHO-K1, que sólo el formulado Twin Pack Gold[®] fue capaz de incrementar la frecuencia de MN con la concentración de 5 µg/ml. Al igual que lo acontecido en células CHO-K1, la frecuencia de MN no pudo ser analizada con concentraciones de 10-15 µg/ml de ambos formulados comerciales debido a la aparición de alteraciones en la morfología celular. Finalmente, todos los compuestos fueron capaces de inducir rupturas de cadena simple en el ADN de las células HepG2 con todas las concentraciones ensayadas, efecto evidenciado mediante la variante alcalina del EC.

Los efectos citotóxicos fueron evaluados mediante el análisis de la progresión del ciclo celular, el índice de proliferación celular (IPC), el índice mitótico (IM), el índice de división nuclear (IDN), ensayos colorimétricos de captación de Rojo Neutro y MTT (RN y MTT, respectivamente) y el estudio de muerte celular programada o apoptosis. En la línea celular CHO-K1, fue factible observar que el IPC decrece en función de la concentración empleada de todos los compuestos, destacándose que, la capacidad de ambas formulaciones comerciales de inducir retraso en la progresión del ciclo celular siempre fue mayor que la ejercida por la misma concentración del principio activo FLC. Adicionalmente, se observó una actividad inhibidora de la mitosis por parte tanto del principio activo FLC como de los formulados comerciales

Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®]. Los resultados también revelaron la capacidad de la formulación comercial Rainbow[®] de inducir una mayor inhibición de la actividad mitótica para una concentración dada la cual siempre fue más marcada que la inducida por FLC o Twin Pack Gold[®] en este modelo de estudio. Asimismo, se observó una marcada reducción de la actividad mitocondrial principalmente con las mayores concentraciones ensayadas de todos los compuestos. El empleo del ensayo de RN, puso en evidencia que únicamente la formulación comercial Rainbow[®] fue capaz de ejercer un efecto citotóxico a nivel lisosomal. Los estudios de viabilidad celular mediante técnicas de coloración con naranja de acridina-bromuro de etidio demostraron que los formulados comerciales resultaron ser más citotóxicos que el principio activo FLC.

En cuanto a la actividad citotóxica en células HepG2 se observó una reducción de la actividad mitocondrial con 5-15 µg/ml de Twin Pack Gold[®] y 15 µg/ml de Rainbow[®]. Del mismo modo, la actividad lisosomal se vió afectada sólo por los formulados comerciales, pero no por el principio activo. El ensayo de Anexina V-FITC permitió determinar la inducción de apoptosis luego de un tratamiento continuo de 24 h de exposición para todos los compuestos analizados.

En cuanto a los estudios *in vivo*, los valores de CL50_{96 h} obtenidos para larvas de *R. arenarum* fueron semejantes, alcanzando valores de 2,96 mg/L y 2,85 mg/L para Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®], respectivamente. Asimismo, sólo el formulado Rainbow[®] fue capaz de incrementar la frecuencia de MN con la concentración de 0,71 mg/L a las 48 h de exposición. Sin embargo, el EC permitió determinar la capacidad genotóxica de ambas formulaciones en larvas expuestas tanto durante 48 como 96 h a los mismos.

Cabe resaltar que nuestras investigaciones constituyen la primera evidencia del uso de biomarcadores de efecto genotóxico y citotóxico para evaluar la capacidad deletérea ejercida por el herbicida FLC y dos de sus variantes comerciales Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] utilizadas actualmente en el agro de nuestro país en modelos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo*.

6.1. Estudios *in vitro*

Uno de los biomarcadores de genotoxicidad empleado en la presente Tesis Doctoral fue la prueba de ICHs, la cual es utilizada por su sensibilidad y versatilidad en la detección de daño cromosómico producido por factores químicos, físicos y/o biológicos (Carballo y *col.*, 2006). Este bioensayo constituye una de las metodologías más utilizadas mundialmente debido a que se ha demostrado una estrecha relación entre el incremento de la frecuencia de ICHs y el aumento en la tasa de eventos mutacionales y carcinogénicos (Popescu y *col.*, 1977; Carrano y *col.*, 1978; Larramendy y *col.*, 1981; Tucker y *col.*, 1993; Wilson y Thompson, 2007). Si bien el mecanismo de formación de ICHs aún no está completamente dilucidado, una de las teorías que ha sido propuesta para explicar cómo acontecen los mismos es el modelo de replicación propuesto por Painter (1980). Según este modelo, se propone que durante el período S, las rupturas de cadena doble serían generadas en los sitios de inicio de los replicones donde coexisten regiones parcial y completamente duplicadas de ADN. Por consiguiente, aquellos agentes capaces de inducir un bloqueo total o un retraso en el desplazamiento de la horquilla de replicación del ADN van a permitir por más tiempo, la coexistencia de rupturas de cadena doble en los sitios de replicación, favoreciendo a una recombinación anormal de las cadenas de ADN con la consecuente

aparición de ICHs. Contrariamente, los agentes que inhiban el inicio de la replicación van a disminuir la posibilidad de la formación de ICHs. Esta hipótesis fue comprobada experimentalmente a nivel citogenético en linfocitos humanos *in vitro* por Bianchi y Larramendy (1983). Por otra parte, investigaciones recientes sugieren, asimismo, que los ICHs ocurrirían principalmente por mecanismos de recombinación homóloga asociados a la replicación del ADN (Wilson y Thompson, 2007). Según Wilson y Thompson (2007) los ICHs se originarían según ocurra la resolución del intermediario de Holliday tras el retraso de la horquilla de replicación al encontrar una rotura de cadena simple en el ADN. Se conoce, además, que en este mecanismo están involucradas proteínas que participan en las vías relacionadas con la reparación por escisión de bases y en la reparación de rupturas de cadena simple, formas más frecuentes de daño espontáneo de ADN, así como proteínas reguladoras implicadas en el mecanismo de recombinación homóloga (Wilson y Thompson, 2007). Sumado a los mecanismos antes descriptos, es conocido que existen diferentes agentes capaces de producir cortes adicionales en la horquilla de replicación y de esta forma, incrementan la inestabilidad del material genético (Krishna y *col.*, 1988; Stagos y *col.*, 2005; Concetta y *col.*, 2011). De acuerdo a este criterio, si existe un incremento de las rupturas de cadena simple, habría una frecuencia elevada de ICHs. Teniendo en cuenta lo anterior, puede sugerirse que el mecanismo mediante el cual FLC produciría ICHs podría ser debido a uno(s) de(los) mecanismos anteriormente planteados que involucren un retraso en el desplazamiento de la horquilla de replicación, por la producción de rupturas de cadena simple o bien por alteraciones en las proteínas involucradas en este proceso y así incrementar la frecuencia de ICHs. Asimismo, es dable destacar que la exposición a las mayores concentraciones ensayadas de los

formulados comerciales fueron capaces de inducir un alargamiento del ciclo celular, evidenciado por la alta frecuencia de células en su primera división mitótica, motivo por el cual no fue posible analizar la frecuencia de ICHs en esas concentraciones. Nuestros resultados evidencian que FLC, Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] son agentes inductores de ICHs, poniendo de manifiesto la capacidad de inducir inestabilidad genómica, al menos cuando el análisis de la frecuencia de ICHs es empleado como bioensayo de genotoxicidad en células CHO-K1.

Es bien conocido que en la actualidad uno de los biomarcadores de efecto más empleados a nivel mundial es el análisis de la frecuencia de MN, desarrollado para el estudio y caracterización de agentes genotóxicos, ya sea en ensayos *in vitro* e *in vivo* como también en estudios de monitoreo ambiental (Mudry y Carballo, 2006). Este biomarcador permite la detección de pequeños fragmentos cromosómicos o cromosomas acéntricos en células interfásicas inducidos por agentes clastogénicos, o cromosomas enteros que han quedado rezagados en anafase-telofase luego de la acción de un agente aneugénico que afecta la segregación normal de los cromosomas durante la división celular (OECD, 2010). Dada las características de esta metodología, el análisis de la frecuencia de MN debe ser restringido a células que atravesaron la primera división mitótica después del tratamiento con agente bajo estudio (Fenech, 2007).

En el presente trabajo de Tesis Doctoral la frecuencia de MN fue analizada en células de las líneas celulares CHO-K1 y HepG2. Los resultados han puesto en evidencia que en ambas líneas celulares sólo el formulado Twin Pack Gold[®] fue capaz de inducir MN con la concentración de 5 µg/ml. Por lo tanto, sería válido suponer que FLC no sería capaz de inducir MN *per se* en ambas líneas celulares. Asimismo,

nuestros resultados podrían estar indicando que el efecto diferencial inducido por Twin Pack Gold[®] estaría determinado por un xenobiótico con capacidad clastogénica y/o aneugénica formando parte del excipiente de dicha formulación. Sin embargo, no podríamos descartar otras posibles hipótesis para explicar estas observaciones. En cuanto al no incremento de la frecuencia de MN en los tratamientos con FLC, podrían sugerirse varias explicaciones para explicar este efecto: 1) aquellas células dañadas serían incapaces de continuar con su ciclo celular, quedando detenidas en el momento del daño, por lo tanto, no podrían finalizar el primer ciclo de división celular, impidiendo de esta manera, su posterior inclusión en el análisis celular; 2) ambas líneas celulares CHO-K1 y HepG2 podrían ser capaces de reparar el daño inducido por FLC durante el primer ciclo celular; 3) FLC no produciría rupturas de doble cadena en el ADN ni otro tipo de macrolesiones que lleven a la formación de MN. Hasta el momento, no contamos con ninguna evidencia experimental que nos permita dilucidar cuáles de estas propuestas sería la adecuada para explicar el efecto observado.

Nuestros resultados también ponen en evidencia que concentraciones de 10 y 15 µg/ml de los formulados comerciales, independientemente de la línea celular empleada como modelo experimental, se comportaron de manera similar. En todos los casos fue factible observar, bajo estas condiciones, una alta citotoxicidad en los cultivos tratados que impidió el monitoreo de MN en las células bajo dichos tratamientos. La citotoxicidad fue evidenciada por cambios morfológicos tanto nucleares como citoplasmáticos. Entre dichos cambios se observaron pérdida de integridad de la membrana celular, imposibilitando, de acuerdo a los criterios establecidos, la inclusión de este tipo celular en un registro de análisis (Fenech, 2000, 2007). Cabe aclarar, que

dichas alteraciones morfológicas no fueron evidenciadas en ninguno de los cultivos tratados con el principio activo FLC.

El EC fue otro de los biomarcadores de efecto empleados durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral. El mismo es ampliamente utilizado para caracterizar las propiedades genotóxicas de xenobióticos en diferentes tipos celulares tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (Jha, 2008; Concetta y col., 2011; Vera Candiotti y col., 2013). Es un método sencillo, rápido y sensible (Singh y col., 1988, 1996). Existen varias investigaciones que han demostrado la mayor sensibilidad del EC en la detección de daño genotóxico ante la exposición a diversos agentes en comparación con el empleo de otros biomarcadores de efecto, incluyendo al ensayo de MN. Observaciones previas de otros grupos de investigación avalan este enunciado. Así, podemos mencionar que Moretti y colaboradores (2002) demostraron la sensibilidad del EC al evaluar la genotoxicidad del herbicida terbutrin en linfocitos de sangre periférica humana; Cavalcante y colaboradores (2008) evaluaron la genotoxicidad ejercida por una formulación comercial de glifosato en ejemplares de sábalos (*Prochilodus lineatus*), concluyendo que el EC fue más sensible que el ensayo de MN para detectar el daño inducido por el agente en estudio; Heuser y colaboradores (2002) demostraron la sensibilidad del EC con respecto al de MN al evaluar la toxicidad ejercida por emisiones vehiculares sobre eritrocitos de sangre periférica del roedor *Ctenomys minutus* y Andrade y colaboradores (2004) también avalaron la sensibilidad del EC al estudiar la genotoxicidad ejercida por contaminantes ambientales en diferentes especies de peces.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral podemos afirmar que el EC fue el ensayo más sensible para evaluar el daño inducido

por FLC y sus variantes comerciales tanto en los sistemas *in vitro* como *in vivo*, sistema este último al cual nos referiremos en detalle posteriormente. Claramente los resultados demostraron, a diferencia del ensayo de MN, que FLC, Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] son agentes capaces de inducir rupturas de cadena simple y/o sitios álcali sensibles en la molécula de ADN. Una posible explicación para esta observación podríamos relacionarla con el estado celular requerido para la evaluación de daño diferencial entre el EC y el ensayo de MN dado el tipo de lesiones que son detectadas por cada uno de los mismos. Mientras que, el daño en el ADN es estimado en el EC en células independientemente del momento del ciclo celular en el cual se encuentran, en otros ensayos como lo es el de MN, se requiere que la célula sea analizada luego de realizar al menos un ciclo de división celular después de la inducción del daño y que las lesiones hayan perdurado durante al menos dicho lapso de proliferación (Fenech, 2007). Como hemos mencionado anteriormente, por su parte, el ensayo de MN permite detectar daño en el ADN causado tanto por agentes clastogénicos que originan la aparición de fragmentos cromosómicos o cromosomas acéntricos, como por agentes aneugénicos que son capaces de inducir la pérdida de cromosomas enteros que han quedado rezagados en anafase-telofase mitótica (OECD, 2010). La versión alcalina del EC permite, por otro lado, la identificación de lesiones provenientes de la inducción de rupturas de cadena simple en la molécula de ADN y/o de sitios sensibles al álcali (Singh y col., 1988). Los resultados de nuestros estudios *in vitro* demostraron que la línea celular CHO-K1 fue sensible en este ensayo a todos los compuestos y concentraciones ensayadas, siendo el daño dependiente de la concentración empleada, en otras palabras, al aumentar la concentración del xenobiótico se observó un incremento en el daño inducido. Por el contrario, en el caso de las células HepG2

observamos que el mayor daño se indujo con concentraciones intermedias (5 µg/ml) y que a concentraciones mayores, tanto del principio activo como de los formulados estudiados, el daño fue menor. Podríamos plantear una hipótesis posible para explicar estos resultados. Las células HepG2 podrían ser capaces de reparar el daño inducido a través de la activación del mecanismo de reparación SOS cuando las mismas alcanzan un nivel umbral de daño. Estudios previos informados por Rodriguez-Ferreiro y colaboradores (2001) en linfocitos humanos tratados *in vitro* con el antiparasitario tinidazol proponen este mecanismo de reparación frente a resultados similares a los nuestros. Por otra parte, los resultados del EC pondrían en evidencia una respuesta diferencial de las líneas celulares frente a un mismo compuesto. Existen numerosos estudios de toxicidad que demuestran que la sensibilidad de una línea celular empleada como modelo de evaluación de daño depende, entre otros factores, del agente tóxico en estudio, de la concentración empleada del mismo, al igual que de las características intrínsecas, así como del origen de la línea celular (Cetin y Bullerman, 2005; Winter y col., 2008; Westerink y col., 2011; De Marzi y col., 2013). Por lo expuesto, no podríamos descartar ninguna de estas posibilidades como agente causal para explicar las diferencias encontradas en los resultados entre ambas líneas celulares en estudio.

Es sabido que una de las respuestas celulares más importantes ante la exposición de agentes con capacidad genotóxica es el retraso en la progresión del ciclo celular (Galloway y col., 1987; Yang y col., 2003; Olivera y col., 2007). También se sabe que la inducción de lesiones en el ADN ocasiona la activación de puntos de control del ciclo celular que regulan la progresión a través del mismo; de esta manera las células quedan detenidas para tratar de reparar el daño y evitar así, la transmisión de información genética incorrecta a las células hijas (Houtgraaf y col., 2006). Una de las

metodologías más empleadas para analizar la progresión del ciclo celular a nivel citogenético es el denominado método BrdUrd-Giemsa (Perry y Wolff, 1974). El mismo está basado en la incorporación en la molécula de ADN de un análogo de base siendo el más empleado la BrdUrd, análogo de la timina. Asimismo, esta incorporación le confiere al material genético una propiedad tintórea particular, resultando que la intensidad de coloración con el colorante Giemsa es inversamente proporcional a la concentración del análogo de base incorporado en la molécula de ADN de un cromosoma mitótico. De esta manera, y gracias a la duplicación semi conservativa de la molécula de ADN, es factible determinar el número de ciclos celulares que una célula ha realizado en un lapso determinado en presencia del análogo de base, y por consiguiente, estudiar la cinética de proliferación celular debido a la tinción diferencial encontrada en los cromosomas de células que han pasado por uno, dos o más ciclos de división. Mediante su empleo se pudo determinar que FLC, a una concentración máxima de 15 µg/ml induce una reducción del IPC y que ambos formulados comerciales ejercieron el mismo efecto a partir de concentraciones menores. Esta disminución del IPC podría deberse a varios factores. Entre los mismos se podría incluir en primer lugar una pérdida selectiva de parte de la población celular por muerte de células altamente dañadas en los cultivos tratados, donde sólo las células levemente dañadas y/o no dañadas serían capaces de proliferar y realizar un segundo ciclo celular en el lapso de cultivo. Sin embargo, esta posibilidad podría ser descartada para los tratamientos con FLC, ya que la proporción de células viables tras la exposición a los compuestos se encontró significativamente reducida sólo en aquellos cultivos expuestos a 15 µg/ml de los formulados comerciales, pero no en aquellos tratados con el principio activo. Finalmente, podría también postularse que

las células dañadas no serían capaces de reparar el daño inducido y por consiguiente, quedar detenidas en el primer ciclo celular luego del tratamiento *in vitro*. La capacidad de las células de quedar detenidas en puntos de control del ciclo celular tras una lesión producida por la exposición a pesticidas es un hecho bien documentado, como lo hemos mencionado anteriormente y podría explicar los resultados obtenidos en nuestras investigaciones (Soloneski y *col.*, 2002; González y *col.*, 2006; Molinari y *col.*, 2009).

Con respecto al análisis del IM, los resultados obtenidos en el presente estudio de Tesis Doctoral demuestran la existencia de una disminución del mismo ante la exposición a los compuestos, remarcando nuevamente que para ambos formulados la reducción del IM ocurrió a partir de concentraciones menores que el principio activo. Asimismo, todas las concentraciones ensayadas de Rainbow[®] causaron una disminución en el IM demostrando ejercer éste una mayor citotoxicidad que los otros compuestos. Nuestros hallazgos concuerdan con los datos obtenidos por Yüzbasıoğlu y *col.* (2003) quienes, si bien trabajaron con otro modelo de estudio como es *Allium cepa*, observaron una acción inhibitoria de la mitosis por parte de FLC. Según los mismos autores, el herbicida interferiría con el normal funcionamiento del ciclo celular reduciendo el número de células que entran en división debido a que impide que las mismas entren en el período S, el cual es uno de los mayores requisitos para que una célula se divida. Por otra parte, los autores sugieren que este herbicida podría interferir en la acción de ciertas proteínas específicas involucradas en el control del ciclo celular, como por ejemplo la ADN polimerasa, u otras proteínas implicadas en la producción, ensamble u orientación del huso mitótico (Yüzbasıoğlu y *col.*, 2003). Nuestros resultados concuerdan con los hallazgos de estos autores, ya que luego del

tratamiento con FLC se observó un marcado alargamiento del ciclo celular en las células CHO-K1 que corroboran la acción mitodepresiva y citotóxica por parte de los compuestos estudiados.

Ciertos métodos colorimétricos como el MTT y RN son actualmente muy utilizados dado que permiten medir cuantitativamente la actividad metabólica de las células viables expuestas a un tóxico, de manera rápida y precisa, siendo aplicable a aquellas células que crecen adheridas a un sustrato (Borenfreund y Puerner, 1985; Kosmider y *col.*, 2004). En el presente trabajo de Tesis Doctoral hemos empleado estos métodos en las líneas celulares CHO-K1 y HepG2. Los resultados han puesto en evidencia que FLC sería capaz de inducir citotoxicidad alterando el metabolismo energético celular. Además, se observó que la alteración de la actividad mitocondrial se incrementó al evaluar los formulados comerciales en relación al principio activo, al igual que la existencia de diferentes respuestas a un mismo tratamiento por parte de las líneas celulares empleadas. De este modo, cuando los compuestos fueron evaluados en la línea celular HepG2, se pudo determinar que el efecto citotóxico observado para una misma concentración siempre fue menor que el hallado en la línea celular CHO-K1. Asimismo, es de destacar la ausencia de efecto citotóxico, el cual fue solamente observado en las células HepG2 cuando fueron tratadas con el principio activo pero no en células CHO-K1. Se conoce que las células HepG2 se caracterizan por ser un material idóneo para el estudio de tóxicos en general, dado que su comportamiento podría ser considerado emulador de un sistema *in vivo* (Uhl y *col.*, 2000). En presencia de un sistema enzimático capaz de biotransformar, como el presente en las células HepG2, los xenobióticos, entre ellos los pesticidas, pueden comportarse de diversas formas según sea su modo de acción (Repetto y Khun, 2009).

De esta manera, un xenobiótico puede ver disminuida su toxicidad, proceso denominado bioinactivación o detoxificación, o por el contrario verla incrementada o aumentarla, proceso denominado bioactivación. En esta última, los efectos tóxicos provienen de metabolitos reactivos formados a partir del compuesto patrón. Esta biotransformación de compuestos inertes a metabolitos reactivos con una toxicidad mayor que la de los compuestos originales se denomina activación metabólica, bioactivación o toxificación (Repetto y Khun, 2009). Los resultados del presente Trabajo de Tesis Doctoral, pondrían en evidencia que el efecto tóxico ejercido por FLC a nivel de la actividad mitocondrial *in vitro* podría verse atenuado mediante un mecanismo de detoxificación o bioinactivación ejercido por el complejo enzimático presente en las células HepG2. Por otra parte, sólo los formulados comerciales en ambos sistemas celulares fueron capaces de generar daño a nivel de la actividad lisosomal, siendo en ambos casos el daño dependiente de la concentración empleada. Por este motivo, estaríamos en condiciones de sugerir que dicho efecto deletéreo estaría ejercido por la presencia, en las formulaciones comerciales, de algún compuesto con capacidad de inducir daño lisosomal.

Uno de los objetivos de nuestras investigaciones fue analizar si los compuestos en estudio podrían inducir muerte celular programada conocida como apoptosis. Para cumplimentar con el mismo, utilizamos la técnica de Anexina V-FITC la cual permite estimar eventos apoptóticos y evaluar a nivel de población celular la frecuencia de células vivas normales, de apoptóticas tempranas y tardías al igual que de células necróticas. Para entender el fundamento de esta metodología, debemos tener en cuenta que normalmente los fosfolípidos se distribuyen de forma asimétrica a través de la bicapa lipídica de la membrana plasmática de las células eucariotas (Daleke, 2003). De

esta forma, la fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y el fosfatidilinositol se localizan en la cara interna de la membrana plasmática, mientras que la fosfatidilcolina y la esfingomielinina se encuentran en la cara externa de la misma (Daleke, 2003). La exposición de la fosfatidilserina en la superficie celular es una característica conservada del mecanismo de apoptosis, aunque aún se desconocen los mecanismos moleculares que lo conducen, y desempeña un importante papel en la promoción de la eliminación de las células apoptóticas por fagocitosis (Van den Eijnde y *col.*, 1988; Daleke, 2003). Esta metodología se basa en el hecho de que al externalizarse la fosfatidilserina y bajo ciertas concentraciones de calcio, la molécula de Anexina V tiene afinidad específica por este fosfolípido. Existen en la literatura numerosas investigaciones que avalan el uso de este ensayo para detectar eventos apoptóticos tempranos tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo* (Zullig y *col.*, 2007; Alok y *col.*, 2012; Martini y *col.*, 2012; Takaoka-Sugihara y *col.*, 2012). Así, podemos mencionar el empleo de este modelo para detectar procesos apoptóticos en *Caenorhabditis elegans* (Zullig y *col.*, 2007), *Acanthamoebae sp.* (Takaoka-Sugihara y *col.*, 2012), fibroblastos murinos provenientes de la línea celular 3T3-L1 (Martini y *col.*, 2012) y diversas líneas celulares derivadas de neoplasias humanas (Alok y *col.*, 2012), entre otros.

Los resultados obtenidos mostraron que los tres compuestos no causaron una inducción significativa de procesos apoptóticos luego de 2 h de tratamiento de las células HepG2, si bien se observó una tendencia al aumento de células necróticas y apoptóticas totales. En cambio, al cabo de 24 h de exposición, los resultados pusieron en evidencia que el herbicida FLC, tanto en su variante pura como formando parte de los formulados comerciales, fue capaz de incrementar la frecuencia de células apoptóticas. Hemos destacado anteriormente la aparición de cambios morfológicos,

tanto nucleares como citoplasmáticos, que impidieron cuantificar la frecuencia de MN en aquellas células tratadas con los compuestos en estudio. Los resultados obtenidos mediante el empleo de la metodología de Anexina V-FITC, podrían estar indicando que la alta citotoxicidad observada en el ensayo de MN estaría dada por la existencia dentro de la población celular de células que se encontrarían atravesando un mecanismo de muerte celular programada o apoptosis. Un aspecto a destacar de nuestros resultados fue la existencia de una inducción mayor de apoptosis con los formulados comerciales respecto a la inducida por el principio activo FLC. Por este motivo, y en concordancia con lo expresado anteriormente, estaríamos en condiciones de sugerir que dicha capacidad deletérea estaría ejercida por la presencia de algún compuesto con capacidad de inducir eventos apoptóticos en las formulaciones comerciales utilizadas, además de poseer efectos genotóxicos y otros efectos citotóxicos.

Diversos autores relacionan la muerte celular programada con el daño mitocondrial (Fridovich, 1978; Papa y Skulachev, 1997; Fleury y *col.*, 2002), alteración que, como hemos puesto en evidencia en nuestras investigaciones, es un blanco de acción del herbicida FLC. Es conocido que, en muchos casos, la mitocondria es la responsable de la liberación de ERO, las cuales podrían estar involucradas en la iniciación del mecanismo de apoptosis (Fleury y *col.*, 2002). Como consecuencia de la liberación de ERO por parte del condrioma, se producen también otras modificaciones a nivel celular, entre las cuales podemos mencionar cambios en el potencial de membrana, aumento de los niveles de calcio y oxígeno intracelulares, inhibición de la respiración celular y agotamiento de las reservas de ATP como fuente de almacenamiento energético. Estas alteraciones conllevan finalmente a cambios

importantes en la homeostasis celular, entre ellos la muerte celular programada (Fleury y col., 2002). En función de nuestros resultados podríamos postular que el herbicida FLC sería capaz de inducir daño alterando la actividad mitocondrial, evento puesto de manifiesto mediante el ensayo de MTT, esta alteración podría ser el desencadenante del mecanismo apoptótico. En concordancia con este último concepto, se conoce la relación existente entre cambios mitocondriales tanto morfológicos como funcionales y la exposición a diversos xenobióticos, incluidos agroquímicos. Se demostró una disminución significativa del número total de mitocondrias luego de la exposición al insecticida clorpirifos en neuronas corticales de ratas (Middlemore-Risher y col., 2011), la vacuolización de mitocondrias en hepatocitos de peces tratados con el insecticida triclorfón (Xu y col., 2009), cambios morfológicos en crestas mitocondriales de células hepáticas de ratas tratadas con el insecticida diazinón (Kalender y col., 2005), disolución de la matriz mitocondrial en células pancreáticas y miocárdicas crónicamente expuestas al insecticida endosulfán (Kalender y col., 2004a; Kalender y col., 2004b) y la agregación mitocondrial en células del tejido nervioso de ratas expuestas al insecticida diclorvos (Hasan y col., 1979). Con respecto a alteraciones mitocondriales producidas por herbicidas podemos mencionar el aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna a los protones y la inhibición de las reacciones redox en hígado de ratas expuestas a dicamba (Peixoto y col., 2003); despolarización de la membrana mitocondrial y aumento de las tasas de producción de peróxido de hidrogeno en ratas expuestas a paraquat (Czerniczyniec y col., 2011); mitocondrias pleomorficas e hinchadas en tejido muscular, intestinal y renal del pez *Colossoma macropomum* expuesto al herbicida 2-cloro-2,6-bis-etilamina-S-triazina (Segnini y col., 2005), entre otros.

El mecanismo mediante el cual FLC produce daño en el ADN aún no ha sido dilucidado. Numerosas investigaciones han demostrado que tanto el daño en el ADN como la citotoxicidad debidos a la exposición a diversos compuestos se han relacionado con un aumento en la producción de ERO (Larramendy y *col.*, 1987, 1989; Anderson y Phillips, 1999). En particular, en aquellos estudios realizados para evaluar la toxicidad de pesticidas se ha observado una alta sensibilidad de los biomarcadores de estrés oxidativo en diferentes modelos de estudio (Soloneski y *col.*, 2003; Yu y *col.*, 2008; Lushchak y *col.*, 2009; Anju y Bechan, 2010). Las ERO son extremadamente reactivas por lo cual su aumento puede dar como resultado daño en diversas biomoléculas tales como proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, entre otros bioelementos (Wiseman y Halliwell, 1996; Carochi y Ferreira, 2013).

Investigaciones recientes han demostrado que FLC induce alteraciones en la actividad de las enzimas que forman parte del sistema de defensa antioxidante, tales como glutatión S-transferasa y glutatión reductasa (Kaya y Yigit, 2012). Estudios donde se ha empleado a *Vicia sativa* como modelo experimental, han puesto en evidencia la capacidad de FLC de producir fitotoxicidad y de alterar el sistema antioxidante de las células de la especie en estudio (Kaya y Yigit, 2012).

Por lo antes expuesto, parte de nuestras investigaciones se orientaron a evaluar si la capacidad genotóxica y citotóxica ejercida por FLC, Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] en la línea celular CHO-K1 esta mediada por un mecanismo de daño oxidativo. Para ello, se analizó el efecto de la presencia o ausencia de vitamina E (α -tocoferol) en células tratadas con dichos compuestos conociendo la propiedad antioxidante de la misma. Numerosas investigaciones documentan el hecho que la vitamina E es capaz de proteger a células de mamíferos tanto en pruebas *in vitro* como

in vivo del efecto de sustancias con capacidad genotóxica y citotóxica (Anderson y Phillips, 1999; Šiviková y col., 2001; Soloneski y col., 2003; Lazarová y Slameňová, 2004; González y col., 2009). La vitamina E forma parte de un grupo de ocho compuestos de origen natural, biológicamente activos y liposolubles, los tocoferoles y los tocotrienoles. El α -tocoferol es el más abundante en los tejidos humanos y el de mayor actividad biológica (Graham, 1994). Se localiza principalmente en los compartimentos lipídicos de las membranas celulares y subcelulares y actúa como un antioxidante biológico que protege a las membranas de la acción de las ERO (Graham, 1994). Asimismo, otras propiedades inherentes a la vitamina E son su capacidad de detener reacciones en cadena entre ácidos grasos poliinsaturados en la membrana donde se encuentren, detener el ciclo propagativo de la peroxidación lipídica al atrapar un radical libre y convertirse a sí misma en el radical tocoferoxilo, forma biológicamente menos reactiva. Finalmente, el α -tocoferol es capaz de capturar radicales hidroxilo, aniones superóxido y neutralizar al peróxido de hidrógeno (Wilhelm, 2002) al igual que inhibir la activación de endonucleasas que puedan provocar estrés oxidativo (Anderson y col., 1994; Graham, 1994; Anderson y Phillips, 1999).

Nuestros resultados demostraron que la acción antioxidante de la vitamina E incorporada a los cultivos con el posterior análisis del EC contrarrestó significativamente la disminución de la viabilidad celular inducida únicamente por el formulado Twin Pack Gold[®], como mencionamos anteriormente. Sin embargo, el antioxidante no fue capaz de disminuir el daño ejercido en la molécula de ADN evidenciado con el EC en las células CHO-K1 tratadas con FLC, Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®]. La evidencia de la recuperación de la viabilidad celular llevó a considerar

la posibilidad de que Twin Pack Gold[®] ejerciera efectos citotóxicos por un mecanismo propio que podría involucrar la generación de ERO que afectarían específicamente a membranas biológicas. Como se sabe, los ácidos grasos poliinsaturados presentes en las membranas celulares son más lábiles a la oxidación que los saturados y los monoinsaturados debido a que los mismos pueden perder fácilmente un hidrógeno. Las ERO que pueden capturar a estos hidrógenos son el radical hidroxilo HO \cdot y el hidroperoxilo HO $_2\cdot$. Una vez generado el radical carbono en un ácido graso, éste reacciona con el O $_2$ para formar el radical hidroperoxilo iniciando de esta forma la cadena de reacciones de la peroxidación lipídica (Martinez-Cayuela, 1998; Wilhelm, 2002). Por lo expuesto, no podríamos descartar la posibilidad de que Twin Pack Gold[®] fuese capaz de inducir daño en las membranas biológicas mediante la generación de los radicales HO \cdot y HO $_2\cdot$. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para confirmar este concepto, objetivo específico que excede a los que condujeron al presente trabajo de Tesis Doctoral.

No podemos descartar la posibilidad de que el daño inducido por FLC y sus formulados comerciales en el ADN de las células CHO-K1 sea mediado por otro tipo de daño oxidativo o por otros mecanismos independientes de la formación de ERO. En efecto, no podemos dejar de considerar que la hipótesis de que la ausencia de resultados significativos que corroboren el efecto protector de la vitamina E puedan atribuirse a las condiciones experimentales bajo las cuales se realizaron los bioensayos. Así como muchos estudios han reportado efectos protectores de la vitamina E, otros no reportan tales beneficios (Claycombe y Nikbin Meydani, 2001; Azqueta y *col.*, 2007). La actividad de un antioxidante depende de su sitio de formación, de sus propiedades químicas, de su reactividad frente a radicales

específicos, de su capacidad para concentrarse cerca del sitio diana y de su capacidad para inhibir la acción del radical, entre otros (Anderson y Phillips, 1999). Adicionalmente, Anderson y Phillips (1999) han demostrado que el efecto protector de una sustancia antioxidante también puede depender de la concentración de uso, del biomarcador empleado y del tipo de daño ejercido por los compuestos en estudio (Anderson y Phillips, 1999).

Se sabe que la mayor parte de la biota se encuentra inevitablemente expuesta a agroquímicos, hecho que representa una preocupación constante y creciente, tanto a nivel ecológico como sanitario, dada la toxicidad de los mismos. Además, los agroquímicos son compuestos ubicuos en el planeta que son incorporados en grandes cantidades al medio ambiente por diversas actividades antrópicas (<http://www.epa.gov>). A pesar de los beneficios aportados por el uso de agroquímicos tanto en agricultura como en su empleo domiciliario, muchos de ellos pueden representar peligros potenciales dada la contaminación de alimentos, agua y aire; hecho que puede ocasionar graves problemas de salud no sólo para los seres humanos sino también para los ecosistemas y sus comunidades (WHO, 2006). Es sabido que los plaguicidas normalmente se comercializan como formulados complejos que incluyen al principio activo, sustancia que posee la propiedad de matar a la plaga, junto a otros ingredientes inertes (solventes, emulsionantes, tensioactivos, entre otros) que facilitan la aplicación y la eficacia del mismo (WHO, 1990). Numerosos estudios previos en diferentes matrices bióticas han demostrado que los compuestos aditivos presentes en las formulaciones comerciales de ciertos plaguicidas tienen la habilidad de inducir daño celular genotóxico y citotóxico *per se* independientemente del principio activo, debido a que pueden tener propiedades toxicológicas y efectos completamente

diferentes al mismo. Además, estos compuestos pueden ejercer un efecto sinérgico o aditivo junto con el principio activo (WHO, 1990; Klassen, 2008), sumándose los efectos que cada compuesto es capaz de producir por separado en el caso de ser aditivo o el efecto combinado puede resultar mucho mayor a la sumatoria de los efectos que cada uno podría ejercer por sí solos en el caso de ser sinérgico (Klassen, 2008). Más aún, la Agencia de Protección Ambiental de los EE.UU. (USEPA, 1982) afirmó que la toxicidad de un principio activo puede diferir significativamente de la del compuesto formulado que contiene dicho ingrediente activo. Por este motivo, resulta más que indispensable en términos de riesgo toxicológico estudiar a las formulaciones agroquímicas completas considerando otros posibles efectos tóxicos aditivos causados por el/los excipientes (Soloneski y *col.*, 2001; Cox y Surgan, 2006; González y *col.*, 2006, 2007; Zeljezic y *col.*, 2006, 2007; Molinari y *col.*, 2009; Soloneski y Larramendy, 2010).

En la presente Tesis Doctoral se evaluaron comparativamente el principio activo FLC y dos de sus formulaciones comerciales empleadas en Argentina como el Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®], ambas conteniendo un 25% de FLC. Lamentablemente, los compuestos aditivos presentes en las formulaciones comerciales estudiadas son de naturaleza desconocida; las empresas comercializadoras de dichos productos no especifican su composición en el membrete de los mismos, dado que en nuestro país no es obligación dar a conocer al usuario la real composición de los excipientes y se permite el “secreto comercial” (CASAFE, 2011). En función de lo expuesto previamente, no podríamos descartar la posibilidad que las diferencias de toxicidad observadas y puestas en evidencia con los diferentes bioensayos entre el principio activo FLC, Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] sean debidas a efectos causados por los

compuestos teóricamente “inertes” presentes en los excipientes de ambas formulaciones comerciales. Aseverando lo antes expuesto, estudios previos han demostrado una respuesta diferencial entre el herbicida 2,4-D y su formulación comercial 2,4-D DMA[®] mediante el ensayo de ICHs en la línea celular CHO-K1 (González y *col.*, 2005); el fungicida ditiocarbámico zineb y su formulación comercial Azzurro[®] mediante el ensayo de MN en linfocitos humanos (Soloneski y *col.*, 2002); el antiparasitario ivermectina y su formulación comercial Ivomec[®] mediante los ensayos de ICHs y EC en células CHO-K1 (Molinari y *col.*, 2009); el insecticida carbofurán y su formulación Furadan[®] mediante ensayos de genotoxicidad y citotoxicidad en la línea celular CHO-K1 (Soloneski y *col.*, 2008), entre otros ejemplos.

6.2. Estudios *in vivo*

Teniendo en cuenta lo expuesto en el párrafo anterior inherente al uso a campo de formulaciones comerciales de agroquímicos y no principios activos puros, los estudios tendientes a evaluar la toxicidad *in vivo* fueron realizados empleando los formulados comerciales Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®]. Dichos efectos fueron evaluados mediante ensayos de letalidad y de genotoxicidad en larvas de *R. arenarum* (Anura: Bufonidae) expuestas en condiciones experimentales de laboratorio. Dentro de los bioensayos utilizados, el estimador de letalidad empleado fue la determinación de la CL50_{96 h}. Asimismo, como estimadores de genotoxicidad se utilizaron el análisis de la frecuencia de MN en eritrocitos circulantes y el ensayo de electroforesis de células únicas o EC en células sanguíneas.

Los estudios de toxicidad aguda tienen por objetivo determinar los efectos tóxicos a corto plazo de un determinado xenobiótico sobre los organismos prueba expuestos al mismo. Dicho estimador nos brinda información acerca de la toxicidad de ese xenobiótico y permite la comparación de la sensibilidad diferencial entre diferentes especies al agente en estudio por ser un estimador representativo para la comparación de las toxicidades y susceptibilidades (USEPA, 1975; ASTM, 1989; Díaz-Baez y col., 2004). Además, estos ensayos a corto plazo aportan antecedentes del compuesto en estudio que son de utilidad para el diseño de investigaciones posteriores (Klassen, 2008). En términos generales, un ensayo de toxicidad aguda consiste en exponer a un grupo de organismos a diversas concentraciones de un xenobiótico donde la variable más comúnmente evaluada es la mortalidad, aunque algunos efectos subletales pueden ser también determinados (USEPA, 1975; ASTM, 1989). El punto final es la mortalidad observada y puede ser expresada como la CL50, concentración de una sustancia en el aire o el agua que produce la muerte del 50% de la población bajo análisis (USEPA, 1975; ASTM, 1989).

Como hemos descripto anteriormente, los efectos letales ejercidos sobre larvas de *R. arenarum* por los formulados bajo estudio, permitieron estimar una CL50_{96 h} de 2,96 mg/L para Twin Pack Gold[®] y de 2,85 mg/L para el caso de Rainbow[®]. De esta manera, si bien las formulaciones comerciales evaluadas poseen el mismo porcentaje de principio activo en su composición (25% FLC), los resultados de los ensayos de mortalidad nos permitieron determinar que Rainbow[®] fue más tóxico que Twin Pack Gold[®] cuando las larvas de *R. arenarum* fueron expuestas durante 96 h de tratamiento. De acuerdo a lo previamente expuesto, no podemos descartar la posibilidad que la mayor toxicidad ejercida por Rainbow[®] pudiera deberse a los componentes inertes y/o

coadyuvantes presentes en la formulación comercial. En este sentido, varios autores han informado acerca del peligro potencial que suponen los aditivos y surfactantes presentes en las formulaciones comerciales de un agroquímico, los cuales no son habitualmente considerados en la evaluación de toxicidad y que pueden modificar en forma significativa la toxicidad de los productos formulados en ensayos de letalidad (Mann y *col.*, 2003, 2009). Finalmente, no podríamos descartar la posibilidad de que los excipientes, teóricamente inertes, presentes en la formulaciones comerciales estudiadas en el presente Trabajo de Tesis Doctoral, pudieran estar ejerciendo un efecto tóxico adicional al principio activo, haciendo de Rainbow[®] una formulación comercial con mayor toxicidad que Twin Pack Gold[®].

Considerando los valores de toxicidad aguda CL50_{96 h} obtenidos para Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] en el presente trabajo de Tesis Doctoral y de acuerdo a las categorías de toxicidad propuestas por organismos reguladores como la OECD y la UN (2011), ambos herbicidas formulados deberían ser clasificados para *R. arenarum* como compuestos pertenecientes a la categoría II y como “tóxicos” según los criterios de toxicidad propuestos por Mazzatorta y *col* (2002).

Por otra parte, teniendo en cuenta los valores obtenidos de CL50_{96 h} en el presente trabajo de Tesis Doctoral para Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] en larvas de *R. arenarum* podríamos elaborar una comparación con respecto a valores de toxicidad aguda reportados en la bibliografía para otros vertebrados acuáticos expuestos a formulaciones comerciales de herbicidas que contienen FLC en su composición comercial. Al comparar los valores de CL50_{96 h} obtenidos para *R. arenarum* expuestos a Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®], con el valor de CL50_{96 h} obtenido para las especies piscícolas *Oncorhynchus mykiss* y *Lepomis macrochirus* cuyos valores fueron de 3

mg/L, y 10,2 mg/L, respectivamente (<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/Reports/346.htm>; EFSA, 2010), sería factible observar que ambas formulaciones comerciales estudiadas en el presente Trabajo de Tesis Doctoral ejercieron un efecto letal mayor que el hallado en los peces expuestos. Al comparar los valores de toxicidad obtenidos para FLC en estas especies de vertebrados acuáticos con las obtenidas para larvas de *R. arenarum*, esta especie nativa representante de nuestro país, podría considerarse como una especie con una sensibilidad mayor al efecto tóxico ejercido por el herbicida FLC.

La preocupación creciente por la declinación de las poblaciones de anfibios pone de manifiesto la necesidad de ampliar nuestros conocimientos acerca del posible impacto de los agroquímicos en estos organismos, siendo que la toxicidad de los mismos puede potencialmente disminuir la supervivencia de las poblaciones naturales debido a los efectos letales o subletales que los agroquímicos provocan.

El presente trabajo de Tesis Doctoral permite destacar la importancia de realizar evaluaciones toxicológicas agudas con especies nativas incluyendo los estadios larvales de anfibios, ya que los mismos representan una de las etapas del ciclo vital más susceptibles a los diferentes tipos de noxas, incluyendo a las formulaciones comerciales de agroquímicos que son, en última instancia, los compuestos a los cuales están directamente expuestos los organismos en el ambiente. Como prueba de ello, numerosos grupos de investigación de nuestro país han empleado el modelo *in vivo* de *R. arenarum* para la evaluación de los efectos potenciales de agentes ambientales como son los plaguicidas, proponiendo al organismo anfibio en cuestión como una especie blanco válida para este tipo de estudios. Dentro de los antecedentes que involucran el uso de *R. arenarum* podemos mencionar las investigaciones llevadas a

cabo por el grupo perteneciente al Instituto Multidisciplinario de Investigación y Desarrollo de la Patagonia Norte quienes emplearon esta especie para evaluar cambios bioquímicos y morfológicos por exposición a diferentes agroquímicos tales como los insecticidas clorpirifos, metil azinfos, carbaryl, malation y al herbicida Magnacide® H mediante diferentes tipos de bioensayos bajo condiciones experimentales de laboratorio (Ferrari y col., 2009, 2011; Lascano y col., 2011a,b; Sotomayor y col., 2012). Asimismo, Lajmanovich y su grupo de investigación (Bionda y col., 2011; Lajmanovich y col., 2011, 2013; Junges y col., 2012, 2013) evaluaron en esta especie el efecto tóxico de varios herbicidas, entre otros, glifosato, metilsulfuron y picloram, teniendo en cuenta diferentes parámetros enzimáticos, morfológicos y genotóxicos. De forma semejante, Brodeur y colaboradores (2009, 2013) comprobaron la alta sensibilidad de esta especie a la atrazina a través de ensayos de toxicidad aguda bajo condiciones de laboratorio. Estudios similares fueron llevados a cabo para la misma especie analizando la toxicidad del zinc y del arsenito (Brodeur y col., 2009). Del mismo modo, otros investigadores evaluaron los efectos letales y subletales de diferentes xenobióticos, incluyendo agroquímicos como el 2,4-D, cipermetrina, atrazina, entre otros, determinando las concentraciones letales para la especie estudiada (Fridman y col., 2004; Pérez-Coll y Herkovits, 2004, 2006; Herkovits y col., 2006; Pérez-Coll y col., 2008; Castañaga y col., 2009; Aronzon y col., 2011a,b; Hutler Wolkowicz y col., 2011; Sztrum y col., 2011; Svartz y col., 2012). Finalmente, cabe mencionar que en nuestro grupo de investigación se analizó la mortalidad así como diversos parámetros subletales inducidos por el insecticida pirimicarb (Vera Candiotti y col., 2010) en la especie antes mencionada. Finalmente, estas investigaciones avalan el uso de *R. arenarum* como un modelo experimental válido de estudio.

El ensayo de MN fue otro de los biomarcadores de efecto empleado durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral para caracterizar el potencial genotóxico de las formulaciones comerciales Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] en eritrocitos circulantes de larvas de *R. arenarum* expuestas bajo condiciones experimentales de laboratorio. Los resultados demostraron que únicamente el formulado Rainbow[®] fue capaz de incrementar la frecuencia de MN en células sanguíneas en aquellos ejemplares expuestos sólo a las 48 h de exposición y con la menor concentración ensayada equivalente a un 25% de la CL₅₀_{96 h}. Publicaciones previas indican que las larvas de anfibios resultan ser organismos susceptibles a daños genéticos causados por distintos tipos de xenobióticos luego de tiempos cortos de exposición y a bajas concentraciones de los mismos (Ralph y col., 1996; Clements y col., 1997). Nuestros resultados concuerdan con estas observaciones, avalando lo sugerido por estos autores.

Por otra parte, nuestros resultados mostraron que luego de la exposición de los ejemplares de *R. arenarum* a ambos formulados comerciales, ninguno de los mismos tuvo la capacidad de incrementar la frecuencia de MN. Para explicar nuestros hallazgos, podría considerarse que las mayores concentraciones del formulado Rainbow[®] y todas las concentraciones de Twin Pack Gold[®] podrían estar causando un efecto tóxico y/o inhibitorio ejercido por dichas concentraciones de los compuestos ensayados, las que estarían afectando la división mitótica provocando un retraso del ciclo celular y la consecuente alteración en la tasa de renovación de los eritrocitos circulantes, y de esta manera, no podría ser visualizado el daño inducido en el ADN por los formulados (Cavaş y Ergene-Gözükara, 2003; Rodriguez-Cea y col., 2003). Otra posible explicación estaría fundamentada en el hecho que los estadios larvales de anfibios presentan una eritropoyesis activa en la cual los eritrocitos se dividen en

circulación (Campana y *col.*, 2003); por ello, la frecuencia de células dañadas podría verse rápidamente disminuida por un fenómeno de dilución de los eritrocitos micronucleados circulantes. En consecuencia, estas células no estarían siendo detectadas en el análisis de los ejemplares expuestos con las mayores concentraciones de los formulados tanto a las 48 h como a las 96 h de exposición. Otra posible hipótesis para explicar nuestros hallazgos podría estar relacionada con el hecho conocido de que, a determinadas concentraciones de un xenobiótico, el sistema sanguíneo de los anfibios puede responder de diferentes maneras debido a que presenta la propiedad de poseer una gran plasticidad (Bouhafs y *col.*, 2009). De esta manera, si se estimula la eritropoyesis luego de la exposición a un xenobiótico, el resultado sería un aumento desmesurado de los eritrocitos circulantes, con la consecuente dilución de los eritrocitos formados portadores de MN y una disminución de su frecuencia relativa sanguínea (Udroiu, 2006). Por otro lado, no podría descartarse un efecto inhibitorio de la eritropoyesis en función de lo propuesto por Udroiu (2006), quien sugirió que el efecto observado podría deberse a una deficiente actividad eritropoyética que reemplace, en la circulación periférica a los eritrocitos dañados por eritrocitos no dañados. Finalmente, no podemos desconocer el hecho de que no todas las células dañadas alcanzan a completar un ciclo de división debido a que pueden entrar en un proceso de muerte celular programada y/o necrosis y serían eliminadas rápidamente del organismo (Fenech, 2007). De esta manera, las células portadoras de MN serían eliminadas del torrente sanguíneo. Finalmente, tampoco podemos descartar la posibilidad de un efecto combinado de estas causales para explicar los hallazgos encontrados en el presente trabajo de Tesis Doctoral.

Cuando se llevaron a cabo estudios tendientes a analizar la inducción de rupturas de cadena simple en la molécula de ADN, los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral evidenciaron un incremento de las mismas en células sanguíneas circulantes de larvas de *R. arenarum* expuestas a las formulaciones comerciales. En líneas generales, los resultados obtenidos por este biomarcador revelaron mayores niveles de daño con las menores concentraciones ensayadas. Estas observaciones están en concordancia con los reportes previos indicando que en general las larvas de anfibios se caracterizan por presentar una mayor sensibilidad a los efectos genotóxicos ante bajas concentraciones de un xenobiótico (Ralph y col., 1996; Clements y col., 1997). Cabe señalarse, que este comportamiento característico de las larvas de anfibios resulta un aspecto importante de mencionar. El mismo podría estar determinando fluctuaciones en las poblaciones naturales de estos vertebrados, teniendo en cuenta que exposiciones similares a bajas concentraciones de un xenobiótico podrían ocurrir en su hábitat natural. Es conocido que habitualmente los pequeños cuerpos de agua de las cercanías de los sembradíos son los primeros en ser afectados por las descargas de agroquímicos (Geng y col., 2005).

Nuestros resultados revelan que la variante alcalina de EC puso de manifiesto un incremento significativo del daño inducido en el ADN de eritrocitos circulantes de *R. arenarum* expuestos bajo condiciones experimentales de laboratorio a Twin Pack Gold® y Rainbow®, tanto a las 48 como a las 96 h de exposición. En aquellos ejemplares expuestos tanto a Twin Pack Gold® como a Rainbow® se observó un aumento en la frecuencia de células dañadas y una disminución de las células no dañadas. Como consecuencia, se determinó un aumento en el IDG ejercido por ambos compuestos, tanto para los ejemplares analizados a las 48 como a las 96 h de

exposición. Investigaciones referentes al estudio de la inducción de rupturas de cadena simple en la molécula de ADN empleando anfibios expuestos a distintos agroquímicos han sido comunicadas por otros autores. Es así que Liu y *col.* (2011) analizaron los efectos genotóxicos del herbicida butaclor en larvas de *Fejervarya limnocharis* expuestas en condiciones experimentales de laboratorio. Resultados similares fueron obtenidos por Feng y colaboradores (2004) empleando eritrocitos circulantes de *Rana limnocharis* y *Rana N. hallowell* expuestas al insecticida imidacloprid y a RH-5849, antagonista de la ecdisona. Estudios recientes demostraron la capacidad del insecticida–acaricida profenofos de inducir rupturas en la molécula de ADN de eritrocitos de *Rana spinosa* efecto evaluado mediante el EC (Li y *col.*, 2010), entre otros.

Por otra parte, si bien los resultados de estos estudios no son comparables, ni extrapolables de una especie a otra debido a las diferencias de origen, diseño experimental, entre otros (Mudry, 2006), podríamos establecer una comparación tentativa para remarcar nuestros resultados. Si tenemos en cuenta los valores máximos de IDG obtenidos para *R. arenarum* y los comparamos con los resultados obtenidos en los sistemas *in vitro* incluidos en este trabajo de Tesis Doctoral, podríamos establecer una escala de sensibilidad comparativa para Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®]. Una síntesis de nuestros resultados se presenta en la tabla siguiente:

Valores máximos de IDG			
	CHO-K1	HepG2	<i>R. arenarum</i>
Twin Pack Gold®	1,79	2,54	3,30
Rainbow®	2,09	2,30	2,69

Valores máximos de IDG obtenidos en los distintos modelos de estudio tras el análisis del EC

Como podemos observar en este cuadro comparativo de sensibilidades se desprendería que la magnitud del IDG fluctuaría de la siguiente manera: *R. arenarum* > HepG2 > CHO-K1.

Por lo expuesto, podríamos sugerir que el modelo *in vivo* de *R. arenarum* fue más sensible para evaluar y cuantificar el efecto genotóxico inducido por los compuestos en estudio empleando la variante alcalina del EC como biomarcador de efecto.

Finalmente, un aspecto a destacar es que, a pesar de que está bien documentado el uso del EC en anfibios, no se han informado hasta el presente, resultados en la literatura acerca del uso de *R. arenarum* como modelo de estudio específicamente empleando este biomarcador de efecto. Nuestras investigaciones representan por consiguiente, la primera evidencia del empleo de esta especie nativa de nuestro país como modelo de análisis cuando el EC es utilizado como biomarcador de efecto.

En función de nuestros resultados podemos confirmar mediante este modelo de estudio el riesgo potencial que FLC podría causar en los organismos acuáticos, principalmente en las poblaciones de anfibios, pudiendo provocar a largo plazo efectos negativos sobre los mismos.

Es conocido a nivel mundial que las poblaciones de vertebrados en general y de los acuáticos en particular, se encuentran en un franco proceso de declinación, fenómeno que en la mayor parte de los casos está asociado a la contaminación del ambiente por prácticas agrícolas que fomentan un uso indiscriminado de plaguicidas (Mann y *col.*, 2009). A pesar de que se desconocen las verdaderas razones por las cuales muchas poblaciones de anfibios se encuentran en proceso de declinación, las mismas parecen estar expuestas a los mismos factores que afectan a otros organismos como así también al ser humano (Hopkins, 2007). Entre los factores más importantes que se cree estarían implicados en este proceso podemos mencionar: la pérdida y/o modificación del hábitat, las enfermedades, el cambio climático, la introducción de especies exóticas, la sobreexplotación del suelo y principalmente la intensificación de la agricultura junto con el empleo masivo de agroquímicos (Hopkins, 2007; Mann y *col.*, 2009). Actualmente, debido a la sensibilidad que los caracteriza frente a los cambios ambientales, los anfibios se han convertido claramente en un modelo de estudio crucial para la evaluación del riesgo potencial como resultado de las diferentes actividades antrópicas. Particularmente, enfocándonos en el empleo masivo de agroquímicos, está documentado que los pesticidas y contaminantes inorgánicos ejercen efectos deletéreos sobre las poblaciones de anfibios (Sparling y *col.*, 2001; Mann y *col.*, 2009). Existen diversos estudios que indican efectos negativos sobre poblaciones naturales de anfibios. Entre los mismos podemos mencionar estudios realizados en poblaciones de *Bufo bufo*, *B. americanus*, *B. boreas*, *Pseudacris crucifer*, *P. regilla*, *Hyla versicolor*, *Rana pipiens*, *R. clamitans*, *R. cascadae*, *R. boylei*, *R. catesbeiana* y *Litoria freycineti* expuestas al insecticida y acaricida organoclorado endosulfán (Sparling y *col.*, 2001; Broomhall y Shine, 2003; Brunelli y

col., 2009; Jones y *col.*, 2009; Relyea, 2009), *P. regilla*, *H. chrysoscelis*, *Lithobates sphenoccephalus*, *Acris crepitans*, *R. boyllii* y *Gastrophryne olivacea* expuestas al insecticida organofosforado clorpirifos (Sparling y *col.*, 2001; Widder y Bidwell, 2006, 2008), *R. boyllii* expuestas al insecticida carbámico carbaril (Davidson y *col.*, 2007), *R. pipiens* expuestas al insecticida organofosforado diazinón (Relyea, 2009) y en *R. temporaria* expuestas a diferentes agroquímicos incluyendo al fungicida azoxystrobin, al fenoxi herbicida MCPA y al insecticida carbámico pirimicarb (Johansson y *col.*, 2006), entre otros.

Por lo expuesto, no podemos descartar la posibilidad de que aplicaciones reiteradas del herbicida FLC empleado en los diferentes cultivos del agro de nuestro país podrían ingresar en los ambientes acuáticos, pudiendo ocasionar efectos deletéreos no solo sobre larvas de *R. arenarum*, sino también sobre otras poblaciones de organismos acuáticos. Desafortunadamente, no existe en la literatura información disponible sobre los niveles de FLC existentes en cuerpos de agua. Cabe mencionarse que solamente se cuenta con valores informados por la EFSA (2010) indicando concentraciones mayores a 0,1 µg/ml en suelo y agua de bebida. Por lo expuesto, y basándonos en el único valor conocido hasta el presente de concentraciones reales ambientales de FLC, resultaría poco frecuente la posibilidad de encontrar en el ambiente las concentraciones de este compuesto empleadas en nuestras investigaciones. Sin embargo, no podríamos descartar la posibilidad de que las concentraciones dentro del rango empleado en la presente Tesis Doctoral pudieran observarse en el caso de acontecer eventos específicos tales como aplicaciones directas en las proximidades de aguas superficiales de arroyos, estanques y zanjas de drenaje, por descarga accidental o derrames del herbicida, como tampoco podrían

descartarse exposiciones ocupacionales y accidentales a este agroquímico que pudieran afectar no sólo a las poblaciones naturales sino a seres humanos expuestos laboralmente. Finalmente, no podemos dejar de destacar que así como las poblaciones acuáticas podrían estar expuestas a los efectos nocivos de FLC, los trabajadores rurales, las poblaciones linderas a zonas de aplicación, e incluso los consumidores podrían estar expuestos al efecto deletéreo de este herbicida de masivo uso en nuestro agro.

7. CONSIDERACIONES FINALES

Teniendo en cuenta los objetivos planteados y los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, podemos llegar a las siguientes consideraciones finales.

A partir de los estudios *in vitro*:

1. El principio activo flurocloridona y sus dos formulaciones comerciales Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] son agentes inductores de intercambios de cromátidas hermanas en células de hámster, al menos en la línea celular establecida CHO-K1.
2. El principio activo flurocloridona y sus dos formulaciones comerciales Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] son capaces de introducir lesiones de cadena simple y/o sitios álcali sensibles en el ADN de células de hámster (CHO-K1) y de hepatocarcinoma humano (HepG2) evaluadas y cuantificadas mediante la variante alcalina del ensayo cometa.
3. El principio activo flurocloridona es un herbicida no inductor de micronúcleos en células de hámster (CHO-K1) y de hepatocarcinoma humano (HepG2), al menos a las concentraciones y tiempos de exposición ensayados.
4. El formulado comercial Twin Pack Gold[®] indujo un incremento de la frecuencia de micronúcleos en células de hámster (CHO-K1) y en células de

hepatocarcinoma humano (HepG2). Dicho efecto genotóxico podría deberse a la presencia de un(s) xenobiótico(s) en los excipientes presentes en dicha formulación comercial con capacidad clastogénica y/o aneugénica pero no al principio activo *per se*.

5. El principio activo flurocloridona y sus dos formulaciones comerciales Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] produjeron alteraciones en la cinética de proliferación celular evidenciada por un alargamiento del ciclo y una disminución en la actividad mitótica en células de hámster (CHO-K1).
6. El principio activo FLC y sus dos formulaciones comerciales Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] indujeron una reducción significativa de la actividad celular evidenciada por alteraciones en la actividad lisosomal y en el metabolismo energético en células de hámster (CHO-K1) y de hepatocarcinoma humano (HepG2).
7. Ambas formulaciones comerciales ejercieron en células de hámster (CHO-K1) y de hepatocarcinoma humano (HepG2) una mayor citotoxicidad que el principio activo *per se*. También, Rainbow[®] resultó ser más citotóxico que Twin Pack Gold[®] tanto en células de hámster (CHO-K1) y de hepatocarcinoma humano (HepG2).

8. El principio activo flurocloridona y sus dos formulaciones comerciales Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] son capaces de inducir procesos apoptóticos en células de hepatocarcinoma humano (HepG2).
9. El formulado comercial Twin Pack Gold[®] podría ejercer daño celular mediante la liberación de especies reactivas de oxígeno, evidenciado mediante la incorporación de vitamina E a los cultivos.

A partir de los estudios *in vivo*:

1. Ambas formulaciones comerciales Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] fueron capaces de ejercer efectos letales y subletales en larvas de *R. arenarum* expuestas bajo condiciones experimentales de laboratorio.
2. Las formulaciones comerciales Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] deberían ser consideradas como compuestos tóxicos para larvas de *R. arenarum* de acuerdo a los patrones internacionales de clasificación de riesgo toxicológico para especies acuáticas.
3. El herbicida Rainbow[®] fue capaz de incrementar la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos circulantes en larvas de *R. arenarum* expuestas bajo condiciones experimentales de laboratorio.

4. Ambas formulaciones comerciales Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] son capaces de introducir lesiones de cadena simple y/o sitios álcali sensibles en el ADN de células sanguíneas de larvas de *R. arenarum* expuestas bajo condiciones experimentales de laboratorio y evaluadas y cuantificadas mediante la variante alcalina del ensayo cometa.
5. La especie estudiada *R. arenarum* resultó ser más sensible a los efectos letales y subletales genotóxicos inducidos por la formulación comercial Rainbow[®] que por la formulación comercial Twin Pack Gold[®].
6. Nuestros estudios constituyen la primera evidencia del empleo de larvas de la especie nativa *R. arenarum* empleando al ensayo cometa como biomarcador de efecto de la exposición de formulaciones comerciales conteniendo al herbicida flurocloridona como principio activo.
7. El modelo *in vivo* de evaluación de efectos genotóxicos empleando larvas de *R. arenarum* expuestas bajo condiciones experimentales de laboratorio resultó ser más sensible que los modelos *in vitro* cuando la variante alcalina del ensayo cometa fue utilizada como biomarcador de efecto.
8. Los resultados de la evaluación de los efectos letales, genotóxicos y citotóxicos ejercidos por el herbicida flurocloridona y formulaciones comerciales Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] en ambas matrices bióticas nos permitiría concluir que la respuesta diferencial encontrada en cada modelo de estudio frente a los

compuestos podría deberse a la presencia de excipientes de naturaleza desconocida presentes en los formulados comerciales como asimismo, a variaciones en la sensibilidad de los modelos en estudio.

9. Los estudios realizados en este trabajo de Tesis Doctoral constituyen el primer antecedente de evaluación letal, genotóxica y citotóxica del herbicida flurocloridona y sus dos variantes comerciales Twin Pack Gold[®] y Rainbow[®] en los modelos biológicos empleados.

Las investigaciones llevadas a cabo en el presente trabajo de Tesis Doctoral han demostrado mediante los diferentes estudios realizados que el herbicida flurocloridona es un agente capaz de generar efectos letales, genotóxicos y citotóxicos en las matrices bióticas analizadas. Actualmente, la ausencia de resultados concluyentes que permitan determinar claramente el perfil toxicológico de flurocloridona es un área de urgente investigación. Hasta el momento no existen para Argentina registros de concentraciones de este compuesto en el medio ambiente, ni estudios toxicológicos sobre organismos expuestos, entre ellos el hombre. Cabe ser mencionado que la Agencia para la Protección Ambiental de EE. UU. (USEPA) aún tiene pendiente su registro clasificatorio en función de su toxicidad y que la Administración de Alimentos y Drogas (FDA) tiene pendiente el análisis de sus residuos en alimentos y forrajes desde el año 2001.

Por lo expuesto, sugerimos la necesidad de una correcta evaluación toxicológica de flurocloridona y de sus formulaciones comerciales antes que el mismo continúe siendo empleado masivamente a nivel mundial, en general y nuestro país, en

particular. Finalmente, su actual uso como un herbicida por excelencia, como lo hemos mencionado anteriormente, podría estar comprometiendo la salud de los organismos, entre los cuales se encuentran, sin lugar a dudas, los seres humanos expuestos directa o indirectamente a formulaciones comerciales conteniendo el principio activo flurocloridona.

8. Referencias bibliográficas

- Ali, D., Nagpure, N.S., Kumar, S., Kumar, R., Kushwaha, B. 2008a. Genotoxicity assessment of acute exposure of chlorpyrifos to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Chemosphere* 71, 1823-1831.
- Ali, F.A., El-Shehawi, A.M., Seehy, M.A. 2008b. Micronucleus test in fish genome: A sensitive monitor for aquatic pollution. *African Journal of Biotechnology* 7, 606-612.
- Alok, N., Arpita, S., Nitasha, S., Ajit, K., Vinod, K.D. 2013. *Sphaeranthus indicus* induces apoptosis through mitochondrial-dependent pathway in HL-60 cells and exerts cytotoxic potential on several human cancer cell lines. *Integrative Cancer Therapies* 12, 236-237.
- Anderson, D., Basaran, N., Blowers, S.D., Edwards, A.J. 1994. The effect of antioxidants on bleomycin treatment in *in vitro* and *in vivo* genotoxicity assays. *Mutation Research* 329, 37-47.
- Anderson, D., Phillips, B.J. 1999. Comparative *in vitro* and *in vivo* effects of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology* 37, 1015-1025.
- Andrade, V.M., J, S., Silva, F.R., Heuser, V.D., Dias, J.F., Yoneama, M.L., Freitas, T.R. 2004. Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the comet assay and micronucleus test. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 44, 459-468.
- Anju, A., Bechan, S. 2010. Pesticides induced oxidative stress in mammalian systems: a review. *International Journal of Biological and Medical Research* 1, 90-104.

- APHA, AWWA, WEF 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. APHA, Washington DC 20th Edition.
- Aronzon, C.M., Sandoval, M.T., Herkovits, J., Pérez-Coll, C.S. 2011a. Stage-dependent toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic on the embryonic development of a South American toad, *Rhinella arenarum*. Environmental Toxicology 26, 373-381.
- Aronzon, C.M., Sandoval, M.T., Herkovits, J., Pérez Coll, C.S. 2011b. Stage-dependent susceptibility to copper in *Rhinella arenarum* embryos and larvae. Environmental Toxicology and Chemistry 30, 2771-2777.
- ASTM, 1989. Standard guide for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates, and amphibians. Biological effects and environmental fate. ASTM E, 729-80.
- Azqueta, A., Arbillaga, L., Pachón, G., Cascante, M., Creppy, E.E., López de Cerain, A. 2007. A quinoxaline 1,4-di-N-oxide derivative induces DNA oxidative damage not attenuated by vitamin C and E treatment. Chemico-Biological Interactions 168, 95–105.
- Bianchi, N.O., Larramendy, M.L. 1983. The effects of incorporated tritium and bromodeoxyuridine on the frequency of sister chromatid exchanges. Chromosoma 88, 11-15.
- Bionda, C.L., Lajmanovich, R.C., Salas, N.E., Martino, A.L., Di Tada, I.E. 2011. Reproductive ecology of the common South American toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae): Reproductive effort, clutch size, fecundity, and mate selection. Journal of Herpetology 45, 261-264.
- Borenfreund, E., Puerner, J.A. 1985. Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. Toxicology Letters 24, 119-124.

- Bosh, B., Mañas, F., Gorla, N., Aiassa, D. 2011. Micronucleus test in post metamorphic *Odontophrynus cordobae* and *Rhinella arenarum* (Amphibia: Anura) for environmental monitoring. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences* 3, 155-163.
- Bouhafs, N., Berrebbah, H., Devaux, A., Rouabhi, R., Djebbar, M.R. 2009. Micronucleus induction in erythrocytes of tadpoles *Rana saharica* (green frog of north africa) exposed to Artea 330EC. *American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences* 1, 7-12.
- Brodeur, J.C., Sassone, A., Hermida, G.N., Codugnello, N. 2013. Environmentally-relevant concentrations of atrazine induce non-monotonic acceleration of developmental rate and increased size at metamorphosis in *Rhinella arenarum* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 92, 10-17.
- Brodeur, J.C., Svartz, G., Perez-Coll, C.S., Marino, D.J., Herkovits, J. 2009. Comparative susceptibility to atrazine of three developmental stages of *Rhinella arenarum* and influence on metamorphosis: non-monotonous acceleration of the time to climax and delayed tail resorption. *Aquatic Toxicology* 91, 161-170.
- Broomhall, S., Shine, R. 2003. Effects of the insecticide endosulfan and presence of congeneric tadpoles on Australian treefrog (*Litoria freycineti*) tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 45, 221-226.
- Brunelli, E., Bernabò, I., Berg, C., Lundstedt-Enkel, K., Bonacci, A., Tripepi, S. 2009. Environmentally relevant concentrations of endosulfan impair development, metamorphosis and behaviour in *Bufo bufo* tadpoles. *Aquatic Toxicology* 91, 135-142.

- Burggren, W.W., Warburton, S. 2007. Amphibians as Animal Models for Laboratory Research in Physiology. *ILAR Journal* 48, 260-269.
- Campana, M., Panzeri, A., Moreno, V., Dulout, F. 2003. Micronuclei induction in *Rana catesbeiana* tadpoles by the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Genetics and Molecular Biology* 26, 99-103
- Carballo, M.A., Hick, A.S., Soloneski, S., Larramendy, M.L., Mudry, M.D. 2006. Genotoxic and aneugenic properties of an imidazole derivative. *Journal of Applied Toxicology* 26, 293-300.
- Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology* 51, 15-25.
- Carrano, A.V., Thompson, L.H., Lindl, P.A., Minkler, J.L. 1978. Sister chromatid exchange as an indicator of mutagenesis. *Nature* 271, 551-553.
- CASAFE, 2009. Guía de Productos Fitosanitarios para la República Argentina. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes, Buenos Aires, pp. 1944.
- CASAFE, 2011. Guía de Productos Fitosanitarios para la República Argentina. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes, Buenos Aires, pp. 1974.
- Castañaga, L.A., Asorey, C.M., Sandoval, M.T., Pérez-Coll, C.S., Argibay, T.I., Herkovits, J. 2009. Stage-dependent teratogenic and lethal effects exerted by ultraviolet B radiation on *Rhinella* (*Bufo*) *arenarum* embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 427-433.
- Cavalcante, D.G.S.M., Martinez, C.B.R., Sofia, S.H. 2008. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutation Research* 655 41-46.

- Cavaş, T., Ergene-Gözükar, S. 2003. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutation Research* 538, 81-91.
- Cavaş, T., Konen, S. 2007. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis* 22, 263-268.
- Cetin, Y., Bullerman, L.B. 2005. Cytotoxicity of *Fusarium* mycotoxins to mammalian cell cultures as determined by the MTT bioassay. *Food and Chemical Toxicology* 43, 755-764.
- Claycombe, K.J., Nikbin Meydani, S. 2001. Vitamin E and genome stability. *Mutation Research* 475, 37-44.
- Clements, C., Ralph, S., Petras, M. 1997. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 29, 277-288.
- Concetta, F., Salvatore, M., Palmieria, C., Pappalardo, M., Librandò, V., Saccone, C. 2011. Phenylurea herbicides induce cytogenetic effects in Chinese hamster cell lines. *Mutation Research* 721, 89-84.
- Countryman, P., Heddle, J.A. 1976. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated human lymphocytes. *Mutation Research* 41, 321-332.
- Cox, C. 1999. Inert ingredients in pesticides: who's keeping secrets? *Journal of Pesticide Reform* 19, 2-7.

- Cox, C., Surgan, M. 2006. Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. *Environmental Health Perspectives* 114, 1803-1806.
- Chiang, S.Y., Lee, P.Y., Lai, M.T., Shen, L.C., Chung, W.S., Huang, H.F., Wu, K.Y., Wu, H.C. 2011. Safrole-2,3-oxide induces cytotoxic and genotoxic effects in HepG2 cells and in mice. *Mutation Research* 726, 234-241.
- Czerniczyniec, A., Karadayian, A. G., Bustamante, J., Cutrera, R. A., Lores-Arnaiz, S. 2011. Paraquat induces behavioral changes and cortical and striatal mitochondrial dysfunction. *Free Radical Biology and Medicine* 51, 1428-1436.
- Daleke, D.L. 2003. Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *Journal of Lipid Research* 44, 233-242.
- Davidson, C., Benard, M.F., Shaffer, H., Parker, J.M., O'Leary, C., Conlon, J.M., Rollins-Smith, L.A. 2007. Effects of chytrid and carbaryl exposure on survival, growth and skin peptide defenses in foothill yellow-legged frogs. *Environmental Science and Technology* 41, 1771-1776.
- Davison, C. 2004. Declining downwind: amphibian population declines in California and historical pesticide use. *Ecological Applications* 14, 1892-1902.
- De Marzi, L., Monaco, A., De Lapuente, J., Ramos, D., Borrás, M., Di Gioacchino, M., Santucci, S., Poma, A. 2013. Cytotoxicity and genotoxicity of ceria nanoparticles on different cell lines *in vitro*. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 3065-3077.
- Devlin, M.R., Kisiel, M.J., Kostusiak, A. 1979. Influence of R-40244 on pigment content of wheat and corn. *Weed Research* 19, 59-61.

- Díaz-Baez, M.C., Bustos López, M., Espinosa Ramirez, A.J., 2004. Pruebas de toxicidad acuática: Fundamentos y métodos. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia, pp. 142.
- Donald, P.F. 2004. Biodiversity impacts of some agricultural commodity production systems. *Conservation Biology* 18, 17-37.
- EFSA 2010. Peer review report to the conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance flurochloridone. *EFSA Journal* 8, 1869-1935.
- Evans, H., Neary, G.J., Williamson, F. 1959. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma rays on *Vicia faba* roots and the effects of oxygen. Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei. *International Journal of Radiation Biology* 3, 216-229.
- FAO, 2012. El estado mundial de la agricultura y la alimentación. FAO, Roma, pp. 1-178.
- Fenech, M. 2000. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation research* 455, 81-95.
- Fenech, M. 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 2, 1084-1104.
- Feng, S., Kong, Z., Wang, X., Zhao, L., Peng, P. 2004. Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian, *Rana N. Hallowell*. *Chemosphere* 56, 457-463.
- Ferrari, A., Lascano, C., Pechen De D'Angelo, A.M., Venturino, A. 2011. Effects of azinphos methyl and carbaryl on *Rhinella arenarum* larvae esterases and antioxidant enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 153, 34-39.

- Ferrari, A., Lascano, C.I., Anguiano, O.L., D'Angelo, A.M.P.d., Venturino, A. 2009. Antioxidant responses to azinphos methyl and carbaryl during the embryonic development of the toad *Rhinella* (*Bufo*) *arenarum* Hensel. *Aquatic Toxicology* 93, 37-44.
- Fleury, C., Mignotte, B., Vayssiere, J. 2002. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* 84, 131-141.
- Fridman, O., Corró, L., Herkovits, J. 2004. Estradiol uptake, toxicity, metabolism, and adverse effects on cadmium-treated amphibian embryos. *Environmental Health Perspectives* 112, 862-866.
- Fridovich, J. 1978. The biology of oxygen radicals. *Science* 201, 875-880.
- <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/i0142s/i0142S06.pdf>.
- Galloway, S.M., Armstrong, M.J., Reuben, C., Colman, S., Brown, B., Cannon, C., Bloom, A.D., Nakamura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, B.H., Resnick, M.A., Anderson, B., Zeiger, E. 1987. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluations of 108 chemicals. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 10, 1-35.
- García, S.I., Bovi Mitre, G., Moreno, I., Eiman Grossi, M., Digón, A., 2003. Taller regional sobre intoxicaciones por plaguicidas y armonización en la recolección de la información. Secretaría de Programas Sanitarios Subsecretaría de Programas de Prevención y Promoción. Ministerio de Salud de la Nación, Buenos Aires, Argentina, pp. 26.
- Geng, B., Yao, D., Xue, Q. 2005. Genotoxicity of the pesticide Dichlorvos and herbicide Butachlor in *Rhacophorus megacephalus* tadpoles. *Acta Zoologica Sinica* 51, 447-454.

- González, M., Soloneski, S., Reigosa, M.A., Larramendy, M.L. 2005. Effect of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and its derivative 2,4- D dichlorophenoxyacetic acid dimethylamine salt (2,4-D DMA). I. Genotoxic evaluation on Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicology In Vitro* 19, 289-297.
- González, N.V., Soloneski, S., Larramendy, M. 2009. Dicamba-induced genotoxicity on Chinese hamster ovary (CHO) cells is prevented by vitamin E. *Journal of Hazardous Materials* 163, 337-343.
- González, N.V., Soloneski, S., Larramendy, M.L. 2006. Genotoxicity analysis of the phenoxy herbicide dicamba in mammalian cells *in vitro*. *Toxicology In Vitro* 20, 1481-1487.
- González, N.V., Soloneski, S., Larramendy, M.L. 2007. The chlorophenoxy herbicide dicamba and its commercial formulation banvel induce genotoxicity in Chinese hamster ovary cells. *Mutation Research* 634, 60-68.
- Gosner, K.L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* 16, 183-190.
- Graham, W.B. 1994. Vitamin E: molecular and biological function. *Proceedings of the Nutrition Society* 53, 251-262.
- Grunh, P., Goletti, F., Yudelman, M., 2000. Manejo integrado de nutrientes, fertilidad del suelo y agricultura sostenible: problemas actuales y futuros retos. *International Food Policy Research Institute*, Washington, pp. 1-2.
- Hasan, M., Maitra, S.C., Ali, S.F. 1979. Organophosphate pesticide DDVP-induced alterations in the rat cerebellum and spinal cord - an electron microscopic study. *International Journal of Experimental Pathology* 17, 88-94.

- Heddle, J.A., Benz, R.D., Countryman, P.I., 1978. Measurement of chromosomal breakage in cultured cells by the micronucleus technique. Mutagen-induced chromosome damage in man. Evans Lloyd. Edinburgh University Press, Edinburgh, pp. 191-199.
- Herkovits, J., D'Eramo, J.L., Fridman, O. 2006. The effect of UV-B radiation on *Bufo arenarum* embryos survival and superoxide dismutase activity. International Journal of Environmental Research and Public Health 3, 43-47.
- Herrera, L.A., Tittelbach, H., Gebhart, E., Ostrosky-Wegman, P. 1991. Changes in the proliferation of human lymphocytes induced by several cytostatics and revealed by the premature chromosome condensation technique. Mutation Research 263, 101-106.
- Heuser, V.D., da Silva, J., Moriske, H., Dias, J.F., Yoneama, M.L., de Freitas, T.R.O. 2002. Genotoxicity biomonitoring in regions exposed to vehicle emissions using the comet assay and the micronucleus test in native rodent *Ctenomys minutus*. Environmental and Molecular Mutagenesis 40, 227–235.
- Hopkins, W.A. 2007. Amphibians as Models for Studying Environmental Change. ILAR Journal 48, 270-277.
- Houtgraaf, J.H., Versmissen, J., van der Giessen, W.J. 2006. A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. Cardiovascular Revascularization Medicine 7, 165- 172.
- http://iaspub.epa.gov/sor_internet/registry/substreg/searchandretrieve/advancedsearch/externalSearch.do?p_type=CASNO&p_value=61213-25-0.
- <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/Reports/346.htm>.
- http://www.alanwood.net/pesticides/class_herbicides.html.

<http://www.epa.gov>.

<http://www.fao.org>.

http://www.iucnredlist.org/about/summary-statistics#Fig_2.

http://www.pesticideinfo.org/Docs/ref_toxicity2.html#Acute.

http://www.senasa.gov.ar//Archivos/File/File4719-CTIVOS_Web%20Dic%202012.xls.

Hutler Wolkowicz, I.R., Herkovits, J., Pérez Coll, C.S. 2011. Stage-dependent toxicity of bisphenol a on *Rhinella arenarum* (anura, bufonidae) embryos and larvae. *Environmental Toxicology* 2, 146-154.

ICH 2011. Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceutical intended for human use S2 (R1). ICH Harmonised Tripartite Guideline.

INTA 2012. Evolución del mercado de herbicidas en Argentina. Instituto de ingeniería rural. *Economía y desarrollo agroindustrial* 1, 1-6.

Jha, A.N. 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23, 201-221.

Johansson, M., Piha, H., Kylin, H., Merilä, J. 2006. Toxicity of six pesticides to common frog (*Rana temporaria*) tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 3164-3170.

Jones, D.K., Hammond, J.I., Relyea, R.A. 2009. Very highly toxic effects of endosulfan across nine species of tadpoles: Lag effects and family-level sensitivity. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9, 1939-1945.

Junges, C.M., Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Cabagna Zenklusen, M.C., Basso, A. 2012. Toxicity of the fungicide trifloxystrobin on tadpoles and its effect on fish-tadpole interaction. *Chemosphere* 87, 1348-1354.

- Junges, C.M., Vidal, E.E., Attademo, A.M., Mariani, M.L., Cardell, L., Negro, A.C., Cassano, A., Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Zalazar, C.S. 2013. Effectiveness evaluation of glyphosate oxidation employing the H₂O₂/UVC process: Toxicity assays with *Vibrio fischeri* and *Rhinella arenarum* tadpoles. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* 48, 163-170.
- Kalender, S., Kalender, Y., Ogutcu, A., Uzunhisarcikli, M., Durak, D., Acikgoz, F. 2004a. Endosulfan-induced cardiotoxicity and free radical metabolism in rats: the protective effect of vitamin E. *Toxicology* 202, 227–235.
- Kalender, Y., Kalender, S., Uzunhisarcikli, M., Ogutcu, A., Açikgoz, F., Durak, D. 2004b. Effects of endosulfan on B cells of Langerhans islets in rat pancreas. *Toxicology* 200, 205–211.
- Kalender, S., Ogutcu, A., Uzunhisarcikli, M., Acikgoz, F., Durak, D., Ulusoy, Y., Kalender, Y. 2005. Diazinon-induced hepatotoxicity and protective effect of vitamin E on some biochemical indices and ultrastructural changes. *Toxicology* 211, 197–206.
- Kaya, A., Yigit, E. 2012. Interactions among glutathione s-transferase, glutathione reductase activity and glutathione contents in leaves of *Vicia faba L.* subjected to flurochloridone. *Fresenius Environmental Bulletin* 21, 1636-1640.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currier, A.R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 26, 239-257.

- Killinger, J.M., Wilczynski, S.L., Minor, J.L., Downs, J.R., Frank, D.W., Freudenthal, R.I. 1986. The effect of R-40244 on male fertility in rats. *Journal of Andrology*, 21.
- Klassen, C.D., 2008. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. McGraw-Hill, pp. 1280.
- Korenberg, J.R., Freedlender, E.F. 1974. Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges. *Chromosoma* 48, 355-360.
- Kosmider, B., Zyner, E., Osiecka, R., Ochocki, J. 2004. Induction of apoptosis and necrosis in A549 cells by the cis-Pt(II) complex of 3-aminoflavone in comparison with cis-DDP. *Mutation Research* 563, 61-70.
- Krishna, G., Nath, J., Petersen, M., Ong, T. 1988. *In vivo* and *in vivo/in vitro* kinetics of cyclophosphamide-induced sister-chromatid exchanges in mouse bone marrow and spleen cells. *Mutation Research* 204, 297-305.
- Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Peltzer, P.M., Junges, C.M., Cabagna, M.C. 2011. Toxicity of four herbicide formulations with glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) tadpoles: B-esterases and glutathione S-transferase inhibitors. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 60, 681-689.
- Lajmanovich, R.C., Junges, C.M., Attademo, A.M., Peltzer, P.M., Cabagna-Zenklusen, M.C., Basso, A. 2013. Individual and mixture toxicity of commercial formulations containing glyphosate, metsulfuron-methyl, bispyribac-sodium, and picloram on *Rhinella arenarum* tadpoles. *Water, Air, and Soil Pollution* 224, 1404-1416.
- Lamberti, L., Bigatti-Ponzetto, P., Ardito, G. 1983. Cell kinetics and sister chromatid exchange frequency in human lymphocytes. *Mutation Research* 120, 193-199.

- Larramendy, M.L., Bianchi, M.S., Padrón, J. 1989. Correlation between the anti-oxidant enzyme activities of blood fractions and the yield of bleomycin-induced chromosome damage. *Mutation Research* 214, 129-136.
- Larramendy, M.L., Knuutila, S. 1990. Immunophenotype and sister chromatid differentiation: A combined methodology for analyzing cell proliferation in unfractionated lymphocyte cultures. *Experimental Cell Research* 188, 209-213.
- Larramendy, M.L., Mello-Filho, A., Leme-Martins, E., Meneghini, R. 1987. Iron mediated induction of sister chromatid exchanges by hydrogen peroxide and superoxide anion. *Mutation Research* 178, 57-63.
- Larramendy, M.L., Popescu, N.C., Di Paolo, J.A. 1981. Induction by inorganic metal salts of sister chromatid exchange and chromosome aberrations in human and syrian hamster cell strains. *Environmental Mutagenesis* 3, 597-606.
- Lascano, C., Ferrari, A., Venturino, A. 2011a. Sublethal concentrations of azinphos-methyl induce biochemical and morphological alterations in *Rhinella arenarum* embryos. *Chemistry and Ecology* 27, 557-568.
- Lascano, C.I., Ferrari, A., Gauna, L.E., Cocca, C., Cochón, A.C., Verrengia, N., Venturino, A. 2011b. Organophosphorus insecticides affect normal polyamine metabolism in amphibian embryogenesis. *Pesticide, Biochemistry and Physiology* 101, 240-247.
- Lavilla, E.O., Richard, E., Scrocchi, G.J., 2000. Categorización de los Anfibios y Reptiles de la República Argentina. Asociación Herpetológica Argentina, pp. 1-97.

- Lay, M.M., Henstrand, J.M., Lawrence, S.R., Cromartie, T.H. 1985. Studies on the mode of action of the herbicide fluorochloridone. British Crop Protection Conference-Weeds, 179-186.
- Lay, M.M., Niland, A.M. 1983. The herbicidal mode of action of R-40244 and its absorption by plants. Pesticide Biochemistry and Physiology 19, 337-343.
- Lazarová, M., Slameňová, D. 2004. Genotoxic effects of a complex mixture adsorbed onto ambient air particles on human cells *in vitro*; the effects of vitamins E and C. Mutation Research 557, 167-175.
- Li, X., Li, S., Liu, S., Zhu, G. 2010. Lethal effect and *in vivo* genotoxicity of profenofos to Chinese native amphibian (*Rana spinosa*) tadpoles. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 59, 478-483.
- Liu, W., Wang, C., Wang, T., Fellers, G., Lai, B., Kam, Y. 2011. Impacts of the herbicide butachlor on the larvae of a paddy field breeding frog (*Fejervarya limnocharis*) in subtropical Taiwan. Ecotoxicology 20, 377-384.
- López, S.L., Aiassa, D., Benitez-Leite, S., Lajmanovich, R., Mañas, F., Poletta, G., Sanchez, N., Simoniello, M.F., Carrasco, A., 2012. Pesticides used in south american GMO-based agriculture: A review of their effects on humans and animal models. Advances in Molecular Toxicology. Elsevier, pp. 41-75.
- Lushchak , O.V., Kubrak, O.I., Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchak, V.I. 2009. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. Chemosphere 76, 932–937.
- Mann, R.M., Bidwell, J.R., Tyler, M.J. 2003. Toxicity of herbicide formulations to frogs and the implications for product registration: A case study from Western Australia. Applied Herpetology 1, 13–22.

- Mann, R.M., Hyne, R.V., Choung, C.B., Wilson, S.P. 2009. Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution* 157, 2903-2927.
- Martinez-Cayuela, M. 1998. Toxicidad de xenobióticos mediada por radicales libres de oxígeno. *Ars Pharmaceutica* 39, 5-18.
- Martini, C.N., Gabrielli, M., Vila, M.C. 2012. A commercial formulation of glyphosate inhibits proliferation and differentiation to adipocytes and induces apoptosis in 3T3-L1 fibroblasts. *Toxicology In Vitro* 26, 1007-1013.
- Mazzatorta, P., Benfenati, E., Neagu, D., Gini, G. 2002. The importance of scaling in data mining for toxicity prediction. *Journal of Chemical Information and Modeling* 42, 1250-1255.
- McGahon, A.J., Martín, S.J., Bissonnette, R.P., Mahboubi, A., Shi, Y., Mogil, R.J., Nishioka, W.K., Green, D.K. 1995. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis *in vitro*. *Methods in Cell Biology* 46, 153-185.
- Middlemore-Risher, M.L., Adam, B.L., Lambert, N.A., Terry Jr., A.V. 2011. Effects of chlorpyrifos and chlorpyrifos-oxon on the dynamics and movement of mitochondria in rat cortical neurons. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 339, 341-349.
- Miller, B.M., Adler, I.D. 1989. Suspect spindle poisons: analysis of c-mitotic effects in mouse bone marrow cells. *Mutagenesis* 4, 208-215.
- Ministerio de Salud Presidencia de la Nación, Secretaria de Ambiente y Desarrollo Sustentable, 2007. La problemática de los agroquímicos y sus envases, su incidencia en la salud de los trabajadores, la población expuesta por el ambiente. Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, pp. 312.

- Molinari, G., Soloneski, S., Reigosa, M.A., Larramendy, M.L. 2009. *In vitro* genotoxic and cytotoxic effects of ivermectin and its formulation ivomec[®] on Chinese hamster ovary (CHO_{K1}) cells. *Journal of Hazardous Materials* 165, 1074-1082.
- Molinari, G., Soloneski, S., Reigosa, M.A., Larramendy, M.L. 2010. Genotoxic and cytotoxic *in vitro* evaluation of ivermectin and its formulation ivomec[®] on *Aedes albopictus* larvae (CLL-126TM) cells. *Toxicological and Environmental Chemistry* 92, 1577-1593.
- Moretti, M., Marcarelli, M., Villarini, M., Fatigoni, C., Scassellati-Sforzolini, G., Pasquini, R. 2002. *In vitro* testing for genotoxicity of the herbicide terbutryn: cytogenetic and primary DNA damage. *Toxicology In Vitro* 16, 81-88.
- Mudry, M.D., Carballo, M.A., 2006. *Genética Toxicológica*. De Los Cuatro Vientos, Buenos Aires. Argentina, pp. 1-669.
- Natale, G.S. 2006. Análisis ecotoxicológico de una comunidad de anuros de la Región Pampeana - Efecto del Cr(VI) sobre embriones y larvas de distintas especies de una taxocomunidad. Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata. Tesis Doctoral, pp. 312.
- OECD 1986. Genetic Toxicology: *In vitro* sister chromatid exchange assay in mammalian cells. OECD Guideline for testing of chemicals.
- OECD 1992. Fish, early-life stage toxicity test. OECD Guideline for testing of chemicals.
- OECD 1997a. *In vitro* mammalian chromosome aberration test. OECD Guideline for testing of chemicals.
- OECD 1997b. Mammalian erythrocyte micronucleus test. OECD Guideline for testing of chemicals.

- OECD 2010. *In vitro* mammalian cell micronucleus test. OECD Guideline for testing of chemicals.
- Olivera, P.A., Colaço, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., De-La-Cruz, L.F., Lopes, C. 2007. Chemical Carcinogenesis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 79, 593-616.
- Ostling, O., Johanson, K.J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 123, 291-298.
- Painter, R.B. 1980. A replication model for sister-chromatid exchange. *Mutation Research* 70, 337-341.
- Papa, S., Skulachev, V.P. 1997. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Molecular and Cellular Biochemistry* 174, 305-319.
- Peixoto, F., Vicente, J. A. F., Madeira, V. M. C. 2003. The herbicide dicamba (2-methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid) interacts with mitochondrial bioenergetic functions. *Archives of Toxicology* 77, 403-409.
- Pengue, W., 2005. Agricultura industrial y transnacionalización en América Latina ¿la transgénesis de un continente? Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, Red de Formación Ambiental para América Latina y el Caribe, Colonia Lomas de Virreyes, pp. 205.
- Pengue, W., Bárcena, A., Katz, J., Morales, C., Schaper, M., 2004. Los transgénicos en América Latina y el Caribe: un debate abierto. Libros de la CEPAL, pp. 396.
- Pérez-Coll, C.S., Herkovits, J. 2004. Lethal and teratogenic effects of naringenin evaluated by means of an amphibian embryo toxicity test (AMPHITOX). *Food and Chemical Toxicology* 42, 299-306.

- Pérez-Coll, C.S., Herkovits, J. 2006. Synergistic effects of copper and butylic ester of 2,4- dichlorophenoxyacetic acid (Esternon Ultra) on amphibian embryos. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 3, 343-347.
- Pérez-Coll, C.S., Sztrum, A.A., Herkovits, J. 2008. Nickel tissue residue as a biomarker of sub-toxic exposure and susceptibility in amphibian embryos. *Chemosphere* 74, 78-83.
- Perry, P., Wolff, S. 1974. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 251, 156-158.
- Peruzzo, P., Porta, A.A., Ronco, A.E. 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental Pollution* 156, 61-66.
- Petrelli, G., Siepi, G., Miligi, L., Vineis, P. 1993. Solvents in pesticides. *Scandinavian Journal of Work, Environmental & Health* 19, 63-65.
- Pitarque, M., Creus, A., Marcos, R., Hughes, J.A., Anderson, D. 1999. Examination of various biomarkers measuring genotoxic endpoints from Barcelona airport personnel. *Mutation Research* 440, 195-204.
- Plenge-Tellechea, F., Sierra-Fonseca, J.A., Castillo-Sosa, Y.A., 2007. Riesgos a la salud humana causados por plaguicidas. *Tecnociencia Chihuahua*, pp. 4-6.
- Popescu, N.C., Turnbull, D., Di Paolo, J.A. 1977. Sister chromatid exchange and chromosome aberration analysis with the use of several carcinogens and nocarcinogens. *Journal of Natural Cancer Institute* 59, 289-293.
- Puck, T.T., Cieciura, S.J., Robinson, A. 1958. Genetics of somatic mammalian cells III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subject. *Journal of Experimental Medicine* 108, 945-956.

- Ralph, S., Petras, M., Pandrangi, R., Vrzac, M. 1996. Alkaline single-cell gel (Comet) assay and genotoxicity monitoring using two species of tadpoles. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 28, 112-120.
- Relyea, R.A. 2009. A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia* 159, 363-376.
- Repetto, M., Khun, G., 2009. *Toxicología fundamental*. Ediciones Diaz de Santos, S.A, pp. 432.
- Rodriguez-Cea, A., Ayllon, F., Garcia-Vazquez, E. 2003. Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 442-448.
- Rodriguez Ferreiro, G., Cancino Badias, L., Gonzalez Prieto, E., Espinosa Aguirre, J. 2001. Tinidazol: una droga antimicrobiana con actividad genotóxica. *Revista Cubana de Investigación Biomédica* 20, 54-58.
- Rojas, E., Herrera, L.A., Monserrat, S., Gonsebatt, M.E., Montero, R., Rodriguez, R., Ostrosky-Wegman, P. 1993. Mitotic index and cell proliferation kinetics for identification of antineoplastic activity. *Anti-Cancer Drugs* 4, 637-640.
- Sanchez-Lamar, A. 1999. Utilización de la línea celular CHO en los ensayos de genotoxicidad. *Revista Cubana de Investigación Biomédica* 18, 19-21.
- Sánchez-Torres, L., Vargas, F.D. 2003. Apoptosis: El fenómeno y su determinación. *Técnica Pecuaria en México* 41, 49-62.
- Satorre, E.H., 2005. Cambios tecnológicos en la agricultura Argentina actual. *Ciencia Hoy*, pp. 24-31.
- Segnini, M. I., Medina, J., Marcano, S., Boada-Sucre, A., Finol, H. 2005. Efectos del herbicida 2-cloro-2,6-bis-etilamina-S-triazina, sobre algunos tejidos de

- Colossoma macropomum* Cuvier 1818 (pisces: characidae). Boletín del Instituto Oceanográfico de Venezuela 44, 51-57.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. 1988. A simple technique for quantifications of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175, 184-191.
- Singh, N.P., 1996. Microgel electrophoresis of DNA from individual cells: principles and methodology. In: Pfeifer, G.P. (Ed.). *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations*. Plenum Press, New York, pp. 3-24.
- Šiviková, K., Piešová, E., Dianovský, J. 2001. The protection of vitamin E and selenium against carbon tetrachloride-induced genotoxicity in ovine peripheral blood lymphocytes. *Mutation Research* 494, 135-142.
- Soloneski, S., González, M., Piaggio, E., Apezteguía, M., Reigosa, M.A., Larramendy, M.L. 2001. Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation azzurro. I. Genotoxic evaluation on cultured human lymphocytes exposed *in vitro*. *Mutagenesis* 16, 487-493.
- Soloneski, S., González, M., Piaggio, E., Reigosa, M.A., Larramendy, M.L. 2002. Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation azzurro. III. Genotoxic evaluation on Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Mutation Research* 514, 201-212.
- Soloneski, S., Larramendy, M. 2010. Sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells treated with insecticide pirimicarb. *Journal of Hazardous Materials* 174, 410-415.

- Soloneski, S., Reigosa, M.A., Larramendy, M.L. 2003. Vitamin E prevents ethylene bis (dithiocarbamate) pesticide zineb-induced sister chromatid exchange in Chinese hamster ovary cells. *Mutagenesis* 18, 505-510.
- Soloneski, S., Reigosa, M.A., Molinari, G., González, N.V., Larramendy, M.L. 2008. Genotoxic and cytotoxic effects of carbofuran and furadan on Chinese hamster ovary (CHOK1) cells. *Mutation Research* 656, 68-73.
- Sotomayor, V., Lascano, C., de D'Angelo, A.M., Venturino, A. 2012. Developmental and polyamine metabolism alterations in *Rhinella arenarum* embryos exposed to the organophosphate chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31, 2052-2058.
- Souza Casadinho, J., 2007. La problemática del uso de los agroquímicos y sus envases, su incidencia en la salud de los trabajadores, la población expuesta y sus envases. Ministerio de salud de la Nación, Buenos Aires. Argentina, pp. 1-7.
- Sparling, D.W., Fellers, G.M., McConnell, L.L. 2001. Pesticides and amphibian population declines in California, USA. *Environmental, Toxicology and Chemistry* 20, 1591-1595.
- Stagos, D., Karaberis, E., Kouretas, D. 2005. Assessment of antioxidant/ anticarcinogenic activity of plant extracts by a combination of molecular methods. *In Vivo* 19, 741-747.
- Strunjak-Perovic, I., Coz-Rakovac, R., Topic Popovic, N., Jadan, M. 2009. Seasonality of nuclear abnormalities in gilthead sea bream *Sparus aurata* (L.) erythrocytes. *Fish Physiology and Biochemistry* 35, 287-291.

- Stuart, S.N., Chanson, J.S., Cox, N.A., Young, B.E., Rodriguez, A.S.L., Fischman, D.L., Waller, R.W. 2004. Status and trends of amphibians declines and extinctions worldwide. *Science* 306, 1783-1785.
- Svartz, G.V., Herkovits, J., Pérez-Coll, C.S. 2012. Sublethal effects of atrazine on embryo-larval development of *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). *Ecotoxicology* 21, 1251-1259.
- Sztrum, A.A., D'Eramo, J.L., Herkovits, J. 2011. Nickel toxicity in embryos and larvae of the South American toad: Effects on cell differentiation, morphogenesis, and oxygen consumption. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 1146-1152.
- Takaoka-Sugihara, N., Yamagami, S., Yokoo, S., Matsubara, M., Yagita, K. 2012. Cytopathic effect of *Acanthamoeba* on human corneal fibroblasts. *Molecular Vision* 18, 2221-2228.
- Taylor, J.H. 1958. Sister-chromatid exchanges in tritium-labeled chromosomes. *Genetics* 43, 515-529.
- Teubal, M., Domínguez, D., Sabatino, P., 2005. El campo argentino en la encrucijada. Estrategias y resistencias sociales, Ecos en la ciudad. Transformaciones agrarias en la Argentina. Agricultura industrial y sistema agroalimentario. Alianza Editorial, Buenos Aires, pp. 37-78.
- Thoday, J.M. 1951. The effect of ionizing radiations on the broad bean root X. Chromosome breakage and the lethality of ionizing radiations to the root meristem. *British Journal of Radiology* 24, 572-576.
- Torres, D., Capote, T. 2004. Agroquímicos un problema ambiental global: uso del análisis químico como herramienta para el monitoreo ambiental. *Ecosistemas* 3, 2-6.

- Tucker, J.D., Auletta, A., Cimino, M.C., Jacobson-Kram, D.K.L.D., Tice, R.R., Carrano, A.V. 1993. Sister-chromatid exchange: second report of the Gene-Tox Program. *Mutation Research* 297, 101-180.
- Udroiu, I. 2006. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology* 79, 201-204.
- Uhl, M., Helma, C., Knasmüller, S. 2000. Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (HepG2) cells. *Mutagenesis* 468, 213-225.
- UN 2011. Peligros para el medio ambiente. Naciones Unidas Parte 4, 229 - 258.
- Unrine, J.M., Hopkins, W.A., Romanek, C.S., Jackson, B.P. 2007. Bioaccumulation of trace elements in omnivorous amphibian larvae: Implications for amphibian health and contaminant transport. *Environmental Pollution* 149, 182-192.
- USEPA 1975. Methods for acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates, and amphibians. EPA 660/3-75-009, 62.
- USEPA, 1982. Pesticide Assessment Guidelines Subdivision E. Hazard evaluation: wildlife and aquatic organisms. United States Environmental Protection Agency. In: EPA-540/9-82-02, W.D.
- Vaira, M., Akmentins, M., Attademo, M., Baldo, D., Barrasso, D., Barrionuevo, S., Basso, N., Blotto, B., Cairo, S., Cajade, R., Céspedes, J., Corbalán, V., Chilote, P., Duré, M., Falcione, C., Ferraro, D., Gutierrez, R., Ingaramo, M., Junges, C., Lajmanovich, R., Lescano, J., Marangoni, F., Martinazzo, L., Marti, R., Moreno, L., Natale, G., Pérez Iglesias, J.M., Peltzer, P., Quiroga, L., Rosset, S., Sanabria, E., Sanchez, L., Schaefer, E., Úbeda, C., Zaracho, V. 2012. Categorización del

- estado de conservación de los anfibios de la República Argentina. Cuadernos de Herpetología 26, 131-159.
- Van den Eijnde, S.M., Boshart, L., Baehrecke, E.H., De Zeeuw, C.I., Reutelingsperger, C.P., Vermeij-Keers, C. 1988. Cell surface exposure of phosphatidylserine during apoptosis is phylogenetically conserved. Apoptosis 3, 9-16.
- Vera Candiotti, J., Natale, G., Soloneski, S., Ronco, A.E., Larramendy, M.L. 2010. Sublethal and lethal effects on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles exerted by the pirimicarb-containing technical formulation insecticide Aficida[®]. Chemosphere 78, 249–255.
- Vera Candiotti, J., Soloneski, S., Larramendy, M.L. 2013. Single-cell gel electrophoresis assay in the ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842), as bioassay for agrochemical induced genotoxicity. Ecotoxicology and Environmental Safety doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.08.011, En Prensa.
- Von Ledebur, M., Schmid, W. 1973. The micronucleus test methodological aspect. Mutation Research 19, 109-117.
- Westerink, W.M.A., Schirris, T.J.J., Horbach, G.J., Schoonen, W.G.E.J. 2011. Development and validation of a high-content screening *in vitro* micronucleus assay in CHO-k1 and HepG2 cells. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 724, 7-21.
- WHO-FAO, 2004. Pesticide residues in food-2004. Toxicological evaluations : part II / Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticides Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group, Rome, Italy 20–29 September 2004, pp. 451.

- WHO 1990. Public health impacts of pesticides used in agriculture (WHO in collaboration with the United Nations Environment Programme, Geneva, 1990). World Health Organization, Geneva, pp. 174.
- WHO, 2006. Recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to the classification. World Health Organization, Geneva, pp. 200.
- WHO, 2009. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2009. World Health Organization, Geneva, pp. 78.
- Widder, P.D., Bidwell, J.R. 2006. Cholinesterase activity and behavior in chlorpyrifos-exposed *Rana sphenocephala* tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 2446-2454.
- Widder, P.D., Bidwell, J.R. 2008. Tadpole size, cholinesterase activity, and swim speed in four frog species after exposure to sub-lethal concentrations of chlorpyrifos. *Aquatic Toxicology* 88, 9-18.
- Wilczynski, S.L., Killinger, J.M., Frank, D.W., Freudenthal, R.I. 1986. The effect of R-40244 on male reproductive function in the rabbit and nonhuman primate. *Journal of Andrology* 21.
- Wilhelm, H. 2002. Biología de la especies reactivas de oxígeno. *Mensaje Bioquímico* 26, 19-54.
- Wilson, D.M.R., Thompson, L.H. 2007. Molecular mechanisms of sister-chromatid exchange. *Mutation Research* 616, 11-23.
- Winter, H.K., Ehrlich, V.A., Grusch, M., Lackner, A., Schulte-Hermann, R., Grasl-Kraupp, B., Mikulits, W., Knasmüller, S. 2008. Use of four new human-derived liver-cell lines for the detection of genotoxic compounds in the single-cell gel

electrophoresis (SCGE) assay. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 657, 133-139.

Wiseman, H., Halliwell, B. 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochemical Journal* 313, 17-29.

www.iucnredlist.org, 2012.

Xu, W.N., Liu, W.B., Liu, Z.P. 2009. Trichlorfon-induced apoptosis in hepatocyte primary cultures of *Carassius auratus gibelio*. *Chemosphere* 77, 895–901.

Yagüe González, J.I., Yagüe Martínez de Tejada, A., 2013. Guía Práctica de Productos Fitosanitarios 2013. Gowan Española Fitosanitarios S. L., Barcelona, España, pp. 384.

Yang, J., Yu, Y., Hamrick, H.E., Duerksen-Hughes, P.J. 2003. ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses. *Carcinogenesis* 24, 1571-1580.

Yu, F., Wang, Z., Wang, J.Y., Wang, J., Bai, D. 2008. Apoptotic effect of organophosphorus insecticide chlorpyrifos on mouse retina *in vivo* via oxidative stress and protection of combinations of vitamins C and E. *Experimental Toxicology Pathology* 59, 415-423.

Yüzbaşıoğlu, D., Ünal, F., Sancak, C., Kasap, R. 2003. Cytological effects of the herbicide racar “flurochloridone” on *Allium Cepa*. *Caryologia* 56, 97-105.

Zeljezic, D., Garaj-Vrhovac, V., Perkovic, P. 2006. Evaluation of DNA damage induced by atrazine and atrazine-based herbicide in human lymphocytes *in vitro* using a comet and DNA diffusion assay. *Toxicology In Vitro* 20, 923-935.

Zullig, S., Neukomm, L.J., Jovanovic, M., Charette, S.J., Lyssenko, N.N., Halleck, M.S., Reutelingsperger, C.P.M., Schlegel, R.A., Hengartner, M.O. 2007. Aminophospholipid translocase TAT-1 promotes phosphatidylserine exposure during *C. elegans* apoptosis. *Current Biology* 17, 994-999.