

EVALUACIÓN DE LA GENOTOXICIDAD DE UNA PRESENTACIÓN COMERCIAL DEL GLIFOSATO PARA USO AGRÍCOLA EN LA LÍNEA CELULAR HEK 293

Erika Patricia Felizzola Jiménez

CC 63542399

Código estudiantil: 201512056641

Correo institucional: efelizzola@unisimon.edu.co

Trabajo de Investigación como requisito para optar el título de
Magister en Genética

Tutor/es

JORGE ALONSO LEYVA ROJAS MSc. Dr.rer.nat

ANTONIO ACOSTA HOYOS. PhD.

RESUMEN

El glifosato es una sustancia química de uso agrícola para el control de maleza en cultivos, jardinería y erradicación de cultivos ilícitos. Los seres humanos y animales al tener contacto con agua y alimentos contaminados con glifosato, puede provocar en ellos intoxicación, presentando síntomas como náuseas, vómito, calambre abdominal, diarrea y otros más severos como daño renal, hepático y eventualmente la muerte. El objetivo del presente estudio fue evaluar los efectos citotóxicos y genotóxicos de una presentación comercial de glifosato llamada PANZER® en la línea celular renal embrionaria humana HEK 293. Las células fueron expuestas a diferentes concentraciones de glifosato, 6,729 µg/ml; 13,39 µg/ml; 26,79 µg/ml; 47,25 µg/ml; 53,5 µg/ml; 94,5 µg/ml; 107 µg/ml; 162 µg/ml 176 µg/ml; 189 µg/ml; 216 µg/ml y un control de células HEK 293 sin ningún tratamiento de glifosato en condiciones *in vitro*. El efecto biológico que puede provocar el glifosato sobre las células fue evaluado en el ensayo clonogénico donde se observó que a partir de la concentración de 47,25 µg/ml disminuye la capacidad de multiplicación celular y esta capacidad clonogénica sigue disminuyendo en las concentraciones de 94,5 µg/ml y 189 µg/ml. En el ensayo citoma a partir de concentración de 47,25 µg/ml se observó la presencia de micronúcleos (MN), puentes nucleares (NPBs) y brotes nucleares (NBUDs), las células necróticas y apoptóticas aumentan en la concentración de 189 µg/ml. En el ensayo cometa se observó el daño sobre el ADN a partir de la concentración de 47,25 µg/ml y continuó aumentando en las concentraciones de 94,5 µg/ml y 189 µg/ml. Estos resultados mostraron el efecto citotóxico y genotóxico que puede provocar la presentación comercial de glifosato (PANZER®) en las células HEK 293. Además, de la necesidad de seguir estudiando diversos mecanismos de toxicidad asociados con la exposición al glifosato y sus implicaciones en la salud humana y ambiental con la finalidad de controlar el uso y manejo de este químico y así disminuir los riesgos a la salud.

Antecedentes:

El contacto originado por consumo de aguas contaminadas con formulaciones comerciales de glifosato y su participación en la cadena alimenticia genera preocupación por los efectos adversos que pueden presentarse en humanos y animales, ya que se ha encontrado glifosato y su metabolito ácido aminometilfosfónico (AMPA), como contaminantes medioambientales, tanto en el suelo como en los ríos.

En humanos la intoxicación por glifosato genera náuseas, vómitos, calambre abdominal, diarrea, ulceración gastrointestinal, daño renal y hepático, además de otros más severos como falla renal y respiratorio, convulsiones, coma y, eventualmente la muerte. En este sentido además es importante señalar que extensos estudios desarrollados por toxicólogos concluyen que el uso normal del herbicida glifosato, en su presentación original, en las dosis indicadas, no produce efectos adversos sobre el desarrollo, la reproducción o el sistema endocrino en humanos y otros mamíferos. Pero la composición química del glifosato (N-fosfonometil-glicina) en forma de sal isopropilamina y polioxietilenamina (POEA) como surfactante (soluble en agua), resulta mucho más tóxico que el mismo glifosato puro, y se ha comprobado en diferentes estudios que el surfactante POEA es extremadamente dañino para los organismos acuáticos.

Asimismo, cobra relevancia especial, si se tiene en cuenta que en Colombia han sido reportados casos de intoxicación con glifosato y sus formulaciones comerciales en peces nativos, tal es el caso del sur de Colombia y la región fronteriza con Ecuador. Otros estudios *in vitro*, clasifican al glifosato de manera particular como posible disruptor endocrino alterando el sistema hormonal reduciendo los niveles de testosterona, aumentando los trastornos reproductivos, además de afectar la producción de progesterona y aumentando también la mortalidad de las células placentarias, ello se evidenció a través de un estudio

observacional – experimental que permitió observar estos aspectos en hijos de trabajadoras del campo de Almería, España.

Otros estudios científicos se han preocupado en torno a la temática y sus resultados revelan el daño que provoca el glifosato, ya que este herbicida se ha detectado en los alimentos, el agua y en el aire mucho después de ser aplicado. Un informe de Organización Mundial de la Salud (OMS), que indicó que los animales se ven afectados a nivel gastrointestinal y embrionario provocando abortos en más del 50 % de los embarazos del ganado bovino, lo que amenaza la supervivencia de ésta especie.

En este sentido, la Agencia Internacional para Investigación en Cáncer (IARC), reveló en un informe que el glifosato hace parte de los 5 plaguicidas más peligrosos, clasificándolo en el grupo 2-A, lo que significa que es probablemente carcinogénico, es decir, hay suficiente evidencia de que el glifosato produce cáncer en experimentos controlados en animales, pero con evidencias limitadas en seres humanos.

Un estudio de tipo epidemiológico correspondiente a lugares como Colombia, México, Argentina, Estados Unidos, Nueva Zelanda, donde se realiza la agricultura y aspersiones con este herbicida, han señalado consecuencias clínicas con sintomatología de los humanos como resultado de la exposición por largos periodos al glifosato y el consumo de alimentos y aguas contaminadas con estos químicos.

Para este estudio, se escogió la formulación comercial de herbicida PANZER® de grado técnico (INVESA S.A. HS-P-A-013) para uso en Colombia, este estudio pretende evaluar los efectos citotóxicos y genotóxicos que tienen los productos a base de glifosato sobre la salud de los seres humanos y si esta presentación particular tiene efectos genotóxico en la línea celular renal embrionaria HEK 293.

Objetivos:

Objetivo general

Evaluar los efectos citotóxicos y genotóxicos del glifosato en la línea celular renal embrionaria HEK 293.

Objetivos específicos

- Determinar la viabilidad celular de células HEK293 sometidas a diferentes concentraciones de PANZER®.
- Evaluar los efectos citotóxicos y genotóxicos en las células HEK 293 expuestas a diferentes concentraciones de glifosato.

Materiales y Métodos:

Se utilizó la línea celular embrionaria humana de riñón, HEK 293. Esta línea ha sido usada tanto para estudio de fisiología, biología celular y molecular. Las células HEK 293, fueron obtenidas de la colección ATCC-CRL-1573.

El PANZER®, glifosato comercial que se utilizó para el estudio es de grado técnico (INVESA S.A. HS-P-A-013.) (360g/L de ácido glifosato). A partir de esta solución se preparó la solución de trabajo o “de uso en finca” equivalente a 150ml de PANZER® por cada 20 litros de agua, con una concentración de 2679 µg/ml. Para mantener la misma proporción, la preparación en el laboratorio fue 75µl de PANZER® por cada 10ml de medio DMEM manteniéndose a temperatura ambiente. Las concentraciones de glifosato fueron 6,729 µg/ml; 13,39 µg/ml; 26,79 µg/ml; 47,25 µg/ml; 53,5 µg/ml; 94,5 µg/ml; 107 µg/ml; 162 µg/ml 176 µg/ml; 189 µg/ml; 216 µg/ml y un control de células HEK 293 sin ningún tratamiento de glifosato

Ensayo Clonogénico.

Para observar si hay multiplicación celular, se expusieron las células HEK 293 al glifosato en el tiempo y concentraciones previamente establecidas. Posteriormente se realizaron los lavados, las células se desprendieron con tripsina y se realizó conteo en cámara new bauer. Luego se contaron y se sembró 400 células en cada pozo con 1,5ml de DMEM, cada concentración se sembró por triplicado. Se observó al microscopio cada 48 horas hasta el día 14 que fue el día en el que las células de los pozos control formaron colonias lo suficientemente grandes, que son colonias representativamente viables que contiene 50 células como mínimo para ser contada. Para fijar y colorear las colonias, se descartó el medio, se lavó con 200 μ l PBS 1X dos veces teniendo cuidado de no desprender las células, se retiró el PBS, y se agregó 3 ml de metanol puro durante 30 minutos para fijar las colonias, transcurrido el tiempo, retiramos el metanol, y se agregó 3 ml de cristal violeta al 0,5% por 30 minutos, pasado el tiempo se retiró el colorante haciendo lavados con PBS 1X o agua destilada sumergiendo la placa con mucho cuidado de no desprender las colonias, luego se dejó secar a temperatura ambiente por 24 horas y se hizo conteo de colonias en un estereomicroscopio. Después de esto se hacen los cálculos para hallar eficiencia de plaqueo (PE) y fracción de células supervivientes (SF)

Ensayo del Citoma.

Transcurridas las 24 horas del tratamiento con glifosato se retiró el medio, se lavaron las células con 200 μ l PBS 1X dos veces teniendo cuidado de no desprenderlas del pozo, se preparó medio con citocalasina, se agregó la citocalasina B (Sigma, C6762) a una concentración final de 60 μ g/ml de medio de cultivo DMEM y se incubó durante 24 horas a 37°C a 5% CO₂. Al finalizar las 24 horas se retiró la citocalasina, se lavaron las células con 200 μ l PBS 1X, se descartó, y luego se agregó 200 μ l de tripsina por 20 segundos para desprender

las células y se completa a un volumen de 1ml con 800µl de medio DMEM, se mezclaron cuidadosamente las células, luego se centrifugó a 700 rpm por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células con 1ml de PBS y luego se trató con 2 ml de solución hipotónica (0,075 M KCl) por 3 minutos, transcurridos los 3 minutos se fijó con 3 ml de metanol absoluto/ácido acético glacial 99.5%, en proporción 3:1, se resuspendieron las células suavemente. Para hacer las placas, las células fijadas se dejaron caer por goteo sobre portaobjetos frío humidificado. Las láminas se dejaron secar al aire y se tiñeron con Giemsa stain, al 10% durante 8 minutos.

Para el análisis, 1000 células BN se contaron con un microscopio óptico; 500 células por portaobjetos se contaron y se clasificaron para determinar las proporciones de células mononucleadas, binucleadas y células multinucleadas para obtener el índice de división nuclear (NDI).

Ensayo Cometa.

Se tomó 20 µl de células previamente tratadas con glifosato por 24 horas y se mezclaron con 70 µl de 0,5% de agarosa de bajo punto de fusión (LMA-Invitrogen) a 37° C. Esta mezcla se colocó en un portaobjetos previamente recubierto con agarosa punto de fusión normal al 1,5% y tratadas a 60° C. Las capas de agarosa se cubrieron con un cubreobjetos, se mantuvieron a 4° C durante 5 minutos para permitir la solidificación de la agarosa. Los portaobjetos se sumergieron durante la noche en solución de lisis (2,5 M NaCl, 100 mM de EDTA y 10 mM Tris; pH 10,0-10,5; 1% con recién añadido 1% de Tritón X-100% y 10% de DMSO) a 4°C en oscuridad. A continuación, los portaobjetos se colocaron en tampón alcalino (NaOH 300 mM y EDTA 1 mM; pH> 13, durante 30 min a 4°C, para desenrollar el ADN. La electroforesis alcalina se realizó durante 30 minutos a 25 V y 300 mA. Este procedimiento alcalino estándar permite detectar roturas en el ADN de una sola hebra; en estas condiciones, las lesiones alcalinas débiles se convierten en roturas de hebras. Los geles se neutralizaron con 0,4 M Tris (pH 7,5), se hicieron

tres lavados con intervalos de 5 minutos cada uno. Por último, los portaobjetos se tiñeron con 30µl de SYBR Green (2µl/ml) y se examinaron en aumento de 40x con un microscopio fluorescencia equipado con un filtro verde de 540 nm.

Resultados:

Después de exponer las células HEK 293 a las concentraciones de glifosato 6,729; 13,39; 26,69; 53,5; 107; 162 y 216 µg/ml por 24 horas observamos que en la concentración de 216 µg/ml hubo muerte celular del 100% y en la concentración de 162 µg/ml todavía presentaba una viabilidad de más del 70%.

Debido a que la concentración de glifosato de 216 µg/ml ocasionó el 100% de muerte celular y la concentración de 162 µg/ml se observó más del 70% de células vivas, se establecieron valores intermedios entre esas dos concentraciones para hallar la dosis letal 50

los porcentajes de la Fracción Superviviente (SF) de las células HEK 293 que fueron sembradas inmediatamente después del tratamiento con glifosato. Se observó una variación de entre 23,6% y un 84,7% para las diferentes concentraciones de PANZER® con respecto al control.

Para determinar el efecto del glifosato en el citoma de las células HEK293 se determinó el número de micronúcleos (MN), puentes nucleares (NPBs), brotes nucleares (NBUDs), además del porcentaje de células necróticas y apoptóticas en las diferentes concentraciones de glifosato. Se observó que en las concentraciones de 47,25 µg/ml, 94,5 µg/ml, 189 µg/ml, hubo un incremento en el promedio de MN, NPBs y NBUDs con respecto al control. En el porcentaje de células necróticas y apoptóticas solo hubo aumento en la concentración de 189 µg/ml con respecto al control

El porcentaje de ADN de la cola, en las células HEK 293 observado después del tratamiento con las diferentes concentraciones de glifosato. Los resultados

mostraron un incremento en el porcentaje de la cola hasta del 48,41% para la concentración de 189µg/ml.

Conclusiones:

Se estableció que la concentración mínima inhibitoria de PANZER® en la línea celular HEK 293 fue 189 µg/ml, siendo 14 veces menor a la usada en campo.

En el estudio realizado se evidencia el efecto genotóxico del glifosato en su presentación comercial PANZER® en la línea celular de riñón HEK 293, a partir de la concentración de 47,25 µg/ml del producto evidenciado por la fragmentación del ADN.

En el ensayo clonogénico se observó que el daño producido en el ADN de las células de riñón HEK293 persiste en las siguientes generaciones por la disminución del porcentaje de crecimiento, ya que estas pierden la capacidad de multiplicarse por daños en el ADN.

Se sugiere que el glifosato, en la presentación comercial PANZER®, no se limita únicamente a afectar los elementos de las plantas para el cual es comercializado, sino que puede alterar la estructura del ADN de humanos y animales.

Finalmente, para efectos de estudios a futuro, se recomienda hacer evaluaciones en humanos y animales que habiten lugares donde se trabaje con glifosato.

Palabras clave:

PANZER®, Citotoxicidad, Genotoxicidad, Glifosato

ABSTRACT

Glyphosate is a chemical used in agriculture to control weeds in crops, gardening and the eradication of illicit crops. Human beings and animals, when in contact with water and food contaminated with glyphosate, can cause intoxication in them, presenting symptoms such as nausea, vomiting, abdominal cramps, diarrhea and other more severe ones such as kidney and liver damage and eventually death. The objective of the present study was to evaluate the cytotoxic and genotoxic effects of a commercial presentation of glyphosate called PANZER® in the human embryonic kidney cell line HEK 293. The cells were exposed to different concentrations of glyphosate, 6,729 µg/ml; 13.39 µg/ml; 26.79 µg/ml; 47.25 µg/ml; 53.5 µg/ml; 94.5 µg/ml; 107 µg/mL; 162 µg/ml 176 µg/ml; 189 µg/ml; 216 µg/ml and a control of HEK 293 cells without any glyphosate treatment under in vitro conditions. The biological effect that glyphosate can cause on cells was evaluated in the clonogenic assay, where it was observed that from a concentration of 47.25 µg/ml the capacity for cell multiplication decreases and this clonogenic capacity continues to decrease at concentrations of 94 0.5 µg/ml and 189 µg/ml. In the cytome assay from a concentration of 47.25 µg/ml, the presence of micronuclei (MN), nuclear bridges (NPBs) and nuclear buds (NBUDs) was observed, the necrotic and apoptotic cells increase in the concentration of 189 µg/ml. ml. In the comet assay DNA damage was observed starting at the 47.25 µg/ml concentration and continued to increase at the 94.5 µg/ml and 189 µg/ml concentrations. These results showed the cytotoxic and genotoxic effect that the commercial presentation of glyphosate (PANZER®) can cause in HEK 293 cells. In addition, the need to continue studying various mechanisms of toxicity associated with exposure to glyphosate and its implications for health human and environmental in order to control the use and management of this chemical and thus reduce health risks.

Background:

Contact caused by consumption of water contaminated with commercial formulations of glyphosate and its participation in the food chain raises concern about the adverse effects that may occur in humans and animals, since glyphosate and its metabolite aminomethylphosphonic acid (AMPA) have been found, as environmental pollutants, both in the soil and in rivers.

In humans, glyphosate poisoning causes nausea, vomiting, abdominal cramps, diarrhea, gastrointestinal ulceration, kidney and liver damage, in addition to other more severe conditions such as kidney and respiratory failure, seizures, coma, and eventually death. In this sense, it is also important to point out that extensive studies carried out by toxicologists conclude that the normal use of the herbicide glyphosate, in its original presentation, in the indicated doses, does not produce adverse effects on development, reproduction or the endocrine system in humans and others. mammals. But the chemical composition of glyphosate (N-phosphonomethyl-glycine) in the form of isopropylamine salt and polyoxyethyleneamine (POEA) as a surfactant (soluble in water), is much more toxic than the same pure glyphosate, and it has been proven in different studies that the POEA surfactant is extremely harmful to aquatic organisms.

Likewise, it takes on special relevance, if one takes into account that cases of intoxication with glyphosate and its commercial formulations in native fish have been reported in Colombia, such is the case of southern Colombia and the border region with Ecuador. Other in vitro studies classify glyphosate in a particular way as a possible endocrine disruptor, altering the hormonal system, reducing testosterone levels, increasing reproductive disorders, in addition to affecting the production of progesterone and also increasing the mortality of placental cells. through an observational-experimental study that allowed us to observe these aspects in children of farm workers in Almeria, Spain.

Other scientific studies have been concerned about the issue and their results reveal the damage caused by glyphosate, since this herbicide has been detected in food, water and in the air long after it has been applied. A report from the World Health Organization (WHO), which indicated that animals are affected at the gastrointestinal and embryonic levels, causing abortions in more than 50% of cattle pregnancies, which threatens the survival of this species.

In this sense, the International Agency for Research on Cancer (IARC), revealed in a report that glyphosate is part of the 5 most dangerous pesticides, classifying it in group 2-A, which means that it is probably carcinogenic, that is, there is sufficient evidence that glyphosate causes cancer in controlled animal experiments, but limited evidence in humans.

An epidemiological study corresponding to places such as Colombia, Mexico, Argentina, the United States, and New Zealand, where agriculture and spraying with this herbicide are carried out, have indicated clinical consequences with symptoms in humans as a result of long-term exposure to the herbicide. glyphosate and the consumption of food and water contaminated with these chemicals.

For this study, the commercial formulation of technical grade herbicide PANZER® (INVESA S.A. HS-P-A-013) was chosen for use in Colombia. This study aims to evaluate the cytotoxic and genotoxic effects of glyphosate-based products. on human health and whether this particular presentation has genotoxic effects on the HEK 293 embryonic kidney cell line.

Objective:

General

To evaluate the cytotoxic and genotoxic effects of glyphosate in the HEK 293 embryonic kidney cell line.

Specific objectives

- Determine the cell viability of HEK293 cells subjected to different concentrations of PANZER®.
- Evaluate the cytotoxic and genotoxic effects in HEK 293 cells exposed to different concentrations of glyphosate.

Materials and Methods:

The human embryonic kidney cell line, HEK 293, was used. This line has been used to study physiology, cell and molecular biology. HEK 293 cells were obtained from the ATCC-CRL-1573 collection.

The PANZER®, commercial glyphosate that was used for the study is technical grade (INVESA S.A. HS-P-A-013.) (360g/L of glyphosate acid). From this solution, the working solution or "for farm use" was prepared, equivalent to 150ml of PANZER® for every 20 liters of water, with a concentration of 2679 µg/ml. To maintain the same proportion, the laboratory preparation was 75µl of PANZER® for every 10ml of DMEM medium, kept at room temperature. Glyphosate concentrations were 6,729 µg/ml; 13.39 µg/ml; 26.79 µg/ml; 47.25 µg/ml; 53.5 µg/ml; 94.5 µg/ml; 107 µg/mL; 162 µg/ml 176 µg/ml; 189 µg/ml; 216 µg/ml and a control of HEK 293 cells without any glyphosate treatment

Clonogenic assay.

To observe if there is cell multiplication, HEK 293 cells were exposed to glyphosate in the previously established time and concentrations. Subsequently, the washings were carried out, the cells were detached with trypsin and counting was carried out in a new bawer chamber. They were then counted and 400 cells were seeded in each well with 1.5 ml of DMEM, each concentration was seeded in triplicate. It was observed microscopically every 48 hours until day 14, which was the day when the cells in the control wells formed large enough colonies, that is, representative viable colonies containing at least 50 cells to be counted. To fix and color the colonies, the medium was discarded, washed with 200 μ l PBS 1X twice, taking care not to detach the cells, the PBS was removed, and 3 ml of pure methanol was added for 30 minutes to fix the colonies. elapsed the time, we removed the methanol, and added 3 ml of 0.5% crystal violet for 30 minutes, after the time the dye was removed by washing with PBS 1X or distilled water submerging the plate with great care not to detach the colonies, then it was allowed to dry at room temperature for 24 hours and colonies were counted in a stereomicroscope. After this, calculations are made to find plating efficiency (PE) and fraction of surviving cells (SF).

Cytome Assay.

After 24 hours of treatment with glyphosate, the medium was removed, the cells were washed with 200 μ l PBS 1X twice, taking care not to detach them from the well, medium was prepared with cytochalasin, cytochalasin B (Sigma, C6762) was added to a final concentration of 60 μ g/ml of DMEM culture medium and incubated for 24 hours at 37°C at 5% CO₂. At the end of 24 hours, the cytochalasin was removed, the cells were washed with 200 μ l PBS 1X, discarded, and then 200 μ l of trypsin was added for 20 seconds to detach the cells and it was completed to a volume of 1 ml with 800 μ l of medium. DMEM, the cells were carefully mixed, then centrifuged at 700 rpm for 10 minutes, the supernatant was discarded and the cells were resuspended with 1 ml of PBS and then treated with 2 ml of hypotonic solution (0.075 M KCl) for 3 minutes, After 3 minutes, it was fixed with 3 ml of

absolute methanol/99.5% glacial acetic acid, in a 3:1 ratio, and the cells were gently resuspended. To make the plates, the fixed cells were dropped onto cold, humidified slides. Slides were air-dried and stained with 10% Giemsa stain for 8 minutes.

For analysis, 1000 BN cells were counted under a light microscope; 500 cells per slide were counted and graded to determine the proportions of mononucleated, binucleated, and multinucleated cells to obtain the nuclear division index (NDI).

Comet Essay.

Twenty μ l of cells previously treated with glyphosate for 24 hours were taken and mixed with 70 μ l of 0.5% low melting point agarose (LMA-Invitrogen) at 37°C. This mixture was placed on a previously coated slide. with 1.5% normal melting point agarose and treated at 60°C. The agarose layers were covered with a coverslip, kept at 4°C for 5 minutes to allow the agarose to solidify. Slides were immersed overnight in lysis solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, and 10 mM Tris; pH 10.0-10.5; 1% with freshly added 1% Triton X-100% and 10% DMSO) at 4°C in the dark. Slides were then placed in alkaline buffer (300 mM NaOH and 1 mM EDTA; pH> 13, for 30 min at 4°C, to unwind the DNA. Alkaline electrophoresis was performed for 30 min at 25 V and 300 mA This standard alkaline procedure allows detection of single-stranded DNA breaks, under these conditions weak alkaline lesions become strand breaks Gels were neutralized with 0.4 M Tris (pH 7.5), made three washes with intervals of 5 minutes each Finally, the slides were stained with 30 μ l of SYBR Green (2 μ l/ml) and examined at 40x magnification with a fluorescence microscope equipped with a 540nm green filter.

Results:

After exposing HEK 293 cells to glyphosate concentrations 6,729; 13.39; 26.69; 53.5; 107; 162 and 216 μ g/ml for 24 hours, we observed that at the concentration

of 216 $\mu\text{g/ml}$ there was 100% cell death and at the concentration of 162 $\mu\text{g/ml}$ there was still a viability of more than 70%.

Since the glyphosate concentration of 216 $\mu\text{g/ml}$ caused 100% cell death and the concentration of 162 $\mu\text{g/ml}$ more than 70% of living cells were observed, intermediate values between these two concentrations were established to find the lethal dose. fifty

Surviving Fraction (SF) percentages of HEK 293 cells that were seeded immediately after glyphosate treatment. A variation of between 23.6% and 84.7% was observed for the different concentrations of PANZER® with respect to the control.

To determine the effect of glyphosate on the cytome of HEK293 cells, the number of micronuclei (MN), nuclear bridges (NPBs), and nuclear sprouts (NBUDs) were determined, in addition to the percentage of necrotic and apoptotic cells in the different concentrations of glyphosate. It was observed that in the concentrations of 47.25 $\mu\text{g/ml}$, 94.5 $\mu\text{g/ml}$, 189 $\mu\text{g/ml}$, there was an increase in the average of MN, NPBs and NBUDs with respect to the control. In the percentage of necrotic and apoptotic cells, there was only an increase in the concentration of 189 $\mu\text{g/ml}$ with respect to the control

The percentage of tail DNA in HEK 293 cells observed after treatment with the different concentrations of glyphosate. The results showed an increase in the percentage of the tail up to 48.41% for the concentration of 189 $\mu\text{g/ml}$.

Conclusions:

It was established that the minimum inhibitory concentration of PANZER® in the HEK 293 cell line was 189 $\mu\text{g/ml}$, being 14 times lower than that used in the field.

In the study carried out, the genotoxic effect of glyphosate in its commercial presentation PANZER® is evidenced in the HEK 293 kidney cell line, from the concentration of 47.25 µg/ml of the product evidenced by DNA fragmentation.

In the clonogenic assay, it was observed that the damage produced in the DNA of the HEK293 kidney cells persists in the following generations due to the decrease in the growth percentage, since they lose the ability to multiply due to DNA damage.

It is suggested that glyphosate, in the commercial presentation PANZER®, is not limited only to affecting the elements of the plants for which it is marketed, but that it can alter the structure of the DNA of humans and animals.

Finally, for the purposes of future studies, it is recommended to carry out evaluations in humans and animals that inhabit places where glyphosate is worked.

KeyWords:

PANZER®, Cytotoxicity, Genotoxicity, Glyphosate.

REFERENCIAS

1. Benbrook CM. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ Sci Eur*. 2016;28(1):1–15.
2. Varona M, Henao GL, Díaz S, Lancheros A, Murcia Á, Rodríguez N, et al. Evaluación de los efectos del glifosato y otros plaguicidas en la salud humana en zonas objeto del programa de erradicación de cultivos ilícitos. *Biomédica*. 2009 [cited 2017 May 16];29:456–75.
3. Myers JP, Antoniou MN, Blumberg B, Carroll L, Colborn T, Everett LG, et al. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: A consensus statement. *Environ Heal A Glob Access Sci Source*
4. Mesnage R, Defarge N, Spiroux de Vendômois J, Séralini GE. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food Chem Toxicol*. 2015;84:133–53.
5. Schinasi L, Leon ME. Non-hodgkin lymphoma and occupational exposure to agricultural pesticide chemical groups and active ingredients: A systematic review and meta-analysis. *Int J Environ Res Public Health*. 2014;11(4):4449–527.
6. Bolognesi C. Genotoxicity of pesticides: A review of human biomonitoring studies. *Mutat Res - Rev Mutat Res*. 2003;543(3):251–72.
7. Turkez H, Arslan ME, Ozdemir O. Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*
8. Christmann M, Kaina B. Transcriptional regulation of human DNA repair genes following genotoxic stress: Trigger mechanisms, inducible responses and genotoxic adaptation. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(18):8403–20.
9. Nohmi T. Thresholds of genotoxic and non-genotoxic carcinogens. *Toxicol Res*. 2018;34(4):281–90.
10. Zhang Y. Cell toxicity mechanism and biomarker. *Clin Transl Med*. 2018;7(1). Available from: <https://doi.org/10.1186/s40169-018-0212-7>
11. Producto C, Panzer T, Gestí SLSDE. HERBICIDAS NO SELECTIVOS. 2016.
12. Zirena Vilca F, Gosgot Angeles W, Campos Quiroz CN, Zamalloa Cuba WA. Glyphosate in water bodies: environmental problem. *Rev Investig Altoandinas-Journal High Andean Res* []. 2018;20(3):325–32.

13. Cortina C, Fonnegra F, Pineda M, Muñoz P, Fonnegra R, Díaz Z, et al. Efectos de la intoxicación por glifosato en la población agrícola: revisión de tema Effects of glyphosate intoxication in farming population: topic review. *Rev CES Salud Pública*. 2017;8(1):121–33.
14. Williams GM, Kroes R, Munro IC. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2000;31(2 I):117–65.
15. Eslava Mocha PR, Ramírez Duarte WF, Rondón Barragán IS. Sobre los efectos del glifosato y sus mezclas: Impacto en peces nativos. Vol. 1, Universidad de los Llanos. 2007. 150 p.
16. Clair É, Mesnage R, Traveret C, Séralini GÉ. A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells in vitro, and testosterone decrease at lower levels. *Toxicol Vitro*. 2012;26(2):269–79.
17. Norma julieta Salazar lopez M lourdes AM. HERBICIDA GLIFOSATO: USOS, TOXICIDAD Y REGULACION. *Biotecnia*. 2011 [cited 2017 May 15];XIII:6.
18. Alvarez, Maria; Gimenez; Isabel T, Saitua, Hugo; Enriz, Ricardo D; Giannini FA. Toxicidad en peces de herbicidas formulados con glifosato. *Acta Toxicol Argent*. 2012 [cited 2017 May 18];20(1):5–13.
19. INSTITUTO NACIONAL DE SALUD. APRECIACION REPORTE IARC CLASIFICACION HERBICIDA GLIFOSATO]. BOGOTA; 2015 [cited 2017 May 15].
20. Nivia E. Efectos sobre la salud y el ambiente de herbicidas que contienen glifosato. 1998;
21. Walsh J, Sánchez G, Salinas Y. Aspersión aérea de los cultivos en Colombia: Una estrategia fallida. Of en Washingt para Asuntos Latinoam [Internet]. 2008;1–124. Available from: <http://www.indepaz.org.co/wp-content/uploads/2015/05/LAS-FUMIGACIONES-ESTRATEGIA-FALLIDA.pdf>
22. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*. 1977;36(1):59–72.
23. Swiech K, Picanço-Castro V, Covas DT. Human cells: New platform for recombinant therapeutic protein production. *Protein Expr Purif*. 2012;84(1):147–53.
24. Baldi L, Hacker DL, Adam M, Wurm FM. Recombinant protein production by

large-scale transient gene expression in mammalian cells: State of the art and future perspectives. *Biotechnol Lett.* 2007;29(5):677–84.

25. Durocher Y, Perret S, Kamen A. High-level and high-throughput recombinant protein production by transient transfection of suspension-growing human 293-EBNA1 cells. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(2):1–9.
26. Croset A, Delafosse L, Gaudry JP, Arod C, Glez L, Losberger C, et al. Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells. *J Biotechnol.* 2012;161(3):336–48.
27. Green Fluorescent HEK-293 Cell Line - Innoprot Stable Cell Lines [Internet]. [cited 2022 Mar 5]. Available from: <https://innoprot.com/es/product/green-fluorescent-hek-293-cell-line/>
28. Anadón A, Martínez-Larrañaga MR, Martínez MA, Castellano VJ, Martínez M, Martín MT, et al. Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. *Toxicol Lett.* 2009;190(1):91–5.
29. Monroy CM, Cortés AC, Sicard DM. Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato. 2005;
30. Jorge Kaczewer. Toxicología del Glifosato: Riesgos para la salud humana. *Publ El* 20/12/2002 . 2002;1–7.
31. Investigadores argentinos demuestran la toxicidad del glifosfato en microcrustáceos [Internet]. [cited 2022 Mar 5]. Available from: <https://www.dicyt.com/noticias/investigadores-argentinos-demuestran-la-toxicidad-del-glifosfato-en-microcrustaceos>
32. Biggwood Jeremy P, Gobierno E, Unidos E, Federal C, Unidos E, Unidos E. Breve Resumen de la Literatura Científica con Respeto a los Efectos Nocivos de Formulaciones que Contienen Glifosato en Biotas Acuáticas y Suelos muerte de peces y otra vida acuática , así como daños a cultivos lícitos , bosques vírgenes y fauna ,. *ECOportal.net.* 2002;1–6.
33. Dinehart SK, Smith LM, McMurry ST, Smith PN, Anderson TA, Haukos DA. Acute and chronic toxicity of Roundup Weathermax®and Ignite®280 SL to larval *Spea multiplicata* and *S. bombifrons* from the Southern High Plains, USA. *Environ Pollut* . 2010;158(8):2610–7.
34. Achiorno CL, Villalobos C d., Ferrari L. Toxicity of the herbicide glyphosate to *Chordodes nobilii* (Gordiida, Nematomorpha). *Chemosphere.* 2008;71(10):1816–22.
35. Marc J, Le Breton M, Cormier P, Morales J, Bellé R, Mulner-Lorillon O. A

glyphosate-based pesticide impinges on transcription. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005;203(1):1–8.

36. Paganelli A, Gnazzo V, Acosta H, Lo SL, Carrasco E. Glyphosate-Based Herbicides Produce Teratogenic Effects on Vertebrates by Impairing Retinoic Acid Signaling. 2010;1586–95.
37. Carolina Barbosa M, Aiassa D, Mañas F, Barbosa MC, Aiassa D, Mañas F. EVALUACIÓN DE DAÑO AL ADN EN LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA EXPUESTOS AL HERBICIDA GLIFOSATO. *Rev Int Contam Ambient.* 2017 Aug 1 [cited 2018 Sep 30];33(3):403–10.
38. Mladinic M, Berend S, Vrdoljak AL, Kopjar N, Radic B, Zeljezic D. Evaluation of genome damage and its relation to oxidative stress induced by glyphosate in human lymphocytes in vitro. *Environ Mol Mutagen.* 2009 Dec [cited 2018 Sep 30];50(9):800–7.
39. Plaguidas CPOR. Contaminacion por plaguidas 1. 2017;
40. Chang DJ, Cimprich KA. DNA damage tolerance: When it's OK to make mistakes. *Nat Chem Biol.* 2009;5(2):82–90.
41. Cardona YT, Aparecida M, Morales M. Principales mecanismos de reparacion de daños en la molecula de ADN. *Rev Biosalud.* 2015;13(2):95–110.
42. Yang CG, Garcia K, He C. Damage detection and base flipping in direct DNA alkylation repair. *ChemBioChem.* 2009;10(3):417–23.
43. Pâques F, Haber JE. Multiple Pathways of Recombination Induced by Double-Strand Breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1999;63(2):349–404.
44. Rodríguez-Beltrán J, Rodríguez-Rojas A, Guelfo JR, Couce A, Blázquez J. The *escherichia coli* *sos* gene *dinf* protects against oxidative stress and bile salts. *PLoS One.* 2012;7(4).
45. Altogen Biosystems. HEK293 Cell Line Origins, Cytogenetics, and Expression [Internet]. 2018. Available from: <https://www.hek293.com/>
46. 293 [HEK-293] | ATCC [Internet]. [cited 2022 Mar 5]. Available from: <https://www.atcc.org/products/crl-1573>
47. Sof N, Salazar M, Guia P, Gerdtsen ZP, Miembros H, Comisi DELA, et al. OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO DE CÉLULAS HEK293 EN SUSPENSIÓN PARA SU. 2007;

48. López Castro AF. Análisis comparativo de células HEK293 en cultivo y producción de adenovirus. 2010;1–93.
49. DIVISON A. HERBICIDAS NO SELECTIVOS, HOJA DE SEGURIDAD. Vol. 67. GIRARDOT, ANTIOQUIA; 2007.
50. UASLP. Standard Operating Procedures (SOPs) Laboratorio de Genómica Viral y Humana Facultad de Medicina UASLP Conteo celular y evaluación de viabilidad. 2013; Available from: http://www.genomica.uaslp.mx/Protocolos/Cell_counts_SPA.pdf
51. Roldán E. El Papel del metabolismo fase II en Toxicología Introducción a la toxicología. 2016. 58–59 p. Available from:
52. Munshi A, Hobbs M, Meyn RE. Clonogenic Cell Survival Assay. Chemosensitivity. 110:021–8. Available from: <http://link.springer.com/10.1385/1-59259-869-2:021>
53. Rafahi H, Orlowski C, Georgiadis GT, Ververis K, El-Osta A, Karagiannis TC. Clonogenic Assay: Adherent Cells. J Vis Exp. 2011;(49):15–7.
54. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. Nat Protoc. 2007;2(5):1084–104.
55. Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S. The HUMAN MicroNucleus Project - An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen. 1999;428(1–2):271–83.
56. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res. 1988;175(1):184–91.
57. Collins AR. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. Biochim Biophys Acta - Gen Subj [Internet]. 2014;1840(2):794–800. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.04.022>
58. Eisenbrand G, Pool-zobel B, Baker V, Balls M, Blaauboer BJ, Boobis A, et al. Methods of in vitro toxicology. 2002;40:193–236.
59. Instituto Nacional de Salud (Colombia) A, Reyes I, Reyes N. Biomédica : revista del Instituto Nacional de Salud.. Vol. 27, Biomédica. Instituto Nacional de Salud; 2007 [cited 2017 May 16]. 594–604 p.
60. Presentado G, Biol C, Liliana S, Cuar O, Groot H, Bogot A, et al. EVALUACIÓN DEL RIESGO GENÉTICO IN VITRO DE LA EXPOSICIÓN AL HERBICIDA ROUNDUP EN CÉLULAS CHO – K1 Y LINFOCITOS

HUMANOS. 2008;

61. Yaneri BEN, Estrada A. Efecto citotóxico y genotóxico del glifosato grado técnico y comercial en las células HepG2, Tesis. 2019;
62. Ferré DM, Quero AÁM, Hynes V, Saldeña ELR, Lentini VR, Tornello MJ, et al. Ensayo de micronúcleos de citoma bucal en trabajadores de fincas frutícolas que han aplicado plaguicidas alrededor de quince años. Rev Int Contam Ambient. 2018;34(1):23–33.
63. Gao H, Chen J, Ding F, Chou X, Zhang X, Wan Y, et al. Activation of the N-methyl- d -aspartate receptor is involved in glyphosate-induced renal proximal tubule cell apoptosis. J Appl Toxicol. 2019 Aug;39(8):1096–107.
64. Woźniak E, Sicińska P, Michałowicz J, Woźniak K, Reszka E, Huras B, et al. The mechanism of DNA damage induced by Roundup 360 PLUS, glyphosate and AMPA in human peripheral blood mononuclear cells - genotoxic risk assesement. Food Chem Toxicol. 2018;120:510–22.
65. Almeida Sierra Blanca Flor, Citotoxicidad y gentoxicidad del glifosato en linfocitos humanos 1. 2018;1–43.