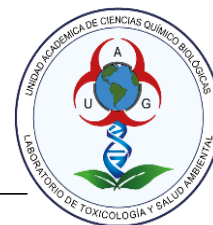




Universidad Autónoma de Guerrero
Facultad de Ciencias Químico Biológicas
Facultad de Ciencias de la Tierra



MAESTRÍA EN BIOCIENCIAS

**Efecto citotóxico y genotóxico del glifosato grado técnico y
comercial en células HepG2**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN BIOCIENCIAS**

P R E S E N T A:

B.E. Nataly Yaneri Apreza Estrada

Directora de tesis: Dra. Ma. Elena Moreno Godínez

Co-director de tesis: Dra. Verónica Antonio Véjar

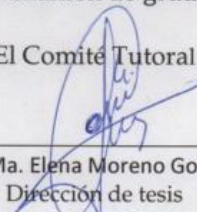


Chilpancingo de los Bravo, Guerrero. Marzo, 2019.

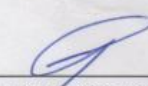
APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 10 días del mes de enero de dos mil diecinueve, se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Biociencias, para examinar la tesis titulada "Efecto citotóxico y genotóxico del glifosato grado técnico y comercial en células HepG2", presentada por la alumna **Nataly Yaneri Apreza Estrada**, para obtener el Grado de Maestría en Biociencias. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.


El Comité Tutorial




Dra. Ma. Elena Moreno Godínez
Dirección de tesis



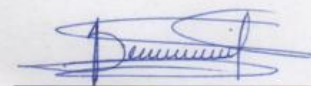
Dra. Jeiry Toribio Jiménez



Dra. Yanet Romero Ramírez

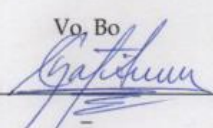


Dra. Yaneth Castro Coronel



Dra. Aurora Elizabeth Rojas García

Vo. Bo



Dra. Natividad Castro Alarcón
Coordinadora de la maestría en
Biociencias de la Facultad de Ciencias
Químico Biológicas



Vo. Bo



Dr. Oscar del Moral Hernández
Director de la Facultad de Ciencias Químico
Biológicas

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Toxicología y Salud Ambiental de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas (FCQB) de la Universidad Autónoma de Guerrero (UAGro) en Chilpancingo Guerrero.

Bajo la dirección de:

Dra. Ma. Elena Moreno Godínez

La co-dirección de:

Dra. Verónica Antonio Véjar

La asesoría externa de:

Dra. Aurora Elizabeth Rojas García

Universidad Autónoma de Nayarit

La asesoría interna de:

Dra. Yaneth Castro Coronel

Dra. Yanet Romero Ramírez

Dra. Jeiry Toribio Jiménez

Durante el periodo en que cursó la Maestría en Biociencias, la C. Nataly Yaneri Apreza Estrada recibió beca (621291) otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a los programas de posgrado de calidad (PNPC). Este proyecto recibió apoyo financiero de la Red PROFIDES: Evaluación y mitigación de contaminantes ambientales y del proyecto de la Red Temática de Toxicología de Plaguicidas del CONACYT.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Ma. Elena Moreno Godínez, investigadora ejemplar. Por su amistad, su confianza, su apoyo y motivación para la culminación de este proyecto y la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Aurora Elizabeth Rojas García, la Dra. Verónica Antonio Véjar, la Dra. Yaneth Castro Coronel, la Dra. Yanet Romero Ramírez y la Dra. Jeiry Toribio Jiménez, por sus contribuciones en la realización de este trabajo.

Al doctor Marco Antonio Ramírez Vargas, por su amistad, su ayuda incondicional, disponibilidad en compartir sus conocimientos conmigo y su tiempo para la elaboración de este trabajo.

A mis compañeros de la maestría, por su amistad y el tiempo compartido durante nuestra formación profesional.

DEDICATORIAS

Dedico esta tesis principalmente a Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto. A mi familia por su apoyo incondicional, por sus consejos, por la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

A mi esposo Manuel, por estar conmigo en aquellos momentos en que el estudio y el trabajo ocuparon mi tiempo y esfuerzo.

Especialmente dedicó esta tesis a mi hijo Diego, tal vez en este momento no entiendas mis palabras, pero para cuando seas capaz, espero te des cuenta lo importante que eres para mí. Eres la razón de que me levante cada día esforzarme por el presente y el futuro, eres mi principal motivación.

A todas las personas que me apoyaron y participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis principalmente a aquellos que me abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos.

**Efecto citotóxico y genotóxico del glifosato grado técnico y
comercial en células HepG2**

Índice	Pág.
Resumen-----	1
Abstract-----	2
I. Introducción-----	3
II. Materiales y métodos-----	5
III. Resultados-----	10
IV. Discusión-----	14
V. Conclusión-----	18
VI. Referencias-----	19
VII. Material suplementario-----	23

Efecto citotóxico y genotóxico del glifosato grado técnico y comercial en células HepG2

Apreza-Estrada NY¹, Ramírez-Vargas MA¹, Antonio-Véjar V², Castro-Coronel Y³, Rojas-García AE⁴,
Moreno-Godínez ME^{1*}.

¹ *Laboratorio de Toxicología y Salud Ambiental, Facultad de Ciencias Químicas Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, México*

² *Laboratorio de Biomedicina Molecular, Facultad de Ciencias Químicas Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, México*

³ *Laboratorio de Investigación en Citopatología e Histoquímica, Facultad de Ciencias Químicas Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, México*

⁴ *Laboratorio de Contaminación y Toxicología Ambiental, Secretaría de Investigación y Posgrado, Universidad Autónoma de Nayarit, Ciudad de la Cultura Amado Nervo, Tepic, Nayarit, México*

Correspondencia del autor

Ma. Elena Moreno-Godínez, PhD. Laboratorio de Toxicología y Salud Ambiental. Facultad de Ciencias Químicas Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, México. Av. Lázaro Cárdenas s/n, Ciudad Universitaria Chilpancingo, Guerrero, México, 39070.

Teléfono: (52) (747) 4725503

Fax: (52) (747) 4725503

E-mail: emoreno20@hotmail.com

Resumen

En la actualidad los herbicidas a base de glifosato son de los más utilizados a nivel mundial y se estima que existen más de 750 formulaciones, las cuales son utilizadas en diversas prácticas para el control de malezas en cultivos con importancia económica y alimenticia. En función de su mecanismo de acción, por mucho tiempo se consideró que el glifosato era inocuo para los humanos, sin embargo, evidencia reciente ha mostrado datos discordantes sobre su potencial citotóxico y genotóxico. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto citotóxico y genotóxico del glifosato grado técnico (GLY_T) y de una formulación utilizada en el sur de México (GLY_F) en células HepG2. La citotoxicidad fue evaluada a las 24, 48, 72 y 96 h a través de ensayos colorimétricos cuantitativos mediante el ensayo de bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) y del ensayo de captación de rojo neutro. El cambio en la proliferación celular fue estimado con el kit de conteo celular-8 (CCK-8) y el ensayo de cristal violeta, mientras que el efecto genotóxico fue evaluado usando el ensayo cometa alcalino. Los resultados mostraron que la viabilidad y la proliferación fueron reducidas solamente por la GLY_F en forma dependiente de la concentración y el tiempo. Por otra parte, el GLY_T disminuyó la proliferación de las células HepG2 solo a 96 h. Sin embargo ambas presentaciones (la GLY_F y el GLY_T) fueron genotóxicas. Estos resultados muestran 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 revalorar el uso y manejo de este herbicida y así disminuir los riesgos a la salud.

Abstract.

At present glyphosate-based herbicides are the most widely used worldwide and it is estimated that there are more than 750 formulations, which are used in various practices for the control of weeds in crops with economic and food importance. Based on its mechanism of action for a long time it was considered that glyphosate was harmless for humans, however recent evidence has shown discordant data on its toxic and genotoxic potential. The objective of this study was to evaluate the cytotoxic and genotoxic effect of technical grade glyphosate (GLY_T) and a formulation used in southern Mexico (GLY_F) in HepG2 cells. Cytotoxicity was evaluated at 24, 48, 72 and 96 h through quantitative colorimetric assays using the bromide 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium (MTT) assay and the uptake of neutral red assay. The change in cell proliferation was estimated using the cell-8 counting kit (CCK-8) and the violet crystal assay, while the genotoxic effect was evaluated using the alkaline comet assay. The results showed that viability and proliferation were reduced only by GLY_F in a concentration and time dependent manner. On the other part, the GLY_T decreased the proliferation of HepG2 cells only at 96 h. However, both presentations (GLY_F and GLY_T) were genotoxic. These results show the need to continue studying diverse mechanisms of toxicity associated with exposure to glyphosate and its implications on human and environmental health in order to reassess the use and management of this herbicide and thus reduce health risks.

Keywords: *glyphosate, cytotoxicity, genotoxicity*

1. Introducción

El glifosato [GLY, N- (fosfometil) glicina] es el ingrediente activo de la mayoría de herbicidas considerados como de amplio espectro, cuyas formulaciones son las más comercializadas en todo el mundo (Benbrook, 2016; Duke, 2015). Su principal mecanismo de acción es la inhibición de la enzima 5-enolpiruvil shiquimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS, EC 2.5.1.19) de la vía del ácido shikímico. Esta enzima es necesaria para la producción de aminoácidos aromáticos y compuestos secundarios, los cuales son esenciales para la supervivencia de las plantas (Gomes et al., 2014). La ausencia de la vía del ácido shikímico en animales ha sido la base para considerar al GLY como un plaguicida seguro para los humanos (EFSA, 2015; Williams et al., 2012), sin embargo, el uso excesivo y extendido del GLY ha incrementado la exposición indirecta de organismos no blanco, en los cuales se han observado efectos tóxicos, generando preocupación e interrogantes sobre efectos adversos a la salud humana y al ambiente (Myers et al., 2016; Van Bruggen et al., 2018).

Dentro de los efectos adversos atribuidos al GLY, se encuentra daño hepático, renal, cardiovascular, ocular, malformaciones embrionarias, así como alteraciones reproductivas y hormonales (Mesnage et al., 2015; Vandenberg et al., 2017). Recientemente se ha reportado una asociación significativa entre la exposición al GLY y la incidencia de cáncer como linfoma no Hodgkin, linfoma de células B y leucemia de células pilosas (Schinasi and Leon, 2014). Por lo cual, la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) en el 2015 reevaluó al GLY, reclasificándolo como probable carcinógeno humano (Grupo 2A) (Guyton et al., 2015; IARC, 2015).

Los índices de seguridad tales como la ingesta diaria admisible (ADI), nivel de mínimo efecto tóxico observable (LOAEL), nivel sin efecto observable (NOEAL) entre otros, son estimados a partir de pruebas de toxicidad regulatoria, y en éstos se analiza únicamente el principio activo de los plaguicidas. Sin embargo, los plaguicidas en el mundo son utilizados en forma de mezclas, llamadas formulaciones comerciales, las cuales están constituidas por el principio activo y los adyuvantes (ingredientes “inertes”) cuya formulación generalmente no es especificada al consumidor en las etiquetas de estos productos (USEPA, 2018). Por lo que, la toxicología regulatoria se enfrenta al reto de evaluar las formulaciones comerciales ya que

cada una podría poseer distintos perfiles toxicológicos derivados de las distintos ingredientes inertes agregados.

Por otro lado, uno de los mecanismos celulares por lo que los plaguicidas ejercen su genotoxicidad es la alteración en la secuencia, estructura y/o funcionalidad del material genético (Bolognesi, 2003; Turkez et al., 2017). Las lesiones más frecuentes asociadas con la exposición a plaguicidas son la rotura de cadena sencilla o doble en el ADN, la modificación de los nucleótidos y la formación de aductos de ADN, que de no ser reparadas adecuadamente, pueden causar cambios cromosómicos, mutaciones genéticas, carcinogénesis o muerte celular (Christmann and Kaina, 2013; Nohmi, 2018; Zhang, 2018). Algunos estudios han confirmado la genotoxicidad del GLY (Alvarez-Moya et al., 2014; Kašuba et al., 2017; Mañas et al., 2009) y de algunas formulaciones a base de GLY (De Almeida et al., 2018;). Así, el objetivo de este estudio fue evaluar el efecto citotóxico y genotóxico del glifosato grado técnico (GLY_T) y de una formulación (GLY_F) utilizada en el sur de México, utilizando un modelo a corto (24 h) y largo plazo (48, 72 y 96 h) a concentraciones de relevancia biológica en un modelo celular de células hepáticas.

2. Materiales y métodos

2.1. Químicos y reactivos

La hidroxIUrea (HU), rojo neutro, cristal violeta, agarosa de punto de fusión normal (NMPA), agarosa de bajo punto de fusión (LMPA) y el Cell Counting Kit-8 (# CAS: 96992, CCK-8) se obtuvieron de la casa comercial Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). El medio Dulbecco's Eagle modificado (DMEM), el suero bovino fetal (SFB) y la solución antibiótica/antimicótica se adquirieron de Gibco® (Grand Island, NY, EE. UU.). El MTT se adquirió de la EMD Millipore (Alemania).

2.2. Línea celular

Se utilizó la línea celular HepG2 (HB8065™) obtenida de ATCC® y derivada de un hepatocarcinoma de un hombre caucásico, basándose en el hecho de que el hígado es el principal órgano implicado en la biotransformación de la mayoría de xenobiótico ambientales. El modelo celular HepG2 es adecuado para evaluar toxicidad y genotoxicidad de xenobióticos (Boehme et al., 2010; Westerink and Schoonen, 2007). La línea celular se cultivó en medio DMEM suplementado con 10% de SFB y con 1% de antibióticos/antimicótico (1000 unidades de penicilina, 1 mg de estreptomina y 2.5 µg de anfotericina B/mL). Las células se mantuvieron a 37 °C en un ambiente humidificado y con 5% de CO₂.

2.3. Plaguicidas

Se utilizó el glifosato grado técnico (GLYT; # CAS: 1071-83-6, pureza ≥ 98.0%, Pestanal TM) y la formulación comercial mexicana Takle Sifatec®, mezcla de glifosato/adyuvantes (Mx, registro RSCO-HEDE-0230.0657-315-41). Esta mezcla contiene 59.0% de ingredientes inertes (adyuvantes) y 41.0% de glifosato (sal isopropilamina de glifosato) como ingrediente activo. La formulación Takle Sifatec® (GLY_F) y su principio activo (GLY_T), fueron diluidos en agua ultra pura estéril. La cantidad de cada tratamiento fue menor al 1% del volumen total en cada pozo de la placa de cultivo celular. Las concentraciones probadas fueron 0.05, 0.5, 5, 50 y 100 mg/L para el tratamiento con ambas presentaciones.

2.4. Condiciones de tratamiento

Las células HepG2 se cultivaron hasta alcanzar una confluencia del 80%, en placas de cultivo celular de 24 pozos para el ensayo cometa y en placas de 96 pozos para los ensayos de citotoxicidad y proliferación celular. Las células se estabilizaron por 24 h antes del tratamiento. El medio fue retirado y cambiado por medio fresco completo adicionado con el GLY_T o la GLY_F. Se probaron concentraciones de relevancia biológica como 0.5 mg/L, la cual corresponde a la Ingesta Diaria Admisible (ADI) (Kašuba et al., 2017); 5 mg/L, concentración reportada como inductora de daño genotóxico (Gasnier et al., 2009) y las concentraciones de 50 y 100 mg/L de GLY son las que han sido encontradas en sangre de personas intoxicadas moderadamente (rango de 0.6 a 150 mg/L) (Zouaoui et al., 2013). Las células fueron expuestas a los tratamientos por 24 h, 48, 72 y 96 h. El número de pase celular utilizado en las condiciones experimentales fueron ≥ 4 y ≤ 9 . Para cada ensayo se usaron controles negativos y positivos descritos en cada ensayo

2.5. Ensayo de citotoxicidad

El efecto citotóxico del GLY_T y de la GLY_F se determinó mediante análisis colorimétricos cuantitativos, por el ensayo de retención de rojo neutro, propuesto por Repetto et al., (2008), y el ensayo de MTT según el protocolo propuesto por Mosmann, (1983). Para ambos ensayos se sembraron 5.0×10^4 células/mL en un volumen final de 200 μ L por pozo en placas de cultivo celular de 96 pozos y se expuso al tratamiento a los tiempos determinados. Para el ensayo de retención de rojo neutro, el medio fue eliminado y se agregaron 100 μ L de rojo neutro (40 μ g/mL en DMEM) y las células se incubaron durante 3 h a 37 °C y 5% de CO₂, posteriormente se eliminó el colorante y se realizaron tres lavados con solución salina tamponada con fosfato, 0.138 M NaCl, 0.0027 M KCl a pH 7.4. A cada pozo se añadió 150 μ L de una solución solubilizante (10 mL de agua desionizada, 10 mL de EtOH al 96% y 0.2 mL de ácido acético glacial al 99.8%). Para el ensayo de MTT, al terminar el tiempo de exposición se eliminó el medio de cultivo y se reemplazó con 100 μ L de MTT (0.5 mg/mL en DMEM libre de rojo fenol). Las células se incubaron durante 4 h a 37 °C y 5% CO₂ protegidas de la luz y, posteriormente se agregaron 100 μ L de DMSO a cada pozo para disolver los cristales de formazán. Para ambos métodos, la absorbancia fue determinada

usando una doble longitud de onda a 545 nm y una corrección a 630 nm en el lector de placas Statfax 2100 (Awareness Technology, Palm City, FL). Las concentraciones en las que la viabilidad fue $\leq 80\%$ con respecto al control negativo, se consideraron como citotóxicas. Como control negativo se utilizaron células sin tratamiento y como control positivo, células tratadas con 10% de DMSO (Miret et al., 2006). Se realizaron dos experimentos independientes por triplicado para cada ensayo.

2.6. Ensayo de proliferación celular

El efecto del GLY_T y de la GLY_F sobre la proliferación de células HepG2 se determinó mediante el Cell Counting Kit-8 (CCK-8) siguiendo las instrucciones del fabricante, y por el ensayo de cristal violeta propuesto por Feoktistova et al., (2016). Para ambos ensayos, se sembraron 2.5×10^4 células/mL en un volumen final de 200 μ L por pozo en placas de cultivo de 96 pozos. Las células fueron expuestas a concentraciones de 0.05, 0.5, 5, 50 o 100 mg/L del GLY_T y 0.05, 0.5, 5 o 50 mg/L de la GLY_F a 24, 48, 72 y 96 h. De manera breve, para el ensayo de CCK-8 al finalizar el tratamiento se retiró el medio y se añadió 100 μ L del CCK-8 (diluido 1:10 en medio DMEM) a cada pozo, se incubó durante 1 h a 37°C y 5% CO₂, posteriormente se leyó la absorbancia a 450 nm. El número de células fue estimado mediante una curva patrón estándar. Para el ensayo de cristal violeta después del tratamiento, las células se fijaron durante 12 horas con formaldehído al 10%, posteriormente se lavaron dos veces con agua destilada. Una vez secos los pozos, se les agregaron 50 μ L de la solución de tinción de cristal violeta al 0.5% (0.5 g cristal violeta, en 80% de agua destilada, 20% de metanol) durante 10 min. Las células se lavaron dos veces con agua corriente para eliminar el exceso de tinte y se dejaron secar. El colorante retenido en las células se disolvió utilizando 0.2 mL de ácido acético al 33% por pozo, y la absorbancia se leyó a 600 nm. La proliferación celular inducida por GLY_T y la GLY_F se calculó con base en la absorbancia de las células del control negativo de 24 h. Como control negativo se utilizaron células sin tratamiento y como control positivo, células tratadas con 10% de DMSO (Miret et al., 2006). Se realizaron dos experimentos independientes por triplicado para cada ensayo.

2.7. Ensayo de cometa alcalino

El daño al ADN se evaluó mediante el ensayo de cometa alcalino, como lo describe Singh et al. (1988) con algunas modificaciones. Las células HepG2 se sembraron a una densidad de 4×10^5 células/mL en un volumen final de 500 μ L en placas de 24 pozos y se expusieron a 0.05, 0.5, 5, 50 u 100 mg/L del GLY_T y 0.05, 0.5, 5 y 50 mg/L de la GLY_F por 24, 48, 72 y 96 h, respectivamente. Después del tratamiento las células se tripsinizaron (tripsina, EDTA al 0,25%) y se centrifugaron a 2500 rpm por 5 min, posteriormente se resuspendieron en 80 μ L de medio DMEM y se mezclaron con 240 μ L LMPA al 0.5%. Se colocaron 80 μ L de la mezcla sobre portaobjetos previamente cubiertos con NMPA al 0.5%, esto se hizo para cada condición. Los portaobjetos se colocaron a 4 °C por 20 min para la solidificación de la agarosa, posteriormente se agregaron otros 85 μ L de LMPA al 0.5% y se mantuvieron nuevamente a 4 °C durante 10 min. Los portaobjetos se sumergieron en solución de lisis (NaCl 2.5 M, Na₂EDTA 100mM, Tris-HCl 10 mM, DMSO 5% y Tritón X-100 0.5%) pH de 10 a 4 °C, durante toda la noche. El desenrollamiento del DNA se realizó por 20 min, previos a la electroforesis, la cual se realizó a 300 mA y 25 V durante 20 min a 4 °C en buffer de electroforesis, pH 10 (NaOH 10 M y EDTA 200 Mm). Posteriormente se agregó Tris-HCl (0.4 M, pH 7.4) y luego EtOH al 96% a cada portaobjeto. Se agregó 30 μ L bromuro de etidio (20 μ g/mL) a cada portaobjeto y se observaron en un microscopio de fluorescencia (Olympus BX-43) equipado con una cámara digital y un software para captura y análisis de imágenes (Comet Assay IV, version 4.3.1, *Perspective Instruments*, Suffolk, UK). El nivel de daño en el ADN se estimó en función de la intensidad de la cola (TI), que mide el porcentaje de ADN en la cola del cometa y la longitud de la cola (TL), que mide el tamaño de los fragmentos de ADN, se leyeron 50 células por cada portaobjeto, para cada condición se realizaron cuatro laminillas. Se incluyeron células sin tratamiento como control negativo y como control positivo a genotoxicidad, células tratadas con 10 mM de hidroxurea (Severin et al., 2003) en cada prueba. El experimento se realizó por cuadruplicado en dos momentos diferentes.

2.8. Análisis estadísticos

Para el análisis de los resultados se utilizó el paquete estadístico STATA versión 13.0 (College Station, TX). Los resultados se presentan como medias (SE). Se usó un análisis ANOVA con la prueba post-hoc de Dunnett para determinar el efecto de la GLY_F y del principio activo (GLY_T) sobre la viabilidad, la proliferación y el ADN. Se realizó un análisis de regresión lineal para calcular la concentración letal cincuenta (CL₅₀), la concentración letal veinte (CL₂₀) y evaluar la relación concentración-efecto. Los gráficos se realizaron utilizando el programa GraphPad 5.04 (La Jolla, CA). Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

3. Resultados

3.1. Efecto del GLY_T y de la GLY_F sobre la viabilidad celular

El GLY_T no fue citotóxico para las células HepG2 a las concentraciones probadas, lo cual fue evaluado por el ensayo de MTT y rojo neutro (Figura 1 A-B). Sin embargo, los resultados estimados por el ensayo de MTT mostraron que la GLY_F ejerció un efecto citotóxico dependiente de la concentración a 24 h ($R^2=0.8577$, $p<0.001$), 48 h ($R^2=0.91131$, $p<0.001$), 72 h ($R^2=0.8107$, $p<0.001$) y 96 h ($R^2=0.7855$, $p<0.001$) (Figura 1 C). Resultados similares fueron observados con el ensayo de retención de rojo neutro para la GLY_F ($R^2=0.9316$, $p<0.001$; $R^2=0.8379$, $p<0.001$, $R^2=0.8109$, $p<0.001$, $R^2=0.7308$, $p<0.001$ para 24, 48, 72 y 96 h, respectivamente) (Figura 1 D). Las CL₂₀ y CL₅₀ a las 24 h estimadas para la formulación comercial fueron 89.9 y 55.9 mg/L, respectivamente, como se muestra en la tabla 1 del material suplementario.

3.2. Efecto del GLY_T y de la GLY_F sobre la proliferación

Las células HepG2 tratadas con el GLY_T presentaron disminución en la proliferación celular a 96 h en comparación con las células del control negativo, en el ensayo de CCK-8 (Figura 2 A). No obstante, mediante el ensayo de cristal violeta, no se observaron cambios significativos en la proliferación celular después del tratamiento con el GLY_T entre los grupos de estudio (Figura 2 B). Por otro lado, la GLY_F indujo una disminución significativa en la proliferación celular a 50 mg/L a 24 h y 48 h de exposición, mientras que a 72 h el efecto fue observado a partir de la ≥ 5 mg/L. Además, a 96 h de exposición todas las concentraciones empleadas indujeron una reducción en la proliferación celular mediante el ensayo de CCK-8 (Figura 2 C), resultados similares fueron observados con el ensayo de cristal violeta (Figura 2 D).

3.3. Efecto del GLY_T y de la GLY_F sobre el ADN

El potencial genotóxico del GLY_T y de la GLY_F fue valorado mediante el ensayo cometa utilizando la intensidad de la cola de cometa (TI) y la longitud de la cola de cometa (TL) como parámetros de evaluación. Los resultados mostraron que tanto el GLY_T como la GLY_F indujeron

efecto genotóxico en la células HepG2, en todas las concentraciones y tiempos probados con respecto al control negativo ($p < 0.001$). El daño al ADN inducido por el GLY_T fue de forma concentración-dependiente a 24 h (TI: $R^2 = 0.789$, $p < 0.001$ y TL: $R^2 = 0.674$, $p < 0.001$), 48 h (TI: $R^2 = 0.775$, $p < 0.001$ y TL: $R^2 = 0.7671$, $p < 0.001$), 72 h (TI: $R^2 = 0.738$, $p < 0.001$ y TL: $R^2 = 0.620$, $p < 0.001$) y 96 h (TI: $R^2 = 0.715$, $p < 0.001$ y TL: $R^2 = 0.609$, $p < 0.001$). Tabla 1

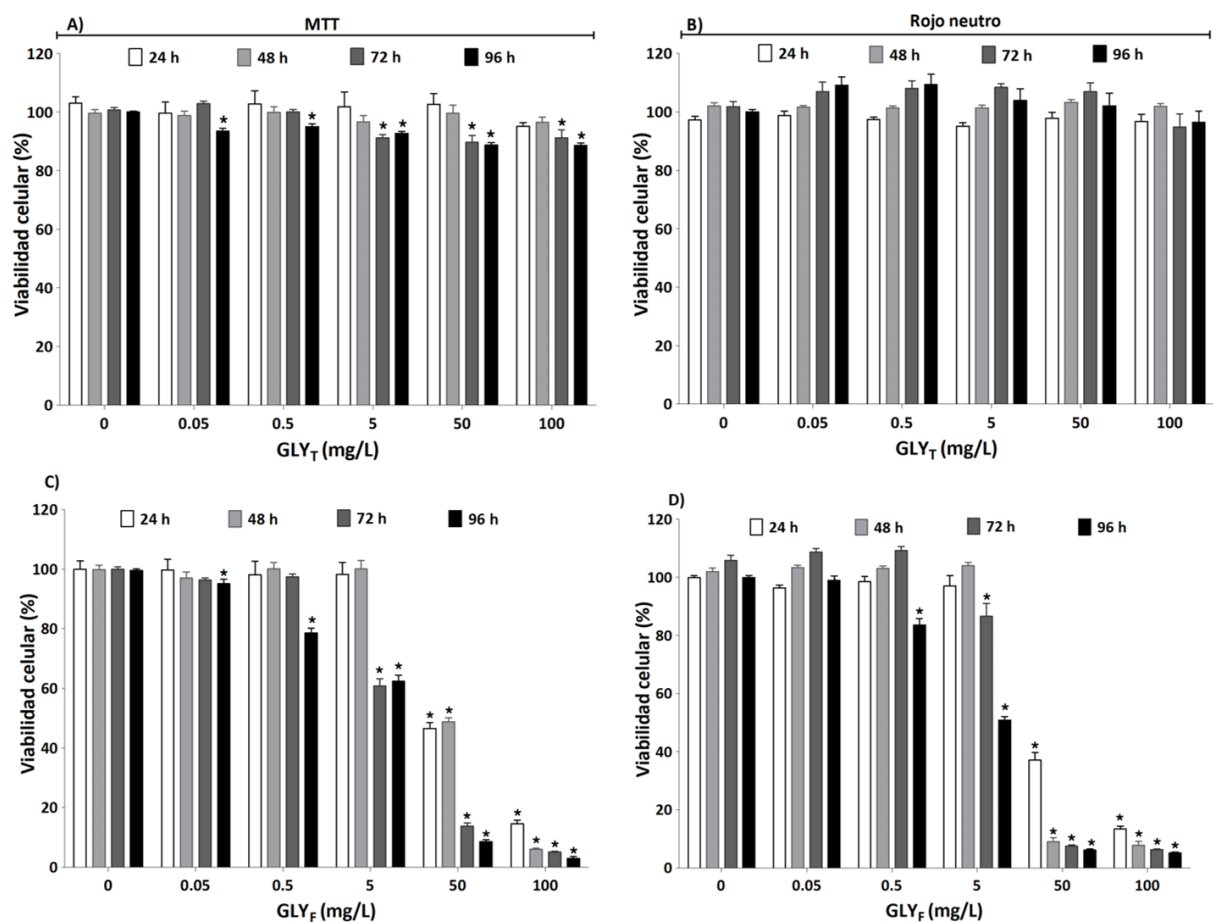


Figura 1. Efecto del GLY grado técnico (GLY_T) y de la formulación de GLY (GLY_F) sobre la viabilidad celular en células HepG2. La viabilidad celular fue valorada por los ensayos de MTT y rojo neutro. * Diferencia significativa ($p < 0.001$) entre las células expuestas y el control negativo (0 mg/L). Los datos representan la media (SE) de dos experimentos independientes con tres repeticiones cada uno.

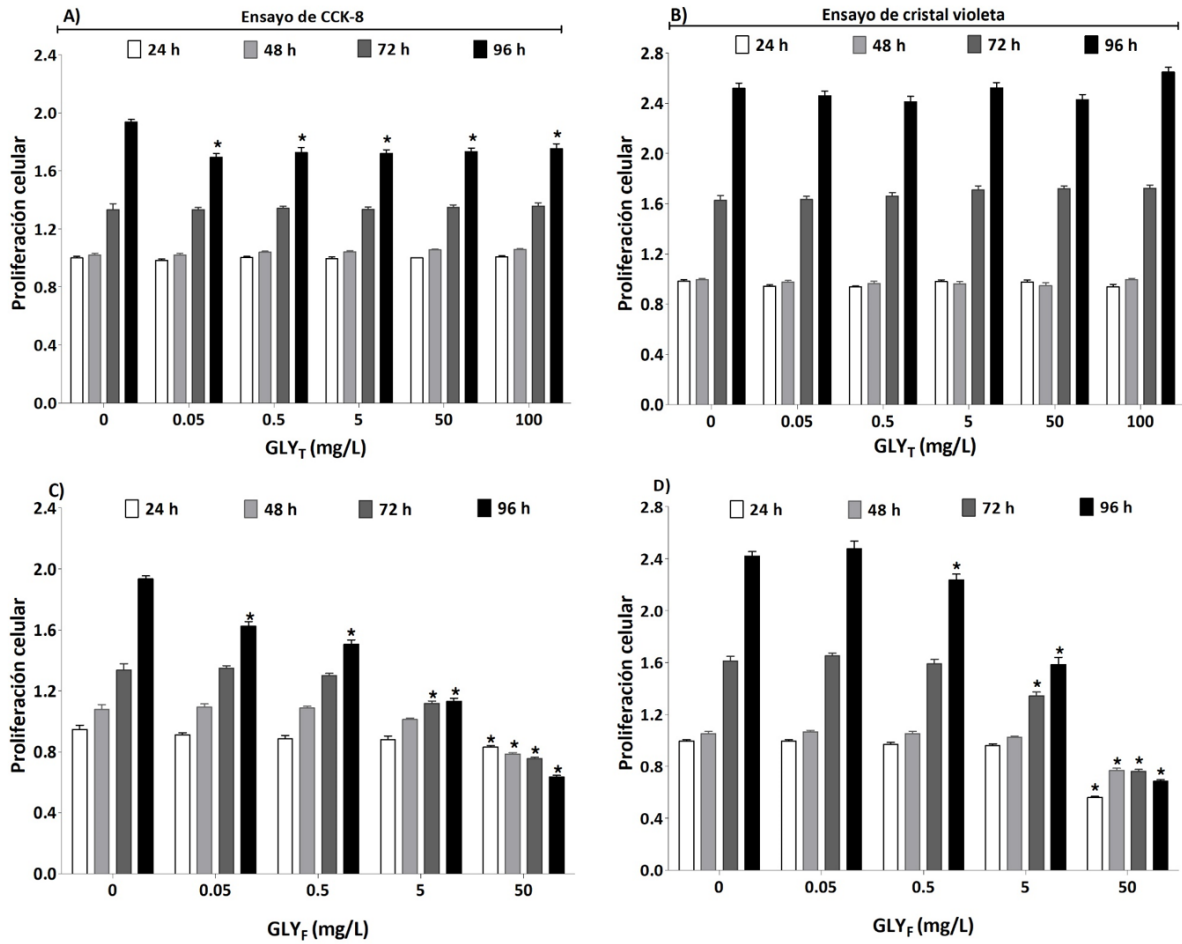


Figura 2. Efecto del GLY grado técnico (GLY_T) y de la formulación del GLY (GLY_F) sobre la proliferación de células HepG2. La proliferación celular fue valorada por los ensayos de CCK-8 y cristal violeta. * Diferencia significativa ($p < 0.001$) entre las células expuestas y el control negativo (0 mg/L). Los datos representan las medias (SE) de dos experimentos independientes con tres repeticiones cada uno.

Tabla 1Daño al ADN en células HepG2 expuestas a diferentes concentraciones del GLY_T y la GLY_F

Tratamiento	GLY _T		GLY _F	
	% ADN en la cola	Longitud de la cola Media (SE)	% ADN en la cola	Longitud de la cola unidades arbitrarias
24 h				
Control	4.44(0.63)	19.23(0.52)	4.44(0.63)	19.23(0.52)
0.05 mg/L	15.66(0.61)*	28.16(0.41)*	20.71(1.05)*	30.09(0.68)*
0.5 mg/L	17.38(0.69)*	28.02(0.43)*	25.70(1.36)*	37.00(0.91)*
5 mg/L	22.69(0.79)*	29.67(0.83)*	28.99(1.38)*	40.92(1.44)*
50 mg/L	27.87(1.03)*	32.78(0.71)*	34.27(0.91)*	49.92(0.79)*
100 mg/L	40.48(1.23)*	37.94(1.05)*	ND	ND
10 mM HU	32.12(2.11)*	36.84(1.09)*	32.12(2.11)*	36.84(1.09)*
48 h				
Control	5.24(0.37)	20.81(0.36)	5.24(0.37)	20.81(0.36)
0.05 mg/L	15.80(0.62)*	25.06(0.52)*	22.99(1.55)*	31.66(0.66)*
0.5 mg/L	19.11(1.23)*	29.92(0.74)*	34.14(1.41)*	37.61(0.96)*
5 mg/L	27.81(1.00)*	35.97(0.78)*	48.84(1.82)*	43.90(0.82)*
50 mg/L	44.01(1.44)*	43.24(1.11)*	56.67(2.18)*	51.83(0.75)*
100 mg/L	48.81(1.21)*	48.29(1.00)*	ND	ND
10 mM HU	35.94(1.16)*	39.76(0.99)*	35.94(1.16)*	39.76(0.99)*
72 h				
Control	9.55(0.65)	24.10(0.53)	9.55(0.65)	24.10(0.53)
0.05 mg/L	24.01(1.13)*	37.99(0.92)*	34.35(1.66)*	51.81(1.48)*
0.5 mg/L	28.98(0.99)*	43.13(0.64)*	43.27(1.36)*	55.41(1.23)*
5 mg/L	33.95(1.10)*	46.33(0.87)*	58.32(1.74)*	61.84(1.04)*
50 mg/L	49.17(1.56)*	50.65(1.52)*	ND	ND
100 mg/L	54.77(1.18)*	58.84(1.13)*	ND	ND
10 mM HU	49.50(2.54)*	50.66(1.23)*	49.50(2.54)*	50.66(1.23)*
96 h				
Control	12.54(0.72)	23.87(0.53)	12.54(0.72)	23.87(0.53)
0.05 mg/L	27.87(1.26)*	40.60(0.66)*	36.81(1.42)*	47.53(1.28)*
0.5 mg/L	30.95(1.11)*	45.43(0.58)*	48.15(1.98)*	56.89(1.70)*
5 mg/L	39.91(1.51)*	49.19(1.09)*	68.31(1.78)*	70.82(1.43)*
50 mg/L	54.24(1.57)*	54.08(1.09)*	ND	ND
100 mg/L	58.91(1.77)*	63.15(0.72)*	ND	ND
10 mM HU	54.81(1.9)*	51.04(1.04)*	54.81(1.9)*	51.04(1.04)*

SE: error estándar; * $p < 0.001$ prueba de Dunnett'sGLY_F: Formulación de glifosato; GLY_T: Glifosato grado técnico

ND: No determinado porque la viabilidad fue menor a 50%

HU: Hidroxiurea

4. Discusión

El uso de plaguicidas es una forma rentable para controlar y/o erradicar especies que alteran la producción, almacenaje y disposición final de los productos agrícolas, su uso se ha justificado con un incremento teórico de la producción agrícola (OMS, 1992). Sin embargo su empleo extensivo ha causado daño a la salud humana y al ambiente (Mostafalou and Abdollahi, 2013). Además los plaguicidas se comercializan como formulaciones que se componen de la mezcla del principio activo y coadyuvantes que mejoran la captación, penetración, translocación y estabilización del plaguicida, sin embargo algunas veces esta mezcla genera perfiles de toxicidad diferente al observado solo con el ingrediente activo (Li et al., 2005; Park et al., 2015). De los herbicidas más utilizados en el mundo se encuentran las formulaciones a base de GLY, ya que anteriormente se consideraba al GLY como un plaguicida relativamente seguro, pues se suponía que tenía un mecanismo de acción selectivo (Benbrook, 2016; Williams et al., 2000). Sin embargo, en los últimos años la investigación sobre nuevos mecanismos de toxicidad se ha convertido en un tema importante, desde que la IARC reclasificó al GLY como probablemente carcinógeno para los humanos en el 2015 (Guyton et al., 2015). La ubicuidad del GLY y sus adyuvantes en alimentos y agua ha aumentado la preocupación y la necesidad de comprender sus efectos directos o indirectos para la salud humana (Rendón-von Osten and Dzul-Caamal, 2017; Rodrigues and de Souza, 2018; Van Bruggen et al., 2018).

En este trabajo evidenciamos el efecto diferencial citotóxico y sobre la proliferación en un modelo celular hepático causado por el tratamiento con glifosato grado técnico (GLY_T) y de una formulación (GLY_F) utilizadas en el sur de México, con un comportamiento formulación concentración; así también un efecto genotóxico similar del GLY_T y de la formulación GLY_F.

Se observó que la GLY_F es capaz de inducir un efecto citotóxico de manera concentración dependiente sobre las células HepG2, dicho efecto es observado a concentraciones ≥ 0.5 mg/L a 96 h, con todos los métodos utilizados. Estos resultados son consistentes con los datos reportados para otra formulación de GLY como *Roundup*[®] donde se muestra un efecto citotóxico sobre células HepG2 a partir de 10 ppm (10 mg/L) expuestas por

24 h (Gasnier et al., 2009). Las diferencias entre las concentraciones a las cuales se observó el efecto citotóxico asociado con la exposición a formulaciones a base de GLY pueden ser atribuidas a la diferencia en la composición de la formulación, efecto ampliamente reportado. Así, los coadyuvantes añadidos, generalmente surfactantes, modulan el potencial tóxico de las formulaciones a base de GLY, a través de una alteración de la integridad de la membrana celular, de la actividad metabólica, la síntesis de proteínas totales, así como causar daño mitocondrial, lo que puede generar apoptosis y/o necrosis (Kim et al., 2013; Song et al., 2012). Dentro de los coadyuvantes más comunes utilizados en las formulaciones a base de GLY se encuentran las seboaminas etoxiladas y alquilpoliglicósido (Mesnage et al., 2012; Myers et al., 2016), que han demostrado modificar el potencial citotóxico del ingrediente activo. En este sentido Mesnage et al. (2012) observaron que una formulación a base de GLY compuesta con 360 g/L de glifosato grado técnico como ingrediente activo y 18 % POE-15 (surfactante seboamina polietoxilada, POE-15) mostró mayor citotoxicidad en comparación con las formulaciones con la misma concentración de ingrediente activo pero con menor concentración de POE-15, lo que sugiere que los coadyuvantes juegan un papel relevante en la toxicidad ejercida por las formulaciones a base de GLY. La CL_{50} de la formulación con 18% de POE-15 (59 mg/L) fue parecida a la CL_{50} estimada para la GLY_F en este estudio (55.9 mg/L). Sin embargo es necesario realizar más estudios que permitan identificar la composición exacta de las formulaciones comerciales o bien generar instrumentos legales que permitan conocer todos los ingredientes de las formulaciones comerciales de los plaguicidas.

En este estudio no se encontró daño citotóxico con el GLY_T a ninguna de las concentraciones utilizadas (0.05-100 mg/L), esto es concordante con lo reportado por Mesnage et al., (2012) quienes mostraron que el GLY grado técnico no afectó la viabilidad celular a concentraciones de 1-1000 ppm. Así mismo Chaufan et al., (2014) demostraron que el glifosato grado técnico no fue citotóxico hasta 1000 mg/L, mientras que la formulación *Roundup Ultra Max*[®] mostró un efecto citotóxico concentración-tiempo dependiente sobre células HepG2 con una CL_{50} estimada de 41.22 mg/L, 35.19 mg/L, y 34.69 mg/L para 24, 48 y 72 h, respectivamente. Estas concentraciones letales estuvieron cercanas a las determinadas en este trabajo (55.9 mg/L, 52.7 mg/L, 40.4 mg/L para 24, 28 y 72 h, respectivamente). Uno

de los posibles mecanismos de toxicidad es que la formulación probada puede estar dañando la membrana y alterando las funciones mitocondriales de las células a concentraciones ≥ 5 mg/L después de 72 h de exposición, como lo reportado por Koller et al. (2012) en células epiteliales.

La inducción de proliferación celular es un mecanismo asociado con la carcinogénesis química, por lo que la evaluación del efecto proliferativo de cualquier xenobiótico es evidencia que podría ser utilizada para valorar el potencial carcinogénico del mismo (Oliveira et al., 2007). En este estudio se evaluó el efecto proliferativo de la GLY_F y del GLY_T sobre células HepG2, los resultados mostraron que la GLY_F disminuyó la proliferación celular a partir de 0.05 mg/L a 96 h, además, los resultados muestran que a la concentración de 5 mg/L la formulación induce daño a la integridad de la membrana celular a partir de las 72 h y a la concentración más alta probada (50 mg/L) el daño comienza a las 24 h. Por otra parte el GLY_T mostró disminución significativa sobre la proliferación de las células HepG2 a 96 h de exposición con el ensayo de CCK-8, sin embargo este fenómeno no se observó cuando se evaluó con el ensayo de cristal violeta a las mismas condiciones experimentales, dichos resultados sugieren que las células tratadas con GLY_T conservan la integridad de la membrana, pese a la pérdida de la actividad metabólica (Aslantürk, 2018). Los datos obtenidos concuerdan con los reportados por Kašuba et al. (2017) quienes no observaron un aumento significativo de la proliferación de células HepG2 tratadas por 4 y 24 h con GLY grado técnico a 0.5, 2.91 y 3.5 mg/L. Por otra parte, en el presente estudio no se observó efecto del GLY_T sobre la proliferación celular a dosis de 100 mg/L lo cual es consistente con lo reportado por Mesnage et al. (2014) quienes informaron que el GLY grado técnico no tiene efectos proliferativos en células HepG2 a concentraciones de 1, 10, 100, 1000 y 1000 ppm (equivalente a mg/L), mientras que la formulación a base de GLY *Roundup Grands Travaux plus*[®] disminuye la proliferación celular a dosis >10 ppm (10 mg/L) después de 24 h de exposición. Sin embargo, más estudios son necesarios para valorar el efecto citostático de las formulaciones del glifosato así como evaluar los posibles efectos de estas sobre el ciclo celular.

Si bien en el presente estudio no observamos un incremento en la proliferación de las células HepG2, en otros modelos celulares se ha reportado el potencial proliferativo del GLY

grado técnico y de formulaciones a base de GLY, principalmente en aquellas estirpes celulares dependientes de estrógenos (De Almeida et al., 2018; Thongprakaisang et al., 2013)t. Estos resultados sugieren que formulaciones a base de GLY y su ingrediente activo ejercen proliferación celular en células dependientes de hormonas al inhibir las actividades de la transcripción de los receptores de estrógeno alfa (ER α) y beta (ER β) (Gasnier et al., 2009).

La genotoxicidad es considerada como la capacidad de un xenobiótico para inducir daño directo o indirecto hacia el DNA y si éste no se repara puede inducir alteraciones cromosómicas, mutaciones genéticas, cáncer o muerte celular (Christmann and Kaina, 2013). El efecto genotóxico observado en este estudio mostró que el GLY_T y la GLY_F inducen daño al ADN a 24, 48, 72 y 96 h en células HepG2, el cual podría ser por rupturas de cadena sencilla y sitios álcalis labis. Estos resultados concuerdan con el efecto genotóxico del GLY grado técnico observado en células Hep-2 después de 4 h de exposición a 3 mM - 7.5 mM (equivalentes a 507.2 mg/L-1268.02 mg/L), donde se observó un incremento en el porcentaje de DNA en la cola de cometa, en la longitud de la cola y en el momento de la cola, (Mañas et al. 2009); también en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humana expuestas a GLY grado técnico a concentraciones de ≥ 0.5 mM (84.5 mg/L) por 24 h (Kwiatkowska et al., 2017) ha sido reportado. Adicionalmente, nuestros resultados demuestran que el GLY_T ejerce un efecto genotóxico en forma concentración-tiempo dependiente, este mismo comportamiento ha sido reportado en modelos *in vivo* con *Eriocheir sinensis* expuesto a 4.4, 9.8, 44 y 98 mg/L de GLY grado técnico durante 24, 48 y 96 h, respectivamente (Hong et al., 2017).

Por otra parte, también se ha demostrado el potencial genotóxico de las formulaciones a base de GLY en células HepG2 expuestas por 24 h a *Roundup 400* (a concentraciones de GLY > 5 mg/L) (Gasnier et al. 2009), efectos similares fueron observados en células derivadas de la mucosa bucal (TR146) después de 20 min de exposición a *Roundup Ultra Max*[®] y a su ingrediente activo, en los cuales se observó el efecto genotóxico a concentraciones mayores o iguales de 20 mg/L (Koller et al., 2012).

El daño al ADN inducido por la exposición a xenobióticos puede ser considerado como directo cuando el xenobiótico se une a la estructura del DNA generando aductos, o de manera

indirecta por la reducción en la capacidad de reparación del DNA, o por la generación de subproductos que tienen un potencial de daño oxidativo, como las especies reactivas de oxígeno, que se forman generalmente durante los procesos fisiológicos o por la biotransformación del plaguicida vía CYP450 (Basu, 2018; Wang et al., 2016), estos radicales pueden modificar las bases nitrogenadas, crear sitiosapuricos o apirimidicos, rupturas de las hebras o enlaces cruzados (Jena, 2012). El GLY ha sido reportado como un agente capaz de inducir estrés oxidativo en diferentes modelos celulares (Chaufan et al., 2014; Coalova et al., 2014; Woźniak et al., 2018), generando la oxidación de purinas y pirimidinas, con la subsecuente inducción de roturas de cadena sencilla y doble al ADN (Woźniak et al., 2018). Los resultados derivados de este estudio indican que el GLY_T no indujo efectos citotóxicos, ni sobre la proliferación, pero sí un efecto genotóxico, el cual podría ser un mecanismo asociado con el desarrollo de toxicidad no organotrópica como carcinogénesis, teratogénesis entre otras. Sin embargo es necesario realizar estudios que evalúen el efecto del GLY sobre los mecanismos moleculares que pueden verse afectados por la exposición a GLY como blancos moleculares de la vía de p53, el estrés oxidativo y los blancos moleculares que activa lo cual permitirá dilucidar los mecanismos asociados a su potencial genotóxico.

5. Conclusión

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran un efecto citotóxico y sobre la proliferación celular, diferencial entre la GLY_F y el GLY_T en células HepG2, además se observó que tanto el GLY_T como la GLY_F inducen daño genotóxico en células HepG2. Estos resultados sugieren un potencial citotóxico mayor de la GLY_F en comparación con GLY_T, lo que conlleva a la necesidad de realizar la evaluación del riesgo utilizando las formulaciones comerciales, además de llevar a cabo otros estudios sobre la caracterización de los adyuvantes que se utilizan en las formulaciones comerciales, así como también evaluar las interacciones toxicológicas de los mismos.

6. Referencia

- Alvarez-Moya, C., Silva, M.R., Ramírez, C.V., Gallardo, D.G., Sánchez, R.L., Aguirre, A.C., Velasco, A.F., 2014. Comparison of the in vivo and in vitro genotoxicity of glyphosate isopropylamine salt in three different organisms. *Genet. Mol. Biol.* 37, 105–110.
- Aslantürk, Ö.S., 2018. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages, in: Larramendy, M.L., Soloneski, S. (Eds.), *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71923>
- Basu, A.K., 2018. DNA Damage, Mutagenesis and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19040970>
- Benbrook, C.M., 2016. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environ. Sci. Eur.* 28. <https://doi.org/10.1186/s12302-016-0070-0>
- Boehme, K., Dietz, Y., Hewitt, P., Mueller, S.O., 2010. Activation of P53 in HepG2 cells as surrogate to detect mutagens and promutagens in vitro. *Toxicol. Lett.* 198, 272–281. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.07.007>
- Bolognesi, C., 2003. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat. Res. Mutat. Res.* 543, 251–272. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(03\)00015-2](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(03)00015-2)
- Chaufan, G., Coalova, I., Molina, M. del C., 2014. Glyphosate Commercial Formulation Causes Cytotoxicity, Oxidative Effects, and Apoptosis on Human Cells: Differences With its Active Ingredient. *Int. J. Toxicol.* 33, 29–38. <https://doi.org/10.1177/1091581813517906>
- Christmann, M., Kaina, B., 2013. Transcriptional regulation of human DNA repair genes following genotoxic stress: trigger mechanisms, inducible responses and genotoxic adaptation. *Nucleic Acids Res.* 41, 8403–8420. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt635>
- Coalova, I., Ríos de Molina, M. del C., Chaufan, G., 2014. Influence of the spray adjuvant on the toxicity effects of a glyphosate formulation. *Toxicol. In Vitro* 28, 1306–1311. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.06.014>
- De Almeida, L.K.S., Pletschke, B.I., Frost, C.L., 2018. Moderate levels of glyphosate and its formulations vary in their cytotoxicity and genotoxicity in a whole blood model and in human cell lines with different estrogen receptor status. *3 Biotech* 8. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1464-z>
- Duke, S.O., 2015. Perspectives on transgenic, herbicide-resistant crops in the United States almost 20 years after introduction. *Pest Manag. Sci.* 71, 652–657. <https://doi.org/10.1002/ps.3863>
- EFSA, 2015. A review of the carcinogenic potential of glyphosate by four independent expert panels and comparison to the IARC assessment: Critical Reviews in Toxicology: Vol 46, No sup1 [WWW Document]. URL <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408444.2016.1214677> (accessed 10.27.18).
- Feoktistova, M., Geserick, P., Leverkus, M., 2016. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2016, pdb.prot087379. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>
- Gasnier, C., Dumont, C., Benachour, N., Clair, E., Chagnon, M.-C., Séralini, G.-E., 2009. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology* 262, 184–191. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2009.06.006>
- Gomes, M.P., Smedbol, E., Chalifour, A., Hénault-Ethier, L., Labrecque, M., Lepage, L., Lucotte, M., Juneau, P., 2014. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. *J. Exp. Bot.* 65, 4691–4703. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru269>
- Guyton, K.Z., Loomis, D., Grosse, Y., Ghissassi, F.E., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Scoccianti, C., Mattock, H., Straif, K., 2015. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion,

- diazinon, and glyphosate. *Lancet Oncol.* 16, 490–491. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70134-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70134-8)
- Hong, Y., Yang, X., Yan, G., Huang, Y., Zuo, F., Shen, Y., Ding, Y., Cheng, Y., 2017. Effects of glyphosate on immune responses and haemocyte DNA damage of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Fish Shellfish Immunol.* 71, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.09.062>
- Jena, N.R., 2012. DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *J. Biosci.* 37, 503–517. <https://doi.org/10.1007/s12038-012-9218-2>
- Kašuba, V., Milić, M., Rozgaj, R., Kopjar, N., Mladinić, M., Žunec, S., Vrdoljak, A.L., Pavičić, I., Čermak, A.M.M., Pizent, A., Lovaković, B.T., Želježić, D., 2017. Effects of low doses of glyphosate on DNA damage, cell proliferation and oxidative stress in the HepG2 cell line. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 19267–19281. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9438-y>
- Kim, Y., Hong, J., Gil, H., Song, H., Hong, S., 2013. Mixtures of glyphosate and surfactant TN20 accelerate cell death via mitochondrial damage-induced apoptosis and necrosis. *Toxicol. In Vitro* 27, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.09.021>
- Koller, V.J., Fürhacker, M., Nersesyan, A., Mišić, M., Eisenbauer, M., Knasmueller, S., 2012. Cytotoxic and DNA-damaging properties of glyphosate and Roundup in human-derived buccal epithelial cells. *Arch. Toxicol.* 86, 805–813. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0804-8>
- Kwiatkowska, M., Reszka, E., Woźniak, K., Jabłońska, E., Michałowicz, J., Bukowska, B., 2017. DNA damage and methylation induced by glyphosate in human peripheral blood mononuclear cells (in vitro study). *Food Chem. Toxicol.* 105, 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.051>
- Li, J., Smeda, R.J., Sellers, B.A., Johnson, W.G., 2005. Influence of Formulation and Glyphosate Salt on Absorption and Translocation in Three Annual Weeds. *Weed Sci.* 53, 153–159.
- Mañas, F., Peralta, L., Raviolo, J., Ovando, H.G., Weyers, A., Ugnia, L., Cid, M.G., Larripa, I., Gorla, N., 2009. Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 28, 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2009.02.001>
- Mesnage, R., Bernay, B., Séralini, G.-E., 2012. Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology* 313, 122–128. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.09.006>
- Mesnage, R., Defarge, N., Spiroux de Vendômois, J., Séralini, G.E., 2015. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food Chem. Toxicol.* 84, 133–153. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.08.012>
- Miret, S., De Groene, E.M., Klaffke, W., 2006. Comparison of In Vitro Assays of Cellular Toxicity in the Human Hepatic Cell Line HepG2. *J. Biomol. Screen.* 11, 184–193. <https://doi.org/10.1177/1087057105283787>
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Mostafalou, S., Abdollahi, M., 2013. Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 268, 157–177. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.01.025>
- Myers, J.P., Antoniou, M.N., Blumberg, B., Carroll, L., Colborn, T., Everett, L.G., Hansen, M., Landrigan, P.J., Lanphear, B.P., Mesnage, R., Vandenberg, L.N., Vom Saal, F.S., Welshons, W.V., Benbrook, C.M., 2016. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. *Environ. Health Glob. Access Sci. Source* 15, 19. <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0117-0>
- Nohmi, T., 2018. Thresholds of Genotoxic and Non-Genotoxic Carcinogens. *Toxicol. Res.* 34, 281–290. <https://doi.org/10.5487/TR.2018.34.4.281>

- Oliveira, P.A., Colaço, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., De-La-Cruz P., L.F., Lopes, C., 2007. Chemical carcinogenesis. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 79, 593–616. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652007000400004>
- OMS, 1992. Consecuencias sanitarias del empleo de plaguicidas en la agricultura. Ginebra: Organizaci'ón Mundial de la Salud.
- Park, S., Hwang, I., Kim, J., Kang, H., Park, S.-Y., Gil, H., Song, H., Hong, S., 2015. The effects of nonyl phenoxypolyethoxyl ethanol on cell damage pathway gene expression in SK-NSH cells. *Korean J. Intern. Med.* 30, 873–883. <https://doi.org/10.3904/kjim.2015.30.6.873>
- Rendón-von Osten, J., Dzul-Caamal, R., 2017. Glyphosate Residues in Groundwater, Drinking Water and Urine of Subsistence Farmers from Intensive Agriculture Localities: A Survey in Hopelchén, Campeche, Mexico. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14. <https://doi.org/10.3390/ijerph14060595>
- Repetto, G., del Peso, A., Zurita, J.L., 2008. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.* 3, 1125–1131. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.75>
- Rodrigues, N.R., de Souza, A.P.F., 2018. Occurrence of glyphosate and AMPA residues in soy-based infant formula sold in Brazil. *Food Addit. Contam. Part A* 35, 723–730. <https://doi.org/10.1080/19440049.2017.1419286>
- Schinasi, L., Leon, M., 2014. 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* 11, 4449–4527. <https://doi.org/10.3390/ijerph110404449>
- Severin, I., Padiou, M., Lhuguenot, J.-C., Chagnon, M.-C., 2003. Toxic interaction between hydroxyurea and 1- β -d-arabino-furanosylcytosine on the DNA of a human hepatoma cell line (HEPG2). *Toxicol. Lett.* 145, 303–311. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2003.08.003>
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191.
- Song, H.-Y., Kim, Y.-H., Seok, S.-J., Gil, H.-W., Hong, S.-Y., 2012. In Vitro Cytotoxic Effect of Glyphosate Mixture Containing Surfactants. *J. Korean Med. Sci.* 27, 711. <https://doi.org/10.3346/jkms.2012.27.7.711>
- Thongprakaisang, S., Thiantanawat, A., Rangkadilok, N., Suriyo, T., Satayavivad, J., 2013. Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. *Food Chem. Toxicol.* 59, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.057>
- Turkez, H., Arslan, M.E., Ozdemir, O., 2017. Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 13, 1089–1098. <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1375097>
- USEPA, 2018. Basic Information about Pesticide Ingredients [WWW Document]. URL <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/basic-information-about-pesticide-ingredients> (accessed 2.13.19).
- Van Bruggen, A.H.C., He, M.M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K.C., Finckh, M.R., Morris, J.G., 2018. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Sci. Total Environ.* 616–617, 255–268. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.309>
- Vandenberg, L.N., Blumberg, B., Antoniou, M.N., Benbrook, C.M., Carroll, L., Colborn, T., Everett, L.G., Hansen, M., Landrigan, P.J., Lanphear, B.P., Mesnage, R., vom Saal, F.S., Welshons, W.V., Myers, J.P., 2017. Is it time to reassess current safety standards for glyphosate-based herbicides? *J. Epidemiol. Community Health* 71, 613–618. <https://doi.org/10.1136/jech-2016-208463>
- Wang, X., Martínez, M.-A., Dai, M., Chen, D., Ares, I., Romero, A., Castellano, V., Martínez, M., Rodríguez, J.L., Martínez-Larrañaga, M.-R., Anadón, A., Yuan, Z., 2016. Permethrin-induced oxidative stress and toxicity and metabolism. A review. *Environ. Res.* 149, 86–104. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.05.003>

- Westerink, W.M.A., Schoonen, W.G.E.J., 2007. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicol. In Vitro* 21, 1581–1591. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.05.014>
- Williams, A.L., Watson, R.E., DeSesso, J.M., 2012. Developmental and reproductive outcomes in humans and animals after glyphosate exposure: a critical analysis. *J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* 15, 39–96. <https://doi.org/10.1080/10937404.2012.632361>
- Williams, G.M., Kroes, R., Munro, I.C., 2000. Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 31, 117–165. <https://doi.org/10.1006/rtph.1999.1371>
- Woźniak, E., Sicińska, P., Michałowicz, J., Woźniak, K., Reszka, E., Huras, B., Zakrzewski, J., Bukowska, B., 2018. 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.* 120, 510–522. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.07.035>
- Zhang, Y., 2018. Cell toxicity mechanism and biomarker. *Clin. Transl. Med.* 7, 34. <https://doi.org/10.1186/s40169-018-0212-7>
- Zouaoui, K., Dulaurent, S., Gaulier, J.M., Moesch, C., Lachâtre, G., 2013. Determination of glyphosate and AMPA in blood and urine from humans: About 13 cases of acute intoxication. *Forensic Sci. Int.* 226, e20–e25. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2012.12.010>

7. Material suplementario

Tabla 1. Material suplementario

Concentración letal 20 y 50 de la formulación del GLY_F en células HepG2.

Time (h)	Ensayo MTT			Ensayo RN		
	LC ₂₀ mg/L	LC ₅₀ mg/L		LC ₂₀ mg/L	LC ₅₀ mg/L	
24	89.85	55.91	($y=-0.84x+99.44$, $R^2=0.87$)	85.40	52.42	($y=-0.91x+97.68$, $R^2=0.93$)
48	84.34	52.78	($y=-0.95x+100.18$, $R^2=0.91$)	72.40	45.63	($y=-1.12x+101.13$, $R^2=0.84$)
72	70.65	40.45	($y=-0.99x+90.18$, $R^2=0.81$)	70.06	44.00	($y=-1.15x+100.64$, $R^2=0.81$)
96	67.23	36.60	($y=-0.98x+85.85$, $R^2=0.79$)	70.70	37.86	($y=-0.92x+84.79$, $R^2=0.73$)

LC: Concentración letal en mg/L; RN: retención de rojo neutro; R²: r cuadrada.