

## Evaluación mutagénica de tres herbicidas a base de glifosato empleando el test de mutación y recombinación somática en *Drosophila melanogaster*

### Mutagenic evaluation of three glyphosate-based herbicides using somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*

Luis Francisco Marín Insfrán<sup>1,\*</sup>, Elvio Gayozo Melgarejo<sup>1</sup>, Cynthia Rivarola Sena<sup>1</sup>,  
& Clara Núñez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Biología, Laboratorio de Mutagénesis, Carcinogénesis y Teratogénesis Ambiental, San Lorenzo, Paraguay.

\*Autor correspondiente: [luismarin@facen.una.py](mailto:luismarin@facen.una.py).

**Resumen:** En zonas rurales de Paraguay los herbicidas son ampliamente utilizados, entre los cuales se encuentran un gran número que son elaborados a base de glifosato, estos actúan inhibiendo la actividad de enzimas que sintetizan aminoácidos aromáticos en las plantas. Estudios han demostrado que no poseen actividad genotóxica, sin embargo, otras investigaciones indican lo contrario. Esta investigación tiene por objetivo principal evaluar la actividad mutagénica de tres herbicidas a base de glifosato (formulación comercial) en *Drosophila melanogaster* mediante el ensayo SMART. El diseño del estudio fue de bloques al azar, donde se trataron larvas de *D. melanogaster* tanto en cruce estándar y en cruce de alta bioactivación por 72±5 horas con diferentes concentraciones de los tres herbicidas a base de glifosato (0,01, 0,1, 1 y 10 mg.mL<sup>-1</sup>), como agente mutágeno se empleó Ciclofosfamida a concentraciones de 2,61 y 0,78 mg.mL<sup>-1</sup>, como testigo agua destilada. Los resultados obtenidos no fueron estadísticamente significativos, sin embargo, el herbicida GBH2 a la concentración de 10 mg.mL<sup>-1</sup> evidenció un aumento significativo de clones mutantes del tipo mancha simple pequeña y en el total de mutaciones en comparación al testigo empleado.

**Palabras clave:** SMART, herbicidas a base de glifosato, *Drosophila melanogaster*, mutagenicidad.

**Abstract:** In rural areas of Paraguay are widely used herbicides, among which several are made of glyphosate, these are systemic broad spectrum and act by inhibiting the activity of enzymes that synthesize aromatic aminoacids in plants. Studies have shown that they don't have genotoxic activity, however, other research indicates that they can alter cellular processes in animals, which can present an environmental and health risk factor. The main objective of this work is to evaluate the mutagenic activity of three glyphosate-based herbicides (commercial formulation) in *Drosophila melanogaster* through SMART assay. For this, third stage larvae of *D. melanogaster* obtained from standard crossing and high bioactivation cross were chronically treated orally for 72 ± 5 hours with different concentrations (0.01, 0.1, 1 and 10 mg.mL<sup>-1</sup>) of three glyphosate-based herbicides, Cyclophosphamide 2.61 and 0.78 mg.mL<sup>-1</sup> were used as a mutagenic agent and as a control distilled water. The results obtained were not statistically significant, however, the herbicide GBH2 at the concentration of 10 mg.mL<sup>-1</sup> showed significant differences compared to control in mutations number of small single spot type and total number of mutations observed.

**Key words:** SMART, glyphosate-based herbicides, *Drosophila melanogaster*, mutagenicity.

### Introducción

El Glifosato es un pesticida no selectivo sistémico, de post-emergencia más vendido en el mundo, y representa alrededor del 25% del mercado global de herbicidas, el mismo actúa en todos los vegetales inhibiendo la actividad de enzimas que sintetizan aminoácidos aromáticos, los cuales son necesarios para la fotosíntesis y por ello las

plantas, al no poder sintetizarlos, mueren o frenan considerablemente su crecimiento (Williams *et al.*, 2016; Labrada *et al.*, 1996). Fue citado por primera vez como herbicida en 1971, y según la U.S Environmental Protection y la O.M.S, el Glifosato no presenta efectos mutagénicos ni cancerígenos (International Programme on Chemical Safety, 1994).

Recibido: 03/11/2021

Aceptado: 01/03/2022



2078-399X/2022 Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay. Este es un artículo de acceso abierto bajo la licencia CC BY 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>).

Según la Tomlin (1994), se comercializan tres tipos de glifosatos, el glifosato-isopropilamonio que es el más empleado en la elaboración de los herbicidas, el glifosato-sesquisódio y glifosato-trimesium que no son muy utilizados.

Existen estudios que sugieren que herbicidas a base de glifosato podrían poseer actividades tóxicas sobre varios otros organismos. Un análisis llevado a cabo al tejido hepático y eritrocitos de *Leptodactylus latinasus*, detectó el aumento de la formación de micronúcleo y anomalías nucleares en los eritrocitos (Pérez-Iglesia *et al.*, 2016), así también se evidenció el daño en el ADN, generando efecto clastogénico y aneugénico, los cuales fueron comprobados mediante la utilización de la línea celular HepG2 (Kašuba *et al.*, 2017), también estudiando el efecto del glifosato sobre el ADN y la regulación de expresión génica de células mononucleares de sangre periférica se determinó que hay posibles daños en el ADN, debido a una regulación negativa en la expresión del gen p53, lo cual activa protooncogenes o secuencias retrotransponibles (Kwiatkowska *et al.*, 2017).

Otras investigaciones realizadas en medula ósea de ratas (*Mus musculus*), encontraron que el Roundup® poseía el mismo nivel de genotoxicidad que el control positivo (Ciclofosfamida), en el mismo estudio también se detectó que a concentraciones recomendadas para el ejercicio de la agricultura, promovía en un 100% la hemólisis de eritrocitos humanos, labilizando la membrana plasmática de los mismos (Rodrigues *et al.*, 2011). Utilizando células del hígado, pulmonares y nerviosas del humano (HepG2, A549 y SH-SY5Y), no se detectaron citotoxicidad relevante (Hao *et al.*, 2019) y con el uso de *Mus musculus*, de la línea V<sub>k</sub>\*MYC, se logró apreciar el desarrollo de anomalías hematológicas progresivas y neoplasias de células plasmáticas como esplenomegalia, anemia e IgG sérica elevada, lesiones óseas líticas y daño renal. En los *Mus musculus* de tipo salvaje, se generaron gammaglobulina monoclonal benigna con aumento de IgG sérica, anemia y presencia de células plasmáticas en el bazo y la médula ósea.

(Wang *et al.*, 2019).

También se observaron daños tóxicos en organismos vegetales de menor escala evolutiva como los briófitos, afectando su fisiología, y por ende ocasionando a largo plazo un desequilibrio ecológico, como pérdida de microhabitats las cuales cumplen un rol importante en la retención natural de humedad y la regulación de erosión de suelos (Narváez Parra *et al.*, 2013).

Paraguay actualmente presenta un gran crecimiento en la agricultura industrializada con el consecuente uso intensivo y masivo de todo tipo de plaguicidas, según menciona Benítez-Leite *et al.* (2009) más de 24 millones de litros de pesticidas al año se emplean en los campos de cultivo en Paraguay, siendo desde el año 2003 para la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura) parte de la lista de países preocupantes en cuanto al uso de los mismos en el mundo.

La exposición continua sin las medidas correctas de bioseguridad puede generar riesgos colaterales sobre la salud no solo humana sino también de la vida salvaje, así como poner en riesgo el equilibrio del ecosistema, es por esto que en esta investigación se propone como objetivo principal evaluar el potencial genotóxico de distintas diluciones de tres herbicidas a base de glifosato en imagos de *D. melanogaster* empleando el bioensayo SMART (Test de mutación y recombinación somática).

## Materiales y métodos

### Preparación de diluciones

Se prepararon las diluciones según uso popular, para ello se realizó una solución stock de 10 mg.mL<sup>-1</sup> de tres herbicidas a base de glifosato (GBH1 con composición g.L<sup>-1</sup>: 48 g de sal isopropilamonio de N-(fosfonometil) glicina, coadyuvantes e inertes 100 mL; GBH2 con composición g.L<sup>-1</sup>: 48 g de sal N-(fosfonometil) glicina, 52 g de inertes; GBH3 con composición g.L<sup>-1</sup>: 48 g de sal isopropilamonio de N-(fosfonometil) glicina), la preparación se llevó a cabo con las medidas de bioseguridad sugeridas para su manejo. De la solución stock

se obtuvieron diluciones correspondientes a 1 mg.mL<sup>-1</sup>, 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> y 0,01 mg.mL<sup>-1</sup> mediante diluciones seriadas de cada solución, según uso popular.

### Test de mutación y recombinación somática en alas de *Drosophila melanogaster*

Se obtuvieron hembras vírgenes de cepas puras de *Drosophila melanogaster* (*flr*<sup>3</sup>/*In*(3LR)*TM3*, *ri p<sup>p</sup>sep I*(3)89*Aa bx*<sup>34e</sup> y *Bd*<sup>s</sup>, y *ORR/ORR; flr*<sup>3</sup>/*In*(3LR)*TM3*, *ri p<sup>p</sup> sep I*(3)89*Aa bx*<sup>34e</sup> y *Bd*<sup>s</sup>) las cuales se encontraban bajo condiciones normales de temperatura ambiente (22°-24° C) y medio de cultivo convencional (harina de maíz 42 g, Agar-agar 6 g, sacarosa 24 gramos, levadura 26,5 g, agua destilada 500 mL, 2 mL de Ácido propiónico-Ácido ortofosfórico 1:1 y 2 mL de solución nipagin al 10%).

También se obtuvieron, de frascos con medio de cultivo convencional, machos de cepa pura *mwh/mwh* de *D. melanogaster*. El cruce estándar (SC) se realizó depositando en cada frasco 80 hembras vírgenes cepa *flr*<sup>3</sup>/*In*(3LR)*TM3*, *ri p<sup>p</sup>sep I*(3)89*Aa bx*<sup>34e</sup> y *Bd*<sup>s</sup> con 40 machos de la cepa *mwh/mwh*, por 72±5 horas (Graf et al., 1984). El cruce de alta bioactivación (BC) se llevó a cabo depositando en cada frasco 80 hembras vírgenes cepa *ORR/ORR; flr*<sup>3</sup> / *In*(3LR)*TM3*, *ri p<sup>p</sup> sep I*(3)89*Aa bx*<sup>34e</sup> y *Bd*<sup>s</sup> con 40 machos de la cepa *mwh/mwh*, todas las cruzas fueron cultivadas en un medio ovopositor por 72±5 horas a temperatura ambiente 22°-24° C (Graf et al., 1984).

Transcurridas las 72±5 horas se procedió a la extracción de cien larvas de tercer estadio de cada frasco, las cuales fueron depositadas en diferentes contenedores con medio instantáneo preparado en el momento de traspaso, para un tratamiento vía oral por 72 horas, los mismos contenían 1,5 gramos de puré de papa instantáneo rehidratado con 5 mL de las diluciones preparadas 0,01 mg.mL<sup>-1</sup>, 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>, 1 mg.mL<sup>-1</sup> y 10 mg.mL<sup>-1</sup> de los herbicidas GBH1, GBH2 y GBH3, de agua destilada como control negativo (diluyente) y Ciclofosfamida como agente mutágeno de referencia (Graf et al., 1984). Todos los tratamientos se realizaron por triplicado.

Una vez eclosionados los imágnes fueron selec-

ciones al azar 10 individuos trans-heterocigotas *mwh*+/+*flr*<sup>3</sup> de cada tratamiento (5 individuos de cada sexo), de las cuales se extrajeron las alas con ayuda de una lupa estereoscópica Motic® y montadas en láminas microscópicas con solución de Faüre (goma arábica 300 g, glicerol 20 mL, hidrato de cloral 50 g y agua destilada 50 mL).

La observación de las láminas se realizó con ayuda de un microscopio óptico compuesto donde se observaron las regiones A, B, C', C, D', D, E, y también los márgenes que separan a las mismas (Rodrigues de Andrade et al., 2004).

Se cuantificó el número de clones mutantes en las alas observadas y se los clasificó según el tipo de marcador expresado; Manchas Simples Pequeñas (MSP) con una o dos células (*mwh* o *flr*<sup>3</sup>), Manchas Simples Grandes (MSG) con tres o más células (*mwh* o *flr*<sup>3</sup>) y Manchas Gemelas (MG) con un área *mwh* y otra *flr*<sup>3</sup> adyacente (Graf et al., 1984; Rodrigues de Andrade et al., 2004).

### Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron mediante tablas estadísticas de acuerdo con Frei y Würgler (1988), que corresponde a un modelo estadístico Binomial Condicional (Test de Kastenbaum-Bowman), con niveles de significancia  $\alpha = \beta = 0,05$  (Kastenbaum & Bowman, 1970), donde las frecuencias de mutaciones se utilizaron directamente en la determinación del valor mínimo de mutaciones. Los gráficos estadísticos fueron realizados empleando el programa MS Excel 2016 (Microsoft Windows, USA).

### Resultados y discusión

Los resultados hallados en el ensayo del cruce estándar para el herbicida GBH1 en concentraciones de 10, 1, 0,1 y 0,01 mg.mL<sup>-1</sup>, fueron en un total de 7, 5, 4 y 4 de clones mutantes respectivamente; siendo el clon mutante de mayor cantidad la mancha simple pequeña (MSP) con un total de 6 clones para el tratamiento con 10 mg.mL<sup>-1</sup> del herbicida, 5 manchas mutantes para el tratamiento con 1 mg.mL<sup>-1</sup> y 4 clones tanto para los tratamientos de 0,1 y 0,01 mg.mL<sup>-1</sup>. Para el marcador mutante mancha simple grande (MSG) solo se registró una mancha mutante

Tratamiento (mg.mL <sup>-1</sup> )	Número de alas	MSP (1-2 céls) <sup>b</sup> <i>m</i> = 2			MSG (>2 céls) <sup>b</sup> <i>m</i> = 5			MG <i>m</i> = 5			TM <i>m</i> = 2		
<b>CRUCE ESTÁNDAR</b>													
<b>Control negativo</b>	20	0,70	(07)	-	0,10	(01)	-	0,00	(00)	-	0,80	(08)	-
<b>Ciclofosfamida 2,61</b>	20	4,40	(44)	+	1,30	(13)	+	0,50	(05)	+	6,20	(62)	+
<b>GBH1</b>													
<b>0,01</b>	20	0,30	(03)	-	0,10	(01)	i	0,00	(00)	i	0,40	(04)	-
<b>0,1</b>	20	0,30	(03)	-	0,10	(01)	i	0,00	(00)	i	0,40	(04)	-
<b>1</b>	20	0,50	(05)	i	0,00	(00)	i	0,00	(00)	i	0,50	(05)	-
<b>10</b>	20	0,60	(06)	i	0,10	(01)	i	0,00	(00)	i	0,70	(07)	i
<b>GBH2</b>													
<b>0,01</b>	20	0,80	(08)	i	0,20	(02)	i	0,00	(00)	i	1,00	(10)	i
<b>0,1</b>	20	0,30	(03)	-	0,10	(01)	i	0,00	(00)	i	0,40	(04)	-
<b>1</b>	20	0,70	(07)	i	0,10	(01)	i	0,00	(00)	i	0,80	(08)	i
<b>10</b>	20	2,90	(29)	+	0,20	(02)	i	0,00	(00)	i	3,10	(31)	+
<b>GBH3</b>													
<b>0,01</b>	20	0,30	(03)	-	0,10	(01)	i	0,00	(00)	i	0,40	(04)	-
<b>0,1</b>	20	0,40	(04)	-	0,30	(03)	i	0,00	(00)	i	0,70	(07)	i
<b>1</b>	20	0,20	(02)	-	0,00	(00)	i	0,10	(01)	i	0,30	(03)	-
<b>10</b>	20	0,50	(05)	i	0,00	(00)	i	0,00	(00)	i	0,50	(05)	-
<b>CRUCE DE ALTA BIOACTIVACIÓN</b>													
<b>Control negativo</b>	20	0,60	(06)	-	0,20	(02)	-	0,00	(00)	-	0,80	(08)	-
<b>Ciclofosfamida 0,78</b>	20	15,00	(150)	+	5,00	(50)	+	0,20	(12)	+	21,20	(212)	+
<b>GBH1</b>													
<b>0,01</b>	20	0,50	(05)	i	0,00	(00)	i	0,00	(00)	i	0,50	(05)	-
<b>0,1</b>	20	0,10	(01)	-	0,00	(00)	i	0,00	(00)	i	0,10	(01)	-
<b>1</b>	20	0,30	(03)	-	0,20	(02)	i	0,00	(00)	i	0,50	(05)	-
<b>10</b>	20	0,40	(04)	i	0,00	(00)	i	0,00	(00)	i	0,40	(04)	-
<b>GBH2</b>													
<b>0,01</b>	20	0,00	(00)	-	0,00	(00)	i	0,00	(00)	i	0,00	(00)	-
<b>0,1</b>	20	0,10	(01)	-	0,00	(00)	i	0,00	(00)	i	0,10	(01)	-
<b>1</b>	20	0,70	(07)	i	0,20	(02)	i	0,10	(01)	i	1,00	(10)	i
<b>10</b>	20	0,10	(01)	-	0,00	(00)	i	0,00	(00)	i	0,10	(01)	-
<b>GBH3</b>													
<b>0,01</b>	20	0,50	(05)	i	0,00	(00)	i	0,00	(00)	i	0,50	(05)	-
<b>0,1</b>	20	0,40	(04)	i	0,00	(00)	i	0,00	(00)	i	0,40	(04)	-
<b>1</b>	20	0,90	(09)	i	0,00	(00)	i	0,10	(01)	i	1,00	(10)	i
<b>10</b>	20	0,80	(08)	i	0,00	(00)	i	0,10	(01)	i	0,90	(09)	i

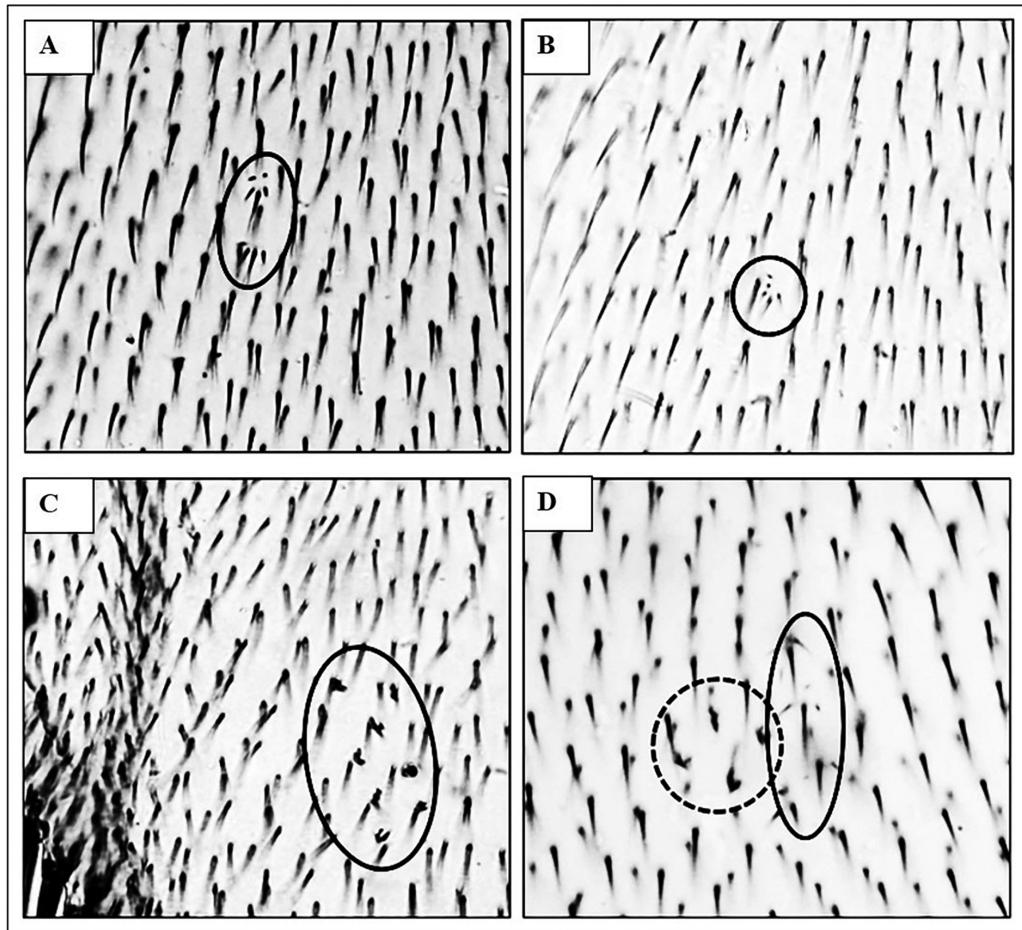
**Página opuesta:** **Tabla 1:** Análisis estadístico del potencial genotóxico de los herbicidas a base de Glifosato: GBH1, GBH2 y GBH3. **a)** Diagnóstico estadístico de acuerdo con Frei y Würgler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. m, factor de multiplicación a fin de evaluar los resultados significativamente negativos. Niveles de significancia  $\alpha = \beta = 0,05$ . **b)** Incluso las manchas simples *flr<sup>3</sup>* raras. **c)** Considerando los clones *mwh* para las manchas simples *mwh* y para las manchas gemelas.

para los tratamientos de 10, 0,1 y 0,01 mg.mL<sup>-1</sup>, no se observaron clones mutantes de mancha gemela (MG) en las alas de los individuos tratados (Tabla 1, Figura 1).

En los tratamientos con 10, 1, 0,1 y 0,01 mg.mL<sup>-1</sup> del herbicida GBH2, se pudieron registrar un total de clones de 31, 8, 4 y 10 respectivamente, siendo el total de mutaciones contabilizadas del clon mancha simple pequeña (MSP) 29, 7, 3 y 8 respectivamente,

para el clon mancha simple grande (MSG) 2, 1, 1 y 2 respectivamente, tampoco se registraron marcadores mutantes del tipo mancha gemela (MG) en las alas observadas de los individuos tratados con este herbicida.

En el tratamiento con el herbicida GBH3 a diluciones de 10 mg.mL<sup>-1</sup>, 1 mg.mL<sup>-1</sup>, 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> y 0,01 mg.mL<sup>-1</sup> se registraron un total de manchas mutantes de 5, 3, 7 y 4 respectivamente, las man-



**Figura 1:** Clones mutantes encontrados en alas de *Drosophila melanogaster* tratadas. **A y B:** Mancha simple pequeña (MSP) marcador *mwh* (círculo de línea sólida) con GBH1 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>. **C:** Mancha simple grande (MSG) marcador *flr<sup>3</sup>* (círculo de línea sólida) tratamiento con GBH2 10 mg.mL<sup>-1</sup>. **D:** Mancha gemela (MG) marcadores *mwh* (círculo de línea sólida) y *flr<sup>3</sup>* (círculo de línea punteada) tratamiento con GBH3 1 mg.mL<sup>-1</sup>. Aumento: 400X.

chas simples pequeñas (MSP) 5, 2, 4 y 3 respectivamente, a su vez las manchas simples grandes (MSG) fueron registrados 3 y un clon mutante para los tratamientos de 0,1 y 0,01 mg.mL<sup>-1</sup> respectivamente, se registró un clon mutante del tipo mancha gemela para el tratamiento con 1 mg.mL<sup>-1</sup> de este herbicida. A su vez en el cruce de alta bioactivación con los tratamientos de 10 mg.mL<sup>-1</sup>, 1 mg.mL<sup>-1</sup>, 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> y 0,01 mg.mL<sup>-1</sup> de GBH1 se observaron un total de 4, 5, 1 y 5 clones mutantes, las manchas simples pequeñas (MSP) se registraron en mayor cantidad siendo estas de 4, 3, 1 y 5 clones respectivamente, mientras que los clones del tipo mancha simple grande (MSG) solo se registraron para el tratamiento de 1 mg.mL<sup>-1</sup> 2 manchas mutantes, no se registraron manchas gemelas en las alas observadas.

En los tratamientos con 10, 1 y 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> del herbicida GBH2 en el cruce de bioactivación, se registraron un total de manchas mutantes de 1, 10 y 1 para los primeros tres tratamientos sin embargo no se observó ningún tipo de clon mutante para el tratamiento de 0,01 mg.mL<sup>-1</sup>, el total de mutaciones del tipo mancha simple pequeña (MSP) fueron de 1, 7 y 1 respectivamente, en cuanto al clon mancha simple grande (MSG) fue de 2 clones para el tratamiento de 1 mg.mL<sup>-1</sup>, también para el mismo tratamiento se registró un clon del tipo mancha gemela (MG).

Para los tratamientos de 10, 1, 0,1 y 0,01 mg.mL<sup>-1</sup> del herbicida GBH3 se registraron en total 9, 10, 4 y 5 clones mutantes, siendo la de mayor frecuencia los clones del tipo mancha simple pequeña (MSP) siendo esta de 8, 9, 4 y 5 clones respectivamente, no se registraron mutaciones del tipo mancha simple grande (MSG), sin embargo, se observó un clon mutante del tipo mancha gemela (MG) para los tratamientos con 10 y 1 mg.mL<sup>-1</sup> del herbicida. Es importante también destacar que fueron encontrados los tres tipos de clones mutantes, siendo estas en mayor cantidad en el tratamiento con el agente mutágeno Ciclofosfamida, tanto para el cruce estándar y el cruce de alta bioactivación (Figura 1, Figura 2, Tabla 1).

Los resultados obtenidos en los tratamientos con las diluciones de GBH1, demostraron fre-

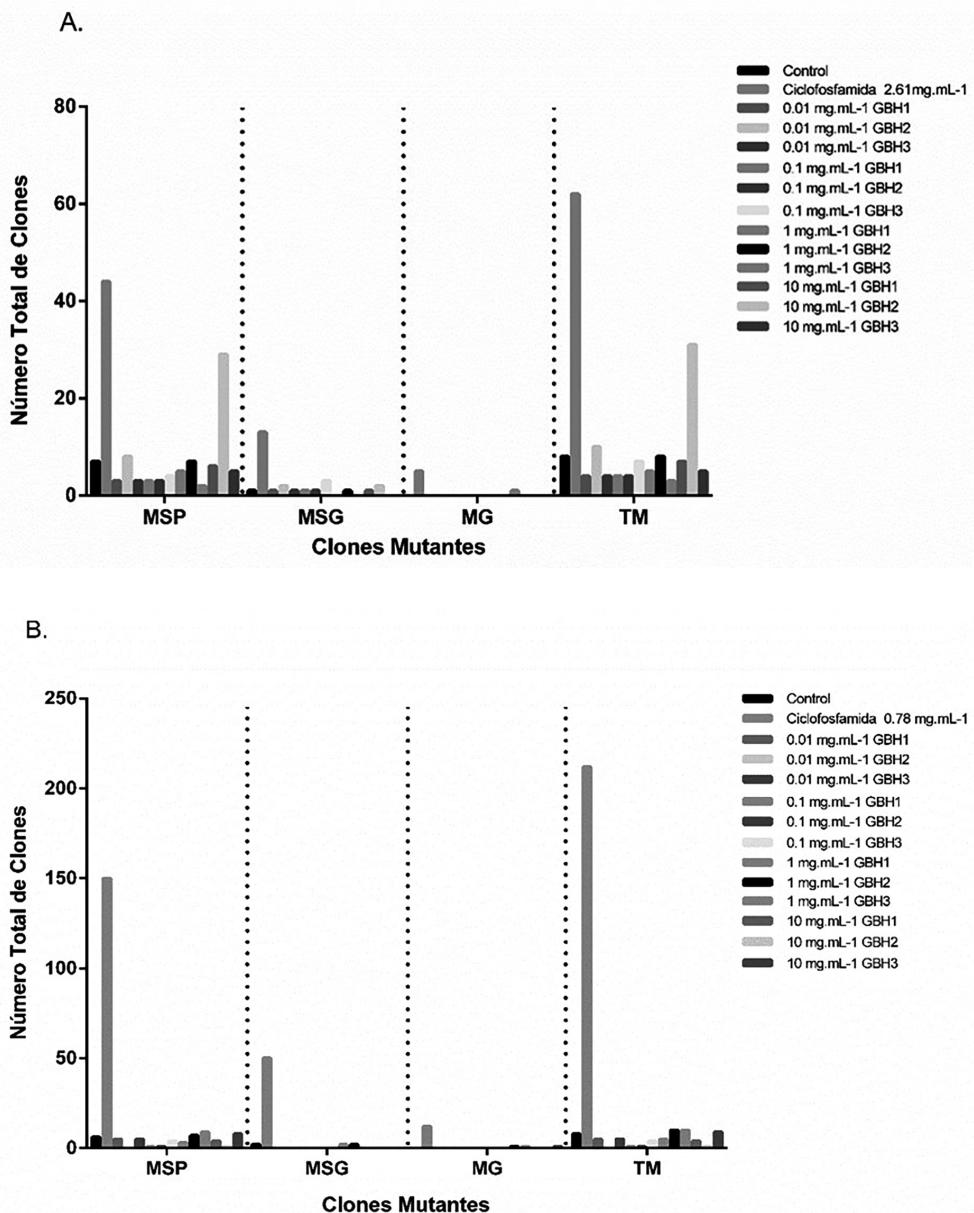
cuencias relativamente bajas para el clon mutante tipo mancha simple pequeña (MSP) comparadas con el agente mutágeno de referencia, siendo las diluciones de 0,1 mg.mL<sup>-1</sup> y 0,01 mg.mL<sup>-1</sup> las que presentaron resultados con diagnóstico negativo, donde se evidenciaron frecuencias menores a las observadas en el control negativo y el tratamiento con la Ciclofosfamida, las diluciones de 1 mg.mL<sup>-1</sup> y 10 mg.mL<sup>-1</sup> presentaron frecuencias de mutaciones similares a las observadas en el control.

Para el clon mutante de mancha simple grande (MSG) y mancha gemela (MG) se evidenciaron frecuencias similares a las halladas en el control. En cuanto al total de manchas (TM) encontradas en los individuos observados presentaron frecuencias bajas comparadas con las del control negativo y del agente mutágeno, evidenciando de esta manera un resultado negativo para las diluciones 1, 0,1, y 0,01 mg.mL<sup>-1</sup>, a su vez con la dilución de 10 mg.mL<sup>-1</sup> se observaron frecuencias estadísticamente similares a las del control.

A su vez los tratamientos con GBH2 mostraron resultados positivos para el marcador MSP a la concentración de 10 mg.mL<sup>-1</sup>, siendo esta frecuencia mayor a la del control negativo, y negativo a concentración de 0,1 mg.mL<sup>-1</sup>, para el marcador MSG y MG los resultados fueron similares a las del control; en cuanto al total de manchas se observó también que la mayor concentración (10 mg.mL<sup>-1</sup>) fue significativamente mayor.

Los tratamientos con GBH3 no evidenciaron resultados positivos para la actividad genotóxica con ninguna de las diluciones con ningún de los marcadores, la mayoría de ellas presentaron frecuencias semejantes a las del control. Los tratamientos con GBH2 y GBH3 no poseen una tasa de frecuencia significativa en comparación con la observada en el control. Sin embargo, se puede observar ligera actividad genotóxica positiva a 10 mg.mL<sup>-1</sup> con GBH2, en cuanto al total de manchas y los clones de manchas simples pequeñas (MSP).

En cuanto a los resultados encontrados en el cruce de alta bioactivación no se evidenció resultados positivos para ninguno de los tratamientos con GBH1, siendo para el clon mutante de mancha



**Figura 2:** Número total de clones mutantes encontrados en las alas de *Drosophila melanogaster*. A: Cruce estándar. B: Cruce de alta bioactivación.

simple pequeña (MSP) y el total de manchas (TM) significativamente menor en comparación con el control. Los tratamientos llevados a cabo con GBH2 no demostraron cantidades significativas de clones mutantes MSP y el total de manchas (TM) en comparación con el control. Así también los tratamientos con GBH3 demostraron frecuencias

de clones mutantes similares a los observados en los controles.

Dichos resultados se ajustan a los datos recabados por Kier & Kirkland (2013) donde la mayoría de las investigaciones llevadas a cabo con el glifosato y herbicidas a base de glifosato no evidenciaron actividades genotóxicas tanto en ensayos con orga-

nismos procariotas y eucariotas animales. También Williams *et al.* (2016) mencionan que el peso total de los resultados hallados en los estudios realizados con el glifosato y herbicidas a base de glifosato no representa un riesgo genotóxico ni carcinógeno y sugieren el cambio de la clasificación del Grupo 2A al mencionado herbicida. Igualmente, Brusick *et al.* (2016) mencionan los resultados obtenidos por un panel de expertos del análisis de las evidencias expuestas en investigaciones acerca de la actividad genotóxica del glifosato y sus formulaciones, donde los mismos concluyeron que el glifosato, las formulaciones del glifosato y el Ácido Aminometilfosfónico (AMPA) no representan un riesgo genotóxico.

El trabajo de Aguiar *et al.* (2016), quienes trataron a individuos de la especie *D. melanogaster* con una dieta a diferentes concentraciones de glifosato, demostraron una activación temprana del sistema de defensa antioxidante lo cual puede prevenir daños posteriores causados por especies reactivas de oxígeno (ROS). Así mismo, Brito Rodrigues *et al.* (2017) sometieron a larvas de *Danio rerio* (pez zebra) a tratamientos de diferentes tipos de herbicidas a base de glifosato, no encontrando efectos genotóxicos significativos. Del mismo modo, Pahwa *et al.* (2019) afirman que no hay una relación del uso del glifosato y el linfoma no Hodgkin.

Sin embargo, contrastando con los resultados encontrados en esta investigación, Kaya *et al.* (2000) mediante el test de mutación somática y de recombinación evidenciaron que el glifosato posee efectos mutagénicos a concentraciones de 2 mM (0,33 mg.mL<sup>-1</sup>), 5 mM (0,85 mg.mL<sup>-1</sup>) y 10 mM (1,69 mg.mL<sup>-1</sup>) en *Drosophila melanogaster*. Así también estudios realizados por Alvarez-Moya *et al.* (2014) realizando estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que el glifosato presenta acciones genotóxicas dependiendo del tiempo de exposición y las concentraciones empleadas en los ensayos. En nuestro estudio GBH2 indujo la formación de manchas simples pequeñas a concentración de 10 mg.mL<sup>-1</sup>, sugiriendo que a esta concentración este herbicida es genotóxico por acción directa con el ADN, coincidiendo con el estudio de Kaya *et al.*

(2000).

Estos resultados coinciden con la revisión realizada por Mensah *et al.* (2015) que indican que el glifosato y sus formulaciones comerciales poseen propiedades genotóxicas, citotóxicas y generan alteraciones endocrinas. Investigaciones como las de Schaumburg *et al.* (2016), reportaron resultados con un aumento estadísticamente significativo en el daño del ADN inducido para todas las concentraciones superiores a 100 µg del glifosato por huevo en embriones de *Salvator merianae* (lagarto tegu) y finalmente, Galin *et al.* (2019), demostraron la reducción de la vida útil de las moscas macho y el número de pupas e imago en la progenie de *D. melanogaster* de la población natural y la cepa Oregon-R usando una concentración de glifosato igual a 2.8 mg.mL<sup>-1</sup>.

## Conclusiones

Los ensayos evidenciaron que el herbicida GBH2 produce mutaciones de forma directa en los individuos de *Drosophila melanogaster* a la concentración de 10 mg.mL<sup>-1</sup>. El resto de los tratamientos con las distintas diluciones de los herbicidas a base de glifosato empleados, no presentaron efectos mutagénicos en las cruzas realizadas con cepas de *D. melanogaster*. Se observó un ligero aumento en la cantidad de clones mutantes a medida que aumenta las concentraciones, sin embargo, no fueron estadísticamente significativos.

## Agradecimientos

Expresamos nuestros sinceros agradecimientos a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FACEN), por permitirnos el uso de la infraestructura y los equipamientos necesarios y a la Dra. Gloria Rodrigo de la Universidad Mayor de San Andrés (La Paz, Bolivia) por su predisposición y ayuda en la elaboración del artículo, también agradecemos a la Lic. Talia Appleyard y la Univ. María Luisa Paniagua por el apoyo durante el desarrollo del trabajo. Este trabajo fue financiado por la Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica de la Universidad Nacional de Asunción (DGICT-

UNA), convocatoria 2014 (FACEN/03/14).

### Contribución de los autores

Los autores contribuyeron de igual manera en la elaboración de este artículo.

### Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

### Literatura citada

- Benítez-Leite, S., Macchi, M. A. & Acosta, M. (2009). Malformaciones congénitas asociadas a agrotóxicos. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 80: 237–247.
- Tomlin, C. (1994). *The Pesticide Manual: a World Compendium: Incorporating the Agrochemicals Handbook*. 10th Ed. Surrey & Cambridge: British Crop Protection Council / Royal Society of Chemistry. xxxv + 1341 pp.
- Brito Rodrigues, L., De Oliveira, R., Abe, F.R., Brito, L.B., Moura, D.S., Valadares, M.C., Grisolia, C.K., De Oliveira, D.P. & De Oliveira, G.A.R. (2017). Ecotoxicological assessment of glyphosate-based herbicides: Effects on different organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 36(7): 1755–1763.
- Brusick, D., Aardema, M., Kier, L., Kirkland, D. & Williams, G. (2016). Genotoxicity Expert Panel review: weight of evidence evaluation of the genotoxicity of glyphosate, glyphosate-based formulations, and amino-methylphosphonic acid. *Critical Reviews in Toxicology*, 46(S1): 56–74.
- de Aguiar, L.M., Figueira, F.H., Gottschalk, M.S. & da Rosa, C.E. (2016). Glyphosate-based herbicide exposure causes antioxidant defence responses in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology*, 185: 94–101.
- Frei, H., & Würgler, F.E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 203(4): 297–308.
- Galin, R.R., Aktyamova, I.F. & Pastukhova, E.I. (2019). Effect of herbicide glyphosate on *Drosophila melanogaster* fertility and lifespan. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 167(5): 663–666.
- Graf, U., Würgler, F.E., Katz, A.J., Frei, H., Juon, H., Hall, C.B. & Kale, P.G. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis*, 6(2): 153–188.
- Hao, Y., Zhang, Y., Ni, H., Gao, J., Yang, Y., Xu, W. & Tao, L. (2019). Evaluation of the cytotoxic effects of glyphosate herbicides in human liver, lung, and nerve. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 54(9): 737–744.
- Kastenbaum, M.A., & Bowman, K.O. (1970). Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 9(5): 527–549.
- Kašuba, V., Milić, M., Rozgaj, R., Kopjar, N., Mladinić, M., Žunec, S., Vrdoljak, A.L., Pavičić, I., Marjanović Čermak, A.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. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(23): 19267–19281.
- Kaya, B., Creus, A., Yanikoglu, A., Cabré, O. & Marcos, R. (2000). Use of the *Drosophila* wing spot test in the genotoxicity testing of different herbicides. *Environmental and molecular mutagenesis*, 36(1): 40–46.
- Kier L. D., & Kirkland, D. J. (2013). Review of genotoxicity studies of glyphosate and glyphosate-based formulations. *Critical Reviews in Toxicology*, 43:283–315.
- 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 and Chemical Toxicology*, 105: 93–98.
- Labrada, R., Caseley, J.C. & Parker, C. (1996). *Manejo de malezas para países en desarrollo*. Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Estudio FAO Producción y Protección Vegetal, 20: xix + 403 pp.
- Mensah, P.K., Palmer, C.G., & Odume, O.N. (2015). Ecotoxicology of Glyphosate and Glyphosate-Based Herbicides — Toxicity to Wildlife and Humans. Pp. 93–112, in Larramendi, M.L. & Soloneski, L. (Eds.). *Toxicity and Hazard of Agrochemicals*. Rijeka: InTech. viii + 160.
- Narváez Parra, E.X., Jerez Jaimes, J.H., Galvis, F., & Smith Parada, H. (2013). Efectos del glifosato en los musgos (*Chrysoblastella chilensis*, *Ectropothecium leptochaeton* y *Suntrichia bogotensis*). *Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 3(1): 77–85.
- Pahwa, M., Beane Freeman, L.E., Spinelli, J.J., Blair, A., McLaughlin, J.R., Zahm, S.H., Cantor, K.P., Weisenburger, D.D., Punan Pahwa, P.P., Dosman, J.A., Demers, P.A., & Harris, S.A. (2019). Glyphosate use and associations with non-Hodgkin lymphoma major histological sub-types: findings from the North American Pooled Project. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 45(6): 600–609.
- Pérez-Iglesias, J.M., Franco-Belussi, L., Moreno, L., Tripole, S., de Oliveira, C., & Natale, G.S. (2016). Effects of glyphosate on hepatic tissue evaluating melanomacrophages and erythrocytes responses in neotropical anuran *Leptodactylus latinasus*. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(10): 9852–9861.
- Rodrigues de Andrade, H.H.; Reguly, M.L. & Lehmann, M. (2004). Wing somatic mutation and recombination test. Pp. 389–412, in Henderson, D.S. (Ed.), *Drosophila Cytogenetics Protocols*. Totowa & New Jersey: Humana Press. xiii + 468 pp.
- Rodrigues, H.G., Penha-Silva, N., De Araujo, M.F.P., Nishijo, H., & Aversi-Ferreira, T.A. (2011). Effects of Roundup® pesticide on the stability of human erythrocyte membranes and micronuclei frequency in bone marrow cells of Swiss mice. *The Open Biology Journal*, 4: 54–59.
- Schaumburg, L.G., Siroski, P.A., Poletta, G.L., & Mudry, M.D. (2016). Genotoxicity induced by Roundup® (Glyphosate) in tegu lizard (*Salvator merianae*) embryos. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 130: 71–78.
- Wang, L., Deng, Q., Hu, H., Liu, M., Gong, Z., Zhang, S., Xu-Monette, Z.Y., Lu, Z., Young, K.H., Ma, X. & Li, Y. (2019). Glyphosate induces benign monoclonal gammopathy and promotes multiple myeloma progression in mice. *Journal of Hematology & Oncology*, 12(1): 1–11.
- International Programme on Chemical Safety. (1994). Environmental Health Criteria 159: Glyphosate. Geneva: World Health Organization. 177 pp.
- Williams, G.M., Aardema, M., Acquavella, J., Berry, S.C., Brusick, D., Burns, M.M., Viana de Camargo, J.L., Garabrant, D., Greim, H.A., Kier, L.D., Kirkland, D.J., Marsh, G., Solomon, K.R., Sorahan, T., Roberts, A. & Kirkland, D.J. (2016). A review of the carcinogenic potential of glyphosate by four independent expert panels and comparison to the IARC assessment. *Critical Reviews in Toxicology*, 46(sup. 1): 3–20.