

*Evaluación de los efectos de herbicidas en modelos animales, *rattus norvegicus*, para predecir comportamientos deletéreos en el organismo humano*

Dr. (c) José G. Riera B.

Universidad Especializada de las Américas / Sedicomvet Internacional Corp – Ciudad del Saber

E-mail: sedicomvet@gmail.com

Resumen

La toxicidad aguda se refiere al desarrollo rápido de síntomas y efectos, después de la aplicación de una dosis única relativamente alta o comúnmente, se relaciona con los daños inmediatos generados por dosis únicas suficientemente grandes. La observación de los animales se lleva a cabo después de la administración de la sustancia y dura hasta 14 días, después de los cuales los animales son sacrificados y analizados anatomopatológicamente. Para cumplir con el principio de las 3 “R” (reducción, refinamiento y reemplazo) se han aprobado tres métodos de reducción y refinamiento de la toxicidad aguda: el de la dosis fija, el de la clase tóxica aguda y el método arriba y abajo.

Este trabajo de investigación es un estudio cuantitativo, con un diseño de investigación experimental realizado con roedores (*rattus norvegicus*); adultos, (8–12 semanas de edad) y pesos comprendidos entre 250 – 300 g. El tipo de estudio es descriptivo porque describe los efectos en situaciones de exposición aguda, donde se aplicó la DL 50 descrita por la FAO de 1700 mg/kg de una atrazina comercial de venta en ciudad de Panamá, siguiendo las normas EPA OPPTS 870.1100, *Health Effects Test Guidelines*

Redes, Revista Científica de la Universidad Especializada de las Américas (2016) 1, (8): 50-59

Acute Oral Toxicity, luego de la aplicación de la misma, se observaron los animales por un lapso de 14 días, en condiciones de bioterio, (28 °C, iluminación natural, ventilación forzada, alimentación ad libitum, así como el agua) para describir el comportamiento de los mismos, en las variables peso, cambios del comportamiento, así como otro aspecto resaltante, que difiera del control, se usaron 10 animales, comprendieron 5 machos, y 5 hembras, tanto para el control, así como para los tratados.

Palabras clave: Atrazina comercial, DL 50, efectos tóxicos, herbicida Atrazina.

Abstract

Acute toxicity refers to the rapid development of symptoms and effects after an application of a single relatively high or commonly relates to the immediate damage caused by single large enough doses. The observation of animals is carried out after administration of the substance and lasts up to 14 days, after which the animals are sacrificed and examined pathologically. To comply with the principle of the 3 “R” (reduction, refinement and replacement) three methods of reduction and refinement of acute toxicity have approved: the fixed dose, the acute toxic class and method up and down.

This research is a quantitative study with a design of experimental research conducted with rodents (*Rattus norvegicus*); adult (8-12 weeks old) and weights ranging from 250-300 g. The type of study is descriptive because it describes the effects in acute exposure, where the LD 50 described by FAO 1700 mg / kg of a commercial atrazine sale in Panama City was applied, following the EPA OPPTS 870.1100 standards, Health Effects Test Guidelines Acute Oral Toxicity. After the application, the animals were observed by a period of 14 days under laboratory conditions (28 ° C, natural lighting, forced ventilation, feeding ad libitum and water) to describe the behavior in the variables such as weight, behavior changes and other highlighted aspects that differs control. Ten (10) animals were used, comprised five males and five females, for both control and for experimental group.

Keywords: Atrazine commercial, DL 50, herbicide atrazine toxic effects.

Introducción

La Atrazina (ATR) es un herbicida usado extensamente en la agricultura. En las plantas, su principal modo de acción es la inhibición de la fotosíntesis. En animales se comporta como disruptor endocrino, que puede inducir tumores mamarios, pero hay controversias en cuanto a los efectos adversos de este herbicida en la salud humana. (DeNoyelles, 1982).

Debido a su débil solubilidad en agua, la ATR permanece en las capas superiores del suelo ejerciendo de este modo su acción por largo tiempo. Es un herbicida muy persistente y puede a veces ocasionar toxicidad en varios cultivos, debido a esa característica de persistencia ambiental (Eshely, 1974; Montgomery, 1961).

Este herbicida es un compuesto relativamente móvil, que puede tener efectos nocivos sobre las comunidades de los ecosistemas acuáticos, ingresando a los mismos principalmente por escurrimiento de aguas pluviales provenientes de áreas cultivadas tratadas. O mediante aguas de escurrimiento adyacentes a campos tratados con la misma, en los cuales se han detectado concentraciones comprendidas entre 27 y 69 µg/l, hasta 1 mg/l (DeNoyelles, 1982).

En ratas adultas, medicadas con ATR al 92 %, se evidenció que el sistema endocrino y reproductivo es el blanco más importantes de acción de la ATR ; por ello los efectos adversos en dichos sistemas han sido ampliamente estudiados. Entre estos efectos se ha observado una disrupción del ciclo hormonal (Cooper y col., 2000), aumento en los niveles de hormonas (estrógenos y progesterona) (Wilhelms, y col 2006b; Cooper y col., 1996; Cooper y col., 1999).

Ratas tratadas con el herbicida a una concentración del 90 %, estando preñadas demostraron: reabsorción fetal, abortos, disminución del peso corporal fetal, osificación incompleta, así como alteración en el desarrollo del sistema nervioso. En otro estudio Peruzovi (1995) reportó prostatitis en machos descendientes, mientras que Šimic (1994) Stevens, y col (1998) hacen mención en la pérdida de peso corporal de moderada a severa, daño cardíaco y renal, así como la disminución de los niveles de eritrocitos, hemoglobina y hematocrito, alteraciones de enzimas hepáticas y disminución del peso del hígado. Santa María y col. en (1987) describe hallazgos importantes en el aumento del peso de la glándula adrenal y en el tamaño de la hipófisis, Babic-Gojmerac (1989); Šimi (1994) describen que encontraron daño histológico en la tiroides, cambios en los niveles de hormonas tiroideas, mientras que Kornilovskaya (1996) , hacen hallazgos de alteración en la actividad cerebral y en la respuesta inmune.

Es importante mencionar que Lu, K.H., y col. (1979), en sus estudios describen disminución del peso del timo, ovarios y útero, así como Eldridge (1994) en su intervención reporta aumento en la incidencia de tumores en la glándula mamaria, hipófisis y adenocarcinoma uterino. Igualmente, se ha evaluado el potencial genotípico

de la ATR en diferentes sistemas in vivo e in vitro, tales como rupturas de cadena simple del ADN, formación de micronúcleos, mutaciones, aneuploidías, recombinación mitótica y aberraciones cromosómicas (Murnick y col (1977); Adler y col., (1980); Pino y col., (1988); Meisner y col. (1992 y 1993); Tripathy (1993); Gebel y col., (1997).

Tanto Robin, (2014) y Tomlin (1994), coinciden que la DL 50 para ratas (*rattus norvegicus*) es de 1700 mg/kg, también menciona que los animales sobrevivientes al estudio y sacrificados al final del ensayo, se practicaron solamente estudios macroscópicos, de órganos, tales como hígado, bazo, riñón, corazón, pulmón; adicionalmente se realizan estudios de microscopía óptica, usando la molécula a una pureza 98 % según Willingham (2004).

Según la Universidad de Oregón (1996) la mayor probabilidad de exposición humana a la Atrazina está asociada a su producción y su uso agrícola. El resultado de un estudio realizado en Estados Unidos mostró que los encargados de aplicar Atrazina, experimentan exposiciones detectables al realizar una sola aplicación; esta exposición se produce a través de la absorción dérmica, de la inhalación, o de ambas según Perry (2000), y National Toxicology Program (1991). En forma adicional, el público en general puede sufrir exposición al producto químico, a través del consumo de agua potable contaminada (Pereira, W. & Rostad, 1990).

El objetivo de la investigación es evaluar los cambios tóxicos, mediante alteración anatomopatológica, en corazón, hígado, bazo, páncreas, pulmones, riñones, y cerebro, en ratas medicadas con Atrazina vía oral a una dosis de 1.700 mg/kg, su correlación con el humano y su posible impacto en la salud pública.

Hasta el momento se ha realizado una primera fase en al cual se contesta a la siguiente **hipótesis:** Los plaguicidas tienen efectos tóxicos sobre las células animales, por lo que se espera encontrar alteraciones importantes en los diversos órganos sometidos a estudio, al hacer comparación con control de roedores.

Marco metodológico

Es una investigación con un diseño experimental pretest-postest, con varias mediciones durante el proceso descriptivo, porque detalla los efectos en situaciones de exposición aguda, mediante sonda esofágica, y un ensayo clínico controlado aleatorizado (1 dosis a 10 animales y un grupo control de 10 (5 machos y 5 hembras), a los cuales no se les administrará ningún compuesto.

Se seguirán las normas de la oficina de protección ambiental de EUA (EPA) Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.1100 Acute Oral Toxicity.

Resultados

La evaluación de la DL 50, aplicada a los roedores vía oral, y con un tiempo de observación de 14 días, a una dosis de 1.700 mg/kg, se apreció disminución considerable de peso, y sintomatología nerviosa, ocasionados posiblemente no tanto por la molécula Atrazina, si no más bien por el vehículo en el cual la misma es disuelta, que es un hidrocarburo, ya que la ATR por sí misma presenta poca solubilidad en agua, y necesariamente debe disolverse en un disolvente no polar, ya que los hallazgos de las histopatologías, no coinciden con las alteraciones, enunciadas por la EPA y la OMS, en la evaluación preliminar de la molécula, antes de su salida al mercado; al estudio de microscopia óptica de las muestras de tejidos, incluidos en parafina sólida se evidenció a nivel del corazón: focos hemorrágicos frecuentes con zonas de microinfartos agudos y subagudos, con hemosiderosis, fragmentación de las estriaciones transversales de las microfibrilas y eosinofilia Degeneración de Zenker (Figura 1).

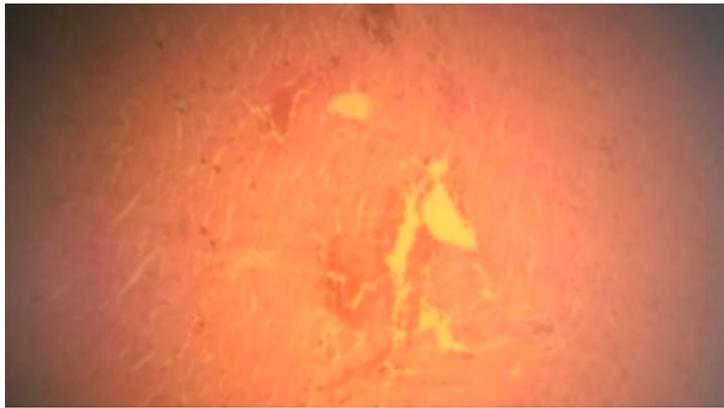


Figura 1

PULMÓN Se observa inflamación moderada a severa lobulillar (Fig.2a,b,c) con abundante exudado inflamatorio peribronquiolar y alveolar, con edema y hemorragias abundantes.



Figura 2, a,b, c

RIÑÓN : Se aprecia microtrombosis en asas glomerulares focal y hemorragias segmentales córtico – medulares (Figura 3a,b). Hay hemorragias en la grasa mesentérica perirenal (Figura 3c). Se observan cilindros hialinos y hemoglobinuricos en túbulos distales y colectores hacia la medular (Figura 3 a,b).



Figura 3, a,b, c

BAZO : Se aprecia hiperplasia linfoides centro folicular y con agotamiento perifolicular o zona T –dependiente (Figura 4).



Figura 4

CEREBRO – CEREBELO Se aprecia inflamación y hemorragias focales en Meninges con zonas adherentes y zonas de vacuolización y degeneración Axonal o Degeneración Walleriana (Figura 5).



Figura 5

HÍGADO Se encontraron focos hemorrágicos de necrosis periacinar aguda y focos hemorrágicos con hemosiderosis (Figura 6 a,b). Hay abundante agregación plaquetaria intrasinusoidal.

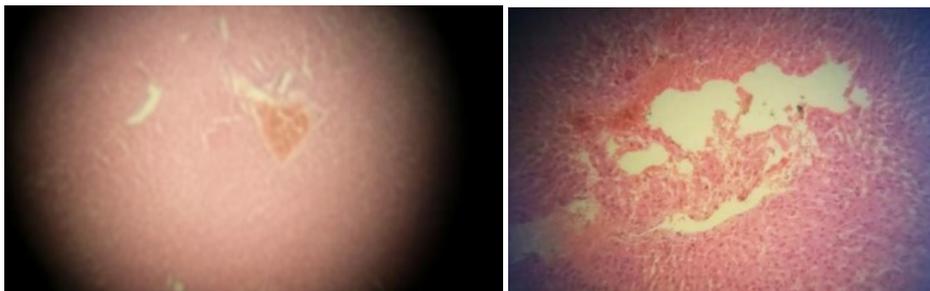


Figura 6 a,b

Conclusiones

El presente estudio permitió conocer las alteraciones, provocadas por la Atrazina formulada, en las ratas sometidas a la DL 50%, esto contrasta con los resultados arrojados por la FAO, y la EPA, pues en la mismas sólo se evalúan, los efectos basados en la molécula de ATR, al 90 %, grado técnico o grado analítico, mientras que nuestro estudio, evalúa la Atrazina formulada, tal cual como se vende en el mercado, a los usuarios, la cual tiene como vehículo de disolución un hidrocarburo, el cual genera un abanico de lesiones, que no están contempladas en investigaciones, llevadas a cabo para el registro de los productos, ante las distintas entidades, legales previas a la comercialización del mismo, en los países que se pretenda distribuir.

Las lesiones observadas parecen genuinas de la acción de los productos indicados y sus diagnósticos, cónsonos con la acción tóxica que pueden inducir dichos productos en las dosis retadas.

Es de considerar que los cambios pulmonares, podrían asociarse a dichos productos, sin olvidar que muchos ratones de bioensayos son portadores sanos y desarrollan cambios subclínicos variable de peribronquiolitis y bronquitis asociada a ***Mycoplasma pulmonis*** y ***Mycoplasma spp.***, que inducen el efecto de “ Rolling Mouse “ como el observado clínicamente en este experimento.

Los daños antes mencionados, es posible, que sucedan en organismos humanos, que ingieran la Atrazina a dosis similares, aunque esto sólo sucedería, en ingesta de personas que lo ingieren para suicidarse, ya que los niveles de residuos, tienden a ser mucho menores, a niveles de microgramos/ litro de agua, o microgramos/kg de peso de alimento, pero sería interesante evaluar los mismos en modelos animales, siguiendo los protocolos internacionales, para el tema en cuestión.

Referencias bibliográficas

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). (2001). **Toxicological profile for lindane**. Public Health Service.. Atlanta, GE, USA: U.S. Department of Health and Human Services.

Adler, I., (1980). **A review of the coordinated research effort on the comparison of test systems for the detection of mutagenic effects, sponsored by the EEC**. Mutat. Res., 74, 77–93.

Babic-Gojmerac, T., Kniewald, Z. & Kniewald, J. (1989) **Testosterone metabolism in neuroendocrine organs in male rats under atrazine and deethylatrazine influence**. J. Steroid Biochem., 33, 141–146.

Bester K, Huhnerfuss H. (1993). **Triazines in the Baltic and North Sea**. Mar. Pollut. Bull. 26: 423-427.

Cooper, R, Goldman, J., Stoker, T.(1999). **Neuroendocrine and reproductive effects of contemporary-use pesticides**. Toxicol and Health 15:26-36.

Cooper, R, Stoker, T., Goldman, J., Parrish, M., Tyrey, L. (1996). **Effect of atrazine on ovarian function in the rat**. Reproductive Toxicology 10:257-264.

Cooper, R, Stoker, T., Tyrey, L., Goldman, J, McElroy, W.(2000). **Atrazine disrupts the hypothalamic control of pituitary-ovarian function**. Toxicol Sci 53:297-307.

DeNoyelles, F.,Kettle,Sinn.D (1982). **The responses of plankton communities in experimental ponds to atrazine, the most heavily used pesticide in the United States**. Ecology 63: 1285-1293. En: Eisler, R. 2000. Atrazine (chapter 11). Handbook of chemical risk assessment. Boca Raton, Florida: Lewis Publishers.

Eshely, Y, Kovacs, M, Rubin, B. (1974). **Differential tolerance of *Pisum sativa* to Prometrina and terbutrim**. Pest Biochem. Physiol. 5:295.

Gebel, T., Kevekorde, S., Pav, K., Edenharder, R. & Dunkelberg, H. (1997) **In vivo genotoxicity of selected herbicides in the mouse bone-marrow micronucleus test**. Arch. Toxicol., 71, 193–197.

Kornilovskaya I,, Gorelaya M., Usenko V., Gerbilsky L., Berezin V.,(1996) **Histological studies of atrazine toxicity on the thyroid gland in rats**. Biomed Environ Sci. Mar;9(1):60-6.

Lu, K. Hopper, B. Vargo, T. & Yen, S.. (1979). **Chronological changes in sex steroid, gonadotropin and prolactin secretion in aging female rats displaying different reproductive states**. Biol. Reprod., 21, 193–203.

Marc A., Hareth M, Muthuramanan. R, and Itzick V. (2007). **Atrazine is an Immune disruptor in adult northern Leopard frogs (*Rana pipeiens*)**. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 26, No. 1, pp. 80–84.

Meisner, L. Belluck, D. & Roloff, B. (1992). **Cytogenetic effects of alachlor and/or atrazine in vivo and in vitro**. Environ. mol. Mutag., 19, 77–82.

Meisner, L., Roloff, B., & Belluck, D., (1993). **In vitro effects of N-nitrosoatrazine on chromosome breakage**. Arch. environ. Contam. Toxicol., 24, 108–112.

Montgomery, M, Freed V., (1961) **The uptake translocation and metabolism of simazine and atrazine by corn plant**. Weeds 9:231.

Murnik, M. & Nash, C.,(1977). **Mutagenicity of the triazine herbicides atrazine, cyanazine, and simazine in *Drosophila melanogaster***. J. Toxicol. environ. Health, 3, 691–697.

National Toxicology Program (1991). **NTP Chemical Repository Data Sheet: Atrazine**, Research Triangle Park, NC.

Oregon State University (1996) **EXTOXNET (Extension Toxicology Network/ Pesticide Information Profiles, Atrazine**: consultado en mayo 2016.<http://ace.ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/atrazine.htm>

Pellizzetti E, Maurino V, Minero C, Carlin V, Tosato M, Pramauro E, Zerbinati O. (1990). **Photocatalytic degradation of atrazine and other s-triazine herbicides**. Environ. Sci. Technol. 24: 1559-1565.

Pereira, W. & Rostad, C., (1990). **Occurrence, distributions and transport of herbicides and their degradation products in the lower Mississippi River and its tributaries**. Environ. Sci. Technol., 24, 1400–1406.

Peruzovic, M., Kniewald, J., Capkun, V. & Milkovic, K. (1995). **Effect of atrazine ingested prior to mating on rat females and their offspring**. Acta physiol. hung., 83, 79–89.

Pino, A., Muara, A. & Grillo, P. (1988). **DNA damage in stomach, kidney, liver and lung of rats treated with atrazine**. Mutat. Res., 209, 145–147.

Redondo M, Ruiz M, Font G, Boluda R. (1997). **Dissipation and distribution of atrazine, simazine, chlorpyrifos, and tetradifon residues in citrus orchard soil**. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 32: 346-352.

Mesnage, R.,Defarge,N., Gilles,E., (2014). revisado en mayo 2016:<http://dx.doi.org/10.1155/2014/179691>.

Santa Maria, C., Moreno, J. & Lopez-Campos, J., (1987). **Hepatotoxicity induced by the herbicide atrazine, in the rat.** J. appl. Toxicol., 7, 373–378.

Seybold C, Mersie W, McName C, Tierney D. (1999). **Release of atrazine (14C) from two undistributed submerged sediments over a two-year period.** J. Agric. Food Chem. 47:2156-2162.

Šimic, B., Kniewald, J. & Kniewald, Z. (1994). **Effect of atrazine on reproductive performance in the rat.** J. appl. Toxicol., 14, 401–404.

Stevens, J., Breckenridge, C., Wetzell, L., Thakur, A., Liu, C., Werner, C., Luempert, L., & Eldridge, J., (1998). **Risk characterization for atrazine: Oncogenicity profile.** J. Toxicol environ Health, 55, 101–141.

Tomlin, C., ed. (1994). **The Pesticide Manual, 10th Ed.**, Thornton Heath, British Crop Protection Council/Cambridge, The Royal Society of Chemistry, pp. 51–52.

Tripathy, N., Routray, P., Sahu, G. & Anandkumar, A., (1993). **Atrazine, a triazine herbicide, is genotoxic in the *Drosophila* somatic and germ line cells.** Biol. zent. Bl., 112, 312–318.

Wilhelms, K., Cutler, S, Proudman, J., Carsia, R., Anderson, L., Scanes, C. (2006). **Lack of effects of atrazine on estrogen-responsive organs and circulating hormone concentrations in sexually immature female Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*).** Chemosphere 65:674-81.

Willingham, E. (2004). **Endocrine-disrupting compounds and mixtures: unexpected dose-response.** Arch Environ Contam Toxicol 46:265-9.