

**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS TÓXICOS,
CITOTÓXICOS/GENOTÓXICOS *IN VIVO*
DEL ROUNDUP (GLIFOSATO) MEDIANTE LA PRUEBA
DE LETALES DOMINANTES EN RATÓN (*Mus musculus*)**

**CARLOS ANDRÉS CHICANGANA BURBANO
NASLY FARLEY URIBE PIAMBA**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2006**

**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS TÓXICOS,
CITOTÓXICOS/GENOTÓXICOS *IN VIVO*
DEL ROUNDUP (GLIFOSATO) MEDIANTE LA PRUEBA
DE LETALES DOMINANTES EN RATÓN (*Mus musculus*)**

**CARLOS ANDRÉS CHICANGANA BURBANO
NASLY FARLEY URIBE PIAMBA**

Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar al título de Biólogos

**Directora
Mg. LUZ STELLA HOYOS GIRALDO**

**Asesor
Mg. SILVIO MARINO CARVAJAL VARONA**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2006**

Nota de aceptación:

Directora :

Mg. LUZ STELLA HOYOS GIRALDO

Jurado:

PH.D NOHELIA CAJAS SALAZAR

Jurado:

MG. EDNA LOURDES OROZCO CALAMBAS

Popayán, 26 de Abril del 2006.

A **Dios** por rodearme con los mejores instrumentos
para hacer mis sueños realidad.
A mi familia especialmente a
mi linda abuelita, Soledad Ruiz,
a mi mamá Nidia, hermanos, sobrinos...
A el amor de mi vida, Néstor Soso,
A cada uno de ustedes infinitas gracias porque con su cariño
y apoyo incondicional hicieron parte esencial
de esta meta alcanzada.
Por todas las horas que no compartimos
durante la realización de este estudio.
Con mucho, mucho Amor... *Nashy*

A Dios por guiar mi camino en la vida
A mi familia, especialmente a mi padre José Jenner Chicangana,
A mi madre Ilma Isabel Burbano y a mis hermanos,
quienes con su amor incondicional me apoyaron
para alcanzar mis sueños,
A mis amigos, quienes siempre están conmigo
A todos con mucho amor.
Andrés

AGRADECIMIENTOS

A Dios por rodearnos con los mejores instrumentos para empezar, perseverar y culminar con éxito esta etapa de nuestra vida.

A nuestros padres, abuelos y hermanos, por su amor, por brindarnos lo mejor, pensando siempre en nuestra felicidad.

A nuestros familiares y amigos, que con su inmenso cariño, energía, alegría, apoyo y comprensión hicieron que esta experiencia fuera mucho más agradable.

A nuestros queridos profesores que nos acompañaron en algún momento de nuestra carrera. Muy especialmente a: Mg. Luz Stella Hoyos Giraldo, por brindarnos con entusiasmo su valiosa experiencia, conocimientos y tiempo, fortaleciendo nuestra formación personal, académica y profesional, a ella nuestra admiración y afecto. Al Mg. Silvio Marino Carvajal Varona por sus importantes y significativos aportes a nuestro trabajo de grado.

A las diversas instituciones, cuyos significantes aportes fueron claves para el desarrollo de nuestro estudio: Laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética; Dr. Fabio Gonzáles, Veterinaria de Colombia (VECOL); Dr. Santiago Ayerve, Director Museo de Historia Natural; Colciencias, por el apoyo financiero.

A nuestros compañeros de estudio del programa de Biología, por sus especiales formas de hacernos sentir su cariño y apoyo, especialmente a: Adriana Arteaga, Alejandro Martínez, Carmen Valdivieso, Claudia Sanjuán, Daicy Plazas, Sandra Ordóñez, Diana Muñoz, Heidy Navia, Jhon Jairo Viveros, Lorena Urbano, Nancy Guerrero, Nubia Maca, Roger Figueroa, Soledad Ordóñez y demás compañeros del énfasis de Toxicología Genética y Citogenética.

CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	14
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS	16
2. JUSTIFICACIÓN	18
3 OBJETIVOS	20
3.1 OBJETIVO GENERAL	20
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	20
4. ANTECEDENTES	21
5. MARCO TEORICO	35
5.1 LOS PLAGUICIDAS	35
5.1.1 Grupos de Plaguicidas	36
5.1.2 Clasificación de los Plaguicidas	36
5.2 ACTIVACIÓN METABÓLICA	38
5.3 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS	39
5.4 MUTACIÓN	40
5.5 PRUEBAS BIOLÓGICAS	41
5.5.1 Pruebas de Toxicidad	41
5.5.2 Pruebas Citotóxicas y Genotóxicas	41
5.5.2.1 Prueba de Letales Dominantes en machos	41

5.6 ESPERMATOGÉNESIS EN RATONES	43
6. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL	46
6.1 QUÍMICOS	46
6.2 ANIMALES	46
6.3 TRATAMIENTO	46
6.4 GRUPOS DE ESTUDIO	46
6.4.1 Dosis Letal Media (DL ₅₀)	47
6.4.2 Dosis Máxima Tolerada (DMT)	48
6.4.3 Selección de las Dosis Experimentales	48
6.5 PRUEBA DE LETALES DOMINANTES EN MACHOS	48
6.5.1 Grupos de Estudio	48
6.5.2 Protocolo de Letales Dominantes en Espermátidas de Ratón <i>Mus musculus</i>	49
6.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	50
7. RESULTADOS	51
7.1 ANIMALES	51
7.2 PRUEBA DE TOXICIDAD	51
7.2.1 Dosis Letal Cincuenta (DL ₅₀)	51
7.2.2 Dosis Máxima Tolerada (DMT)	52
7.3 SELECCIÓN DE DOSIS EXPERIMENTALES	52
7.4 PRUEBA LETALES DOMINANTES (LD)	53
7.4.1 Registro de letalidad dominante post-implantación	53
8. DISCUSIÓN	61

9. CONCLUSIONES	70
10. RECOMENDACIONES	71
BIBLIOGRAFÍA	72
ANEXOS	88

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Estudios que utilizaron pruebas que evalúan efectos de diferentes sustancias en células germinales de ratones o ratas (1.982-2004)	30
Cuadro 2. Estudios que evaluaron el Roundup o Glifosato en diferentes sistemas y con diferentes pruebas (en orden cronológico, 1.993-2005)	32
Cuadro 3. Resumen de los resultados de Genotóxicidad del Glifosato, Roundup y otros. Williams, <i>et al.</i> (2000)	33
Cuadro 4. Variables Analizadas	50

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Diseño experimental para DL ₅₀ y DMT	48
Tabla 2. Diseño experimental para la prueba de Letales Dominantes	49
Tabla 3. Porcentaje de Letalidad Inducida a diferentes concentraciones del Roundup para determinar la DL ₅₀	52
Tabla 4. Resultados Dosis Letal Cincuenta, Dosis Máxima Tolerada y Dosis Experimentales seleccionadas	52
Tabla 5. Porcentaje de fertilidad inducida a diferentes dosis de “Roundup”	56
Tabla 6. Índice promedio (\bar{x}) de Moles (M), Embriones Muertos (EM) y Mortalidad Total (MT), con su respectivo error estándar (EE) y significancia estadística (P)	56

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Proceso de Espermatogénesis en Ratón	45
Figura 2. Tratamiento de los animales mediante la técnica de gavage	47
Figura 3. Protocolo experimental para la prueba de Letales Dominantes en espermátidas de ratón <i>Mus musculus</i> .	49
Figura 4. Embriones vivos, tratamiento grupo control negativo (agua de grifo)	53
Figura 5. Muertes tempranas post-implantación (Moles) inducidas por el plaguicida “Roundup” a dosis baja, en espermátida de ratón <i>Mus musculus</i>	53
Figura 6. Muertes tardías post-implantación, inducidas por el plaguicida “Roundup” a dosis media, en espermátida de ratón <i>Mus musculus</i>	54
Figura 7. Muertes tempranas post-implantación (Moles), inducidas por el plaguicida “Roundup” a dosis alta, en espermátida de ratón <i>Mus musculus</i>	54
Figura 8. Muertes tempranas post-implantación (Moles), inducidas por la Ciclofosfamida (control positivo) sobre espermátida de ratón <i>Mus musculus</i>	55
Figura 9. Índice de Moles por efecto del plaguicida “Roundup” sobre espermátidas de ratones tratados	58
Figura 10. Índice de Embriones Muertos por efecto del plaguicida “Roundup” sobre espermátidas de ratones tratados	59
Figura 11. Índice de Mortalidad Total (Embriones muertos + moles) por efecto del plaguicida “Roundup” sobre espermátidas de ratones tratados	60

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A Formato para Registro de Datos, Prueba DL ₅₀	89
Anexo B Formato para Registro de Datos, Prueba de LD	90
Anexo C Información Básica de los Individuos Experimentales Utilizados en el Trabajo de Investigación	91
Anexo D Información Básica del Alimento Suministrado a los Ratones <i>Mus musculus</i>	91
Anexo E Representación Gráfica de la Espermatogénesis en Ratón	92
Anexo F Representación gráfica de la Espermatogénesis en Humano	92

INTRODUCCIÓN

El uso masivo de plaguicidas a nivel mundial, es un problema preocupante que afecta la salud pública. Colombia un país en desarrollo, basa principalmente su economía en la agricultura, sector en el que por los requerimientos de producción, se utilizan grandes cantidades de plaguicidas como el Roundup, para la eliminación de malezas de cultivos de caña de azúcar, yuca, plátano, entre otros. Sumado a lo anterior, debido a la problemática actual de los cultivos ilícitos, sobre todo en la región sur-occidental del país (departamentos del Cauca, Nariño y Putumayo), el uso del Roundup es cada vez mayor, ya que este es el plaguicida que se utiliza para la erradicación de estos cultivos. Por lo anterior, Colombia ocupa el tercer lugar en Latinoamérica en el uso de plaguicidas, después de Brasil y México (Zarate *et al*, 1997).

En Colombia y en especial en el Cauca, hay escasez de estudios sobre los efectos tóxicos del herbicida Roundup, lo que hace desconocer en realidad a que riesgos se enfrenta la población, teniendo en cuenta la disponibilidad libre de esta sustancia. El Roundup pertenece al grupo de los plaguicidas organofosforados que además, de tener como compuesto activo el glifosato, contiene otros compuestos inertes como el POEA, entre otros, cuya función es aumentar su eficacia; la exposición a estos últimos suele ser más tóxica que la de los compuestos activos. Para evaluar los efectos tóxicos, citotóxicos/genotóxicos, que conlleva la utilización del Roundup, se realizó el presente estudio.

Se han reportado efectos adversos en la salud humana a corto plazo, por el Roundup, tanto por aspersiones aéreas como por la manipulación inadecuada en la agricultura (Industria Monsanto, 2002). Además, es bien conocido que el Roundup ocasiona desequilibrio ambiental en los diferentes ecosistemas y extinción de diferentes especies. Los efectos a largo plazo como los mutagénicos, carcinogénicos, teratogénicos, no han sido lo suficientemente estudiados en células germinales y somáticas. Los agentes genotóxicos en células germinales inducen problemas reproductivos, abortos, malformaciones y en células somáticas inducen problemas de salud como el cáncer (Wit and Bishop, 1996), por lo tanto es prioritario evaluar los efectos genotóxicos de los plaguicidas como el Roundup, en células germinales, para predecir los potenciales riesgos de la salud, en las futuras generaciones o el posible desarrollo de cáncer de la población expuesta; contribuyendo así con los resultados, a la literatura científica, en cuanto a los efectos genotóxicos del Roundup.

Para desarrollar la Prueba de Letales Dominantes en ratones *Mus musculus*, se inició determinando la Dosis Letal Cincuenta (DL₅₀), la cual se tomó como referencia para seleccionar las dosis alta, media y baja del grupo experimental. La prueba de Letales Dominantes es muy relevante porque permite evaluar las sustancias que pueden interactuar

con las células germinales y por lo tanto determinar si las sustancias que se evalúan, pueden o no afectar a las generaciones futuras (EPA, 1998). Se seleccionó el estadio de espermátidas para evaluar el efecto citotóxico/genotóxico. Se conformaron 3 grupos de estudio con los ratones: El grupo control negativo, tratados con agua destilada; el grupo experimental: dosis baja, media, alta, tratados con “Roundup” y el grupo control positivo, tratados con Ciclofosfamida, sustancia altamente mutagénica. (Ehling, 1977; Dean *et al*, 1981; EPA, 1998).

La realización de estudios como este, son pertinentes y prioritarios, porque se enmarcan dentro de uno de los problemas nacionales, en la salud pública, como es el de la toxicidad de los organismos y el deterioro de la calidad de vida de los individuos expuestos y en sus futuras generaciones. Además, este estudio pretende que las entidades gubernamentales, que vigilan y controlan el uso extensivo de los plaguicidas, la salud y el ambiente se motiven a apoyar los programas pendientes y a controlar la exposición del ecosistema a sustancias que lo afectan negativamente, cuidando de esta manera las poblaciones presentes y futuras. El objetivo general del estudio fue: Evaluar los efectos Tóxicos, Citotóxicos/Genotóxicos del plaguicida “Roundup” en células germinales (en estadio de espermátidas) de ratones *Mus musculus* mediante la prueba de Letales Dominantes. Los resultados son de gran interés para la comunidad científica y para la sociedad en general, porque mediante esta prueba se evaluó la habilidad del Roundup de interactuar, alterar el material genético y su potencial para inducir problemas de salud.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Mundialmente, los plaguicidas son usados indiscriminadamente. Debido a la falta de educación, información sobre sus potenciales efectos genotóxicos y del desarrollo de una cultura preventiva, su empleo es inadecuado; lo cual genera a la población expuesta, directa e indirectamente, efectos para la salud, no solo efectos tóxicos a corto plazo, sino también efectos a largo plazo (mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos) en células germinales, las cuales pueden ocasionar problemas genéticos transmisibles, expresados en malformaciones, enfermedades congénitas y/o efectos dominantes no transmisibles como abortos espontáneos y problemas de esterilidad (Witt and Bishop, 1996). En Colombia, especialmente en la región sur-occidental, se utilizan gran cantidad de diferentes plaguicidas con el objetivo de obtener en sus cosechas mas y mejores productos, sin tener en cuenta los efectos secundarios que a corto y largo plazo perjudican no solo sus cultivos sino también su salud, entre los plaguicidas mas usados se encuentra el Roundup, utilizado también por el estado, para la erradicación de cultivos ilícitos mediante fumigaciones aéreas, desde el año 1986 (Mattié, 2003; Ferrer, 2003) e implementado en el Plan Nacional de Desarrollo (2002-2006).

El Roundup es una sustancia de acción sistémica y no selectivo, de amplio espectro (Smith and Oehme, 1992) fabricado por Monsanto, es un plaguicida que pertenece al grupo de los organofosforados, sustancias genotóxicas y potencialmente carcinogénicas (IARC, 1987), ha sido evaluado en animales para toxicidad aguda, crónica y reproductiva, como embriogénesis y/o teratogénesis. Los estudios agudos han reportado que los productos que contienen glifosato y el surfactante polioxietileneamina (POEA) pueden ser más tóxicos que el mismo glifosato puro (Adam *et al*, 1997), esto hace que el Roundup que contiene estas dos sustancias se convierta en una forma más tóxica por los efectos sinérgicos, aditivos y potenciadores. (Gold and Ames, 1990).

El uso de Roundup para la erradicación de cultivos ilícitos mediante fumigaciones aéreas se ve más acentuado y se ha aprobado su uso sin que se conozcan estudios previos sobre posibles efectos en la salud humana, mucho menos en ecosistemas tropicales (Mattié, 2003; Ferrer, 2003). Lo anterior genera una problemática social, porque al realizar fumigaciones aéreas, se contaminan indiscriminadamente ecosistemas terrestres, aéreos, acuáticos, ocasionando destrucción de cultivos de alimentos básicos, de organismos que en ellos habitan y efectos adversos a la salud de las personas tanto a corto plazo, problemas de toxicidad (Personería Municipio Valle del Guamuéz, 2001), como a largo plazo, efectos genotóxicos, que permiten o inducen procesos de mutagénesis, carcinogénesis, teratogénesis y/o problemas reproductivos (Maldonado, 2003; Band *et al*, 1990). Por lo tanto, es prioritario evaluar *in vivo* los efectos tóxicos, citotóxicos y genotóxicos del Roundup (disponible en el mercado

con un acceso indiscriminado y poco controlado) para extrapolar los resultados y predecir el riesgo en los humanos.

La gran mayoría de la población expuesta a este plaguicida por ser de bajo nivel educativo, no visualiza la gran dimensión del problema, ignorando los efectos dañinos que el Roundup puede generar en los seres humanos. El mayor problema radica en que las autoridades gubernamentales desconocen los efectos a largo plazo (mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos y/o problemas reproductivos) que pueden producir los plaguicidas cuando son absorbidos (a través de vía oral, cutánea, respiratoria) y que una vez dentro del organismo son biotransformados en metabolitos activos e inactivos que al interactuar con el material genético causan múltiples daños tanto a células somáticas como en células germinales, que al no ser reparados correctamente, ocasionan mutaciones que pueden originar malformaciones congénitas, abortos, problemas de esterilidad, graves problemas de salud como el cáncer, entre otros (Wit and Bishop, 1996).

Este estudio respondió a las preguntas: ¿El Roundup tiene efecto tóxico causando daño orgánico o la muerte en los organismos tratados? ¿El Roundup tiene efecto citotóxico/genotóxico provocando daño en células germinales, en estadio de espermátida (espermatogénesis) de ratón *Mus musculus*, expresándose en la descendencia luego de ser apareados con hembras vírgenes no expuestas, provocando la muerte de los embriones? Si el Roundup es Citotóxico/Genotóxico se espera que afecte las células germinales en estado de espermátidas de ratón *Mus musculus*, expresándose en la descendencia luego de ser apareados con hembras vírgenes no expuestas, provocando la muerte de los embriones.

2. JUSTIFICACIÓN

En Colombia, uno de los países donde más se utiliza el plaguicida Roundup, para usos agrícolas y en forma extensiva para la erradicación de cultivos ilícitos, se conocen de forma deficiente los efectos tóxicos a corto plazo y se desconocen los efectos a largo plazo como los mutagénicos, cancerogénicos y teratogénicos. En la bibliografía consultada, la mayoría de estudios se han realizado en células somáticas, también se encontraron estudios de evaluación a nivel tóxico, citotóxico/genotóxico del Roundup, que reportan resultados tanto positivos como negativos (ver cuadro 2 y 3), lo que genera la polémica de los verdaderos efectos del Roundup en la salud de la personas.

En Colombia y sobre todo en el Cauca son muy pocos los estudios sobre los efectos del plaguicida Roundup, teniendo en cuenta la disponibilidad libre de esta sustancia, se desconoce a que riesgos se enfrenta la comunidad. El objetivo de este estudio es, evaluar los efectos tóxicos, citotóxicos/genotóxicos del plaguicida “Roundup” en células germinales (en estadio de espermátidas) de ratones *Mus musculus*, mediante la prueba de Letales Dominantes. Los roedores, especialmente los ratones han sido empleados desde hace muchos años, para la experimentación y evaluación de los efectos de sustancias en los organismos, determinando su actividad mutagénica, carcinogénica y teratogénica. Este sistema es de gran importancia por la relación que existe con el hombre. Pertenecer a la misma *clase mammalian* y tener un metabolismo similar, permite que los resultados se puedan extrapolar a humanos, de esta manera, si se encuentran resultados positivos en Letales Dominantes significa un riesgo potencial para las células humanas (Rhomberg *et al*, 1990). Otras características de los ratones, que son de gran utilidad e importancia, para realizar esta clase de estudios son: su alta frecuencia de apareamiento, rápido desarrollo, cortos períodos de gestación (17-21 días) y alto número de implantes (EPA, 1998).

La mayoría de estudios para evaluar efectos citotóxicos y genotóxicos *in vitro* e *in vivo* se han realizado empleando células somáticas, luego, es importante y prioritario realizar estudios que permitan predecir los riesgos potenciales de salud no solo en el individuo expuesto, sino también en las futuras generaciones.

La prueba de Letales Dominantes, permite evaluar la actividad citotóxica/genotóxica de xenobióticos. Esta prueba identifica la letalidad dominante, en el cigoto, durante el proceso de desarrollo. Suministra evidencia de daños inducidos en cualquiera de los estadios celulares de la espermatogénesis (en el presente estudio se evaluó el estadio de espermátidas), producidos por la pérdida de cromosomas enteros o de fragmentos resultantes de alteraciones estructurales y/o anomalías en el número de cromosomas y por la posible no disyunción de estos. La existencia de estudios de mutagenicidad con

resultados positivos (ver cuadro 2), sugirió que el plaguicida Roundup es potencialmente dañino para las células germinales.

El propósito del estudio es evaluar los efectos tóxicos, citotóxicos/genotóxicos del plaguicida “Roundup” en células germinales (en estadio de espermátidas) de ratones *Mus musculus*, mediante la prueba de Letales Dominantes, para así aportar elementos básicos de los efectos del Roundup, creando una conciencia civil tanto en las personas que frecuentemente están expuestas a este plaguicida, como en entidades gubernamentales que vigilan y controlan el uso de los plaguicidas y la salud, para motivar al cambio reflexivo de su uso, al diseño y ejecución de programas educativos de vigilancia epidemiológica y a la intervención y prevención oportuna de los riesgos de salud como los efectos en el sistema reproductivo, para una mejor calidad de vida de los individuos expuestos y sus futuras generaciones.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos Tóxicos, Citóxicos/Genotóxicos *In vivo* del plaguicida “Roundup” en células germinales (en estadio de espermátidas), de ratones (*Mus musculus*) mediante la prueba de Letales Dominantes.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Establecer la Toxicidad del “Roundup” mediante la Dosis Letal 50 (DL₅₀) en ratones (*Mus musculus*) como dosis referente para seleccionar las dosis experimentales alta, media y baja.

Determinar el potencial citotóxico/genotóxico del plaguicida “Roundup” en células germinales, en el estadio de espermátida, mediante la prueba de Letales Dominantes en ratón *Mus musculus*.

4. ANTECEDENTES

El Roundup en Colombia, se utiliza como madurante de diferentes cultivos agrícolas y desde 1986, el gobierno lo maneja para la erradicación de cultivos ilícitos, mediante fumigaciones aéreas, a partir del Plan Colombia estas se intensificaron en frecuencia, extensión de hectáreas, concentración del plaguicida por hectárea y mezcla de productos de fumigación. En el departamento del Putumayo las fumigaciones con glifosato (compuesto activo del Roundup) comenzaron en el año 2000, a una concentración del 43,9%, (por encima de la presente en fórmulas comerciales 41%), al que se le adicionan dos surfactantes POEA y Cosmoflux (Nivia, 2003) esta mezcla se aplica a una dosis de 23,4 litros por hectárea. (ONIC, 2002). Según un Informe Conjunto sobre el Seminario-Taller “Erradicación de cultivos ilícitos”, realizado en el año 2002, el plaguicida se usa a una concentración superior (26%) a la aconsejada por la empresa (1%) y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), además, no se han realizado suficientes estudios en animales, sobre los efectos de la mezcla que se utiliza en el producto comercial Roundup. Este plaguicida es potencialmente peligroso, debido a que el producto comercial (Roundup) posee un agente surfactante, el 1,4-dioxano, que se estima es diez veces más carcinogénico que la misma sal de glifosato (Molina, 1995).

Con respecto al glifosato, compuesto activo del Roundup (mezcla compleja), la Agencia de Protección Medioambiental (EPA) lo clasificó inicialmente como clase "D" (no clasificable como carcinógeno humano). Posteriormente, a comienzos de la década de 1990, lo ubicó en clase "C" (Posible carcinógeno en humanos). Actualmente lo clasifica como Grupo E (evidencia de no carcinogénesis en humanos). Sin embargo en la literatura científica, existe muy poca evidencia de la inocuidad de esta sustancia, por lo cual existe una gran polémica, respecto del potencial cancerígeno del glifosato (Kaczewer, 2001) y más aun del Roundup. Según Williams *et al.*, (2000), se han realizado revisiones, de la seguridad del glifosato y del Roundup, dirigida por varias agencias reguladoras e instituciones científicas mundiales, las cuales han concluido que no hay ningún indicio de preocupación para la salud humana. No obstante, surgen interrogantes que periódicamente juzgan la seguridad del Roundup, al existir estudios con resultados contradictorios (ver cuadros 1, 2 y 3).

Según informa el Dr. Jorge Kaczewer (2002), existen cuestionamientos sobre el potencial carcinogénico derivado del uso del glifosato, sus compuestos acompañantes y los productos detectados con técnicas más modernas durante su descomposición. Las dudas sobre el potencial carcinogénico del glifosato persisten, porque este ingrediente contiene el contaminante N-nitroso glifosato (NNG), el cual también puede formarse en el ambiente al combinarse con nitrato (presente en saliva humana o fertilizantes), y se sabe que la mayoría de compuestos N-nitroso son cancerígenos. Adicionalmente, en el caso del Roundup, el surfactante POEA está contaminado con 1-4 dioxano, el cual ha causado cáncer en

animales y daño hepático y renal en humanos. El formaldehído, otro carcinógeno conocido, es también producido durante la descomposición del glifosato (Gómez, 2003). Además, el Dr. Kaczewer, argumenta que: “A nivel eco-tóxico-epidemiológico, la situación se ve agravada, porque son pocos los laboratorios en el mundo que poseen el equipamiento y las técnicas necesarias para evaluar los impactos del glifosato sobre la salud humana y el medioambiente y los estudios toxicológicos que inicialmente realizaron en Estados Unidos, requeridos oficialmente para el registro y aprobación del glifosato, han sido procesados legalmente por el delito de prácticas fraudulentas tales como falsificación rutinaria de datos y omisión de informes sobre incontables defunciones de ratas, falsificación de estudios mediante alteración de anotaciones de registros de laboratorio y manipulación manual de equipamiento científico, para que éste brindara resultados falsos. Esto significa que la información existente respecto de la concentración residual de glifosato en alimentos y el medio ambiente podría ser poco confiable y además escasa” (Kaczewer, 2001).

La Ciclofosfamida, en el presente estudio se utilizó como control positivo, por ser una sustancia ampliamente utilizada en estudios *in vivo*, Schimenti *et al*, (1997), evaluaron los efectos de la Ciclofosfamida en las células germinales de ratón (*Mus domesticus*). Los resultados indicaron, inducción de mutaciones principalmente en células meióticas, lo que demuestra el potente poder mutagénico de la ciclofosfamida en las células germinales.

Para el estudio se emplearon ratones *Mus musculus*, estos animales son usados desde hace muchos años en la experimentación como sistemas modelos para evaluar los efectos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos (mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos) u otros, de xenobióticos, por tener un metabolismo similar, lo cual permite extrapolar los resultados a humanos (Rhomberg *et al* , 1990). Además, los ratones son uno de los sistemas biológicos más favorables por su alta frecuencia de apareamiento, rápido desarrollo, corto período de gestación y alto número de implantes, para realizar estudios encaminados a encontrar evidencias que determinen si un xenobiótico, altera el material genético de las células germinales e identificar el riesgo en futuras generaciones (EPA, 1998).

Como la Dosis Letal Cincuenta (DL₅₀) del Roundup en ratones *Mus musculus* vía oral, no se encuentra en la literatura científica, a continuación se reportan los estudios que se tuvieron en cuenta para iniciar a determinar esta dosis. Atkinson, (1985), determinó que la DL₅₀ oral del glifosato para ratas y conejos es de 4000 a 6000 mg/kg, mientras que Sawada *et al*, en el año 1988, determinó que la DL₅₀ del POEA para las ratas es de 1000 a 2000 mg/kg. Estos resultados indican que los productos que contienen glifosato y el surfactante POEA (polioxietileneamina) pueden ser más tóxicos que el glifosato solo (Adán *et al*, 1997). La Organización Mundial de la Salud (WHO), reporta que DL₅₀ para el Roundup en ratas, vía oral, es de 5000 mg/Kg (WHO, 1994).

Muchos estudios sobre efectos tóxicos ocasionados por el Roundup o el glifosato son descritos, a continuación se reportan en forma cronológica. La Organización Mundial de la Salud, realizó dos estudios de exposición crónica del glifosato en ratas a diferentes concentraciones, uno en 1979/1981 y el otro en 1988/1990. En el primer estudio se observó en los testículos de las ratas, un aumento significativo de tumores celulares intersticiales; sin embargo, la ausencia del mismo efecto con las dosis más altas usadas en el segundo estudio, sentó base para que los investigadores excluyeran al glifosato de la categoría carcinogénica (WHO, 1994). Los estudios de teratogénicidad mostraron que la administración oral de dosis altas de glifosato durante el embarazo a ratas Charles River, del día 6 al 19 de gestación y a conejos del día 6 al 27, causó toxicidad materna. Los mayores efectos observados fueron la muerte de los embriones y aumento en el número de fetos con osificación reducida (WHO, 1994). Se concluyó que la toxicidad aguda del glifosato aumenta cuando la sustancia se combina con el surfactante. En el Reino Unido, el glifosato ha sido una de los principales responsables de accidentes por toxicidad, de acuerdo a los registros del Panel para el uso y control de incidentes con plaguicidas (PIAP). Entre 1990 y 1995 fueron registrados 33 demandas y 34 casos por intoxicación (Pesticida Monitoring Unit, 1993; HSE, 1995). En California, el glifosato se encuentra entre los plaguicidas más comúnmente reportados como causa de enfermedad o daños entre los trabajadores que manipulan plaguicidas. Las presentaciones más comunes tienen relación con efectos oculares e irritación de la piel (EPA, 1993). Existen resultados de investigaciones científicas acerca de plaguicidas que contienen glifosato, que contradicen indicaciones de la empresa fabricante y sostienen que el uso de éste plaguicida, puede conducir a la contaminación del agua, así como a daños en animales y microorganismos benéficos para el suelo (Cox, 1995).

Adam *et al*, en el año 1997 realizaron un estudio sobre el Roundup y sus componentes químicos, glifosato (N-fosfonometilglicina) y polioxietilenoamina (POEA), la toxicidad se determinó a diferentes tiempos, con glifosato puro, POEA y Roundup (mezcla de glifosato + POEA), los efectos respiratorios eran inmediatos, más severos y mucho más duraderos en los grupos expuestos a las preparaciones que contenían POEA que en los grupos expuestos a glifosato puro. En 1 hora, todas las preparaciones habían causado muertes, pero en mayor número para las preparaciones que contenían POEA. La administración de POEA y Roundup, produjeron diarrea y hemorragia nasal. Se observó muerte a las 24 horas con POEA. El glifosato puro, produjo diarrea transitoria sin hemorragia nasal, POEA causó diarrea a 1 hora y la mezcla de POEA + glifosato produjo diarrea aumentando su severidad con el tiempo, causaron hemorragias pulmonares y daño en células epiteliales pulmonares. Sólo se observaron hemorragias nasales con las preparaciones que contenían POEA y glifosato. Estos resultados indican que POEA y preparaciones que contienen POEA son más tóxicos que el glifosato puro.

En el estudio realizado por Williams *et al*, en el año 2000, reportan que la absorción oral del glifosato y AMPA (ácido aminometilfosfónico) es baja al igual que la penetración dérmica del Roundup. Los investigadores no encuentran ninguna toxicidad significativa en

exposiciones agudas, subcrónicas y crónicas. Sin embargo, describen que la exposición ocular directa a la formulación concentrada del Roundup puede producir irritación transitoria, mientras las diluciones normales causan efectos mínimos. Williams *et al*, 2000 también describen como el glifosato ejerce su acción plaguicida través de la inhibición de una enzima, 5-enol-piruvil-shikimato-3-fosfato-sintetasa (EPSPS), impidiendo así que las plantas elaboren tres aminoácidos aromáticos esenciales para su crecimiento y supervivencia.

Un informe reportado por fabricantes de diferentes fórmulas suministran información de los ingredientes inertes comerciales, identificados en diferentes fórmulas en base a glifosato y sus síntomas tóxicos correspondientes: 3-yodo-2-propinilbutilcarbamato: Irritación ocular severa, mayor frecuencia de aborto, alergia cutánea; Metil pirrolidinona: Irritación ocular severa. Aborto y bajo peso al nacer en animales de laboratorio; Polioxietileno-amina (POEA): Ulceración ocular, lesiones cutáneas (eritema, inflamación, exudación, ulceración), náusea, diarrea; Sulfito sódico: Irritación ocular y dérmica severas concomitantes con vómitos y diarrea, alergia cutánea, reacciones alérgicas severas; Ácido sórbico: irritación cutánea, náusea, vómito, neumonitis química, angina, reacciones alérgicas; Isopropilamina: sustancia extremadamente cáustica de membranas mucosas y tejidos de tracto respiratorio superior, lagrimeo, laringitis, cefalea, náusea (Kaczewer, 2001).

El Roundup se encuentra en varios países entre los primeros plaguicidas que causan incidentes de envenenamiento en humanos. La mayoría de éstos han involucrado irritaciones dermales y oculares en trabajadores, después de la exposición durante la mezcla, carga o aplicación. También se han reportado náuseas y mareos después de la exposición, así como problemas respiratorios, aumento de la presión sanguínea y reacciones alérgicas. (Ibáñez, 2002). La cantidad de Roundup (glifosato + POEA) requerida para ocasionar la muerte de ratas es tres veces menor que la de glifosato puro. El POEA es 5 veces más tóxico que el mismo glifosato en humanos. En humanos, los síntomas de envenenamiento incluyen irritaciones dérmicas y oculares, náuseas y mareos, edema pulmonar, descenso de la presión sanguínea, reacciones alérgicas, dolor abdominal, pérdida masiva de líquido gastrointestinal, vómito, pérdida de conciencia, destrucción de glóbulos rojos, electrocardiogramas anormales y daño o falla renal (Gómez, 2003).

Richard *et al*, en el año 2005, mostraron que el glifosato es tóxico en células de placenta humana a concentraciones bajas, este efecto aumenta con la concentración y tiempo o en la presencia de coadyuvantes del Roundup. Los investigadores se sorprenden al constatar que siempre el Roundup es más tóxico que su ingrediente activo (glifosato). Se concluye que pueden observarse efectos endocrinos y tóxicos por el Roundup, en los mamíferos y que la presencia de coadyuvantes en el Roundup refuerza la acumulación del glifosato. En el año 2002, Maldonado *et al*, realizaron dos estudios de salud: el primero un estudio comparativo de los efectos de las fumigaciones en la salud de poblaciones tanto de Ecuador como de

Colombia. La mayoría de la población en el momento de las fumigaciones sufren síntomas como: dolor de cabeza, irritación en ojos, lagrimeo, afecciones de la piel, mareos, dolores abdominales, fiebre, vómitos, náuseas, diarrea, cansancio y estrés. Esta sintomatología es típica de los compuestos organofosforados como el Roundup.

La Prueba de Letales Dominantes (LD), ha sido empleada a través de la historia para evaluar la mayoría de las sustancias, dada su eficacia para arrojar datos certeros, (Witt and Bishop, 1996). Los efectos en letales dominantes fueron primeramente, reconocidos en mamíferos, uno de los primeros estudios fue el de Brenneke 1937, quien evaluó el efecto de la irradiación de rayos X en células germinales en ratones machos. En la década de los 50s, la prueba de Letales dominantes, fue utilizada como prueba mutagénica y como indicador de mutaciones inducidas en espermatozoides por irradiación (Kaplan y Lyon, 1953). En el año de 1956 Oakberg, estudio la secuencia del proceso de maduración de las células germinales desde el estado de espermatogonia al de espermatozoide y registró que el proceso de espermatogénesis tardaba 52 días en ratones (ver figura 1). Esta prueba también fue recomendada en 1977 por Bateman para evaluar agentes mutagénicos.

Recientemente, Dallegrave *et al*, (2003), realizaron el único estudio, encontrado en la literatura científica, que evalúa la teratogenicidad del Roundup (36% glifosato y 18% polioxietilneamina), mediante la prueba de Letales Dominantes; estos investigadores trataron oralmente grupos de ratas de 6 a 15 días de gestación. El día 21 de embarazo realizaron las disecciones y registraron el número de cuerpos lúteos, sitios de implantación, fetos vivos, muertos y reabsorciones. En el estudio determinaron el peso y el género de los fetos y los examinaron para detectar malformaciones externas y alteraciones del esqueleto. Los resultados mostraron una proporción del 50% de mortalidad, observándose alteraciones del esqueleto. Dallegrave y sus colaboradores, concluyeron que el Roundup es tóxico e induce retraso en el desarrollo del esqueleto fetal.

Debido a la escasez de estudios, que evalúen el Roundup mediante la prueba de Letales Dominantes, se reportan a continuación (en orden cronológico), estudios que han evaluado daños inducidos por diferentes sustancias en células germinales de ratones (ver cuadro 1). En Colombia en el año de 1982, De la Hoz y Zuleta, evaluaron el efecto de la Cafeína y de Triethylene melamine (TEM) para inducir letales dominantes en ratones. Los resultados indicaron que la sobrevivencia embrionaria es similar entre el grupo control y el grupo tratado con Cafeína, en cambio la sobre-vivencia embrionaria disminuyó en el grupo tratado con TEM y el promedio de embriones muertos por hembra fue mayor. La Cafeína aumento la producción de mutaciones letales dominantes en ratones tratados a la vez con TEM en relación con los tratados con TEM únicamente. Los resultados sugirieron que la Cafeína sola, no es mutagénica. Ehling *et al*, (1988), determinaron los efectos mutagénicos del Dietilsulfato mediante la prueba de mutaciones específicas en letales dominantes y concluyeron que este plaguicida induce mutaciones en locus específicos y letales dominantes en ratones machos. Russell *et al*, en 1989, mediante la prueba de mutaciones

en células germinales de ratón, evaluó los efectos del Clorambucil y registraron que este plaguicida induce mutaciones en células germinales de ratón. En 1990, Bhunya and Pati estudiaron los efectos del plaguicida Deltametrín en ratones y encontraron que esta sustancia induce anomalías en los espermatozoides junto con alteraciones cromosómicas y micronúcleos en la médula ósea. Pandey, (1990) evaluó, el efecto del Endosulfán, utilizando la prueba de letales Dominantes en estadio de espermatogonias y espermatozoides, reportaron resultados positivos. Ehling and Neuhauser-Klaus, en 1991 determinaron los efectos mutagénicos del Bisulfán mediante la prueba de mutaciones específicas en letales dominantes y concluyeron que este plaguicida induce mutaciones en locus específicos y letales dominantes en ratones machos. Russell *et al*, (1992) evaluó el Melfalán y observó la inducción de mutaciones en espermatozoides y alta frecuencia de deleciones heredables en ratón.

En el año de 1996, los investigadores Witt and Bishop, realizaron un estudio sobre la mutagenicidad de drogas anticancerígenas en células germinales de mamíferos, empleando las pruebas de: Letales Dominantes, translocaciones heredables y mutaciones de locus específicos. Alguno de los resultados fueron: de las veintiún drogas anticancerígenas estudiadas, dieciséis resultaron positivas para una o más de estas tres pruebas; dos indujeron letales dominantes en oocitos de hembras mientras que en células germinales de machos no. Diez dieron positivo para la prueba de Letales Dominantes en las fases post-meióticas (espermatida a través de la maduración a espermatozoide) y siete indujeron traslocaciones recíprocas y/o mutaciones en locus específicos. Los investigadores discuten las implicaciones para el ser humano.

En el año de 1998, Chamorro *et al*, investigó la mutagenicidad de α -asarona, agente obtenido de *Gutteria gaumeri*, una planta medicinal usada en México. α -asarona fue evaluada con la prueba de Letales Dominantes, con tratamiento oral en ratones machos CF1. Los resultados no revelaron ningún efecto sobre la preñez, pero sí un incremento de muertes post-implantación en las hembras apareadas. La evaluación del semen de los ratones mostró una disminución de espermatozoos y su movilidad. Los resultados sugieren que la α -asarosa causa incremento de letales dominantes así como daño directo a los espermatozoides. Chamorro *et al*, en 1999, también evaluó la α -asarona (oral) con la prueba de Letales Dominantes en ratas Wistar machos y hembras a tratamiento corto. La examinación de los úteros y ovarios de las hembras preñadas mostraron pérdidas pre-implantación y post-implantación, indicando actividad genotóxica. Iziga *et al*, (1998), evaluaron mediante la prueba de Letales Dominantes *Uncaria tomentosa*, “uña de gato”, de origen comercial, en ratones hembras (*Albino suizo*). Se evidenció un incremento de embriones anormales (lisados o retardados) con respecto al control, sugiriendo un efecto embrio-tóxico.

Shukla and Taneja, (2000), emplearon la prueba Letales Dominantes para analizar el potencial mutagénico del Deltametrín, mediante exposición oral, en *Albino suizo*. Los

resultados revelaron que el Deltametrín no incidió en la preñez y fertilidad de los ratones. No se registró ninguna pérdida de pre-implantación. Las pérdidas post-implantación fueron observadas con las dosis media y alta. No se observó claramente una relación dosis-efecto que produjera mutaciones letales. Tyl, en el año 2000, evaluó el efecto de la acrilamida en dos generaciones de ratas, con la prueba de Letales Dominantes y su potencial neurotóxico. Los resultados indicaron que este compuesto produce efectos positivos. En el mismo año Russell, mediante la prueba de Letales Dominantes confirmó que la Bleomicina (BLM) es un inductor poderoso de mutaciones letales dominantes en hembras, pero no induce tales mutaciones en las fases post-espermatogoniales de machos. Demostró también, mediante la prueba de locus específico que la BLM es mutagénica en ratones machos, la cual se restringe a las espermatogonias y a las fases de diferenciación.

En el 2001, Shukla and Taneja, evaluaron el efecto antimutagénico del extracto de té negro con la prueba de Letales Dominantes en *Albino suizo*, usando Benzo [a]pireno (BaP) como mutágeno. BaP fue administrado por vía intraperitoneal en única dosis. Se suministró a los animales 1, 2 o 4% de solución acuosa de té negro como única fuente de bebida anterior a BaP. Los resultados revelaron que BaP causó una reducción en la implantación y un incremento en pérdidas pre-implantación y post-implantación. El efecto de la protección de la solución de té sobre la inducción mutagénica de BaP se observó al incrementar el número de implantes y disminuyendo de forma significativa la muerte de implantes en los animales mantenidos con 2 y 4% de la solución de té.

El efecto mutagénico del Carbazol fue evaluado (Jha and Barthi, 2002) empleando la prueba de Letales Dominantes y la prueba de anomalías de la cabeza de los espermatozoides en machos *Albino suizo* (exposición intraperitoneal). Este tratamiento con carbazol arrojó como resultados la inducción de Letales Dominantes y anomalías en la cabeza de los espermatozoides. Chamorro *et al*, en el 2003, evaluó la mutagenicidad del γ -etil- γ -fenil-butirolactone (EPBL) con la prueba de Letales Dominantes en ratones CF1, intraperitonealmente. El estudio se realizó en dos fases: la primera, machos tratados fueron apareados con hembras no tratadas y la segunda fase, machos sin tratamiento fueron apareados con hembras tratadas. La incidencia de preñez disminuyó en las dos fases. Se observó, un incremento en las pérdidas pre-implantación y post-implantación. Los investigadores concluyen que el EPBL es un mutágeno de las células germinales y sus efectos son más frecuentes durante la fase post-meiótica.

En el 2003, Barnett and Lewis, evaluaron dos agentes antineoplásicos, Clornafazine (CN) y Cloranbucil (CHL) intraperitonealmente, para la inducción de Letales Dominantes en ratón macho. El CN fue administrado en ratones DBA/2J y el CHL en ratones C3H/HeJ y DBA/2J, siendo luego apareados con hembras vírgenes. Ambos antineoplásicos claramente indujeron mutaciones Letales Dominantes. El CN indujo efectos Letales Dominantes en todos los estados post-meióticos de las células germinales, con una relación dosis-respuesta. Los resultados de CHL en los machos DBA indicaron que todos los estados post-

meióticos de las células germinales, a excepción de las espermátidas tardías, fueron afectados, mientras que en los machos C3H, el CHL indujo efectos Letales Dominantes en todos los estados post-meióticos. Una relación dosis-respuesta se observó también con el CHL en ratones C3H.

En el 2004, Brake and Evenson, realizaron un estudio para evaluar los efectos en la salud al consumir soja transgénica (tolerante al glifosato). Los investigadores utilizaron los testículos de ratón para biomonitorizar los potenciales efectos tóxicos. Se alimentaron las hembras preñadas con soja transgénica y no transgénica (convencional), la dieta se realizó a través de la gestación y la lactación. Después del destete, los ratones machos se mantuvieron en las dietas respectivas. A diferentes días después del nacimiento se sacrificaron, los testículos fueron sustraídos y se midieron las poblaciones celulares mediante citometría de flujo. Los resultados mostraron que la dieta con soja transgénica no tenía efecto fetal, post-natal, pubertal o en el desarrollo testicular del adulto.

Al consultar diferentes bases de datos de la literatura científica, se conoció que no existen estudios que evalúen el plaguicida Roundup utilizando la prueba de Letales Dominantes en ratones *Mus musculus*, por lo cual se reportan estudios citotóxicos o/y genotóxicos que han evaluado el Roundup o/y el Glifosato en diferentes sistemas biológicos y con otras pruebas (ver cuadro 2). Rank, en el año 1993 evaluó en tres ensayos diferentes del potencial genotóxico del plaguicida Roundup y su agente activo, glifosato. En el primero, en médula ósea de ratón con la prueba de micronúcleos no se encontró ningún efecto clastogénico para los dos agentes. En un ensayo con *Salmonella*, el Roundup mostró un débil efecto mutagénico en concentraciones cercanas del nivel tóxico. En *Allium* no se observó efecto por parte del glifosato, pero sí se observó un aumento significativo de alteraciones cromosómicas luego del tratamiento con Roundup.

En el año 1998, AP and TJ, probaron el potencial genotóxico del glifosato, en ensayos *in vitro* e *in vivo* en *Typhimurium Salmonella*, *Escherichia coli*, células de ovario de hámster chino y médula ósea de rata. No se observó ninguna actividad genotóxica en los ensayos realizados. Los datos sugieren que el glifosato no propone un riesgo a considerar. Peluso, 1998, realizó un estudio donde revela que el Roundup puede inducir aductos en el ADN en los riñones e hígado de ratones. Para el ingrediente activo del Roundup (glifosato) no se relacionaron aductos de ADN, pero si a otro componente desconocido de la mezcla del plaguicida. Argumentaron que son necesarios experimentos adicionales para identificar la especie del químico de la mezcla del Roundup involucrado en la formación de aductos en el ADN.

En un trabajo por Hardell y Ericsson (1999), se revela la relación entre glifosato y Linfoma No Hodgkin (LNH). Los investigadores sostienen que la exposición al plaguicida puede incrementar los riesgos de contraer esta enfermedad, basándose también en un estudio

realizado entre 1987 y 1990 en Suecia. En el año 2000, Grisolia y Cordeiro, evaluaron Glifosato, Ciclofosfamida, Mitomicina C, Deltanmetrín, Dicofol y Mazapir en eritrocitos de *Oreochromis niloticus* y ratón *Albino suizo*, aplicando el compuesto vía intraperitoneal, la frecuencia de Micronúcleos indica que no existe efecto genotóxico en estos sistemas.

En el año 2000, Szarek *et al*, evaluaron el efecto del plaguicida Roundup en hepatocitos de la carpa (*Cyprinus carpio*), los peces eran expuestos por inmersión en Roundup. Mediante microscopía electrónica observaron que el plaguicida causó una apariencia no usual en la estructura de los hepatocitos, inflamando la mitocondria y ocasionando la desaparición de su membrana interior. Concluyeron entonces, que el Roundup era dañino a la carpa en las concentraciones aplicadas. Marc *et al*, en el año 2002 evaluaron el Roundup en erizo de mar en etapa de división embrionaria. Indican que el Roundup induce un retraso en la cinética de la primera división celular de embriones de erizo de mar. El retraso es dependiente de la concentración del Roundup. El glifosato puro es ineficaz para inducir retraso indicando sinergia entre el glifosato y los productos de formulación del Roundup. Dicho efecto involucra en un retraso para la entrada en la fase de mitosis del ciclo de celular. Analizando la CDK1/cyclina, complejo proteico que regula universalmente la fase de mitosis del ciclo celular, con los efectos del Roundup, se observó una activación tardía en la activación de este complejo durante la primera división del desarrollo embrionario. En conclusión, el Roundup afecta la regulación de ciclo celular, retardando la activación de la CDK1/cyclina B, por los efectos sinérgicos del glifosato y los productos de la formulación comercial. Considerado la universalidad entre especies de la regulación de la CDK1/cyclina B, estos resultados cuestionan la seguridad del glifosato y del Roundup en la salud humana.

Maldonado *et al*, (2002) complementaron un estudio de toxicidad, con la prueba de Alteraciones Cromosómicas y la prueba Cometa. Las muestras de sangre periférica, se tomaron dos semanas después de la exposición. Los resultados muestran que se produce un daño genético significativo considerable. En el mismo año Maldonado dirigió otro estudio donde se estableció la relación de las fumigaciones aéreas del plan Colombia, con daños en el material genético. Se analizaron 47 mujeres de la frontera entre Ecuador y Colombia, que fueron expuestas a la mezcla de glifosato con POEA más Cosmoflux 411F. Se realizaron análisis de sangre utilizando las pruebas de Cometa Alteraciones Cromosómicas. Los resultados indican que el 100% de mujeres, además de los síntomas de intoxicación presentaron daños genéticos en un tercio de las células sanguíneas. Se concluyó que someter a la población a las fumigaciones puede aumentar el riesgo de daño celular y que una vez sea permanente, se pueden incrementar los casos de cáncer, mutaciones y alteraciones embrionarias importantes que den lugar entre otras posibilidades al incremento del número de abortos en la zona. Guerrero y Muñoz, en el año 2003, al evaluar el Roundup en Branquias de pez *Oreochromis niloticus*, mediante la prueba de Micronúcleos (Exposición *in vivo*), reportaron resultados positivos.

Cuadro 1. Estudios que utilizaron pruebas que evalúan efectos de diferentes sustancias en células germinales de ratones o ratas (1.982-2004)

SISTEMA BIOLÓGICO	RUTA DE EXPOSICIÓN	BIOMARCADOR	SUSTANCIA	RESULTADO	REFERENCIA
Ratones cepa Albino suizo	Oral	Letales Dominantes	Cafeína y TEM	Positivo	De la Hoz y Zuleta, 1982
Ratones machos	Exposición en condiciones de laboratorio	Mutaciones específicas en Letales Dominantes	Dietilsulfato (DES)	Positivo	Ehling <i>et al</i> , 1988
Ratón	Exposición en condiciones de laboratorio	Mutación en células germinales	Clorambucil	Positivo	Russell <i>et al</i> , 1989
Ratones	Exposición en condiciones de laboratorio	anormalidades en espermatozoides	Deltametrín	Positivo	Bhunya y Pati, 1990.
Ratones	Exposición en condiciones de laboratorio	Letales Dominantes , daño en espermatogonias y espermatozoides	Endosulfán	Positivo	Pandey, 1990
Ratones	Exposición en condiciones de laboratorio	Mutaciones específicas en Letales Dominantes	Busulfán	Positivo	Ehling and Neuhauser-Klaus, 1991
Ratones	Exposición en condiciones de laboratorio	Mutaciones en espermatozoides	Melfalán	Positivo	Russell <i>et al</i> , 1992
Células germinales de mamíferos	Exposición en condiciones de laboratorio	La prueba de Letales Dominantes , Prueba de translocaciones hereditables y la prueba Morfológica de sitio específico	Actinomycin D, driamicin, Amsacrina, Bleomicina, Busulfán, Carmustine, Clorambucil, Mecloretamina, Ciclofosfamida , Etoposide, 5-Fluorouracil, Melfalan, 5-Mercaptopurina, Mitomicina C, Mitoxantrone, Platinol, Procarbazine, Thio TEPA, Trofosfamide, Vinblastina, Vincristina	Positivo	Witt and Bishop, 1996.
Células germinales de Ratones de la línea germinal TgCOR3 y TgLacFin,	Intraperitoneal	Prueba de Muscateer.	Ciclofosfamida	Positivo	Schimenti <i>et al</i> , 1997

SISTEMA BIOLÓGICO	RUTA DE EXPOSICIÓN	BIOMARCADOR	SUSTANCIA	RESULTADO	REFERENCIA
Ratones machos CF1	Oral	Letales Dominantes	∞ -asarosa (agente obtenido de <i>Gutteria gaumeri</i>)	Positivo	Chamorro <i>et al</i> , 1998
Células germinales, ratones <i>Swiss albinos</i>		Letales Dominantes	<i>Uncaria tormentosa</i>	Positivo	Iziga <i>et al</i> , 1998
Células germinales, ratas Wistar	Oral	Letales Dominantes	alfa-asarona	Positivo	Chamorro <i>et al</i> , 1999
Ratones <i>Albino suizo</i>	Oral	Letales Dominantes	Deltametrin	Negativo	Shukla and Teneja, 2000
Células germinales, ratas	Oral	Letales Dominantes	Acilamida	Positivo	Tyl, 2000
Ratones hembras y machos	-	Letales Dominantes Sitio-específico en machos	Bleomicina	Positivo	Rusell, 2000
Células germinales, (<i>Albino suizo</i>)	Intraperitoneal (i.p)	Letales Dominantes	Benzo(a)pireno	Positivo	Shukla and Teneja, 2001
Células germinales, (<i>Albino suizo</i>)	i.p	Letales Dominantes Anormalidades en la cabeza de los espermatozoides	Carbazol	Positivo	Jha and Bharti, 2002
Células germinales, ratones CF1	i.p	Letales Dominantes	γ etil- γ fenil-butirolactone	Positivo	Chamorro <i>et al</i> , 2003
Células germinales ratones machos DBA/2J, C3H/HeJ	i.p	Letales Dominantes	Clornafazine, Cloranbucil	Positivo	Barnett and Lewis, 2003
Ratas Wistar	Oral	Letales Dominantes	Roundup (glifosato)	Positivo	Dallegrave <i>et al</i> , 2003
ratones	Oral	Medición (citometría de flujo) de Células germinales	Soja transgénica (tolerante al Glifosato)	Negativo	Brake and Evenson, 2004

Cuadro 2. Estudios que evaluaron el Roundup o Glifosato en diferentes sistemas y con diferentes pruebas (en orden cronológico, 1.993-2005)

SISTEMA BIOLÓGICO	RUTA DE EXPOSICIÓN	BIOMARCADOR	SUSTANCIA	RESULTADO	REFERENCIA
1.médula ósea de ratón 2. <i>Salmonella</i> 3. <i>Allium cepa</i>	Exposición en condiciones de laboratorio	1.micronúcleos 2. <i>Salmonella</i> 3.alteraciones cromosómicas	Roundup glifosato	1. no efecto clastogénico 2 débil efecto mutagénico 3. efecto - en glifosato 3.+ en Roundup	Rank, 1993
<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> en <i>Typhimurium</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Escherichia coli</i> , células de ovario de hámster chino y médula ósea de rata.	Exposición en condiciones de laboratorio	-	glifosato	Negativo	Ap and TJ, 1998
Riñones e hígado de ratones.		Aductos de ADN	Roundup glifosato	Positivo	Peluso, 1998
Eritrocitos de <i>Oreochromis niloticus</i> y ratón <i>Albino suizo</i>	Intrape-ritoneal (i.p)	Micronúcleos (Mn)	Glifosato, Ciclofosfamida, Mitomicina C, Deltanmetrina, Dicofol y mazapir	Negativo	Grisolia y Cordeiro, 2000
hepatocitos de la carpa (<i>Cyprinus carpio</i>)	Exposición en condiciones de laboratorio	Modelo ultraestructural de hepatocitos en carpa	Roundup	Positivo	Szarek <i>et al</i> , 2000
Erizo de mar en etapa de división..	Exposición en condiciones de laboratorio	activación e inactivación de CDK1/cyclina complejo B	Roundup glifosato	Positivo	Marc <i>et al</i> , 2002
Linfocitos humanos	Exposición <i>in situ</i>	Alteraciones Cromosómicas Prueba Cometa	Round Up Ultra	Positivo	Maldonado <i>et al</i> , 2002
Bránquias de pez <i>Oreochromis niloticus</i>	Exposición <i>in vivo</i>	Micronúcleos	Roundup	Positivo	Guerrero y Muñoz, 2003

Cuadro 3. Resumen de los resultados de Genotóxicidad del Glifosato, Roundup y otros. Williams, *et al.* (2000)

Sistema Biológico	Biomarcador	Compuesto puro (dosis alta analizada)	Evaluación		
			Sin S9	Con S9	Referencias
<i>S. typhimurium</i> TA98	Mutación revertante	Roundup 1.44 mg/Kg (glifosato 48%; POEA)	-	-	Rank <i>et al.</i> (1993)
<i>S. typhimurium</i> TA100	Mutación revertante	Roundup 0.72 mg/Kg (glifosato 48%; POEA)	-	+	Rank <i>et al.</i> (1993)
<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, A1535, TA1537	Mutación revertante	Roundup 0.5 mg/Kg (glifosato 30.4%; 15% POEA)	-	-	Kier <i>et al.</i> (1997)
<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, A1535, TA1537	Mutación revertante	Rodeo (glifosato 5 mg/Kg Con sal <i>isopropilamina</i> , 54%)	-	-	Kier <i>et al.</i> (1997)
<i>S. typhimurium</i> TA98, TA100, A1535, TA1537	Mutación revertante	Direct (glifosato 0.5 mg/Kg Con amonio al 72%; (surfactante específico)	-	-	Kier <i>et al.</i> (1997)
<i>D. melanogaster</i>	Letales recesivos ligados-sexo	Roundup 1 mg/L (1 (glifosato ppm) 41%; (POEA)	+	0	Kale <i>et al.</i> (1995)
<i>Allium cepa</i> (onion root tip)	Alteraciones cromosómicas	Glifosato 2.88 mg/L (sal <i>isopropilamina</i>)	-	0	Rank <i>et al.</i> (1993)
<i>Allium cepa</i> (onion root tip)	Alteraciones cromosómicas	Roundup 1.44 mg/L (glifosato 48%; POEA)	+	0	Rank <i>et al.</i> (1993)
Linfocitos sangre periférica (humanos) <i>in vitro</i>	Alteraciones cromosómicas	Glifosato 0.56 mg/mL (.98%) 0.33 mg/mL	-	-	van de Waart 1995)
Linfocitos sangre periférica(humanos) <i>in vitro</i>	Alteraciones cromosómicas	Glifosato 1.4 mg/L (.98%)	+	0	Lioi <i>et al.</i> (1998a)
Linfocitos sangre periférica(bovinos) <i>in vitro</i>	Alteraciones cromosómicas	Glifosato 2.9 mg/L (.98%)	+	0	Lioi <i>et al.</i> (1998b)
Sangre periférica (humana) <i>in vitro</i>	I.C.H	Glifosato 1.0 mg/mL(99.9%)	+	0	Bolognesi <i>et al.</i> (1997)
Sangre periférica (humana) <i>in vitro</i>	I.C.H	Roundup 0.1 mg/mL (glifosato 30.4%; 15% surfactant)	+	0	Bolognesi <i>et al.</i> (1997)
Sangre periférica (humana) <i>in vitro</i>	I.C.H	Glifosato 1.4 mg/L (.98%)	±	0	Lioi <i>et al.</i> (1998a)
Linfocitos sangre periférica(bovinos) <i>in vitro</i>	I.C.H	Glifosato 2.9 mg/L (.98%)	±	0	Lioi <i>et al.</i> (1998b)
<i>V. faba</i> (renacuajo)	Micronúcleos	Solado 1.4 mg/g soil (glifosato 21%)	-	0	De Marco <i>et al.</i> (1992)
medula ósea ratones (<i>in vivo</i>), dieta por 13 semanas	Micronúcleos	Glifosato (99%) 11,379 g/kg/día	-	0	NTP (1992)
Medula ósea ratones (<i>in vivo</i>) inyección intraperitoneal (ip), 24 h, 48 h	Micronúcleos	Glifosato (no específico) 200 mg/kg	-	0	Rank <i>et al.</i> (1993)

Medula ósea ratones (<i>in vivo</i>) inyección ip, 24 h	Micronúcleos	Roundup 200 mg/kg (glifosato 48%; POEA)	-	0	Rank <i>et al.</i> (1993)
Medula ósea ratones (<i>in vivo</i>) inyección ip	Micronúcleos	Glifosato 300 mg/kg (99.9%)	+	0	Bolognesi <i>et al.</i> (1997)
Medula ósea ratones (<i>in vivo</i>) inyección ip	Micronúcleos	Roundup 135 mg/kg (glifosato 30.4%; 15% surfactante)	+	0	Bolognesi <i>et al.</i> (1997)
Ratones medula ósea (<i>in vivo</i>) inyección ip	Micronúcleos	Roundup 555 mg/kg (glifosato 30.4%; 15% POEA)	-	0	Kier <i>et al.</i> (1997)
Ratones medula ósea (<i>in vivo</i>) inyección ip	Micronúcleos	Rodeo (glifosato 3400 mg/kg IPA 54%; agua)	-	0	Kier <i>et al.</i> (1997)
Ratones medula ósea (<i>in vivo</i>) inyección ip	Micronúcleos	Directo (glifosato 365 mg/kg 72% con sal NH ₄ ; surfactante)	-	0	Kier <i>et al.</i> (1997)
Ratones técnica de gavage (<i>in vivo</i>)	Letales Dominantes	Glifosato 2000 mg/kg (98.7%) DNA daño/reactividad	-	0	Wrenn (1980)
Ratones expuestos vía ip (in vivo)	aductos DNA	Glifosato (sal isopropilamina) 270 mg/kg	-	0	Peluso <i>et al.</i> (1998)
Ratones expuestos vía ip (<i>in vivo</i>)	aductos DNA	Roundup (30.4% glifosato sal isopropilamina; 15% surfactante) 400 mg/kg	+	0	Peluso <i>et al.</i> (1998)
Ratones expuestos via ip (<i>in vivo</i>) alkaline elution of extracted DNA	DNA (quebres de cadena simple)	Glifosato (99.9%) 300 mg/kg	+	0	Bolognesi <i>et al.</i> (1997)
Ratones expuestos via ip (<i>in vivo</i>) alkaline elution of extracted DNA	DNA (quebres de cadena simple)	Roundup (glifosato 30.4%; 15% surfactante) 270 mg/kg	+	0	Bolognesi <i>et al.</i> (1997)
<i>R. catesbeiana</i> (renacuajo)	DNA (quebres de cadena simple) Ensayo Cometa	Roundup (glifosato 30.4%; 15% POEA) 6.75 mg/L	+		Clements <i>et al.</i> (1997)
Ratones expuestos vía ip (<i>in vivo</i>)	8-OHdG	Glifosato (99.9%) 300 mg/kg	±	0	Bolognesi <i>et al.</i> (1997)

+, positivo; -, negativo; 0, prueba no realizada.

5. MARCO TEÓRICO

5.1 LOS PLAGUICIDAS

La Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) define plaguicida (también conocido como, biocida) a toda sustancia o mezcla de sustancias de origen natural o sintético destinada a controlar, prevenir, destruir, repeler o mitigar eliminando o disminuyendo cualquier plaga, especies no deseadas como hierbas (herbicida), insectos (insecticida), roedores (rodenticida), hongos (fungicida), ácaros (acaricidas), nematodos (nematicidas), moluscos (molusquicidas) entre otros, capaces de interferir en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre su cuerpo. (Bastidas y Gómez, 1999). Los plaguicidas son altamente contaminantes, tanto como del aire como del mar y las aguas dulces. Prácticamente, todos los elementos que se consumen los contienen en cierta cantidad. La gran afinidad que tiene por las grasas hace que alcancen concentraciones considerables en los humanos. (www.ingenieroambiental.com.ar).

Las consecuencias de un uso continuo y desaprensivo de los plaguicidas, junto con la ausencia de aplicación de normas de prevención han determinado la aparición de una serie de problemas que inciden directa o indirectamente en la salud de los seres humanos (Bastidas y Gómez, 1999). El primer problema es la resistencia de la plaga a los plaguicidas, esta situación genera que se eleve la dosis de aplicación o/y que se empleen productos más tóxicos. Estrategias que potencializan una mayor cantidad de intoxicaciones agudas y crónicas, y al mismo tiempo se sinergizan para producir una mayor resistencia, reforzando aquello que se quiere combatir.

El segundo problema es la incidencia directa o indirecta de los plaguicidas, los cuales generan: efectos agudos, son intensos y perceptibles que aparecen en cuestión de horas o días ante una exposición a dosis altas; efectos sub-agudos, por exposiciones a dosis más bajas necesitan tiempos más largos para que los síntomas sean visibles y efectos crónicos, por exposiciones a largo plazo y dosis bajas, los síntomas dependen también de los solventes en que se presenten los plaguicidas, inciden en problemas reproductivos, desordenes nerviosos, genotóxicidad y tumores. (Bastidas y Gómez, 1999).

Otro problema que desencadena el inadecuado uso de los plaguicidas es la contaminación de los recursos hídricos, contaminan las fuentes de agua potable humana y animal, los nacimientos de agua, las aguas subterráneas, los ríos y los mares. Las consecuencias de esta contaminación se relacionan con la pérdida de flora y fauna acuática, pérdida del recurso

como fuente de agua y alimento e intoxicación humana y animal. La flora y fauna del suelo, responsables del reciclaje de la materia orgánica, se ven también seriamente afectadas por los plaguicidas, con lo cual se deprime la provisión de nutrientes del suelo.

5.1.1 Grupos de Plaguicidas. Entre los principales grupos de plaguicidas se encuentran: los organoclorados, los carbamatos, las triazinas, los fenoxiácidos y los Organofosforados, a este último grupo pertenece el Roundup (sustancia objeto de estudio). Los organofosforados fueron desarrollados primero como armamento químico (gas nervioso), después se elaboraron para uso agrícola. Son compuestos derivados del ácido fosfórico. A causa de su alta toxicidad aguda presentan un alto riesgo ocupacional y ambiental.

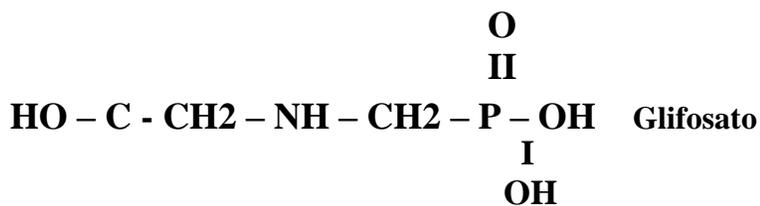
El mecanismo de acción de los organofosforados (y los carbamatos) es inhibir las colinesterasas (enzimas responsables de la actividad biológica del neurotransmisor acetilcolina), cuando se bloquea la colinesterasa se produce, una estimulación excesiva y continúa de la musculatura manifestándose con temblores o espasmos abdominales, mientras que la excitación de las glándulas sudoríparas provoca un exceso de sudoración. (www2.udec.cl/~digentox/glosario/plaguicidaorganofosforado.html). Si la exposición a plaguicidas organofosforados es muy intensa se producen efectos agudos. Los primeros síntomas suelen ser náuseas, dolor de cabeza, fatiga, vértigo, visión borrosa y constricción pupilar. Es importante que se diagnostique a tiempo este tipo de intoxicación porque ello permite una intervención médica eficaz mediante la administración de atropina, una sustancia que actúa como antídoto específico de los organofosforados, si no se trata, se puede llegar a producir la muerte por fallo respiratorio. Cuando hay un contacto repetido y continuo con pequeñas dosis de organofosforados, tal vez no pase nada a corto plazo, pero a largo plazo estas sustancias se acumulan en el organismo y provocan intoxicaciones crónicas afectando el sistema nervioso, se manifiesta con síntomas como fatiga crónica, cefalea, disminución en la libido, intolerancia al alcohol y nicotina e impresión de envejecimiento precoz, defecto de memoria y demencia. También puede producirse debilidad muscular de extremidades. (<http://www.gencat.es>).

En general los organofosforados pueden penetrar en el organismo por cualquier vía. Algunos de ellos, por ejemplo el Paratión, ingerido en pequeñas cantidades al comer o fumar puede producir una intoxicación grave, incluso mortal. Sin embargo la vía de intoxicación más habitual es por la vía respiratoria. Además, aunque no producen irritación, se absorben fácilmente a través de la piel y de los ojos de ésta manera la persona expuesta puede no advertirlo.

5.1.2 Clasificación de los Plaguicidas. De acuerdo a su acción los plaguicidas se clasifican como: insecticidas, fungicidas y herbicidas. Los herbicidas, son un tipo de compuesto químico que destruye la vegetación, ya que impiden el crecimiento de los vegetales en su etapa juvenil o bien ejercen una acción sobre el metabolismo de los

vegetales adultos. Se experimento un cambio de gran importancia en la década de 1940, época en que se formularon los primeros plaguicidas sintéticos. Estos compuestos, baratos y eficaces, revolucionaron los métodos de lucha contra las malas hierbas y redujeron la mano de obra necesaria para obtener grandes cantidades de productos alimenticios. Muchos herbicidas ejercen una actividad selectiva: destruyen ciertos tipos de plantas y no afectan a otros. La selectividad de muchos herbicidas es decir, las especies que controlan y aquéllas a las que no afectan puede modificarse ajustando el volumen de producto aplicado por hectárea y la estación de aplicación (Documento Plan de Manejo Ambiental Erradicación de Cultivos Ilícitos. 2000). Los plaguicidas de amplio espectro, como el glifosato, controlan casi todas las formas de vegetación. Algunos esterilizan el suelo, eliminan toda la vegetación y retrasan la invasión de nuevas “malas” hierbas Los plaguicidas varían mucho en cuanto a su persistencia en las plantas y el medio ambiente. Los no persistentes, preferidos en agricultura, controlan las malas hierbas con rapidez y se descomponen en el curso de algunos días o semanas. Los plaguicidas persistentes, se mantienen activos en el suelo durante cien días o más, prolongan el control durante más tiempo. (Industria Monsanto, 2002).

Entre los plaguicidas más utilizados en la agricultura encontramos: el Glifosato: Chemical Abstracts Service (CAS) 1071-83-6. Composición: Sal isopropilamina de N-Fosfono metil glicina (IPA) (EPA, 2003). Pertenece al grupo de los organofosforados, es el plaguicida de mayor uso en el mundo por ser efectivo y por que permite su aplicación de diversas maneras. Constituye uno de los descubrimientos agroquímicos más importantes, el glifosato es una molécula formada por una fracción de glicina y un radical aminofosfato unido como sustituyente de uno de los hidrógenos del grupo a-amino (Industria Monsanto, 2002).



Las formulaciones de glifosato se encuentran registradas en más de cien países, incluyendo los Estados Unidos; en donde ha sido aprobado por la EPA (Agencia de Protección Ambiental) para ser utilizado en más de sesenta cultivos agrícolas, en manejo de bosques sometidos a intervención para su conservación, y en sistemas de cultivos diferentes, incluidos el mantenimiento jardines públicos y domésticos (Industria Monsanto, 2002).

El Glifosato se comercializa en la forma de concentrados solubles de la sal isopropanolamina de N- (Fosfonometil) glicina, en los cuales se integran el Glifosato y los ingrediente inertes requeridos para cada tipo de formulación comercial. Aunque, la forma de comercialización más común son los concentrados solubles en agua, también es posible

tener acceso a las siguientes preparaciones para uso específicos: Ingrediente de grado químicamente puro (uso de laboratorio); ingrediente de grado técnico; emulsiones concentradas, emulsiones concentradas invertidas, concentrados solubles en agua, polvos solubles en agua y para espolvoreo, formulaciones para fumigar; formulaciones granulares, y formulaciones encapsuladas.

El proceso de preparación de las diferentes formulaciones de uso comercial de cualquier plaguicida, incluyendo el Glifosato, es una tarea compleja y aunque se disponga de un procedimiento básico de referencia, siempre existirán causales que obliguen a introducir modificaciones en la selección y calidad de las materias primas, con énfasis especial en los solventes y en las mezclas o surfactantes aniónicos y no iónicos. Para el caso del Glifosato de acuerdo con el fabricante, la formulación típica del Glifosato de uso comercial, en su presentación de líquido soluble, contiene el ingrediente activo: Glifosato, N-(Fosfometil) glicina, en sal isopropilamina, 41,0 % ; Ingredientes Inertes: Seboaminas etoxiladas, 59,0 %, estos últimos componentes son sustancias químicas peligrosas, en concepto de algunas Entidades Normativas, y capaces de causar irritación gastrointestinal, náuseas, vómito y diarrea (Documento Plan de Manejo Ambiental Erradicación de Cultivos Ilícitos. 2000).

Otro plaguicida ampliamente utilizado es el Roundup SL (Glifosato comercial): fórmula química, $C_6H_{17}N_2O_5P$, CAS No. 38641-94-0. EL Roundup está compuesto de un ingrediente activo, la sal isopropilamina de N-fosfometil glicina e ingredientes aditivos, surfactante y agua. El Roundup es una solución viscosa de color ambarino claro; pH 4,4 a 4,9; gravedad específica 1,17; olor tenue a amina. En el campo agrícola es usado para eliminar maleza perenne y anual de los cultivos, también es utilizado como madurante de caña, yuca, plátano y desecante de granos. El Roundup usado en estas actividades contiene 41% de sal N-fosfometilglicina que viene en forma de sal isopropilamida (IPA) de glifosato y el Roundup usado en el plan Colombia para erradicar cultivos ilícitos como la marihuana, coca y amapola contiene 43.9% del ingrediente activo (Industria Monsanto, 2002). El Roundup en todas sus presentaciones, es altamente soluble en agua, prácticamente insoluble en solventes orgánicos. Su compuesto activo, IPA, cuando cae al suelo se metaboliza en ácido aminometilfosfónico (AMPA) y formaldehído y junto con la saliva se transforma en N-nitroso glifosato, los tres compuestos poseen la característica común de ser cancerígenos, a la anterior mezcla se le adicionan una serie de compuestos inertes como el POEA (surfactante) para hacer que el compuesto sea más efectivo (Gómez, 2003).

5.2 ACTIVACIÓN METABÓLICA

Los seres humanos están expuestos a una gran variedad de agentes químicos naturales y sintéticos como los plaguicidas. Estos químicos ingresan al organismo por diferentes vías de absorción como la piel, sistema respiratorio y digestivo. Una vez el plaguicida se encuentra dentro del organismo es biotransformado en metabolitos activos, diferentes al compuesto parental (original), los cuales son llevados a diferentes órganos del cuerpo por vía sanguínea, interactuando con moléculas como el ADN, proteínas, etc. Los metabolitos

formados pueden ser lipofílicos, los cuales pueden atravesar fácilmente la membrana celular y ser acumulados en ciertos tejidos como el graso. Los metabolitos hidrofílicos, son fácilmente excretados del organismo y no son acumulados en los tejidos. Los procesos de biotransformación suceden principalmente en el hígado, pero otros órganos como los riñones, los pulmones, intestino, piel, etc., también son capaces de metabolizar. (Witt and Bishop, 1996)

El proceso de biotransformación sucede en dos fases: en la primera fase ocurren reacciones de oxidación-reducción por acción de ciertas enzimas que convierten generalmente los compuestos en derivados que son más solubles en agua que el original y en la segunda fase suceden las reacciones de conjugación o síntesis. El metabolito originado en primera fase es conjugado a una molécula endógena como resultado se da un nuevo producto totalmente diferente al compuesto parental. La finalidad de las reacciones (primera y segunda fase) del proceso de biotransformación es convertir las sustancias extrañas en sustancias que fácilmente sean excretadas (como un mecanismo de detoxificación del organismo), pero no siempre el producto generado es menos tóxico que el parental ya que en diferentes casos los metabolitos son más tóxicos (como un mecanismo de toxicación), esto ocurre con ciertos químicos identificados como carcinógenos (Klug and Cummings, 1999).

5.3 ASPECTOS TOXICOLÓGICOS

La Toxicología es el estudio de los efectos adversos de químicos en los organismos vivos. Los agentes tóxicos se clasifican según diversos criterios por ejemplo al órgano afectado, al uso (plaguicida, solvente) procedencia (animales y plantas), efecto (cáncer, mutación, daño reproductivo o al hígado) etc.

Un estudio toxicológico trata de examinar la naturaleza de efectos incluyendo los mecanismos de acción celular, bioquímico y molecular y las probabilidades de recurrencia. El espectro de la dosis tóxica se mide en relación a la DL50. Sin embargo algunos químicos de baja toxicidad aguda pueden tener efecto carcinogénico o teratogénico a dosis que no evidencian toxicidad aguda. Los efectos tóxicos adversos pueden producirse por el producto en sí o por sus metabólicos (biotransformación) en este caso se requiere un tiempo para su manifestación. Las rutas y sitios de exposición ocupacional más frecuentes son generalmente la inhalación o por contacto directo y prolongado. La duración y frecuencia de exposición se expresa en cuatro categorías; aguda, sub-aguda subcrónica y crónica a largo término comúnmente usado para evaluar el potencial oncogénico de una sustancia.

Convencionalmente las exposiciones crónicas a agentes tóxicos pueden producir algunos efectos inmediatos (agudos) y efectos por exposiciones por largo tiempo a bajos niveles. La toxicidad diferida puede ocurrir después de un tiempo de una administración única de cancerígenos por ejemplo 20 a 30 años después de la primera exposición; la neurotoxicidad

también se puede presentar con efecto diferido como el caso de algunos insecticidas organofosforados.

La toxicidad puede ser sistémica o local, el efecto sistémico requiere absorción y distribución, no causa igual grado de toxicidad en todos los órganos. Los órganos que con mayor frecuencia están involucrados en toxicidad sistémica son el sistema nervioso central y el sistema circulatorio, sistema hemopoyético y viscerales como el hígado, riñón y piel.

Con base en dosis por unidad de superficie corporal, los efectos tóxicos en humanos tienen usualmente el mismo rango que en animales, de allí la asunción de que carcinógenos en animales pueden serlo en humanos. La variación en cuanto a respuestas a carcinógenos parece deberse a diferencias en la biotransformación de los procarcinógenos que se convierten en carcinógenos. Segundo Principio La exposición de animales de experimentación a agentes tóxicos en altas dosis es un método necesario y válido para identificar riesgos potenciales en humanos.

5.4 MUTACIÓN

Los plaguicidas o sus metabolitos originados por procesos de biotransformación, pueden interactuar con macromoléculas como el ADN y las proteínas ocasionando lesiones primarias o pre-mutacionales las cuales pueden ser no reparadas, reparadas o reparadas incorrectamente. Luego de transcurrir un ciclo de división celular, los daños no reparados o mal reparados son expresados como mutaciones y en casos extremos llevan a la célula a apoptosis (Klug and Cummings, 1999).

Las mutaciones pueden ser génicas, genómicas y cromosómicas. Las mutaciones génicas o puntuales, son microlesiones o daños a nivel de un gen por sustitución, adición o delección de bases. No son visibles a través del microscopio óptico. Las mutaciones genómicas, se caracterizan por un cambio en el número de cromosomas ya sea por aumento o disminución de uno o de varios cromosomas. Este tipo de mutaciones ocurre con mayor frecuencia en los cromosomas sexuales, originando aneuploidías o poliploidías causantes de múltiples enfermedades como el síndrome de Turner (XO), síndrome de Klinefelter (XXY), etc. Estas mutaciones son visibles al microscopio óptico. Las mutaciones cromosómicas, son cambios estructurales a nivel del material genético (ADN), llamadas alteraciones cromosómicas (AC), las cuales se expresan como deleciones, quiebres cromatídicos, quiebres cromosómicos, inversiones, etc. (Klug and Cummings, 1999).

La mutación Letal Dominante, “Es un suceso ocurrido en una célula germinal que no causa disfunción en el gameto, pero que es letal para la fertilización del ovulo o desarrollo embrionario” (EPA, 1998)

5.5 PRUEBAS BIOLÓGICAS

5.5.1 Pruebas de Toxicidad. Permiten detectar daño orgánico mensurable catalogándose como toxicidad crónica o aguda dependiendo si causa o no muerte del organismo. Se habla de toxicidad crónica cuando la exposición prolongada a una sustancia tóxica, en dosis normalmente moderadas, causa un daño orgánico pero no provoca la muerte del organismo. La toxicidad aguda se presenta cuando una exposición única al agente tóxico causa un daño orgánico que puede provocar la muerte (Klug and Cummings, 1999). Entre las pruebas de toxicidad se encuentran las siguientes: la Dosis Letal Media (DL50), es una prueba de toxicidad, estimada como la dosis de un químico que por diferentes vías (cutánea, oral, intramuscular, respiratoria, etc.), es suministrada a un grupo de estudio, la cual aun período de tiempo (días, semanas) es capaz de producir el 50% de muertes en los animales expuestos al agente evaluado (Thomsom and Weil, 1952) y la Dosis Máxima Tolerada (DMT), se define como la máxima dosis de un químico que al ser suministrado a un cierto número de animales produce fuertes signos de intoxicación, mas no letalidad. El 80% de la Dosis Letal 50 es generalmente utilizada como una buena aproximación a la dosis alta evaluada (Thomsom and Weil, 1952).

5.5.2 Pruebas Citotóxicas y Genotóxicas. Las pruebas Citotóxicas permiten detectar daños a nivel celular expresados como cambios en su morfología, bloqueo de los mecanismos de reparación celular y alteraciones en la cinética del ciclo celular que se producen cuando un agente químico, físico o biológico interactúa con la célula (Klug and Cummings, 1999). Las pruebas Genotóxicas son las que permiten detectar daños a nivel de la molécula del DNA, ocasionados por agentes químicos que interactúan con esta, produciendo alteraciones en su estructura, manifestados como alteraciones cromosómicas, micronúcleos, entre otros y en casos extremos produciendo la muerte celular (apoptosis) (Klug and Cummings, 1999).

5.5.2.1 Prueba de Letales Dominantes en machos. La prueba de Letales Dominantes (LD) *in vivo* en células germinales de ratones machos tratados y apareados con hembras vírgenes no tratadas, mide los efectos citotóxicos/genotóxicos resultantes de la interacción del químico y sus metabolitos con el ADN o las proteínas. Suministra información general sobre el potencial de un agente para interferir con procesos hormonales críticos, metabólicos o genéticos en las gónadas. Además, suministra evidencia de daños inducidos en cualquiera de los estadios celulares de la espermatogénesis, producidos por la pérdida de cromosomas enteros o de fragmentos resultantes de alteraciones estructurales y/o anomalías en el número de cromosomas y por la posible no disyunción de estos. Evalúa también translocaciones producidas en células germinales que pueden ser transmitidas a la generación filial siguiente (Adler *et al*, 1998; EPA, 1998). La inducción de Letales Dominantes, por consiguiente es parte de un spectrum de efectos en células germinales los cuales incluyen daño en la fertilidad o esterilidad, pérdidas pre-implantación y post-implantación de embriones, así como aumento de anormalidades genéticas, morfológicas y de comportamiento en la descendencia (Trasler *et al*, 1986; Anderson *et al*, 1987; Au *et al*, 1990).

En la prueba de Letales Dominantes se registra el número de muertes post-implantación, moles (residuo de reabsorción embrionaria) y embriones muertos (Bateman, 1971). Los embriones vivos se diferencian de los embriones muertos porque estos son rosados y translucidos con la placenta claramente visibles. Los embriones muertos aparecen de color blanco natoso y son más pequeños que los embriones vivos. Las moles aparecen como una masa necrótica indicio de un implante. (Solarte *et al*, 1998).

Las pérdidas post-implantación se pueden subdividir muertes tempranas y muertes tardías. Estas pueden ser inducidas en cualquier tiempo desde la fecundación hasta el nacimiento, no obstante predominan las muertes tempranas (moles) en la medida que han sido consideradas las más indicativas de un efecto Letal Dominante (Favor *et al*, 1978). Las muertes embrionarias tardías pueden también ser causadas por un gran número de indeterminables factores incluyendo condiciones medioambientales adversas tales como la privación nutricional, privación del oxígeno e infecciones microbianas (Bateman, 1958; Röhrborn, 1968).

La prueba de Letales Dominantes en roedores es usada, en sentido estratégico para determinar si una sustancia que es genotóxica en células somáticas es también genotóxica en células germinales. La prueba por consiguiente evalúa la habilidad de un agente para alcanzar las gónadas y los gametos e inducir lesiones las cuales, cuando se expresaban en el huevo fertilizado, causan muerte prematura del embrión en desarrollo (Anderson *et al*, 1983; Green, 1987). Si el desarrollo embrionario se detiene, después de la fertilización, antes de la implantación del huevo en la pared uterina, el suceso es una pérdida pre-implantación, para realizar el registro las hembras son disectadas se procede a realizar la observación de los ovarios mediante un estereoscopio, para contar el número de cuerpos luteos. De otra forma, si el desarrollo se detiene y la muerte del embrión ocurre en un estado posterior a la implantación realizada, el suceso representa una pérdida post-implantación, para realizar el registro las hembras son disectadas y se cuentan el número de Moles (muertes post-implantación temprana) o Embriones Muertos (Muertes post-implantación tardía) (Bateman, 1958).

La prueba de Letales Dominantes puede ser realizada tanto en animales machos como en hembras, no obstante han sido tradicionalmente empleados los machos para estas pruebas (Sudman and Generoso, 1991). Los ratones y las ratas son las especies normalmente preferidas aunque en menor grado de preferencia hámster y cobayos son estudiados (Lyon and Smith, 1971). El empleo mas frecuente de ratones machos que hembras para realizar esta prueba se debe principalmente a los siguientes factores: dificultad en relacionar los efectos genotóxicos del tratamiento, independientemente de las variables fisiológicas como la capacidad hormonal o daño uterino afectando al final la supervivencia de los implantes. Los efectos hormonales y sistémicos pueden influenciar en la ovulación, fertilización, implantación y crecimiento de embriones, dificultando la interpretación de los resultados obtenidos a nivel genético. Los mutágenos en las hembras pueden afectar el porcentaje de

ovulación, afectar el citoplasma del óvulo o interferir en el proceso mitótico; factores muy importantes de tener en cuenta en el momento de interpretar los resultados de la prueba de Letales Dominante en hembras (Bateman and Epstein, 1971); otro factor es la dificultad de distinguir entre respuestas tóxicas y genotóxicas en caso de intensa muerte de oocitos e inhabilidad para evaluar las hembras expuestas y apareadas más de una vez (Maxwell and Newell, 1973; Verschaeve and Léonard, 1984; Mattison and Thomford, 1989). En cualquiera de las especies o sexo a evaluar, las bases del ensayo continúan siendo las mismas. Primero, la exposición de los animales al agente (químico, físico o viral) (Epstein and Shafner, 1968; Reddi and Vasudevan, 1968; Pathki and Polasa, 1988); segundo, el apareamiento de los animales tratados con los animales no tratados del sexo opuesto; y tercero, examen a las hembras apareadas para evaluar la frecuencia de implantes vivos y muertos en la descendencia.

La prueba de Letales Dominantes, suministra evidencia de daños que son transmitidos por vía germinal e indica que el agente evaluado es potencialmente genotóxico en células sexuales y un resultado negativo indica que el compuesto no induce incrementos en la incidencia de Letales Dominantes (muertes pre y post-implantación) y efectos asociados en células germinales; por lo tanto no actúa como un agente mutagénico en estas células (Adler and Tarras, 1990; Katoh *et al*, 1990; EPA, 1998).

5.6 ESPERMATOGÉNESIS EN RATONES

Proceso de desarrollo y maduración de las células germinales dentro de los túbulos seminíferos, para una renovación constante de las células germinales madres, para tener siempre disponibles espermatogonias, las cuales, al pasar por las diferentes etapas de maduración, se transformarán en espermatozoides. Uno de los pioneros en estos estudios fue Brenneke, (1937), quien estudió las células germinales de ratones machos durante la irradiación de rayos X. Posteriormente Oakberg, (1956) estudió la secuencia del proceso de maduración en células germinales desde el estadio de espermatogonia al de espermatozoide y registro que el proceso de la espermatogénesis tardaba 52 días en ratones, (ver figura 1).

Las células germinales del ratón macho, cuando se diferencian en espermatogonias (aproximadamente 18 días de duración) entran en la etapa de mitosis y por procesos de diferenciación se forman los espermatocitos (aproximadamente 13 días de duración). Los espermatocitos sufren dos divisiones meióticas para originar las espermátidas (aproximadamente 14 días de duración), que más tarde mediante procesos de espermiogénesis se transforman en espermatozoides (aproximadamente 7 días de duración). Si se desea evaluar el efecto de un químico a nivel de las células germinales de ratón macho se puede realizar en cualquiera de los estadios mencionados anteriormente (Oakberg, 1956).

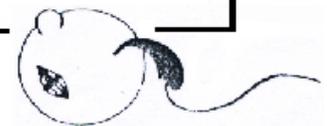
Durante el proceso de espermatogénesis, las células espermatogénicas mantienen una relación estrecha con la célula de Sertoli el único representante celular somático dentro del tubo seminífero. Esta relación favorece la progresión de las diversas fases estructurales, bioquímicas y moleculares que resultan en el desarrollo del espermatozoide. Cuando la relación entre la célula de Sertoli y las células espermatogénicas se altera, la formación de espermatozoides disminuye o se detiene. (Orth *et al*, 1988; Russell *et al* , 1990)

Cuando se desea evaluar las células en cualquiera de los estadios de la espermatogénesis, se trata al macho con el químico, el primer día del tratamiento se le considera como el día cero; cualquiera de las células en los diferentes estadios de la espermatogénesis pueden ser alcanzadas por el químico, pero según el estadio que se propone evaluar se debe permitir que transcurra un número de días suficientes y conocidos después del tratamiento, hasta que las células se transformen en espermatozoides (Oakberg, 1956). En el presente estudio se evaluó el químico (Roundup) en células germinales de ratón *Mus musculus* en el estadio de espermatida, para que esta célula alcanzara a ser madura y diferenciada, en espermatozoide (capaz de fertilizar el ovocito en el apareamiento) se dejaron transcurrir 16 días después del tratamiento (ver figura 1), tiempo en el cual se apareó al ratón con tres hembras vírgenes no tratadas, transcurridos trece días de gestación se evaluó el efecto genotóxico del químico en la viabilidad de los embriones (ver figura 3).

Figura 1. Proceso de la espermatogénesis en ratón.

Días	Estadio		DNA S	Morfología
52	STEM	ESPERMATOGONIAS	■	
51				
50				
49				
48				
47				
46				
45				
44				
43				
42	DIFERENCIADAS	ESPERMATOGONIAS	■	
41				
40				
39				
38				
37				
36				
35				
34	ESPERMATOCITOS	ESPERMATOCITOS	■	
33				
32				
31				
30				
29				
28				
27				
26				
25				
24				
23				
22				
21	ESPERMÁTIDAS	ESPERMÁTIDAS	■	
20				
19				
18				
17				
16				
15				
14				
13				
12				
11				
10				
9				
8				
7	ESPERMATOZOIDES	ESPERMATOZOIDES	■	
6				
5				
4				
3				
2				
1				

Oakberg, 1956.



6. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

6.1 QUÍMICOS

El Roundup, comercialmente conocido con este nombre. Compuesto por el ingrediente activo, la sal isopropilamina de N-fosfometil glicina (480 gramos por litro de formulación a 20 °C) y los ingredientes aditivos, surfactante (POEA) y agua. El Roundup utilizado en el estudio viene en estado líquido, fabricado por MONSANTO, registro de venta ICA No. 0756. Las soluciones del plaguicida fueron preparadas a diferentes concentraciones utilizando como solvente el agua destilada. La Ciclofosfamida, sigma código C-0768, empleado como control positivo en los estudios *in vivo* por ser un mutágeno conocido.

6.2 ANIMALES

Se utilizó un total de 388 ratones de la cepa *Mus musculus* machos y hembras, los animales fueron suministrados por Veterinaria de Colombia (VECOL) de seis semanas, los tratamientos se realizaron a las 10 semanas de edad (prueba de DL₅₀ y LD respectivamente), lo cual favoreció que tuviesen un buen período de aclimatación. Los animales fueron mantenidos y tratados en el Biotério de la Universidad del Cauca. Se distribuyeron al azar en igual número por cajas rotuladas (edad y sexo). Se mantuvieron durante el transcurso del estudio, a una temperatura de 22-23 °C y un ciclo de 12 horas luz/12 horas oscuridad. Su alimentación se basó en concentrado para roedores “Rodentina” el mismo utilizado por VECOL en las primeras semanas de vida (ver anexo D) y agua de grifo, suministrados diariamente a la misma hora, como sustrato se utilizó viruta seca de madera. Todos los días se realizó un adecuado mantenimiento de limpieza.

6.3 TRATAMIENTO

El tratamiento para todas las pruebas se realizó por vía oral, mediante el método de gavage, por medio de una jeringa terminada en punta bola. Se tuvo cuidado de no maltratar el ratón al suministrar el tratamiento para evitar en lo posible el estrés del animal. El tratamiento fue administrado, antes de alimentar a los animales. Los ratones fueron pesados para calcular el volumen del tratamiento aproximado que se debía administrar por kilogramo de peso corporal, para asegurar que los animales recibieran las dosis establecidas (ver figura 2).

6.4 GRUPOS DE ESTUDIO

Un total de 178 machos y 210 hembras fueron distribuidos al azar en 3 grupos de estudio. El primer grupo de animales conformado por 90 ratones machos, para el establecimiento de dosis letal 50 (DL₅₀). Un segundo grupo de 18 ratones machos para el establecimiento de la dosis máxima tolerada (DMT) y un tercer grupo de 70 ratones machos y 210 hembras para la realización de la prueba de Letales Dominantes (ver tabla 1 y 2).

Figura 2. Tratamiento de los animales mediante la técnica de gavage



6.4.1 Dosis Letal Media (DL₅₀). Debido a que en la literatura científica solo se encuentra reportada la DL₅₀ para el Roundup en ratas vía oral, 5000 mg/Kg (Who, 1994; Williams *et al*, 2000), se partió de esta concentración como la dosis para iniciar los tratamientos. Para determinar la DL₅₀ del Roundup, en ratones, se realizaron diferentes ensayos para establecer la dosis que causará la muerte al 50% de un grupo de animales tratados.

En la primera fase de Iniciación, se tomaron 2 ratones a quienes se les administró la primera dosis del plaguicida “Roundup” en un volumen proporcional al peso del ratón para observar las primeras reacciones de intoxicación. Se partió de la DL₅₀ reportada para ratas, luego de observar que no hubo ninguna muerte, se fue incrementando la concentración, tomando registro de todas las manifestaciones de toxicidad de los ratones tratados y el número de muertes por dosis. En la segunda fase de Aproximación, a medida que se acercaba al 50% la letalidad de los animales tratados, se fue incrementando el número de animales (grupos de 4 y 6 ratones) y se reajustaron las concentraciones de las soluciones preparadas del plaguicida, próximas a la DL₅₀. En la fase de Confirmación, una vez establecida la dosis capaz de causar la muerte del 50% de los animales tratados se confirmó esta dosis administrándola a un grupo de 10 animales. En la primera fase se realizaron cinco ensayos, en la segunda fase se realizaron diez ensayos y en la tercera fase de Confirmación se realizaron tres ensayos, (ver tabla 1.).

6.4.2 Dosis Máxima Tolerada (DMT). Teniendo en cuenta el valor de la DL₅₀ a cinco días, se estableció la DMT, como el 80% de la DL₅₀ (Salomone and Heddle, 1983). Se

trataron grupos de 6 ratones mediante 3 repeticiones y se confirmó que a pesar de la toxicidad de esta dosis ningún ratón murió (100% de supervivencia) (ver tabla 1.).

Tabla 1. Diseño experimental para DL₅₀ y DMT

PRUEBA	FASES	DOSIS mg/kg	No DE RATONES EMPLEADOS	No. DE REPETICIONES	TOTAL	% LETALIDAD
DL ₅₀	Iniciación	5000	2	5	10	0
	Aproximación Inicial	10187,7- 9801,2	4	5	20	100-75
	Aproximación Final	9801,2 - 8161,3	6	5	30	75-67
	Confirmación	6991,8	10	3	30	50
DMT	Confirmación	5593.44	6	3	18	0
TOTAL					108	

6.4.3 Selección de las Dosis Experimentales. Para la prueba de Letales Dominantes, se seleccionaron tres dosis: una baja, una media y una alta. La dosis alta fué la equivalente a la dosis máxima tolerada (DMT) o sea el 80% de la DL₅₀, la dosis media fue equivalente al 50% de la DMT y la dosis baja el 50% de la dosis media o sea el 25% de la DMT.

Una vez definidas las dosis experimentales se conformaron tres grupos de estudio: El grupo control negativo, tratado con agua destilada, el grupo experimental tratado con el plaguicida Roundup, con las diferentes dosis: alta, media y baja, y el grupo control positivo tratado con Ciclofosfamida, sustancia altamente mutagénica. (EPA, 1998) (ver tabla 2).

6.5 PRUEBA DE LETALES DOMINANTES EN MACHOS

El estudio para la evaluación del Roundup se realizó *in vivo*, utilizando la prueba de Letales Dominantes en machos, para evaluar el efecto citotóxico/genotóxico en células germinales (espermátidas).

6.5.1 Grupos de Estudio. Se conformaron tres grupos de estudio: El Grupo Control Negativo con 14 ratones, tratados con agua destilada; el Grupo Experimental, tratados con Roundup con diferentes dosis: baja, media, alta (cada una con 14 animales, para un total de 42 ratones) y el Grupo Control Positivo con 14 ratones tratados con Ciclofosfamida (ver

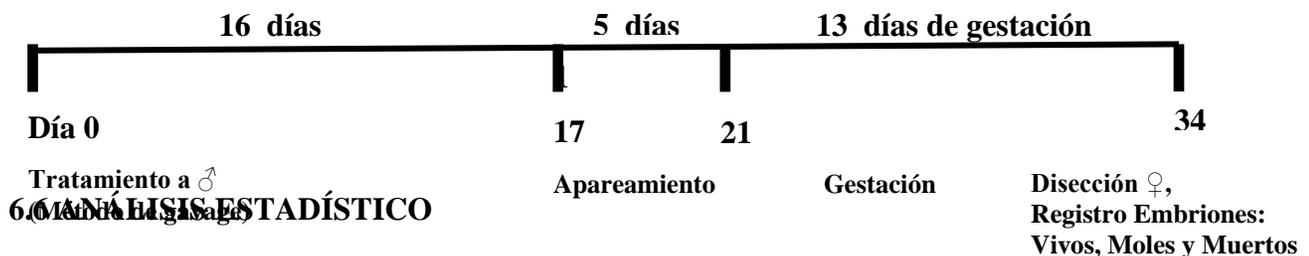
tabla 2). De esta manera se buscó obtener por grupo de estudio 420 implantes para ser analizados (Whorton and Elbert, 1981; Venih and Parry, 1984; Adler *et al*, 1998; EPA, 1998)

6.5.2 Protocolo de Letales Dominantes en Espermátidas de Ratón *Mus musculus*. En la prueba de Letales Dominantes los machos antes de ser tratados fueron distribuidos al azar en cajas previamente rotuladas y distribuidas en forma aleatoria (sistema doble ciego). Después se administró a cada macho la respectiva dosis única por vía oral mediante la técnica de gavage (día 0); después de 16 días de haber sido tratados, cada macho fué apareado con 3 hembras vírgenes, al quinto día (tiempo en el que se presume que las hembras han sido fertilizadas) se retiraron los ratones machos y 13 días después del apareamiento las hembras fueron sacrificadas por dislocación cervical y disectadas para registrar embriones vivos, moles o masas necróticas (muertes post-implantación temprana) y embriones muertos (muertes post-implantación tardía) (Whorton and Albert, 1.981; EPA, 1996; EPA,1998; Dallegrave *et al* , 2003). (ver tabla 2 y figura 2).

Tabla 2. Diseño experimental para la prueba de Letales Dominantes

GRUPOS DE ESTUDIO	TRATAMIENTO	DOSIS mg/kg	No. DE RATONES POR TRATAMIENTO		TOTAL
			Machos	Hembras	
Control Negativo	Agua	0	14	42	56
Grupo Experimental	Dosis baja Roundup	1398,36	14	42	56
	Dosis media Roundup	2796.72	14	42	56
	Dosis alta Roundup	5593.44	14	42	56
Control Positivo	Ciclofosfamida	50	14	42	56
TOTAL	5		70	210	280

Figura 3. Protocolo experimental para la prueba de Letales Dominantes en espermátidas de ratón *Mus musculus*.



Los datos fueron registrados en formatos establecidos, tanto para la prueba de Dosis Letal Cincuenta (DL₅₀) como para la prueba de Letales Dominantes (LD) (ver anexos A y B) posteriormente los datos fueron codificados para ingresarlos al programa Excel, una vez organizados fueron transferidos al paquete estadístico SPSS (Statiscal Package for to Social Scientific), herramienta esencial para analizar los resultados mediante la prueba de Kruskan Wallis y la Prueba de Ducam, utilizada para datos no paramétricos para identificar si existe o no diferencia significativa entre los embriones muertos, moles y total muertos post-implante de los diferentes tratamientos.

En el estudio se tuvo en cuenta tres variables, de tipo dependiente que son: Número de embriones vivos, embriones muertos y moles, estas variables toman esta clasificación porque su frecuencia va a depender de las tres dosis de Roundup, estableciéndose ésta última como variable de tipo independiente. Ambas variables son de naturaleza cuantitativa haciendo que su nivel de medición sea de razón numérica. Las dosis del Roundup también se pueden considerar como tipo categórico (nominal) cuando se las clasifica como alta, media y baja. (ver cuadro 4). El análisis estadístico se realizó mediante pruebas no paramétricas debido a que no se acomoda el índice de varianza debido a la naturaleza y tamaño de la muestra.

Cuadro 4. Variables Analizadas

NOMBRE	TIPO DE VARIABLE	NATURALEZA	NIVEL DE MEDICION
Embriones vivos	Dependiente	Cuantitativa	Razón
Embriones muertos	Dependiente	Cuantitativa	Razón
Moles	Dependiente	Cuantitativa	Razón
Tres dosis Roundup	Independiente	Cuantitativa	Razón

En los análisis de genotóxicidad/citotóxicidad mediante la prueba de Letales Dominantes a nivel de células germinales (espermátidas) se identificó el efecto letal sobre éstas, de los diferentes tratamientos empleados en el estudio comprenden un control negativo (Agua destilada), tres dosis experimentales de “Roundup” (baja, media, alta) y un control positivo (Ciclofosfamida).

Debido a que los datos originales se registraron en forma de número de moles, número de embriones vivos y número de embriones muertos (datos enumerativos), se decidió realizar el análisis estadístico utilizando la prueba de Kruskan Wallis y la prueba de Duncan para datos no paramétricos que permite identificar si existe o no diferencia significativa entre los embriones muertos, moles y total de muertos post-implante de los diferentes tratamientos empleados en la investigación.

7. RESULTADOS

En la evaluación de los efectos tóxicos, citotóxicos/genotóxicos del plaguicida Roundup se emplearon células germinales en estadio de espermatida de ratón.

7.1 ANIMALES

Los ratones *Mus musculus* se adquirieron de una calidad microbiológica certificada por VECOL, en óptimas condiciones de salud, con edades entre 8-12 semanas y un peso promedio de 35 gramos. Las pruebas se realizaron con un buen grado de confiabilidad, puesto que se trató de eliminar las variables individuales de los animales al máximo. Durante el tiempo de experimentación los animales se mantuvieron saludables y en óptimas condiciones ambientales y de asepsia. Un total de 388 ratones fueron empleados.

7.2 PRUEBA DE TOXICIDAD

En los diversos ensayos para hallar la dosis letal cincuenta, los síntomas de toxicidad que presentaron los roedores al ser tratados con el Roundup, en las concentraciones por encima de la dosis 6991,8 mg/Kg (DL₅₀), fueron hiperactividad excesiva en los primeros minutos después del tratamiento, seguido de un estado de pasividad repentina, en algunos de ellos se generó diarrea con sangre, así como secreción de sangre por los ojos y por los oídos, terminando con la muerte del animal.

En los grupos tratados con la DL₅₀, los ratones presentaron fuertes síntomas de toxicidad como: contracciones abdominales, agresividad, hendiduras peritoneales, hiperactividad, inflamación en su cuerpo, pérdida de peso, pérdida de coloración de orejas y cola, respiración lenta, movimientos descoordinados, pelo erizado y lagrimeo. Después de dos horas de haber sido tratados presentaron un estado de pasividad y somnolencia. Luego de 24 horas iniciaron su recuperación, normalizando sus funciones motrices.

Los síntomas de toxicidad en los grupos tratados con la dosis máxima tolerada (Dosis alta), aunque fueron fuertes, similares al de la DL₅₀, en estos grupos no se presentaron muertes de los animales. Los síntomas fueron disminuyendo en los grupos tratados con las dosis media y baja en los cuales los síntomas de toxicidad fueron leves y casi nulos respectivamente, generándose un corto periodo de pasividad, después del cual volvieron a su estado normal.

7.2.1 Dosis Letal Cincuenta (DL₅₀): Como la DL₅₀ del Roundup en ratones no fue posible encontrarla en la literatura científica, se tomó como base la DL₅₀ del Roundup en ratas vía oral, 5000 mg/Kg (WHO, 1994). Después de realizar varios ensayos con varias concentraciones del plaguicida en diferentes grupos de ratones, de dos, cuatro, seis y diez;

la Dosis Letal Cincuenta establecida en ratones *Mus musculus*, vía oral como dosis única por cinco días fue de 6991,8 mg/ Kg de peso corporal (ver tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje de Letalidad Inducida a Diferentes Concentraciones del Roundup para Determinar la DL₅₀

DOSIS mg/Kg DE ROUNDUP	% DE LETALIDAD
5000	0
10187,7	100
9801,2	75
8161,3	67
6991,8	50

En la tabla 3, se aprecia una relación dosis-efecto o asociación positiva entre la dosis administrada y el porcentaje de letalidad, el porcentaje de letalidad es proporcional al incremento de la dosis.

7.2.2 Dosis Máxima Tolerada (DMT): Según Salomone and Heddle, (1983) la DMT se define como el 80% de la DL₅₀ establecida, la cual fue calculada en 5593,44 mg/Kg. Esta dosis fue evaluada en grupos de seis ratones, durante cinco días después del tratamiento, y no se presentó la muerte de los animales, aunque si se observaron fuertes síntomas de toxicidad. La DMT fue seleccionada como la dosis experimental alta de exposición, para realizar la prueba de Letales Dominantes.

7.3 SELECCIÓN DE DOSIS EXPERIMENTALES

Para la prueba de Letales Dominantes se emplearon tres dosis experimentales del plaguicida Roundup, en dosis únicas, la Dosis Máxima Tolerada de Roundup se seleccionó como la dosis alta, 5593,44 mg/Kg; la dosis media se tomó como el 50% de la DMT, 2796,72 mg/Kg; y la dosis baja como el 50% de la dosis media seleccionada (25% de la DMT), 1398,36 mg/Kg (ver tabla 4)

Tabla 4. Resultados Dosis Letal Cincuenta, Dosis Máxima Tolerada y Dosis Experimentales seleccionadas

PRUEBA	DOSIS ROUNDUP mg/Kg
DL ₅₀	6991.8
DMT	5593.44
Dosis Experimentales	Baja 1398,36
	Media 2796.72
	Alta 5593.44

7.4 PRUEBA LETALES DOMINANTES (LD)

7.4.1 Registro de letalidad dominante post-implantación: Para establecer el índice de Letales Dominantes (LD) en las hembras preñadas, de trece días de gestación, apareadas con animales machos y luego de haber transcurrido 16-20 días del tratamiento, se observó y registró el estado de los embriones producto de la fertilización por espermatozoides que, en el momento del tratamiento de los animales, se encontraban en el estadio de espermátidas (células objeto de la evaluación) (Oakberg, 1956).

Figura 4. Embriones vivos, tratamiento grupo control negativo (agua de grifo)

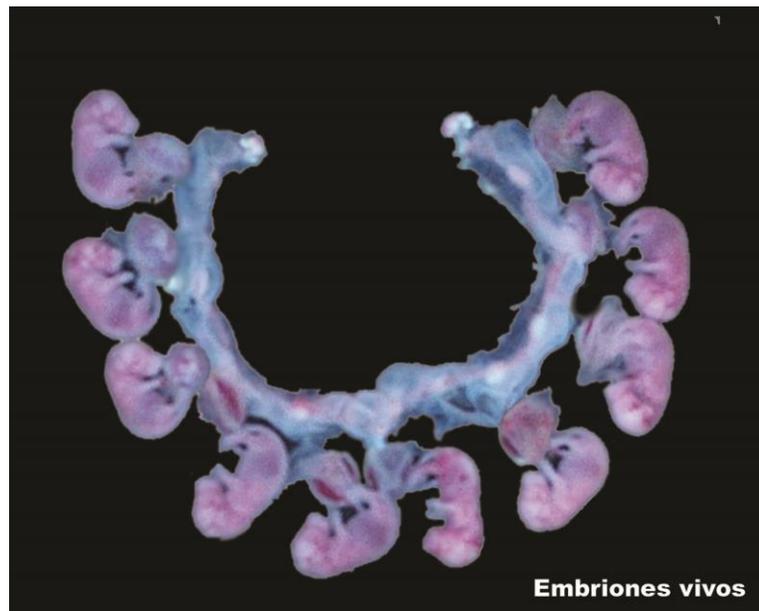


Figura 5. Muertes tempranas post-implantación (Moles) inducidas por el plaguicida "Roundup" a dosis baja, en espermátida de ratón *Mus musculus*

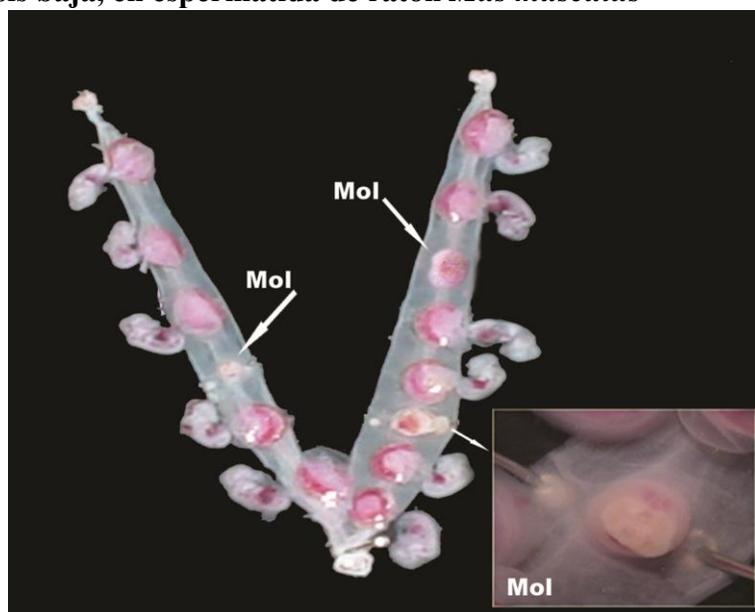


Figura 6. Muertes tardías post-implantación, inducidas por el plaguicida “Roundup” a dosis media, en espermátida de ratón *Mus musculus*



Figura 7. Muertes tempranas post-implantación (Moles), inducidas por el plaguicida “Roundup” a dosis alta, en espermátida de ratón *Mus musculus*

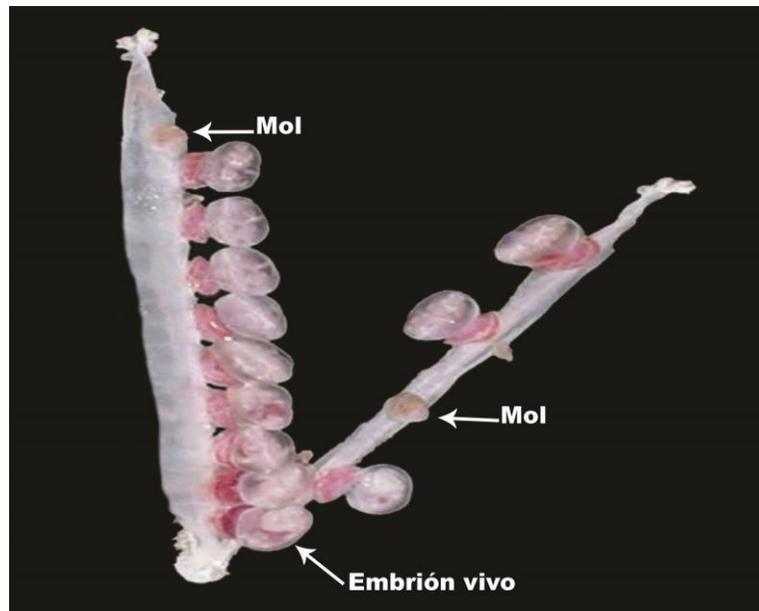
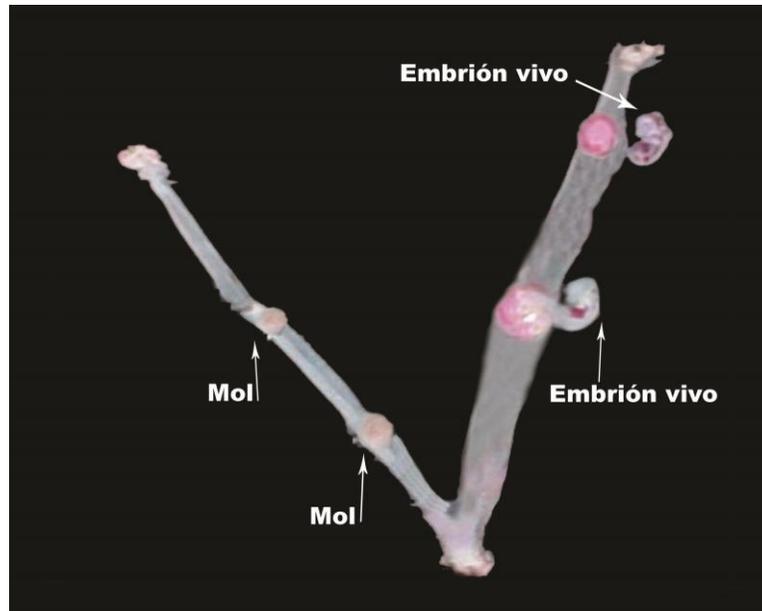


Figura 8. Muertes tempranas post-implantación (Moles), inducidas por la Ciclofosfamida (control positivo) sobre espermatida de ratón *Mus musculus*



La desigualdad en el número de ratones hembras por tratamiento, se debió a que todas las hembras incluidas en el experimento no respondieron al apareamiento o fecundación (ver tabla 5). En la Tabla 6, se registran los índices de moles, embriones muertos y mortalidad total (muertos + moles), con su respectiva medida de variabilidad (error estándar) y significancia estadística, identificados al analizar entre 6 a 14 ratones hembras preñadas, por cada tratamiento.

El análisis de los marcadores de letalidad dominante (moles y embriones muertos) se hizo después de haber sido apareadas durante un periodo de cinco días con ratones machos tratados con dosis únicas del plaguicida “Roundup”, a las concentraciones de: 0 mg/Kg (control negativo, solvente puro), 1398,36 mg/Kg (concentración baja), 2796.72 mg/Kg (concentración media), 5593.44 mg/Kg (concentración alta) y 50 mg/Kg de Ciclofosfamida (control positivo).

Debido a que los datos no cumplen con la asunción de normalidad (Shapiro-Wilk: $p < 0.05$) e igualdad de varianza (Levene: $p < 0.05$) y al pequeño tamaño de la muestra (n), los datos se analizaron mediante prueba de significancia estadística no paramétrica, con un nivel máximo de significancia de 0,05.

Tabla 5. Porcentaje de Fertilidad Inducida a Diferentes Dosis de “Roundup”

GRUPOS	TRATAMIENTOS	DOSIS mg/Kg	NÚMERO DE HEMBRAS APAREADAS	NÚMERO DE HEMBRAS PREÑADAS	% DE FERTILIDAD
Control Negativo	Agua	0	42	14	33,33
Experimental	Dosis Baja Roundup	1398,36	42	6	14,29
	Dosis Media Roundup	2796.72	42	12	28,57
	Dosis Alta Roundup	5593.44	42	7	16,67
Control Positivo	Ciclofosfamida	50	42	14	33,33
TOTAL	5		420	53	

Tabla 6. Índice promedio (\bar{X}) de Moles (M), Embriones Muertos (EM) y Mortalidad Total (MT), con su respectivo error estándar (EE) y significancia estadística (P)

GRUPOS	TRATAMIENTOS	DOSIS mg/Kg	$\bar{X} \pm EE^*$			n
			Moles	Embriones Muertos	Mortalidad Total	
Control Negativo	Agua	0	0,000 \pm 0,00	0,000 \pm 0,00	0,000 \pm 0,00	14
Experimental	Dosis Baja Roundup	1398,36	0,112 \pm 0,09 ^a	0,000 \pm 0,00	0,112 \pm 0,09 ^c	6
	Dosis Media Roundup	2796.72	0,006 \pm 0,005	0,059 \pm 0,02	0,064 \pm 0,02	12
	Dosis Alta Roundup	5593.44	0,012 \pm 0,01	0,072 \pm 0,03	0,084 \pm 0,03	7
Control Positivo	Ciclofosfamida	50	0,000 \pm 0,00	0,131 \pm 0,04 ^b	0,13 \pm 0,04 ^c	14
		P	0,066	0,006	0,014	

* Índice promedio con su Error Estándar, identificado entre 11 – 15 implantes/ hembra, resultado de analizar n ratones hembras.

P = Significancia estadística según la prueba de Kruskal-Wallis.

^a Tratamiento con el valor más alto que difiere significativamente del resto de tratamientos, según prueba de Duncan.

^b Tratamiento con el valor más alto que difiere significativamente del control negativo y de la concentración baja, según prueba de Duncan.

^c Tratamientos con los valores más alto que difieren significativamente del control negativo, según prueba de Duncan.

En la tabla 6, se observa que el tratamiento de Roundup con el valor más alto de Mortalidad Total fue la dosis baja. Los resultados de esta dosis comparados con los resultados del control positivo (tratamiento que como es de esperarse, dio significativamente positivo), no coinciden, en cuanto al efecto para cada biomarcador. Es así como para Moles, la dosis baja de Roundup fue la más letal, en la cual, al tratar ratones machos con 1398,36 mg/Kg de Roundup, indujo en los ratones hembras apareadas, un índice de moles significativamente mayor que en el resto de tratamientos, según la prueba de Duncan (ver figura 9). Para Embriones Muertos, en cambio, el tratamiento más letal fue cuando los ratones machos tratados con el control positivo, a una concentración de 50 mg/Kg, se aparearon con ratones hembras e indujeron una mortalidad significativamente mayor a la observada en el control negativo (0 mg/Kg) y en la dosis baja del Roundup (1398,36 mg/Kg) (ver figura 10). En el índice de Mortalidad Total (embriones muertos + moles), los tratamientos más letales fueron: la concentración baja y el control positivo, los cuales indujeron un índice de mortalidad significativamente mayor al observado en el control negativo (ver figura 11).

Según la prueba de Kruskal-Wallis, los índices promedio de Moles por hembra obtenidos en los diferentes grupos tratados a diferentes dosis del plaguicida Roundup, no alcanzan a ser estadísticamente significativos ($P=0,066$), sin embargo, como se expresó anteriormente, en la dosis baja se observó un incremento en la frecuencia (\bar{x}) de Moles que resultó ser significativamente mayor (prueba de comparaciones múltiples de Duncan) que el resto de tratamientos. Los índices promedios de Embriones Muertos por hembra y los índices totales de Mortalidad Total (muertes post-implantación) por hembra, presentaron valores estadísticamente significativos, $P=0,006$ y $P=0,014$ respectivamente.

En el grupo control negativo los animales fueron tratados con agua, solvente utilizado para preparar las soluciones del plaguicida "Roundup". No se registró Letalidad Dominante (Embriones Muertos o Moles) por lo cual el índice promedio de Mortalidad Total (muertes post-implantación) en este grupo fue nulo (ver figura 11).

El índice promedio de Mortalidad Total (muertes post-implantación) por hembra, en los grupos tratados con las dosis del plaguicida "Roundup", arroja un valor de 0.112 ± 0.09 para la dosis baja, decrece a un valor de 0.064 ± 0.02 para la dosis media y asciende a un valor de 0.084 ± 0.03 para la dosis alta, siendo el grupo tratado con la dosis baja (1398,36 mg/Kg) el que registró el mayor índice promedio de Mortalidad Total por hembra, el cual es similar al índice promedio registrado en el control positivo. En consecuencia, no es posible afirmar que exista una relación "dosis-efecto" debido a que el mayor índice fue observado en la concentración baja (1398,36 mg/Kg) y el menor índice en la concentración media (2796.72 mg/Kg). Como control positivo se empleó el mutágeno Ciclofosfamida a la concentración de 50 Mg/Kg, induciendo un índice de Mortalidad Total por hembra de $0.13 \pm 0,04$ (ver figura 11).

Teniendo en cuenta que, según la significancia estadística registrada mediante la prueba de Kruskal-Wallis ($P=0,066$), los índices promedio de Moles por hembra, obtenidos en los distintos grupos tratados a diferentes concentraciones del plaguicida “Roundup”, no son estadísticamente significativos, se concluye, basándose en los índices de Mortalidad Total de embriones registrados a la dosis baja, que el Roundup es citotóxico/genotóxico *in vivo* a nivel de la espermatogénesis en ratones machos tratados con Roundup, que al fecundar a ratones hembras, genera letalidad en los descendientes durante su desarrollo uterino. La letalidad inducida por la dosis baja de Roundup es tan alta como la del control positivo, pero con “blancos” diferentes a nivel del desarrollo embrionario. Sin embargo, en esta investigación no se evidencio efecto citotóxico/genotóxico de las dosis 2796,72 y 5593,44 mg/Kg de Roundup (dosis media y alta), las cuales indujeron índices promedio de Mortalidad Total de 0,064 y 0,084 respectivamente, que no difieren significativamente del control negativo.

Figura 9. Índice de Moles por efecto del plaguicida “Roundup” sobre espermátidas de ratones tratados

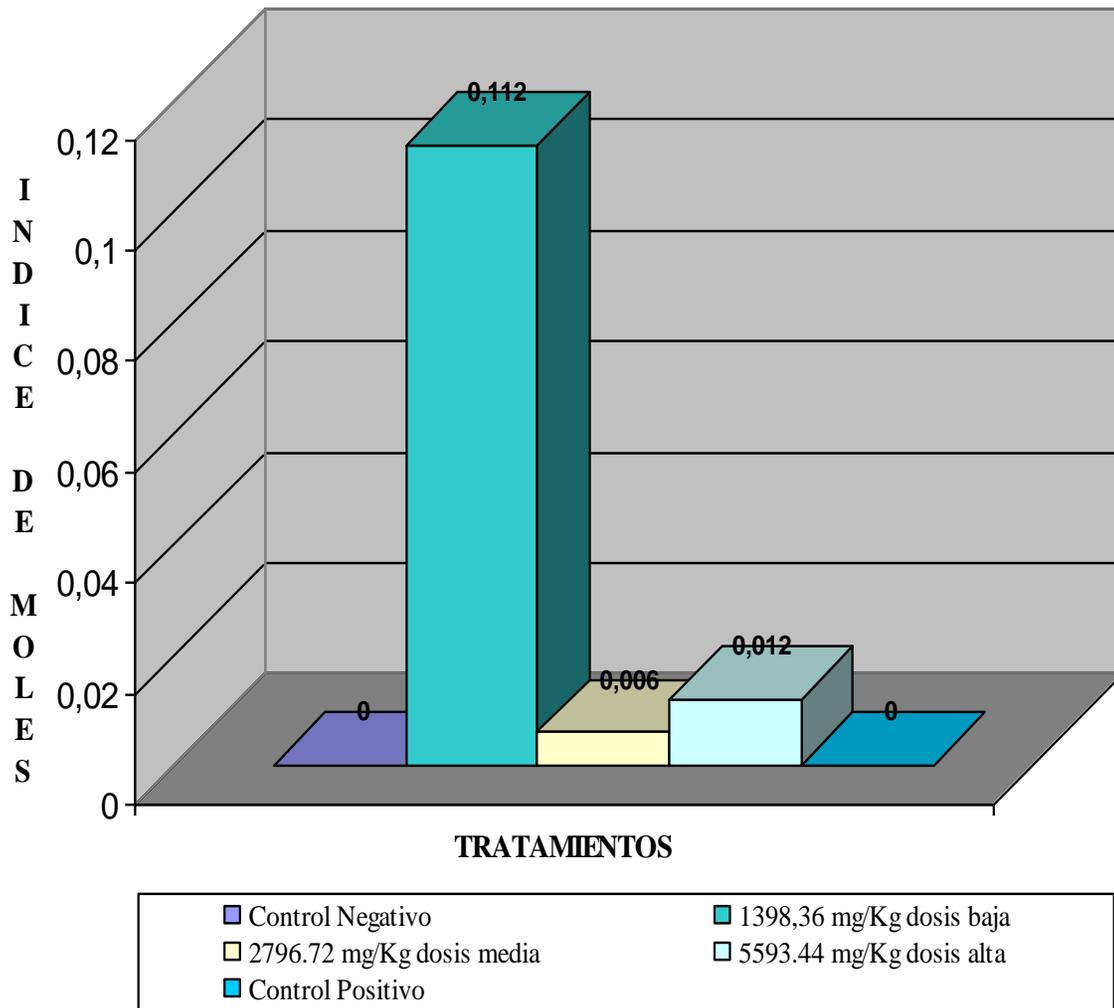


Figura10. Índice de Embriones Muertos por efecto del plaguicida “Roundup” sobre espermátidas de ratones tratados

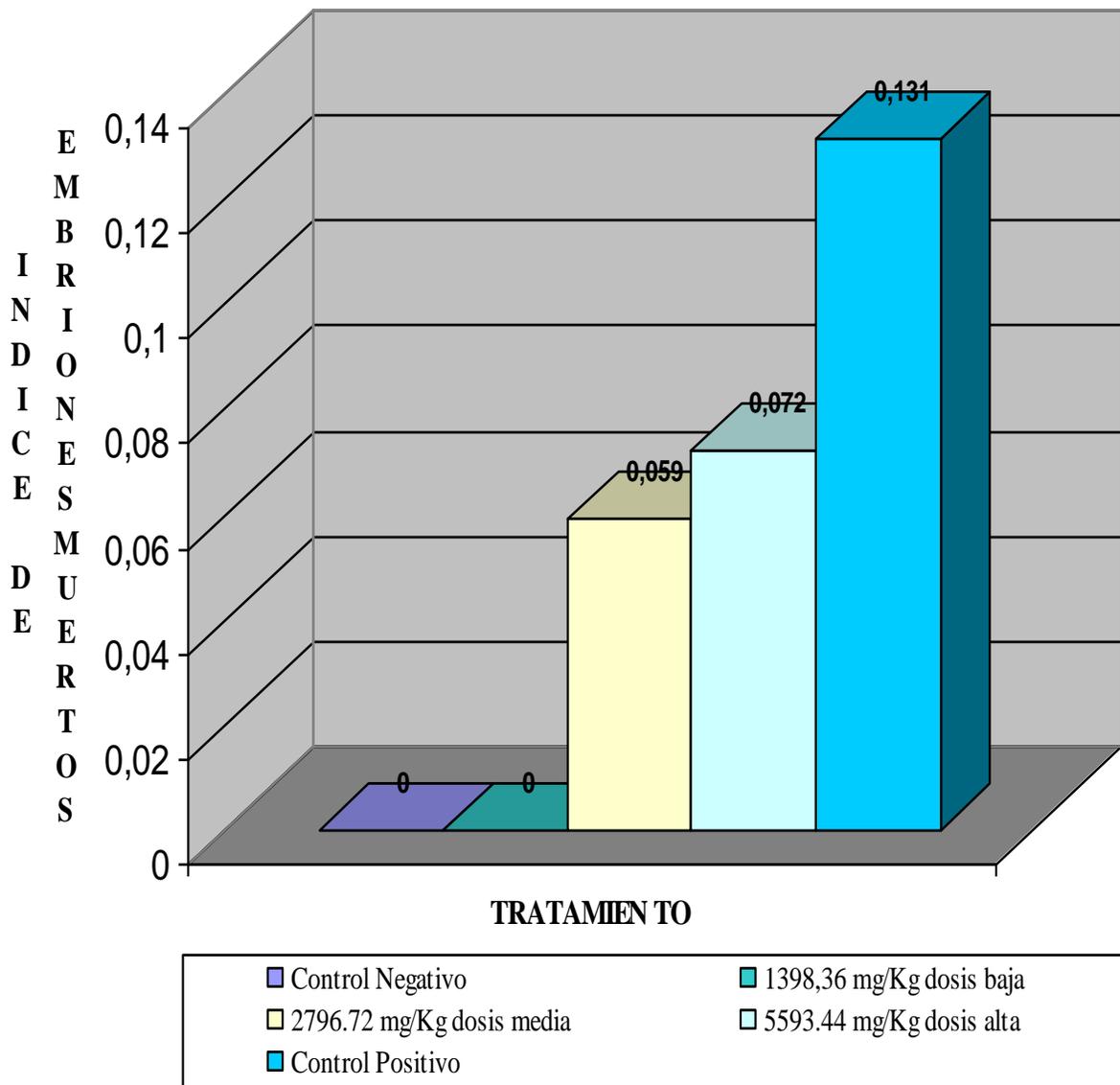
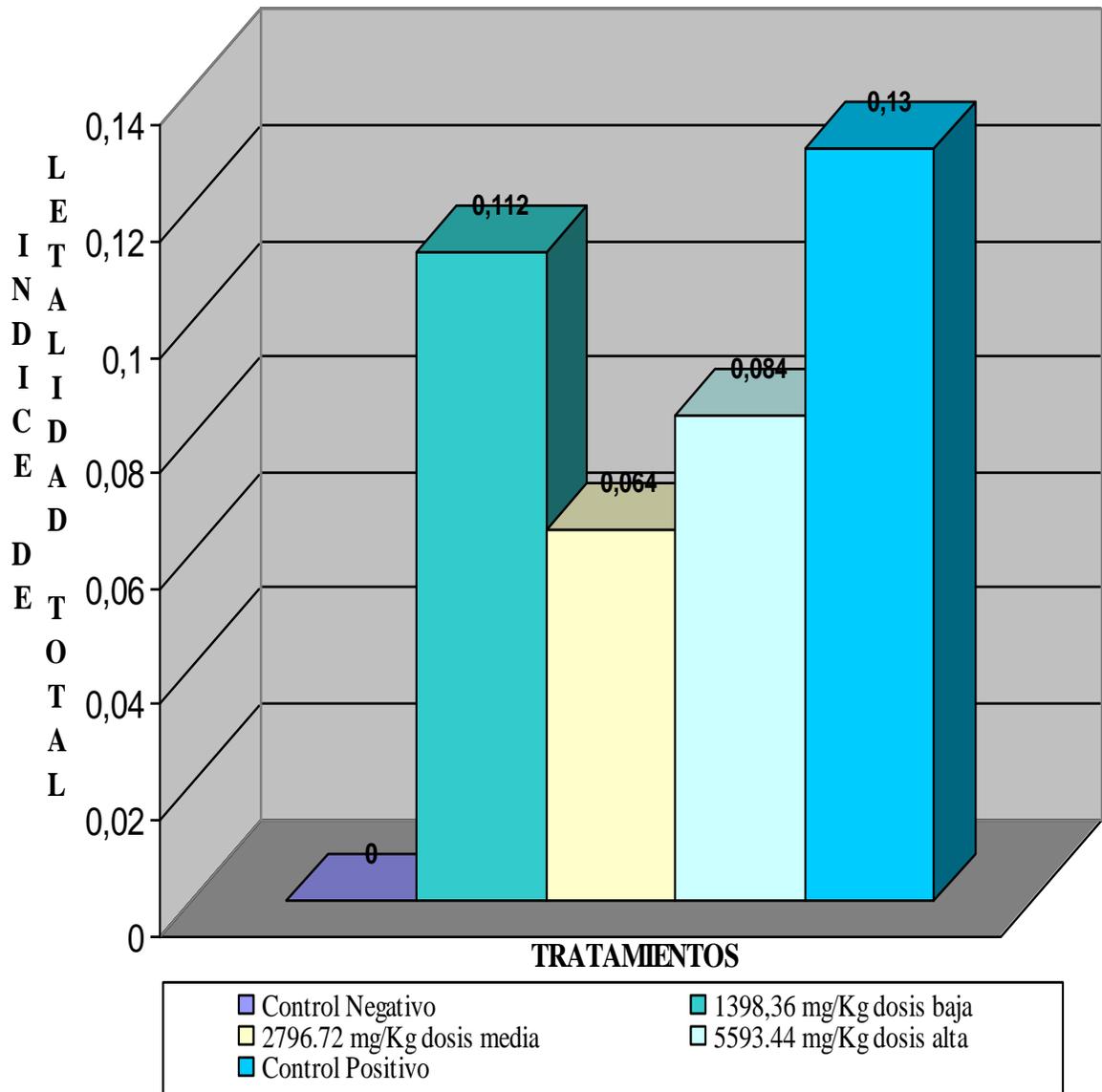


Figura 11. Índice de Mortalidad Total (Embriones muertos + moles) por efecto del plaguicida “Roundup” sobre espermátidas de ratones tratados



8. DISCUSIÓN

El uso extensivo del plaguicida Roundup en la erradicación de cultivos ilícitos, entre otros, especialmente en el sur occidente colombiano (Cauca, Nariño, Putumayo), es objeto de polémica por sus efectos adversos para otros cultivos, la salud humana, los animales y otras formas de vida (Maldonado *et al*, 2002). La información contradictoria sobre los efectos tóxicos, citotóxicos y genotóxicos del Roundup, en la literatura científica, ha motivado a la realización de este estudio titulado “Evaluación de los efectos Tóxicos, Citotóxicos/Genotóxicos *in vivo* del Roundup (glifosato) mediante la prueba de Letales Dominantes en ratón (*Mus musculus*)”. Se encuentra mucha información, sobre los efectos tóxicos a corto plazo, ocasionados por el Roundup en diferentes sistemas biológicos, pero la información sobre los efectos citotóxicos y genotóxicos (mutagénicos, carcinogénicos, teratogénicos) es deficiente y contradictoria (ver cuadro 2). El Roundup contiene ingredientes activos (glifosato), compuestos inertes o surfactantes que pueden tener un efecto aditivo, sinérgico o potenciador del ingrediente activo. Debido a que la toxicidad de los plaguicidas muestra diferencias cuando se emplean los ingredientes activos y la formulación comercial, es de gran importancia evaluar la genotoxicidad del Roundup que es el que realmente se aplica a los cultivos.

Una variedad de organismos tales como moscas, ratones, ratas, hámster y cobayos, han sido usados para la prueba de Letales Dominantes, sin embargo los ratones son los organismos más empleados, para la experimentación y la evaluación de los efectos genotóxicos (mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos) de sustancias (Lyon and Smith, 1971; Green *et al* , 1987), debido a la gran similitud en el metabolismo de los ratones, que a menudo responde a los químicos tóxicos de manera similar que los humanos, característica que los hace un modelo animal de experimentación adecuado (Rhombert *et al* , 1990). Además, los ratones ofrecen ventajas para la investigación por su alta frecuencia de apareamiento, ya que presentan desarrollo y período de gestación cortos (17-21 días) y alto número de implantes (aproximadamente de 10 a 15 implantes por hembra) (EPA, 1998). Se han realizado varios estudios en ratones *Mus musculus* con la prueba de Letales Dominantes, evaluando drogas, plaguicidas, químicos carcinogénicos (Ciclofosfamida, Mitomicina C, Bleomicina, entre otros, ver cuadro 1).

En la realización del presente estudio, las condiciones para el mantenimiento de los animales, mencionadas en la metodología, se implementaron teniendo en cuenta las recomendaciones de los protocolos de Whorton and Elbert, (1981); EPA, (1998) y los trabajos de investigación desarrollados por autores como Tyl and Friedman, (2003), Chamorro *et al* , (2003); Barnett and Lewis, (2003); Sign, Kumar and Jha, (2003); Dallegrave *et al* , (2003) y Brake and Evenson, (2004). El Bioterio de la Universidad del Cauca, lugar donde se desarrolló el estudio, aunque no es el óptimo, por ser una edificación

nueva y construida para el mantenimiento de animales, tiene las condiciones requeridas, para realizar este tipo de estudios.

La prueba de Letales Dominantes es una prueba indirecta que puede ser realizada en animales machos y hembras, sin embargo, se utilizó ratones machos, porque estos poseen períodos gametogénicos rápidos y numerosos, lo cual los convierte en una población eficiente para evaluar el plaguicida. Los estudios que utilizan prueba de Letales Dominantes por lo general no se realizan en hembras debido a que en estas los efectos hormonales sistémicos pueden influenciar en la ovulación, fertilización, implantación y crecimiento de los embriones, dificultando la interpretación de los resultados obtenidos a nivel cito/genético (Maxwell and Newell, 1973; Verschaeve y Léonard, 1984; Mattison y Thomford, 1989).

El número de animales empleados en el estudio fue establecido según Whorton and Elbert, (1981) y la EPA, (1998), que sugieren utilizar como mínimo 30-50 hembras por grupo de estudio, para ser analizadas. Se aparearon 14 machos y 42 hembras (en relación 1:3, respectivamente) por cada grupo de estudio, con el propósito de obtener aproximadamente 420 implantes (Whorton and Elbert, 1981). Por presentarse un bajo porcentaje de fertilidad en el estudio, se obtuvieron un promedio de 138 implantes por grupo de estudio. El período de apareamiento fue de 5 días, tiempo en que se presume los machos preñan a las hembras (Chamorro *et al*, 1999; Herbold *et al*, 2001). La relación de apareamiento (1:3) se eligió según los investigadores Ray and Hyneck (1973); Dean and Johstone (1977) y Ehling *et al* (1978), quienes afirman que la proporción ideal de apareamiento es desde 1:2 hasta 1:3 para machos de alta fecundidad.

La mayoría de los estudios que evalúan sustancias *in vitro* o *in vivo*, por lo general se realizan en células somáticas (linfocitos, eritrocitos, células de médula ósea), valorando los efectos en el organismo en si, pero son escasos los estudios en células germinales, que, además, de valorar el daño en este tejido, advierten sobre los efectos adversos en las futuras generaciones. La evaluación de sustancias en células germinales con la prueba de Letales Dominantes es poco común, lo que corrobora la falta de bibliografía en la evaluación del Roundup por medio de esta prueba. Siendo una prioridad evaluar los efectos de este plaguicida, estudios como el presente en células germinales son de gran importancia por el interés que despiertan hacia el conocimiento de sus efectos, en este caso al hacer una relación (extrapolar resultados) entre los sistemas ratón-humano, se puede prevenir enfermedades, protegiendo la salud individual y la salud de las futuras generaciones.

Teniendo en cuenta el número limitado de animales, recursos económicos y materiales disponibles, se seleccionó únicamente un estadio de la espermatogénesis para la evaluación del Roundup. Se escogió el estadio de espermátida porque en otros estadios como en la espermatoogonia, las células son altamente sensibles a la muerte celular, por lo que

imposibilitan la evaluación de las sustancias (Alder, 1997), el estadio de espermatocitos tienen poca sensibilidad según Barnett y Lewis, (2003), mientras que las espermatidas son la fase celular más sensible para evaluar tóxicos (Schimenti, Hanneman and schimenti, 1997) ya que en este estadio las células desarrollan procesos bioquímicos complejos y graduales de diferenciación morfológica para originar los espermatozoides (Erickson, 1990; Witt and Bishop, 1996). Además, el estadio de espermatida consume una mayor cantidad de oxígeno y de energía por lo cual requiere de elementos nutricionales del medio. De lo anterior se deduce que al interactuar el químico con estas células este podría alterar su bioquímica así como la morfología del espermatozoide afectando su función ya que la espermatida tiende a alargarse además, de iniciar el proceso de la formación de la cola (ver figura 1 y anexo E). También se conoce que durante el período de espermatida hay ausencia de procesos de reparación del ADN (Witt y Bishop, 1996), luego si el químico lesiona al ADN puede dar origen a mutaciones y estas en el estadio de espermatozoides se mantendrían, afectando el normal desarrollo del futuro embrión. Segal (1974), indica que existen diferencias marcadas en cuanto a la exposición de las espermatidas y espermatozoides ya que las espermatidas se encuentran protegidas dentro de una barrera fisiológica formada por las células de Sertoli, mientras que los espermatozoides se encuentran fuera de ella, en el epidídimo; esto hace que las células objeto de evaluación se encuentren menos expuestas a las sustancias del tratamiento, una vez administrado a los animales. Lo anterior es muy relevante ya que si una sustancia afecta las células en estadio de espermatida sugiere que esta es muy tóxica al penetrar la barrera de protección fisiológica de las células de Sertoli.

La administración del tratamiento se hizo por la vía oral, mediante el método de gavage, método comúnmente utilizado para evaluar plaguicidas en ratones (Tyl and Friedman, 2003; Dallegrave *et al*, 2003). Para la administración del tratamiento se empleó la vía oral, por ser la forma de exposición más frecuente en que las personas entran en contacto con el Roundup, quienes lo pueden consumir a través del agua y los alimentos fumigados. Muchos investigadores en la evaluación de sustancias con animales, han sido fuertemente criticados ya que la vía de exposición que han utilizado ha sido la administración intraperitoneal, luego los efectos en el organismo de una sustancia a través de esta vía es muy diferente a los efectos generados por la vía oral, dado a que esta última involucra, además, el proceso de la digestión. Debido a que la administración oral es la vía que más se acerca a la realidad, los resultados de esta investigación permiten hacer una relación más precisa con los posibles efectos que se puedan generarse en los humanos expuestos.

Uno de los estudios que más se ha evaluado el glifosato, el Roundup y sus componentes es el de Williams *et al*, (2000), quienes reportan un cuadro de estudios sobre los efectos genotóxicos de estas sustancias. Este cuadro muestra un resumen de estudios con resultados positivos, negativos y contradictorios, lo cual pone en duda la inocuidad de este plaguicida, generando más polémica acerca de los verdaderos efectos del Roundup. Además, se reporta solo un estudio con la prueba de Letales Dominantes, lo que incentiva a realizar más

estudios, en especial en células germinales, para esclarecer la realidad de los efectos de este y otros plaguicidas.

La toxicidad de los plaguicidas muestra diferencias cuando se evalúan los ingredientes activos y la presentación comercial, ya que esta última contiene, además, de los ingredientes activos, compuestos inertes o surfactantes que pueden tener un efecto aditivo, sinérgico o potenciador del ingrediente activo (Gold and Ames, 1990). El presente estudio muestra la importancia de evaluar los efectos de la formulación comercial de Roundup, que es con el que realmente se fumiga. Adam *et al*, (1997) y la Organización Mundial de la Salud, concluyen que la toxicidad del glifosato aumenta cuando la sustancia se combina con el surfactante (POEA) Marc *et al*, en el año 2002 realizaron un estudio en erizo de mar en etapa de división embrionaria e indicaron que el Roundup afecta la regulación de ciclo celular, retrazando la activación de la CDK1/ciclina B de la cinética de la primera división celular. Considerado la universalidad entre especies de la regulación de la CDK1/cyclina B, estos resultados cuestionan la seguridad del Roundup en la salud humana. Gómez (2003), describe que el Roundup contiene aditivos engañosamente llamados “inertes” como el surfactante polioxietilenoamina (POEA), ácidos orgánicos e isopropilamina, quienes potencian el efecto del ingrediente activo (glifosato), además el glifosato al degradarse en el ambiente produce ácido aminometilfosfónico (AMPA), el cual es tóxico. Los investigadores se sorprenden al constatar que siempre el Roundup es más tóxico que su ingrediente activo (glifosato) y sugieren que la presencia de coadyuvantes en el Roundup refuerzan la acumulación del glifosato; Richard en el 2005, mostraron que el glifosato es tóxico en células de placenta humana en concentraciones bajas y que este efecto aumenta con la concentración y el tiempo o con la presencia de coadyuvantes del Roundup.

Los síntomas tóxicos que manifestaron los animales en este estudio luego de los tratamientos con el Roundup fueron: agresividad, hiperactividad, movimientos descoordinados, falta de equilibrio, diarrea, irritación en ojos, hemorragia nasal, contracciones abdominales, inflamación corporal, lagrimeo, los cuales son similares a los reportados por varios autores al evaluar el Roundup o el glifosato en humanos y otros sistemas.

Existen varios estudios que corroboran la toxicidad del Roundup, se encuentran los reportados por el Instituto Health and safety executive, (1995) y Pesticida Monitoring Unit, (1993), en el Reino unido, que registraron que el glifosato ha sido uno de los principales responsables de accidentes de toxicidad. La agencia de protección de los Estados Unidos (EPA, 1993) reporta que el glifosato es el plaguicida que más daños causa, relacionados con efectos oculares a los trabajadores que lo manipulan. Investigadores como Adam *et al*, (1997); Maldonado, (2002) e Ibáñez, (2002) sostienen que la gran mayoría de la población expuesta al Roundup presentan una sobreestimulación del sistema nervioso central, dolor de cabeza, mareos, náuseas, vómitos, dolor de estomago, diarrea, debilidad, estrés, irritación en ojos, irritaciones dérmicas, hemorragia nasal, problemas respiratorios,

aumento de la presión sanguínea y reacciones alérgicas. Gómez, en el año 2003, reporta síntomas similares a los anteriores en personas intoxicadas por envenenamiento. Los estudios de Teratogénicidad mostraron que la administración oral de dosis altas de glifosato durante el embarazo a ratas Charles River, del día 6 al 19 de gestación y a conejos del día 6 al 27, causó toxicidad materna. Los mayores efectos observados fueron la muerte de los embriones y aumento en el número de fetos con la osificación reducida (WHO, 1994). Szarek *et al*, (2000), evaluaron el efecto del Roundup en hepatocitos de la carpa (*Cyprinus carpio*) y concluyeron que el plaguicida es tóxico para la carpa en las concentraciones aplicadas. Dallegrave *et al*, (2003), indican que el Roundup es tóxico e induce retraso en el desarrollo del esqueleto fetal en ratas.

Los resultados obtenidos sobre los efectos de una sustancia con la prueba de Letales Dominantes no se pueden caracterizar únicamente como respuesta a daños genéticos, ya que los efectos citotóxicos no pueden ser excluidos, lo anterior conlleva a caracterizar los resultados como un efecto citotóxico/genotóxico en células germinales.

En este estudio, los índices de Letalidad Dominante (mortalidad total) en los grupos de ratones tratados a las concentraciones de 0 mg/Kg (agua, control negativo), 1398,36 mg/Kg (concentración baja), 2796.72 mg/Kg (concentración media), 5593.44 mg/Kg (concentración alta) y 50 mg/Kg de Ciclofosfamida (control positivo); fueron de 0,000; 0,112; 0,064; 0,084 y 0,13; respectivamente. Según la significancia estadística de Duncan la dosis baja fue la única que indujo un índice significativo de daño Letal Dominante en las condiciones de este estudio. En forma sorprendente las dosis media y alta mostraron un descenso en el índice de letalidad (ver tabla 6 y figura 10), las cuales indujeron índices promedios de mortalidad de que no difieren significativamente del control negativo. Los índices de letalidad indican que no se da una respuesta dosis-efecto, contrario al estudio realizado por Dallegrave *et al*, 2003, quien evaluó la teratogenicidad del Roundup (oral) en ratas gestantes, a diferentes concentraciones, las cuales generaron alteraciones, mostrando una relación dosis-efecto. El Roundup en esta investigación indujo mutaciones Letales Dominantes estadísticamente significativas en ratones machos a la concentración baja, luego se concluye que el Roundup es citotóxico/genotóxico *in vivo*, en células germinales de ratones *Mus musculus*, en las condiciones particulares dadas en este estudio. La letalidad inducida por la dosis baja es tan alta como la del control positivo, pero con “blancos” diferentes a nivel de desarrollo embrionario (mayor número de muertes tempranas, moles, para la dosis baja y mayor número de muertes tardías para la ciclofosfamida).

Los resultados de genotoxicidad obtenidos en este trabajo concuerdan con los de Rank (1993), que en *Allium cepa* observó un aumento significativo de alteraciones cromosómicas luego del tratamiento con 1.44 y 2.88 mg/L de Roundup, efecto que no se observó al evaluar su componente activo (glifosato). Peluso (1998), revela que el Roundup induce aductos en el ADN en los riñones e hígado de ratones tratados con 600 mg/Kg del plaguicida. La evaluación del ingrediente activo del Roundup no evidenció formación de

aductos en el ADN, lo que permite predecir que el daño se debió a otro u otros componentes de la mezcla del plaguicida. El Roundup es particularmente peligroso, debido a que este producto comercial posee un agente surfactante, el 1,4-dioxano, que se estima es diez veces más carcinogénico que la misma sal de glifosato (Molina, 1995). Bastidas y Gómez en 1999, evaluaron el potencial mutagénico de la mezcla Roundup; Arsenal e Inex con la prueba de Ames presentando resultados mutagénicos para las cepas TA 100, en la concentración inferior. Galindo (1996), evidenció daño genético representado en una frecuencia significativamente alta de Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH/metafase) a la dosis más baja empleada de tratamiento con Roundup (50 mg/Kg) e incremento dosis-dependiente en la frecuencia de células alteradas (Alteraciones cromosómicas) en ratones tratados (50, 100 y 150 mg/Kg de Roundup). Hardell and Ericsson (1999), revela la relación entre glifosato y Linfoma No Hodgkin (LNH). Los investigadores sostienen que la exposición al plaguicida puede incrementar los riesgos de desarrollar esta enfermedad, no obstante, las bases moleculares que soportan la asociación entre la exposición a este plaguicida y el riesgo de LNH no se han logrado esclarecer. Estudios sobre mutagénesis requeridos para el registro del glifosato por lo general no han mostrado acción mutagénica, pero los resultados son diferentes cuando los estudios se realizan con fórmulas comerciales en base a glifosato (Kaczewer, 2001).

Maldonado *et al* (2002), reveló en un estudio de monitoreo genético en una población expuesta a las fumigaciones aéreas, que el Round Up Ultra produce un daño genético significativo considerable; analizó linfocitos de sangre periférica mediante la prueba de Alteraciones Cromosómicas y la prueba Cometa, encontrando aproximadamente un promedio de 48 % de células dañadas en la población donde no debería haber más de un 5%. Guerrero y Muñoz, en el 2003 evaluaron el Roundup *in vivo* mediante la prueba de Micronúcleos en branquias de *Oreochromis niloticus*, registrando un número promedio de micronúcleos estadísticamente significativo en las concentraciones de Roundup (0,003; 0,006; 0,012 mL/L) mostrando una respuesta dosis-efecto. Aunque los resultados positivos de efecto Letal Dominante presentados en este estudio dieron a una concentración superior a las utilizadas en los estudios anteriormente mencionados, deben tenerse muy en cuenta ya que a diferencia de la mayoría, la administración del plaguicida fue por vía oral. Además, como el Roundup dio citotóxico/genotóxico a bajas dosis, mientras que a las dosis superiores no, se podría pensar que a menores dosis podrían aumentar los efectos adversos.

Según las especificaciones de uso del plaguicida que vienen en la etiqueta del producto comercial Roundup para fumigación casera (200 mL por 20 litros de agua) y según la cantidad especificada para las fumigaciones aéreas (23,4 L por 1700 L/hectárea), la población no estaría expuesta a grandes concentraciones del plaguicida por fumigación, no obstante, las fumigaciones son periódicas y por largos periodos de tiempo, lo que permite predecir que los organismos a pesar de exponerse a bajas concentraciones, estas al ser constantes podrían causar daños sistémicos por bioacumulación del producto. Según denunciado la investigadora colombiana Elsa Nivia en un informe publicado en 2001 titulado “Las fumigaciones sobre cultivos ilícitos si son peligrosas”, en los Estados Unidos

se recomienda para cultivos agrícolas el uso del Roundup en concentraciones del 1%, solo sobre las malezas y con equipo de protección. En Colombia se está usando el Roundup Ultra en concentraciones de hasta el 26%, vía aérea, fumigándose de manera indiscriminada sobre alimentos, fuentes de agua, personas y animales.

Si bien en esta investigación el Roundup en bajas concentraciones dio citotóxico/genotóxico en células germinales (espermátidas), los resultados no son concluyentes debido al bajo porcentaje de fertilidad de los animales. No fue suficiente el número de embriones para tener un buen tamaño de la muestra que permitiera tener un adecuado poder estadístico. No obstante, estos resultados alertan sobre los potenciales efectos del Roundup en células germinales y en consecuencia los efectos adversos en las futuras generaciones, ya que ponen en duda la inocuidad del plaguicida en células germinales y sugieren que el Roundup debe ser considerado como un plaguicida potencialmente dañino para la salud humana.

Las hembras empleadas en el experimento registraron un bajo porcentaje de fertilidad en todos los grupos de tratamiento incluyendo el control negativo (tratamiento con agua). A pesar de contar con un grupo de animales de fecundidad certificada (VECOL) y de haber tenido en cuenta las recomendaciones de distintos protocolos para el mantenimiento de los animales en el bioterio, además de que la asepsia fue un parámetro tenido en cuenta para la realización del estudio, se descarta la posibilidad de que dicho porcentaje se deba al tratamiento con el plaguicida, ya que la preñez baja también fue observada en el grupo control negativo. Ningún animal manifestó síntomas de enfermedad. Por lo anterior se presume que el causante del bajo porcentaje de preñez pudo haber sido el estrés de los animales, los cuales por los factores estresantes que son desconocidos, por instinto pudieron haber desequilibrado su ciclo reproductivo, inhibiendo el apareamiento, debido a las condiciones no óptimas para la procreación y el desarrollo de la especie.

Estudios han mostrado que el estrés puede desencadenar un desequilibrio fisiológico terminando en una reducción en la productividad de los ratones: Juan José Borrego, profesor titular de microbiología de la Universidad de Málaga testifica que el estrés disminuye la capacidad del sistema inmunológico para contrarrestar las enfermedades infecciosas; en otra investigación sobre cáncer de piel, se halló que ratones que fueron sometidos a factores estresantes desarrollaron cáncer en la piel en menos de la mitad del tiempo que en ratones que no estaban sometidos al estrés, después de exponerlos a rayos ultravioleta (Johns Hopkins Medical Institutions, 2004) y en otro estudio se encontró que el estrés es un inductor de aborto en ratones (Gasawara y Furukawa, 2002). Lo anterior nos indica que el estrés es un factor muy poderoso que afecta a los organismos desequilibrando sus funciones, reduciendo su productividad, en el caso del presente estudio, hipotéticamente inhibiendo la reproducción en la mayoría de los animales.

Los índices de letalidad dominante estadísticamente no significativos arrojados en los grupos tratados con Roundup con las dosis media y alta, pueden haberse presentado por el desencadenamiento del mecanismo de defensa de los ratones que a estas dosis, estimularon un aumento de la secreción en el hígado de las enzimas detoxificantes como la glutatión S-transferasa (GST) la cual redujo los metabolitos tóxicos del Roundup en el sistema, disminuyendo su potencial genotóxico. La enzima GST de la fase II del metabolismo reacciona con los metabolitos intermediarios de las sustancias químicas, inhibiendo así la formación de enlaces covalentes con macromoléculas como el ADN. El mecanismo por el cual los seres vivos, además, de poseer un sistema enzimático de bioactivación de compuestos también puede reaccionar ante la exposición de un plaguicida con la liberación de enzimas de detoxificación, como la GST (Farber, 1990). Resultados de estudios con plaguicidas como el endosulfán, mostraron que esta sustancia potencia significativamente la actividad de la GST en hígado de ratas (Srikanth and Seth, 1990) y estimula la producción de la GST en la glándula hepatopancreática del Crayfish *procambarus clarkii*, a dosis altas (Blat *et al*, 1988). Otros estudios han documentado que el endosulfán induce la producción de enzimas metabolizantes del hígado (Wells and Milhorn, 1985; Garretson *et al*, 1985; Klaasen, 1985) como GST y la alcoholdehidrogenasa (Singh y Pandey, 1989). Los resultados del estudio de Collazos *et al*, 1995, sobre el efecto genotóxico del endosulfán *in vivo* con la prueba de alteraciones cromosómicas muestran que a bajas dosis, este compuesto es genotóxico, mientras que a dosis altas no. Galindo (1996), en la evaluación genotóxica del Roundup evidenció daño genético representado en una frecuencia significativamente más alta de Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH), a la dosis más baja empleada, comparada con la observada en el grupo control, efecto genotóxico que concuerda con el registrado en el presente estudio. Según Au *et al* (1988, 1991), la exposición de ratones a 40 y 100 p.p.b. de benceno es más peligroso genéticamente que a la dosis más alta de 1000 p.p.b. en la cual, descendía el porcentaje de células alteradas. Para confirmar la asociación de sus resultados con el fenómeno de detoxificación por la enzima GST, ellos realizaron un estudio sobre inducción de esta, a dosis altas por la mezcla de químicos y el benceno y registraron un incremento significativo de la enzima.

Por lo tanto se sugiere que el mecanismo de detoxificación por la GST, pudo presentarse en los ratones tratados en las condiciones dadas de exposición del Roundup en células germinales, en el estudio. Según los resultados *in vivo*, la exposición a bajas dosis del Roundup produce efectos citotóxicos/genotóxicos que no son inducidos por la dosis media y alta, igualmente como se registró en otros estudios donde la exposición a algunos químicos como el benceno a bajas dosis causa efectos más severos que a dosis altas. Zinder *et al* (1988), reportaron que la exposición crónica a bajas dosis (300 p.p.m.) de benceno, es más tumor-génico que la exposición a 1200 p.p.m. Handerson, (1989), observaron que los metabolitos más tóxicos son formados en ratón a las más bajas concentraciones de exposición a benceno. Dos estudios de exposición crónica del glifosato en ratas a diferentes concentraciones de dosificación, dieron los siguientes resultados: en el primero se observó en los testículos de las ratas, un aumento significativo de tumores celulares intersticiales a dosis bajas; sin embargo, hubo ausencia del mismo efecto con las dosis más altas usadas en

el segundo estudio (WHO, 1994). Estudios con resultados como los anteriores permiten predecir que muchos químicos a dosis altas, desencadenan un incremento en la producción de las enzimas de detoxificación, las cuales disminuyen los potenciales adversos, mientras que a dosis bajas, el organismo activaría sus mecanismos de defensa en igual medida a la cantidad del químico, produciendo una detoxificación baja, lo que causaría que el químico entre en contacto con macromoléculas como el ADN produciendo daño.

En consecuencia se concluye que en las condiciones dadas en este estudio, el Roundup a la concentración de 1398,36 mg/Kg, dosis baja, es citotóxico/genotóxico *in vivo*, en la fase de espermatida de la serie espermatogénica, en los ratones machos tratados con Roundup. Una vez las espermatidas han alcanzado el estadio de espermatozoides y de fecundar los ovocitos de las hembras no tratadas, generan letalidad en los descendientes durante su desarrollo uterino por la cantidad de daño genotóxico generado en los espermatozoides.

Por lo anterior no es prudente descartar el potencial genotóxico del plaguicida Roundup. Además, existen pocos estudios a nivel de células germinales para recomendar a este plaguicida como inocuo. Es importante realizar estudios que determinen el efecto del Roundup en la población expuesta en condiciones reales no solo en células somáticas sino también en células germinales. Estos estudios se constituyen como herramientas valiosas para proteger la población y las generaciones futuras al igual que los organismos del entorno.

Con este tipo de trabajos se puede incentivar a los investigadores de nuestro país a adelantar más estudios relacionados sobre los efectos de los plaguicidas en especial del Roundup en células germinales para diseñar programas de prevención de problemas de salud. Los resultados de este estudio serán comunicados y divulgados en eventos científicos con el propósito de motivar la reflexión crítica y el diseño de estrategias de prevención, control y reducción del uso de plaguicidas como el Roundup, empleado extensivamente en las actividades agrícolas y por el estado en la erradicación de cultivos ilícitos.

9. CONCLUSIONES

En las condiciones dadas en este estudio se estableció como Dosis Letal Cincuenta (DL₅₀) oral a 5 días del Roundup en ratón (*Mus musculus*) la dosis de 6991.8 mg/Kg de peso corporal y como Dosis Máxima Tolerada (DMT) 5593.44 mg/Kg de peso corporal.

Esta investigación *in vivo* demostró que el Roundup administrado por vía oral induce un efecto Letal Dominante, en células germinales (estadio de espermatida) para *Mus musculus*, tratados con 1398,36 mg/Kg (dosis baja) de peso corporal, ya que aumenta significativamente el índice de mortalidad en el grupo tratado con relación al control. Sin embargo, no se evidenció efecto letal dominante para las concentraciones 2796,72 y 5593,44 mg/Kg de Roundup (dosis media y alta respectivamente), las cuales indujeron índices promedios de mortalidad de 0,064 y 0,084 respectivamente, que no difieren significativamente del grupo control negativo.

Si bien el Roundup en bajas concentraciones dio citotóxico/genotóxico en células germinales (espermátidas), los resultados no son concluyentes debido al bajo porcentaje de fertilidad que presentó la especie de ratón *Mus musculus*. No obstante, estos resultados alertan sobre los potenciales efectos del Roundup.

Los resultados positivos en la inducción de Letales Dominantes a bajas concentraciones permiten extrapolar el potencial citotóxico/genotóxico en humanos, no solo en células germinales sino también en células somáticas.

Basados en la revisión bibliográfica se puede concluir que el Roundup como mezcla compleja, que contiene otros ingredientes además de su ingrediente activo, el glifosato, induce un efecto Letal Dominante en células germinales.

La determinación del potencial citotóxico y genotóxico de los plaguicidas en células germinales mediante la prueba de Letales Dominantes es relevante para tomar medidas de control con el fin de reducir o eliminar el uso indiscriminado de los plaguicidas potencialmente dañinos, de esta manera prevenir problemas de salud como la teratogenicidad, la mutagenicidad o problemas de fertilidad en las personas expuestas directa o indirectamente. Lo más importante conocer los posibles efectos que puedan generarse en las generaciones futuras.

10. RECOMENDACIONES

Dado que el plaguicida Roundup dio citotóxico/genotóxico a bajas dosis, se deben realizar más estudios en las mismas condiciones a menores dosis, para ver si en estas se presenta una relación dosis-efecto.

Debido a que la especie *Mus musculus* resultó de baja fecundidad, es necesario realizar el apareamiento de los animales en relación 1:1, como lo recomiendan los investigadores Ray and Hynneck (1973); Dean and Johstone (1977) y Ehling *et al* (1978), en estos casos

Es relevante realizar estudios sobre los efectos del Roundup con la prueba de Letales Dominantes en todos los estadios de la espermatogénesis, para comparar la sensibilidad entre estos.

Teniendo en cuenta que esta investigación arrojó resultados positivos, es recomendable realizar estudios a bajas dosis en células somáticas para evaluar efectos cancerígenos.

Es muy importante evaluar los efectos del Roundup por monitoreo genético de las poblaciones expuestas tanto con pruebas en células somáticas como en células germinales, ya que los humanos pueden ser más susceptibles a esta sustancia.

Teniendo en cuenta los procesos de detoxificación metabólica de los organismos, sería importante y necesario realizar estudios sobre la inducción de enzimas de detoxificación como la Glutation S-transferasa (GST) a dosis bajas y altas de Roundup para observar el grado de producción de estas enzimas en condiciones específicas.

BIBLIOGRAFIA

ADAM, A; MARZUKI, A; RAHMAN, H. and AZIS, M. The oral and intratracheal toxicities of Roundup and its components to rats. En: Veterinary Human Toxicology. Vol. 39 (3) (1997); p. 147-151.

ADLER, Ilse-Dore; BOOTMAN, James; FAVOR John; HOOK Graham; SCHRIEVER, Gerlinde; WELZL, Gerhard and WHORTON Elbert. Recommendations for statistical designs of *in vivo* mutagenicity tests with regard to subsequent statistical analysis. En: Mutation Research. Vol. 417 (1998); p. 19–30.

ALDER, ID and EL TARRAS, A. Clastogenic effects of cisdiamminedichloroplatinum II. Induction of chromosomal aberrations in primary spermatocytes and spermatogonial ítem cells of mice. En: Mutation Research. New York. Vol. 243 (1990); p. 173-178.

ALDER, ID. Stage-sensitive and dose-response study after gamma-irradiation of mause primary spermatocytes. Int J. Radiant Biol Relat Stud Phys Chem Med; 3° (1): 79-85 (1997)

AMANN, P. Structure and function of the normal testis and epididymis. En: Journal of the American College of Toxicology. Vol. 8 (1989); p. 457-471.

AMES, B.N., DURSTON,W.E., YAMASAKI,E. and LEE,F.D. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. En: Proc. Natl Acad. Sci. USA. Vol. 70 (1973); p. 2281–2285.

ANDERSON, D; BATEMAN, A. and McGREGOR, D. Dominant Lethal mutation assays. En: United Kingdom Environmental Mutagen Society. Swansea. (1983); p. 143-1164.

ANDERSON, D; BRINKWORTH, M.H.; JENKINSON, P. C; CLODE, S. A; CREASY, D. and GANGOLLI, S. Effect of ethylene glycol monomethyl ether on spermatogenesis, dominant lethality, and F₁ abnormalities in the rat and the mouse after treatment of F₀ males. En: Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis. Vol. 7 (1987); p. 141-158.

AP, Li and TJ, Long. An evaluation of the genotoxic potential of glyphosate. Monsanto Company En: Fundam Appl Toxicol. Vol. 10 (3) (1988); p. 537-546.

ARBUCLE, T. An exploratory Analysis of the Effects of Pesticide Exposure on the Risk of Spontaneous Abortion in an Ontario Farm Population En: Health Perspectives, vol. 109 No. 8. (2001).

ARNI, P; ASHBY, S; CASTELLINO, S; ENGELHARDT, G; HERBOLD, B; PRISTON, R; A. J. and BONTINCK, W. Assessment of the potential germ cell mutagenicity of industrial and plant protection chemical as part of an integrated study of genotoxicity *in vitro* and *in vivo*. En: Mutation Research. Vol. 203 (1988); p. 177-184.

ASHBY, J and CLAPP, M. The rodent dominant lethal assay: A proposed format for data presentation that alerts to pseudo dominant lethal effects. En: Mutation Research. Vol. 330 (1995); p.209-218.

ATKINSON, D. Toxicological properties of glyphosate: a summary. The Herbicide Glyphosate. En: Grossband, E, Atkinson, D. (Eds.), Butterworths, London, UK, (1985); pp. 127-133.

AU, W. Genotoxic effects of a sub-acute low level inhalation exposure to a mixture of carcinogenic chemicals. En: Mutation Research. Vol.203 (1988); p. 103-115.

AU, W ; CANTELLI-FORTI, G; HRELIA, P. and LEGATOR, M. S. Cytogenetic assays in genotoxic studies: somatic cell effects of benzene and germinal cell effects of dibromochloropropane. En: Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis. Vol. 10 (1990); p. 125-134.

AU, W. Monitoring human population for effects of radiation and chemical exposures using cytogenetic techniques. En: Occupational Medicine. Vol.6 (1991); p. 597-611.

BAND, PR; *et al.* Identification of occupational cancer risks using a population-based cancer registry. En: Recen Results Cancer Res. (1990). p. 106-121.

BARNETT, Lois and LEWIS, Susan. Chlornaphazine and chlorambucil induce Dominant Lethal mutations in male mice. Reviews in Mutation Research. Elsevier. USA. 543 (2003).

BASTIDAS, Diela y GÓMEZ, Melba. Evaluación del potencial mutagénico de mezclas de plaguicidas usadas en el Huila. Neiva 1999. Trabajo de Investigación. Universidad Surcolombiana: Facultad de Ciencias de la Salud.

BATEMAN, A.J. and EPSTEIN, S. Dominant lethal mutations in mammals, in: A. Hollaender_Ed., Chemical Mutagens. Principles and Methods for their Detection Vol. 2 Plenum, New York, (1971), p. 541–568.

BATEMAN, A.J. and EPSTEIN, S.S. In Chemical Mutagens. Principles and Methods for their Detection, Hoallender, A. En: Plenum Press (1971); p. 541.

BATEMAN, A.J. Dominant lethal mutations in mammals their deletion. Hollaander (Ed), En: Plenum press. Vol. 2 (1971); p. 541-568.

BATEMAN, A.J. The dominant lethal assay in male mouse, in: T. Kilbey Ed, Hand Book of Mutagenicity Test Procedures, En: ElsevierrNortholland Biomedical Press, Amsterdam, (1977), p. 325–334.

BATEMAN, A. J. The partition of dominant lethals in the mouse between unimplanted eggs and deciduomata. En: Heredity. Vol. 12 (1958); p. 467-475.

BERNARDI, S; BROGLIATTI, G and OYARZABA M. Diferencias de fertilidad en ratones seleccionados por peso: En: Analecta veterinaria. Vol 19,1/2, (1999); p. 11-17

BHUNYA, S.P and PATI, P.C. Effect of Deltamethrin, a synthetic pyrethroid, on the induction of chromosome aberrations, micronuclei and sperm abnormalities in mice. En: Mutagenesis. Vol. 5 (3) (1990); p. 229-232.

BLAT, A; ALMAR, M. M. and ROMERO, F. J. The effect of two sulphur-containing pesticides, fenitrothion and endosulfan, on glutathione (GSH) content and on GSH S-transferase and gamma-glutimyl transpeptidase activities in midgut gland of the American Red Crayfish *Procambarus clarkia*. Drug-Metabol-Drug-Interact. Vol. 6 (1988); p. 383-394.

BORREGO, Juan José. El estrés afecta el resultado de las infecciones. Profesor Titular de Microbiología. Universidad de Málaga. España. <http://www.encuentros.uma.es/encuentros/29/29estres>.

BRAKE, Denise G and EVENSON, Donald P. A generational study of glyphosate-tolerant soybeans on mouse fetal, postnatal, pubertal and adult testicular development. En: Food and Chemical Toxicology, Vol. 42 (2004); p. 29–36.

BRENNEKE, H. En: Strahle Therapie. (1937); p. 60-214.

BROOKE, I.M. and SMITH, A.J. The rodent dominant lethal assay: regulatory questions concerning appraisal of an industrial chemical as exemplified by 1,3 butadiene, *Mutat. Res.* 332 (1995). p.119–121.

CHAMORRO, Germán; GARDUÑO, Leticia; MARTINEZ, Elizdath; MADRIGAL, Eduardo; TAMARIZ, Joaquín and SALAZAR, María. Dominant Lethal study of α -asarona in male mice. En: Toxicology Letters. Elsevier. México. Vol. 99 (1998); p. 71-77.

CHAMORRO, Germán; MADRIGAL, Eduardo; RUÍZ, L. E. and SALAZAR, María. Dominant Lethal study of α -asarona in male and female rats after short-term treatment. En: Medical Science Research. México. Vol. 27 (1999); p. 337-339.

CHAMORRO, Germán; SALAZAR, María; TAMARIZ, Joaquín; DÍAZ, Francisco and LABARRIOS, Fernando. Dominant Lethal study of α -asarona in male and female mice after sub-cronic treatment. En: Phytotherapy Research. México. Vol. 13 (1999); p. 308-311.

CHAMORRO, Germán; VEGA, Fernando; MADRIGAL, Eduardo; MERCADO, Efraín and SALAZAR, María. Germ Cell mutagenicity of γ etil- γ fenil-butirolactone (EPBL) detected in the CF1 mouse-Dominant Lethal study. En: Toxicology Letters. Elsevier. México. Vol. 142 (2003); p. 37-43.

CLERMONT, Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogenical renewal. En: Physiological Reviews. Vol. 52 (1972); p. 198-236.

COLLAZOS, Fabian; GIRALDO, Yolanda y OSPINA, Noralba. Evaluación citotóxica y genotóxica del Endosulfán (Thiodan) *in vitro* e *in vivo*. Popayán, 1995, 117-127 p. Trabajo de Grado (Licenciados en Biología): Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación.

COX, C. Glyphosate. Part 2: Human exposure and ecological effects. En: Journal of Pesticides Reform. Volumen 15, Número 4 (1995). Northwest Coalition for Alternatives to Pesticides, Eugene, OR, USA. 14 p.

DALLEGRAVE, Eliane; DIGIORGIO, Fabiana; SOARES, Ricardo; DRAWANS, J; DALSENER, Paulo and LANGELOH, Augusto. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup in Wistar rats. En: Toxicology Letters. Vol. 142 (2003); p. 45-52.

DEAN, B. J; ANDERSON, D. and SRÁM, R. J. Mutagenicity of selected chemicals in the mammalian dominant lethal assay. En: Comparative Chemical Mutagenesis. (1981); p. 487-538.

DEAN, B. J. and JOHNSTONE, A. Dominant Lethal assay in male mice: evaluation of experimental design, statistical methods and the sensitivity of Charles River (CD1) mice. En: Mutation Research. Vol. 42 (1977); p. 269-278.

DE LA HOZ, Marina y ZULETA, Margarita. Efecto de la cafeína en la producción de Letales Dominantes en ratones tratados con Triethylene melamine. En: Actualidades Biológicas. Vol. 12, No 43 (1982); p. 281

DH. Guidelines for the testing of chemicals for mutagenicity. En: Department of Health Report on Health and Social Subjects. London. Vol. 35 (1989).

Documento Plan de Manejo Ambiental Erradicación de Cultivos Ilícitos. Colombia. 2000.

DULAC, Catherine; MEISTER, Markus and HOLY, Timothy. Feromonas controlan el reconocimiento del sexo de ratones, En: Howard Hughes Medical Institute. (2002)

EHLING, UH. Induction of specific-locus and dominant-lethal mutations in male mice by diethylsulfate (DES). En: Mutation Research. Vol. 1 (1988); p. 191-198.

EHLING. U. H, *et al.* Standard protocol for the dominant lethal test on male mice. Set up by the work group "Dominant Lethal Mutations of the *ad hoc* Committee Chemogenetics". En: Archives of Toxicology. Vol. 39 (1978); p. 173-185.

EHLING, U. H. Dominant lethal mutation in male mice. En: Archives of Toxicology. Vol. 38 (1977); p. 1–11.

EHLING, UH. and NEUHAUSER-KLAUS, A. Induction of specific locus and dominant lethal mutations in male mice by 1-methyl-1-nitrosourea (MNU). En: Mutation Research. (1991); p. 250, 447-456.

EPA (Environmental Protection Agency), Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment: EPA/630/R-96/009, Washington, USA, (1996); p. 1-163.

EPA (Environmental Protection Agency), Health Effects Test Guidelines: OPPTS 870.5450 Rodent Dominant Lethal Assay. En: EPA. 712-C-98-227. (1998).

EPA (Environmental Protection Agency), Integrated Risk Information System. 2003.

EPA (Environmental Protection Agency) USA. 1993. R.E.D. Facts: Glyphosate.

EPSTEIN, S. S. and SHAFNER, H. Chemicals mutagens in the human environment. En: Nature. Vol. 219 (1968); p. 385-387.

ERICKSON, P. Post-meiotic gene expression. En: Trends in Genetics, Vol. 6 (1990). p. 264-269

FARBER, E. Clonal adaptation during carcinogenesis. Biochem Pharmacol. Vol. 39 (1990); p. 1937-1846.

FAVOR, J; SOARES, E. and CRENSHAW, J. Chemical and radiation induced late dominant lethal effects in mice. En: Mutation Research. Vol. 54 (1978); p. 333-342.

FERRER, Yadira. Áreas protegidas en la mira del glifosato. Tierramérica. 2003.

GALINDO, Indira. Evaluación citotóxica y genotóxica del glifosato (Roundup) *in vivo*. Popayán 1996. Trabajo de grado (Licenciado en educación con especialidad en Biología). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación.

GASAWARA, M y FURUKAWA, T.A. La Depresión como Posible Factor Causal en la Interrupción de la Gestación en Mujeres con Antecedente de Abortos Recurrentes Espontáneos. 2002. Human Reproduction. Vol. 17(10), p. 2580-2584. http://64.233.187.104/search?q=cache:9Xn6M3250ycJ:hipnosis.com/noticias/notn/abortos:-mujeres-con-antecedente-de-abortos-ecurrentes_1321.html+estres+en+el+desequilibrio+hormonal+de+los+ratones&hl=es

GARRETTSON, L. K.; GUZELIAN, P. S. and BLANKE, M. D. Evaluation of the genetic activity profile of 65 pesticides. En: Mutation Research. Vol.168 (1985); p. 689-691.

GOLD L and AMES, B. Too many rodent carcinogens?. En: Science. Vol. 249 (1990); p. 970-971.

GÓMEZ, Ubier Eduardo. Mitos y Realidades en la intoxicación por Glifosato. Toxicólogo Clínico. Profesor Farmacología y Toxicología. Hospital Universitario San Vicente De Paul. Universidad De Antioquia. Colombia. 2003.

GREEN, Sidney. A guide for mutagenicity testing using the dominant lethal assay. En: Mutation Research. Washington. Vol. 189 (1987); p. 167-174.

GREEN, S, *et al.* Current status of bioassays in genetic toxicology - the dominant lethal assay. A Report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. En: Mutation Research. Washington. Vol. 154 (1987); p. 49-67.

GRISOLIA, C. and CORDEIRO, C. Variability in micronucleus induction with different mutagens applied to several species. En: Genetics and Molecular Biology. Vol. 23(1) (2000); p. 235-239.

GUERRERO, Nancy y MUÑOZ, Diana. Inducción de micronúcleos *in vivo* en eritrocitos de branquias de *oreochromis niloticus* por efecto de roundup. Popayán 2003. Trabajo de grado (Biólogo). Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación.

HANDERSON, R. F. The effect of dose, dose rate, route of administration and species on tissue and blood levels of benzene metabolites. En: Environmental Health Perspective. Vol.82 (1989); p. 9-17.

HARDELL, L. and ERIKSSON, M. A Case-Control Study of Non-Hodgkin Lymphoma and Exposure to Pesticides. En: Journal of American Cancer Society, (1999) 85:6

HIDALGO, Mayra y MOLINA, Magali. Infecciones virales en ratones de laboratorio. Investigadoras. FONAIAP-CENIAP. Instituto de Investigaciones Veterinarias. Maracay. Aragua. 1999.<http://www.ceniap.gov.ve/bdigital/fdivul/fd62/raton.html>

HOYOS G, Luz Stella *et al.* The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity; a report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. En: Mutation Research. Vol. 123 (1983); p. 61-118.

HOYOS, Luz Stella; CARVAJAL, Silvio y CAJAS, Nohelia, Manual de pruebas Citogenéticas y Letales Dominantes en Ratón, Popayán 2002. Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación.

HOWARD HUGHES MEDICAL INSTITUTE (HHMI, 2003), <http://www.hhmi.org//katz2=esp.html>

Health and Safety Executive (HSE) (1995). Pesticide Incidents Investigated in 1990/1, 91/92, 92/93, 93/94, 94/95.

IARC. Monography Evaluation Carcinogens Risks. En: Hum Suppl. Vol. 7 (1987); 1- 440.

IBAÑEZ, M.. Qué usan en Colombia? El nuevo agente naranja. Efectos sobre la salud y el ambiente de herbicidas que contienen glifosato (2002). www.rebellion.org,

INDUSTRIA MONSANTO. (www.monsanto.com.ar/secciones/productos/agroquimicos/mspr_g.aspwww.monsanto.es/monsantoes/roundup.html).

Informe Conjunto sobre el Seminario-Taller “Erradicación de cultivos ilícitos” Bogotá-Colombia. 13 al 15 de febrero del 2002. Pag.11

IZIGA, R. Efecto *in vivo* de *Uncaria tormentosa* (willd) DC. (Rubiaceae) “Uña de Gato” en el Desarrollo de embriones preimplantacionales de ratón de 72 h.p.c. En: Bol.cSoc. Bio. Concepción, Chile. Tomo 69, (1998); p. 141-145

JHA, Anand and BHARTI, Mithilesh. Mutagenic profiles of carbazole in the male germ cells of Swiss *Albino suizo*. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. En: Elsevier. India. Vol. 500 (2002); p. 97-101.

JOHNS HOPKINS MEDICAL INSTITUTIONS. El estrés crónico puede aumentar el riesgo de cáncer de piel. En: HealthDay (2004) <http://www.ochsner.org/healthnews/healthday-es/041214HD522897.htm>

J.W. Allen; U.H. Ehling, M.; Moore, Lewis, S.E. Germ line specific factors in chemical mutagenesis, *Mutat. Res.* 330 (1995); p. 219–231.

KACZEWER, Jorge. Toxicología del Glifosato: Riesgos para la salud humana. Universidad Nacional de Buenos Aires. Documento obtenido por Internet, Septiembre de 2001.

KACZEWER, J. Toxicología del glifosato: Riesgos para la salud humana. En: La Producción Orgánica Argentina (2002). 607:553-561. MAPO.

KAPLAN, W.D. and LYON, M.F. *Science* (Wash). 1953. p. 118, 777.

KATOH, M. A; CAIN, K. T; HUGHES, L. A. FOXWORTH; L. B., BISHOP, J. B. and GENEROSO, W. M. Female-specific dominant lethal effects in mice. En: *Mutation Research*. Vol. 230 (1990); p. 205-217.

KIRKLAND, David. The role of the UKEMS in the development of testing guidelines. En: *Mutagenesis*. Vol. 17 (6) (2002); p.451–455

KLAASEN, C.D. Nonmetallic environmental toxicants: air pollutant solvents and vapors and pesticides. En: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Vol.7 (1985); p. 1628-1650.

KLUG, William y CUMMINGS, Michael. *Genética*. Quinta edición. Madrid: Prentice Hall. 1999. p 418, 425.

LOPATEGUI, Edgar. Estrés: concepto, causas y control, fisiología del ejercicio. Universidad Interamericana de PR - Metro, Facultad de Educación, Dept. de Educación Física. Puerto Rico. <http://www.saludmed.com/Salud/Estres/Estres.html>

LYON, M. F. and SMITH. B. D. Species comparisons concerning radiation-induced dominant lethal and chromosome aberrations. En: Mutation Research. Vol. 11 (1971); p. 45-58.

MALIK, J; G, Barry and G, Kishore. The herbicide glyphosate. Monsanto Agricultural Company. Biofactors. Missouri. USA Vol. 2 (1) (1989). p. 17-25.

MALDONADO, Adolfo, *et al.* Impacto en Ecuador de las fumigaciones del Plan Colombia realizadas a partir del 28 de julio del 2002. URL.www.accionecologica.org.

MALDONADO, Adolfo. Impacto de las fumigaciones del plan Colombia en la frontera ecuatoriana. 2003. URL www.accionecologica.org.

MALDONADO, Adolfo. Informe de Investigación, Daños Genéticos en la Frontera de Ecuador por las Fumigaciones del Plan Colombia, Noviembre 2003

MARC, J; MULNER, Lorillon; BOULBEN, S; HUREAU D; DURAND G. Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. En: Chem Res Toxicol. Vol. 15 (3) (2002.); p. 326-331.

MATTIÉ, Mailer. Las fumigaciones del plan Colombia. Biodiversidad sustento y cultura.2003

MATTISON, D. R. and THOMFORD, P. J. The mechanisms of action of reproductive toxicants. En: Toxicologic Pathology. Vol. 17 (1989); p. 364-376.

MAXWELL, W. A. and NEWELL, G. W. Considerations for evaluating chemical mutagenicity to germinal cell. En: Environmental Health Perspectives. Vol. 6 (1973); p. 47-50.

MOLINA E.J.. Estudio de Caso Sobre el Manejo Convencional y Agroecológico del Cultivo de la Caña de Azúcar en el Valle del Cauca, Colombia. Informe del estado de los recursos naturales y del medio ambiente en el Valle del Cauca. Contraloría Departamental Del Valle Del Cauca, 1995.

MUÑOZ, Horacio y ZULETA, Margarita. Posible acción mutagénica del Tiosulfato de sodio por el metodo de Letales Dominantes. Medellín 1981. Trabajo de grado (Biólogo) Universidad de Antioquia.

NIVIA, Elsa. Efectos de las fumigaciones. (2003) WWW.S-XXI.net

OAKBERG, E.F. Duration of spermatogenesis in the mouse and of stages of the cell cycle of the seminiferus epithelium. Am. J. Anat. Vol. 99 (1956); p. 507-16

ONIC. Evaluación de las fumigaciones en Colombia. Destrucción de las zonas rurales por el Plan Colombia. Bogotá. Agosto 2002.

ORTH, J; Gunsalus, G. L. and Lamperti, A. A. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. En: *Endocrinology*. Vol.122. (1988). p. 787-794

PANDEY, N, Studies on the genotoxicity of endosulfan, an organochlorine insecticida, in mammalian Grez cels. En: *Mutation Research*. Vol. 242 (1) (1990); p. 1-7

PATHKI. V. and POLASA, H. Dominant Lethal in mice – a test for mutagenicity of influenza X-31 virus . En: *Teratogenesis, Mutagenesis and Carcinogenesis*. Vol. 8 (1988); p. 55-62.

Pesticide Monitoring Unit. (1993). West Midlands Poisons Unit. Surveillance of human acute poisoning from pesticides.

PELUSO, M. 32P-postlabeling detection of DNA adducts in mice treated with the herbicide Roundup. En: *Environ Mol Mutagen*. Genoa. Vol.. 31 (1998); (1); p.55-59.

Personería Municipio del Guamuéz. Personas afectadas por la fumigación. Departamento del Putumayo- Colombia. (2001). p. 14

Plan Nacional de Desarrollo (2002-2006). <<http://www.presidencia.gov.co/documentos/PND>>.

RANK., J. Genotoxicity testing of the herbicide Roundup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, Salmonella mutagenicity test, and Allium anaphase-telophase test. *Mutat Res.* 1993. 300 (1): 29-36.

RAY, V. A. and HYNECK, M. L. Some primary considerations in the interpretation of the dominant-lethal assay. En: *Environmental Health Perspectives*. Vol. 6 (1973); p. 27-35.

REDDI, O. S. and VASUDEVAN, B. Induced dominant lethality in mice by phosphorus-32. En: *Nature*. Vol. 218 (1968); p. 283-284.

RHOMBERG, L; DELLARCO, V. L; SIEGEL-SCOTT, C; DEARFIELD, K. L. and JACOBSON-KRAM, D. Cuantitative estimation of the genetic risks associated with the induction of heritable translocation at low-dose exposure. Ethylene oxide as an example. En: *Environmental and Molecular Mutagenesis*. Vol. 16 (1990); p. 104-125.

RICHARD, Sophie. Differential Effects of Glyphosate and Roundup on Human Placental Cells and Aromatase. En: *Environmental Health Perspectives*, Vol. 113, No. 6, (2005); p. 716-720

R.N. Kar; K. Khan and S.K. Mukherjee, *In vivo* mutagenic effect of methyldopa, dominant lethal test in male mice, *Cytobios* Vol. 41(1984); p.151–159.

RÖHRBORN, G. Mutagenicity test in mice. I. The dominant lethal method and the control problem. En: *Humangenetik*. Vol. 6 (1968); p. 345-351.

RUSSELL, L.B. Chlorambucil effectively induces deletion mutation in mouse germ cells. En: *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 86. (10) (May 1989); p. 3704-3708.

RUSSELL, L. D., REN, H. P.; SINHA H.; SCHULTZE, W. and SINHA H. A comparative study in twelve mammalian species of volume density, volumes, and numerical densities of selected testis components, emphasizing those related to Sertoli cell. En: *The American Journal of Anatomy*, Vol. 188. (1990); p. 21-30.

RUSSELL, LB. Genetic, cytogenetic and molecular analices of mutation induced by melphlan demonstrate high frequencies of hereditary deletions and other rearrangements from exposure of post.spermatogonial stages of the mouse. En: *Proc Natl Acad Sci USA*. Vol. 89 (13) (1992); p. 6182-6186.

RUSSELL, Liane B. Bleomycin, unlike other male-mouse mutagens, is most effective in spermatogonia, inducing primarily deletions. En: *Mutation Research*. Vol. 469 (2000); p. 95-105

SALOMONE, Michael And HEDDLE, Jhon. The bone marrow micronuclei assay: Rationale for a revised protocol. En: *Chemical Mutagens*. Vol. 8 (1983); p 11 – 49.

SAWADA, Y; NAGAI, Y; UEYAMA, M., Yamamoto. Probable toxicity of the surface active agent in commercial herbicide containing glyphosate [letter]. (1988); *Lancet* 8580, 299.

SCHIMENTI, Kerry; HANNEMAN, William and SCHIMENTI, John. Evidence for cyclophosphamide-Induced Gene Conversion and Mutation in Mouse Germ Cells. En: *Toxicology and Applied Pharmacology*. Vol. 147 (1997); p. 343-350.

SEGA, G.A. Unscheduled DNA synthesis in mammalian germ cells of male mice exposed *in vivo* to the chemical mutagen ethyl methanesulfonate, in: N.I. Sax (Ed.), *Cancer Causing Chemicals*, Nostrand Reinhold (Van), New York, 1981; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71 (1974) 4955-4959.

SINGH, S. K. and PANDEY, R. S. Toxicity of endosulfan on kidney of male rats in relation to drug metabolizing enzymes and microsomal lipid peroxidation. *Indian*. Vol.27 (1989); p. 725-728.

SMITH, E.A., OEHME, F.W. The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review. En: *Veterinary Human Toxicology*. (1992). Vol. 234 (6); p. 531-543.

SOLARTE, Paola.; BASTIDAS, Patricia y URBANO, Maria. Efecto citotóxico y genotóxico del insecticida Tiza china en células germinales y somáticas de ratón, mediante las pruebas de Micronúcleos y letales dominantes. Popayán, 1998, 128 p. Trabajo de Grado (Licenciadas en Biología): Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación.

SHUKLA, Yogeshwer and TANEJA, Pankaj. Mutagenic evaluation of deltamethrin using rodent Dominant Lethal assay. Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis. En: Elsevier. India. Vol. 467 (2000); p. 119-127.

SHUKLA, Yogeshwer and TANEJA, Pankaj. Antimutagenic effect of black tea extract using “rodent Dominant Lethal mutation assay”. Toxicology. En: Elsevier. India. Vol. 168 (2001); p. 269-274.

SRIKANTH, Nadadur and SETH, Prahlad. Alterations in xenobiotic metabolizing enzymes in brain and liver of rat coexposed to Endosulfan and Malation. En: Journal of Applied Toxicology, Vol. 10 (1990); p. 157-160.

SUDMAN, P. D. and GENEROSO, W. M. Female-specific mutagenic response of mice to hycanthone. En: Mutation Research. Vol. 246 (1991); p. 31-43.

SZAREK, J; SIWICK, A.; ANDRZEJEWSKA, A.; MAJEWSKA E. and BANASZKIEWICZ, T. Effects of the herbicide Roundup TM on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (Cyprinus carpio). En: Marine Environmental Research. Vol. 50 (2000); p. 263-266.

THOMSON, W.R and WEIL, C.S. En: Brometrics. (1952); p 8, 51.

TRASLER, J. M.; HALES, B. F. and ROBAIRE, B. Chronic low dose cyclophosphamide treatment of adult male rats: effect on fertility, pregnancy outcome and progeny. En: Biology of Reproduction. Vol. 34 (1986); p. 275-283.

TYL, Rochelle and FRIEDMAN, Marvin. Effects of acrylamide on rodent reproductive performance. Reproductive Toxicology. En: Elsevier. USA. Vol. 17 (2003); p. 1-13.

TYL, Rochelle. Rat two-generation reproduction and dominant lethal study of acrylamide in drinking water. En: Reproductive Toxicology 14 (2000). p. 385–401

VENIH, S and PARRY, J. Mutagenicity testing a practical approach. IRL PRESS limited. Oxford Washington DC, 1984. p. 307-335.

VERSCHAEVE, L. and LÉONARD, A. Dominant lethality test in female mice treated with methyl mercury chloride. En: Mutation Research. Vol. 136 (1984); p. 131-135.

WELLS, W. L. and MILHORN, H. Y. Toxicology mechanism of chlorinated Hydrocarbon Insecticide. En: Morgan, P.D. POISIDEX (R). Editorial Staff, Denver. Colorado 80203.1992

WILLIAMS Gary; KROES Robert and MUNRO, Ian. Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans: En: Regulatory Toxicology and Pharmacology. Vol. 31 (2000); p.117–165.

WITT, Kristine and BISHOP, Jack. Mutagenicity of anticancer drugs in mammalian germ cells. En: Mutation Research. Vol. 355 (1996); p. 209-234.

WHO (World Health Organization), Glyphosate. En: Environmental Health Criteria. No.159 (1994); p. 1-177.

WHORTON, Jr. and ELBERT, B. Parametric Statisticsl Methods and Sample Size Considerations for Dominant Lethal Experiments: The Use of Clustering to Achieve Approximate Normality. En: Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis. Vol. 1(1.981); p. 353-360.

ZÁRATE, Fúlver Amado *et al.* Prevalencia de discromatopsia adquirida y exposición a plaguicidas y a radiación ultravioleta solar. En: Rev. Fac. Nac. Salud Pública. Vol. 15(1) (1997); p. 69-93

ZINDER, C. A. The carcinogenicity of discontinuos inhaled benzene exposure in CD-1 and C57B1/6 mice. En: Arch. Toxicol. Vol.62 (1988); p. 331-335.

Disponible en Internet < www.ingenieroambiental.com.ar >

Disponible en Internet <<http://www.gencat.es>>

Disponible en Internet www2.udel.cl/~digentox/glosario/plaguicidaorganofosforado.html.

ANEXOS

Anexo A. Formato para Registro de Datos, Prueba DL₅₀

<p><i>Universidad Del Cauca</i> <i>Evaluación de los Efectos Tóxicos, Citotóxicos/ Genotóxicos In vivo de Roundup (Glifosato) Mediante La Prueba de Letales Dominantes en Ratón</i> <i>(Mus musculus)</i> <i>Responsables: Nasly Farley Uribe Piamba y Carlos Andrés Chicangana Burbano</i> <i>Fecha y hora experimento: R1 _____ R2 _____ R3 _____ No De Experimento: _____</i></p>																		
Determinación del la DL50 y DMT																		
Características tomadas en la PruebaDL₅₀	FASE DE: <u>CONFIRMACION</u>																	
# de ratones	Repetición 1						Repetición 2						Repetición 3					
	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
peso del ratón (Kg)																		
dosis glifosato suministrado (gavage)																		
Vivos																		
Muertos																		
Tiempo que muere																		
Manifestaciones de toxicidad ()																		
Otras observaciones																		

Anexo B. Formato para Registro de Datos, Prueba de LD

Prueba de Letales Dominantes

Nombre del Proyecto: Evaluación de los efectos Tóxicos, Citotóxicos/genotóxicos in vivo del Roundup (glifosato) mediante la Prueba de Letales Dominantes en ratón (Mus musculus)

Fecha Tratamiento: _____ Fecha cruce: _____ Fecha Disección: _____ Tratamiento: _____

MACHOS	HEMBRAS	OBSERVACIONES DE LOS EMBRIONES						
		EMBRIONES VIVOS		EMBRIONES MUERTOS		MOLES (Masa Necrótica)		OTRAS OBSERVACIONES
		Número	Tamaño, color otra característica	Número	Tamaño, color otra característica	Número	Tamaño, color otra característica	
1	1							
	2							
	3							
2	1							
	2							
	3							
3	1							
	2							
	3							
4	1							
	2							
	3							
5	1							
	2							
	3							
6	1							
	2							
	3							
7	1							
	2							
	3							
8	1							
	2							
	3							
9	1							
	2							
	3							
10	1							
	2							
	3							
11	1							
	2							
	3							
12	1							
	2							
	3							
13	1							
	2							
	3							
14	1							
	2							
	3							

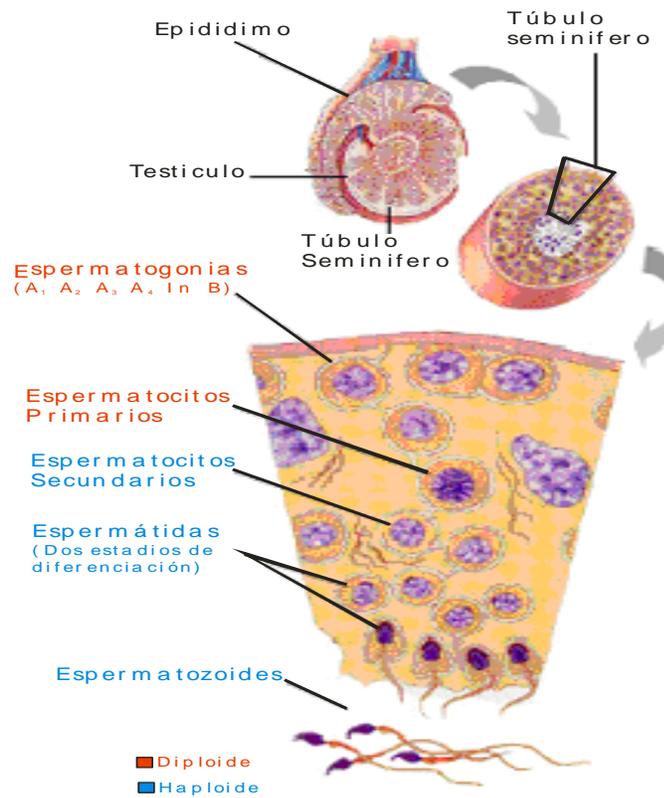
Anexo C. Información Básica de los Individuos Experimentales Utilizados en el Trabajo de Investigación (Información suministrado por Veterinario da Colombia)

CLASIFICACIÓN TAXONOMICA	
Reino	animal
Phylum	chordata
Subfylum	vertebrata
Clase	mammalia
Orden	rodentia
Familia	muridae
Género	Mus
Especie	<i>Mus musculus</i>
Origen de la colonia	Suizo
Designación de la Cepa	CrI: CD1-(ICR)BR
Color	blanco
Calidad microbiológica	BR(SPF)
Cruzamiento	Exogénico (No consanguíneo)
No. de cromosomas	40
Peso al apareamiento	Macho: 30-35 g, hembra 26-30 g
Edad del apareamiento	macho y hembra: 6semanas
Sistema de apareamiento	Monogámico
Duración ciclo estral	4-5 días
Pubertad	5-6 semanas
Periodo de gestación	17-21 días
Tamaño promedio de la camada	10-12
Peso al nacer	1.5 g
Peso al destete	10-12 g
Edad al destete	21 días
Ganancia diaria de peso	0, 2-1 g
Consumo diario de alimento	4-5 g
Consumo diario de agua	5-10 mL
Vida sexual útil	9-10 meses
Esperanza de vida	20-24 meses
CONSTANTES FISIOLÓGICAS	
Frecuencia cardiaca	600 (328-780)
Frecuencia respiratoria	163 (84-230)
Temperatura corporal	36.5 °C
CONCICIONES AMBIENTALES	
Temperatura	20-22°C
Humedad ambiental	40-60%
Cambio de aire (no debe haber corriente de aire)	20 por hora

Anexo D. Información básica de alimento suministrado a los ratones *Mus musculus*

Contenido Nutricional "Rodentina"	Ceniza Máx	Fibra Max	Grasa Mín	Humedad Máx	Proteínas
Porcentaje (%)	8.0	5.0	6.5	13.0	23.5

Anexo E. Representación gráfica de la Espermatogénesis en Ratón



Anexo F. Representación gráfica de la Espermatogénesis en Humano

