

**INDUCCION DE MICRONÚCLEOS *in vivo* EN ERITROCITOS DE BRANQUIAS
DE *Oreochromis niloticus* POR EFECTO DE ROUNDUP**

**DIANA MILENA MUÑOZ SOLARTE
NANCY YADIRA GUERRERO PEPINOSA**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
ÉNFASIS EN GENÉTICA
POPAYÁN
2003**

**INDUCCION DE MICRONÚCLEOS *in vivo* EN ERITROCITOS DE BRANQUIAS
DE *Oreochromis niloticus* POR EFECTO DE ROUNDUP**

**DIANA MILENA MUÑOZ SOLARTE
NANCY YADIRA GUERRERO PEPINOSA**

Trabajo de Grado como requisito parcial para optar al título de Biólogas

**Directora
LUZ STELLA HOYOS GIRALDO**

**Asesores
GUILLERMO LEÓN VASQUEZ ZAPATA
SILVIO CARVAJAL VARONA**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
PROGRAMA DE BIOLOGÍA
ÉNFASIS EN GENÉTICA
POPAYÁN
2003**

Nota de aceptación

Directora

Mg. LUZ STELLA HOYOS G.

Jurado

Mg. PATRICIA E. VELEZ

Jurado

Mg. ALVARO RENAN CAJAS

Fecha de Sustentación: Popayán, 4 de Diciembre de 2003.

A Dios por permitir concluir con éxito esta etapa de nuestras vidas
A nuestros Padres
A nuestros hermanos
A nuestra familia y amigos

Con amor...

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por haber permitido culminar con éxito esta etapa de nuestras vidas.

A nuestros padres y hermanos, que al amarnos nos enseñaron a confiar en nuestras capacidades, con su amor y dedicación incondicional, nos motivan a alcanzar nuevos horizontes en la vida

A la Mg. Luz Stella Hoyos Giraldo, por su dedicación, apoyo y entrega al orientar este trabajo y fortalecer nuestra formación personal y académica.

Al PhD. Guillermo León Vásquez Zapata y Mg. Silvio Carvajal, asesores de este trabajo por su incentivo y constante colaboración durante el desarrollo del mismo.

A la Mg. Patricia Eugenia Velez, por su valiosa ayuda en la revisión del trabajo.

A la Mg. Mercedes Peñalosa y PhD. Mauricio Camargo por su contribución para la ejecución del estudio.

Al Mg. Alvaro Cajas por su colaboración para el desarrollo del estudio.

Al. Biólogo. Augusto Prado por su colaboración y apoyo.

A Cesar Koppe Grisolia, Tolga Cavas, Carlos Gravato y Fernando Ayllon; por el envío oportuno del material bibliográfico, que fue una gran contribución para el desarrollo del trabajo.

A Roger Figueroa, Lorena Bolaños, Ingrid Reyes, Soledad Ordóñez, Noggy Muñoz y Manuel Buitrón y al grupo de Investigación en Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca por su constante apoyo.

A la Corporación Regional del Cauca (C.R.C) por el suministro del material biológico.

CONTENIDO

	Pág
INTRODUCCIÓN	16
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA e HIPÓTESIS	18
2. JUSTIFICACIÓN	20
3 OBJETIVOS	22
3.1 OBJETIVO GENERAL	22
3.2OBJETIVOS ESPECIFICOS	22
4. ANTECEDENTES	23
5. MARCO TEORICO	32
5.1 ROUNDUP	32
5.2 TILAPIA NILÓTICA	34
5.3 PRUEBA DE MICRONUCLEOS	35
5.4 EFECTO DEL ROUNDUP EN LA CALIDAD FISICO-QUÍMICA DE LAS AGUAS NATURALES	36
5.4.1 Parámetros Físico-químicos a analizar	37
6. METODOLOGIA Y DISEÑO EXPERIMENTAL	39
6.1 SELECCIÓN DE LOS PECES OBJETO DE ESTUDIO TILAPIA NILÓTICA(<i>Oreochromis niloticus</i>)	42
6.2 PRUEBA CONCENTRACIÓN LETAL CINCUENTA	43
6.3 SELECCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES EXPERIMENTALES	43

6.4 SELECCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN CONTROL	44
6.5 PRUEBA DE GENOTOXICIDAD	44
6.5.1 Distribución de los bloques en el laboratorio	45
6.5.2 Protocolo de micronúcleos en eritrocitos de las branquias de tilapia nilótica (<i>Oreochromis niloticus</i>).	47
6.6 PRUEBA DE CALIDAD DE AGUAS	49
6.7 REGISTRO Y PROCESAMIENTO DE DATOS	49
7. RESULTADOS	53
7.1 TOXICIDAD DE ROUNDUP EN TILAPIA NILÓTICA	53
7.2 PRUEBA DE GENOTOXICIDAD DEL ROUNDUP EN TILAPIA NILÓTICA	55
7.3 PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS PARA DETERMINACIÓN DE CALIDAD DEL AGUA	60
8. DISCUSION	69
9. ALCANCES	76
10. RECOMENDACIONES	77
11. CONCLUSIONES	78
BIBLIOGRAFÍA	79

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Estudios con pruebas de genotoxicidad y parámetros físico-químicos (1981-2003).	28
Cuadro 2. Variables.	39
Cuadro 3. Evaluación de letalidad y genotoxicidad.	40
Cuadro 4. Parámetros físico-químicos hídricos a evaluar.	40
Cuadro 5. Actividades para realizar en el protocolo.	47
Cuadro 6. Cuadro de registro de datos para prueba de letalidad.	50
Cuadro 7. Cuadro de registro de los parámetros físico-químicos en el experimento de concentración letal cincuenta (CL ₅₀)	50
Cuadro 8. Cuadro de registro de parámetros físico-químicos de la prueba de genotoxicidad.	51
Cuadro 9. Registro de frecuencia de micronúcleos en <i>Oreochromis niloticus</i> .	52
Cuadro 10. Datos de toxicidad CL ₅₀	53
Cuadro 11. Parámetros físico-químicos en el experimento de concentración letal 50.	61
Cuadro 12. Parámetros físico-químicos analizados (valores promedio) en la prueba de genotoxicidad.	62

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Concentraciones de muestreo vs Tiempo de muestreo en días.	55

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Tilapia nilótica (<i>Oreochromis niloticus</i>)	34
Figura 2. Branquia de Tilapia nilótica	35
Figura 3. Formación de Micronúcleos	36
Figura 4. Estanque de la estación piscícola de Timbio(Cauca) propiedad de la C.R.C	41
Figura 5. Río Molino (Sitio de recolección del Agua)	42
Figura 6. Río Molino Km 5 via al Huila	42
Figura 7. (a) un acuario con 8 peces para realizar la prueba CL ₅₀ , (b) La mitad de la población se muere (CL ₅₀), (c) Se comprueba la CL ₅₀ con un nuevo experimento.	43
Figura 8. Distribución de los tratamientos en bloques aleatorizados para la evaluación del efecto genotóxico	44
Figura 9. Distribución de los bloques en el laboratorio	45
Figura 10. Distribución de acuarios por cada bloque	46
Figura 11. Distribución aleatorizada de los cuatro acuarios por bloque	46
Figura 12. Protocolo de la prueba de micronúcleos en eritrocitos de pez.	48

Figura 13. Frecuencia de peces muertos vs Concentración Roundup	54
Figura 14. Frecuencia de micronúcleos vs Concentración Roundup	56
Figura 15. Frecuencia de micronúcleos en los muestreos	56
Figura 16. Micronúcleos observados en sangre periférica de branquias de <i>Oreochromis niloticus</i> con concentración alta (0.012mL/L) de Roundup	58
Figura 17. Micronúcleos observados en sangre periférica de branquias de <i>Oreochromis niloticus</i> con concentración media (0.006 mL/L) de Roundup.	58
Figura 18. Micronúcleo observado en sangre periférica de branquias de <i>Oreochromis niloticus</i> con concentración baja de Roundup	59
Figura 19. Anomalías o deformaciones nucleares observadas en algunas placas	59
Figura 20. Valores de Temperatura (°C) vs Concentraciones de Roundup	63
Figura 21. Valores de Turbiedad (NTU) vs Concentraciones de Roundup	63
Figura 22. Valores de concentración O ₂ (mg/L) vs Concentraciones de Roundup	63
Figura 23. Valores de porcentaje de saturación oxígeno vs Concentraciones de Roundup.	64
Figura 24. Valores Concentración de CO ₂ (mg/L)vs Concentraciones de Roundup	64
Figura 25. Valores de pH (Unidades) vs Concentraciones de Roundup	64
Figura 26. Valores de conductividad (UMhos/cm) vs Concentraciones de Roundup	65

Figura 27. Valores de sólidos disueltos totales (mg/L) vs Concentraciones de Roundup	65
Figura 28. Valores de salinidad (%) vs Concentraciones de Roundup	65
Figura 29. Valores de DQO (mg/L) vs Concentraciones de Roundup	66
Figura 30. Valores de la DBO ₅ (mg/L) vs Concentraciones de Roundup	66
Figura 31. Valores de amonio (mg/L) vs Concentraciones de Roundup	66
Figura 32. Valores de nitritos (mg/L) vs Concentraciones de Roundup	67
Figura 33. Valores de nitratos (mg/L) vs Concentraciones de Roundup	67
Figura 34. Valores de fosfatos (mg/L) vs Concentraciones de Roundup	67
Figura 35. Valores de fósforo (mg/L) vs Concentraciones de Roundup	68

GLOSARIO

ERITROPOYESIS: Proceso mediante el cual se forman las células sanguíneas.

ERITROCITOS: Células sanguíneas, con núcleo, encargadas de transportar oxígeno a los tejidos del organismo, estas células fueron las utilizadas en el estudio para observar los micronúcleos.

MICRONÚCLEOS: fragmento acéntromérico o un cromosoma rezagado que no son halados por el huso acromático en la etapa de anafase en la mitosis, estos son envueltos por una membrana en la etapa de telofase y después de que se da la citocinesis es cuando se va a observar que una de las dos células hijas tiene el micronúcleo.

ROUNDUP (Glifosato): Plaguicida organofosforado, compuesto por un ingrediente activo (N-fosfometilglicina) y compuestos inertes (Poea, cosmoflux).

TILAPIA NILÓTICA (*Oreochromis niloticus*): Pez originario de África central y del Norte.

INDUCCION DE MICRONÚCLEOS *In vivo* EN ERITROCITOS DE BRANQUIAS DE *Oreochromis niloticus* POR EFECTO DE ROUNDUP

Palabras claves: Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*), Micronúcleos, Roundup (Glifosato), eritrocitos, genotoxicidad.

RESUMEN

El uso masivo de plaguicidas y herbicidas en el mundo se ha convertido en un grave problema de la sociedad actual por la polémica desencadenada referente a su toxicidad. Los plaguicidas organofosforados como el Roundup (Glifosato) además de tener un compuesto activo tienen compuestos inertes, cuya función es aumentar su eficacia; la exposición a estos últimos suele ser más tóxica que la de los compuestos activos, como en el caso de los surfactantes como el POEA, entre otros.

Colombia basa principalmente su economía en la agricultura, sector en el que se utilizan cantidades exuberantes de diferentes plaguicidas como el Roundup para eliminar malezas de cultivos básicos, madurar caña de azúcar, yuca y plátano. También es implementado en el Plan Colombia para eliminar cultivos considerados ilícitos como coca, marihuana y amapola. Se han reportado efectos adversos en la salud humana tanto por aspersiones aéreas como por la manipulación inadecuada en la agricultura (Personerías Municipios Valle del Guamuéz, 2001), ocasionando también un desequilibrio ambiental en los diferentes ecosistemas, desencadenando problemas a largo plazo como procesos de mutagénesis, carcinogénesis, teratogénesis así como la extinción de diferentes especies y problemas reproductivos, poniendo en riesgo las futuras generaciones.

En este proyecto se utilizó el biomarcador de micronúcleos *in vivo* en eritrocitos de branquias de *Oreochromis niloticus*, una prueba muy ventajosa principalmente por su sensibilidad, ya que a bajas concentraciones de exposición hay formación de micronúcleos (Hooftman y Raat, 1981). También se evaluó los parámetros físico-químicos universales para determinar el efecto en el ecosistema acuático.

El objetivo general de la investigación fue evaluar el efecto Genotóxico *in vivo* del Roundup en eritrocitos de branquias de Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) mediante el biomarcador de micronúcleos.

En el estudio se utilizaron peces de la sp. *Oreochromis niloticus*, en los cuales se determinó la concentración letal cincuenta (0.015 ml/Lde Roundup), la cual se tuvo como punto de referencia para seleccionar las concentraciones alta, media y baja del grupo experimental.

Dichas concentraciones fueron aplicadas en 3 acuarios con una capacidad de 12 litros y en cada uno se distribuyeron 8 peces. Además se tuvo un acuario con un grupo control negativo el cual fue agua natural, solvente que se utilizó en todos los tratamientos; el diseño experimental empleado fue hecho por bloques aleatorizados, el cual tuvo tres repeticiones. El tiempo de muestreo fue de ocho días, en el cual cada dos días se sacrificaron 2 peces, a los cuales se les extrajeron las branquias y se leyeron cuatro mil eritrocitos por tratamiento (dos mil por pez). Los datos arrojados fueron ingresados al paquete estadístico SPSS, donde el análisis se hizo principalmente mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. El número promedio de micronúcleos (Mn) ($n^{\circ}XMn/2000$ eritrocitos) fue estadísticamente significativo en los tratamientos con Roundup (7.625, 6,583, 4.292 Mn) respecto al control (2.0417 Mn), mostrando una respuesta dosis-efecto, al igual que Grisolia (2002), quien reportó que Roundup en *Tilapia rendalli* indujo un incremento significativo de micronúcleos en las tres dosis (42 mg/Kg, 85 mg/Kg, 170 mg/Kg), observándose que Roundup incrementó la inducción Mn tanto a dosis altas como bajas.

Los parámetros físico-químicos de los tratamientos en concentraciones altas, medias y bajas mostraron un cambio significativo durante el transcurso del experimento, comparado con la caracterización físico-química del tratamiento del agua natural en parámetros tales como: turbiedad, concentración de gas carbónico disuelto, pH, conductividad, concentración de sólidos disueltos totales, amonio, fosfatos y fósforo.

La demanda biológica de oxígeno (DBO_5), demanda química de oxígeno (DQO), concentración de oxígeno disuelto y su porcentaje de saturación, no presentaron una incidencia directa negativa, excepto en la concentración más baja, donde se notó un incremento de los procesos de degradación de la materia orgánica; razón por la cual, las demandas de oxígeno disuelto son mayores y la concentración de iones indicadores químicos de procesos de degradación de materia orgánica aumentan progresivamente, lo cual a la vez, se puede corroborar con el incremento en la concentración del gas carbónico disuelto y su incidencia directa en la baja del pH (aumento de la acidez total) y del estado trófico del sistema hídrico, en cuanto a los valores registrados para la conductividad y en la concentración de los sólidos disueltos totales (TDS).

Con este estudio se contribuye a fortalecer la validación de la prueba de micronúcleos en peces en la comunidad científica del mundo y así incentivar a los investigadores del país a adelantar más estudios relacionados con los efectos de los plaguicidas en especial el Roundup en diferentes ecosistemas y organismos que en él interactúan y de esta forma determinar efectos tanto a corto como a largo plazo (mutagénicos, carcinogénicos, teratogénicos). Además motivar a las entidades que controlan y vigilan la salud y el ambiente para crear estrategias de prevención, control y reducción del uso de los plaguicidas en especial del Roundup.

INTRODUCCIÓN

El uso extensivo de plaguicidas por parte de las industrias, entidades gubernamentales como el ministerio de salud y defensa, para la erradicación de vectores transmisores de enfermedades como el paludismo y de cultivos ilícitos, en la agricultura para el control de malezas en cultivos básicos, a nivel doméstico; ha generado un desequilibrio ambiental que afecta a los ecosistemas y en los organismo efectos a corto (tóxicos) y largo plazo como los efectos mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos.

Los efectos a corto plazo causados por los plaguicidas son bien conocidos, pero los efectos a largo plazo aún no han sido bien estudiados. Se han reportado efectos tóxicos de los plaguicidas en diferentes sistemas biológicos en sistema nervioso, respiratorio y motriz (MacConnel, 1990; Henao *et al*, 1991; La Dou, 1993). Se conocen pocos estudios sobre los efectos de los plaguicidas organofosforados como el Roundup principalmente en organismos de sistemas acuáticos como los peces. Los pocos estudios existentes se han realizado *in vivo* e *in situ* en sistemas ícticos, para evaluar efectos genotóxicos, teratogénicos de aguas contaminadas (Hooftam and Raat, 1981; Al-Sabti and Metcalfe, 1995; Grisolia y Cordeiro, 2000), también estudios sobre el efecto en el desarrollo de las fases tempranas del crecimiento en peces (Weis and Wies, 1989); (Wisk and Cooper, 1990). Usar peces como organismos modelos para evaluar los efectos genotóxicos de aguas contaminadas resulta ventajoso por la facilidad con que se adaptan y mantienen en condiciones de laboratorio y por la respuesta a químicos como los plaguicidas.

El Roundup es un plaguicida organofosforado, no selectivo, de amplio espectro, tiene un compuesto activo de gran actividad biológica que es la N-(fosfometil) glicina y compuestos inertes que lo hacen más tóxico, puede llegar a los ríos, quebradas y lagos por efecto de escorrentía, por los agricultores que utilizan las fuentes hídricas para lavar los utensilios que se emplean en las aspersiones de los plaguicidas y de esta manera contaminan los sistemas hídricos que son fuente de consumo para el hombre.

Dada la polémica sobre la toxicidad de Roundup en países como Colombia, donde su principal actividad económica es la agricultura y además que se ha implementado su utilización para la eliminación de cultivos ilícitos, se considera importante y necesario evaluar el efecto genotóxico del Roundup en organismos acuáticos, debido a que hay gran similitud en el sistema enzimático del metabolismo de los peces que a menudo responden a los químicos tóxicos de manera similar a los vertebrados superiores (Yang *et al.*, 1990; Washburn and Di Giulio, 1989; Stegeman and Lech, 1991) y por lo tanto pueden emplearse para determinar el potencial efecto genotóxico en humanos. Sin embargo la aplicación más directa en el uso de peces como indicadores es determinar la distribución y los efectos tóxicos de químicos contaminantes como los plaguicidas en los ambientes acuáticos, por lo

que es importante analizar el eventual efecto del Roundup sobre los parámetros físico-químicos hídricos que se consideran como indicadores de calidad de aguas naturales. Para evaluar el efecto genotóxico de aguas contaminadas, la prueba de micronúcleos en eritrocitos de branquias de peces, es considerada la mas indicada y efectiva por su sensibilidad, facilidad y costos (Hoftman y Raat, 1981), además resulta exitosa bajo condiciones de laboratorio y de campo (Al-sabti, K,1995; Gustavino, B, 2001) con varias especies de peces (De flora *et al*, 1993; Al-Sabti y Metcalfe , 1995; Minissi, 1996).

El género *Oreochromis* es ampliamente utilizado en estudios de mutagenicidad, genotoxicidad y carcinogénesis debido a su sensibilidad (Cavas y Ergene-Gozukara, 2003). Los peces además de ser individuos centinelas de genotoxicidad también son modelos para analizar calidad de aguas, por su habilidad de metabolizar xenobióticos y acumular poluentes.

El objeto de este estudio fue evaluar el efecto genotóxico *in vivo* del Roundup en eritrocitos de branquias de *Tilapia nilótica* (*Oreochromis niloticus*) mediante el biomarcador de micronúcleos.

Simultáneamente al experimento de genotoxicidad se evaluaron los parámetros físico-químicos del agua tratada. Este proyecto se llevó a cabo en el laboratorio de toxicología genética y citogenética de la Universidad del Cauca (Colombia).

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El incremento de la producción agrícola debido a las demandas exigidas por el mercado mundial en su interés por conseguir alimentos de forma acelerada y de “buena calidad”, la necesidad de erradicar los cultivos ilícitos, eliminar vectores transmisores de enfermedades por parte de los programas de salud y el uso doméstico, han ocasionado una alta dependencia en el uso de sustancias químicas como los plaguicidas.

Los países en vía de desarrollo como Colombia, basan su economía en la agricultura, especialmente en la región sur-occidental en donde se utilizan grandes cantidades de diferentes plaguicidas. El Roundup es utilizado como madurante de caña, de plátano, para eliminar malezas en cultivo de yuca, papa y además para erradicar los cultivos ilícitos que actualmente es una problemática social porque causa efectos adversos en la salud de personas (Personerías Municipios Valle del Guamuéz-Putumayo, 2001) y otros organismos. Los plaguicidas también contaminan ecosistemas aéreos, terrestres, acuáticos, y destruyen cultivos de productos básicos para la alimentación que constituyen la fuente fundamental para la subsistencia de muchas comunidades campesinas e indígenas y además pueden tener efectos en la salud, a largo plazo como son los efectos genotóxicos que permiten o inducen el desarrollo de problemas como el cáncer (Band, *et al.* 1990), en lo cual se cuenta con escasos estudios reportados.

La población expuesta al Roundup, no visualiza la gran dimensión del problema, e ignora la gran controversia acerca de los efectos dañinos que el Roundup puede tener en los seres humanos. Al desconocer sus posibles efectos adversos y por ende no tomar las medidas necesarias para su protección y/o prevención, se encuentra altamente expuesta a este herbicida, el cual puede inducir daños irreversibles en el material genético, expresados en problemas de salud como el cáncer y reproductivos, afectando a las futuras generaciones (Hoyos, 1994). Se ha observado una clara relación entre la exposición a plaguicidas y problemas de salud como el cáncer (Brown *et al.* 1990).

Por ser los ríos uno de los sistemas afectados por el Roundup ya sea cuando cae por aspersión aérea, por escorrentía o cuando la comunidad se encarga de contaminarla lavando utensilios de fumigación, se alteran los factores abióticos como los parámetros físico-químicos de calidad de aguas y bióticos como la fauna y flora, produciendo un desequilibrio en la estructura del ecosistema y de esta forma atentando contra la biodiversidad en la zona afectada.

El Roundup es un plaguicida que pertenece al grupo de los organofosforados que según la IARC son sustancias genotóxicas y potencialmente carcinogénicas (IARC,1987), además los componentes inertes que se le adicionan al Glifosato se caracterizan por ser los más tóxicos de todo el compuesto (Roundup) una de estas sustancias es el POEA, y de esta forma el compuesto se convierte a una forma más tóxica por los efectos sinérgicos, aditivos, y potenciadores de la sustancia resultante (Gold, 1990). Teniendo en cuenta lo anterior y que existen muy pocos estudios sobre el efecto genotóxico del Roundup, es una prioridad realizar estudios sobre los efectos genotóxicos de aguas contaminadas con plaguicidas empleando biomarcadores como los micronúcleos con el propósito de motivar al control y regulación del uso del Roundup, problema que actualmente se enfrentan principalmente en los departamentos de la zona sur-occidental como son Cauca, Nariño y Putumayo, por el extensivo uso del Roundup en donde se distribuyen la mayor parte de cultivos lícitos e ilícitos del país.

Este estudio respondió a las preguntas: ¿ Roundup altera la calidad del agua por los cambios físico-químicos que induce? ¿Roundup induce micronúcleos en los eritrocitos de *Oreochromis niloticus*?

En este trabajo se plantearon las siguientes hipótesis.

Si Roundup altera las condiciones físico-químicas se espera que afecte la calidad del agua.

Si Roundup afecta a la Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*), se espera que incremente la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de peces tratados con relación a la frecuencia de micronúcleos de peces no tratados.

2. JUSTIFICACIÓN

La comunidad científica mundial tiene un gran interés en conocer los efectos genotóxicos de los plaguicidas, debido a la polémica acerca de la toxicidad de este tipo de sustancias en los diferentes ecosistemas.

La pertinencia de la investigación se enmarca dentro de uno de los problemas nacionales como es el de la toxicidad de plaguicidas y el deterioro de la calidad de vida, por ser Colombia uno de los países que masivamente utiliza Roundup para erradicar cultivos ilícitos o para usos agrícolas. Los resultados de este estudio contribuyen a fortalecer las investigaciones relacionadas con los efectos genotóxicos de estas sustancias, además permiten motivar a las entidades gubernamentales que vigilan y controlan el uso extensivo de los plaguicidas, la salud, el ambiente, así como los ministerios pertinentes, para motivar a una de actitud reflexiva y el diseño y ejecución de programas educativos, de vigilancia epidemiológica e intervención y prevención oportuna de los riesgos de salud como el Cáncer.

Los organismos acuáticos como los peces han sido empleados desde muchos años para detectar polución acuática y determinar actividad genotóxica de diferentes sustancias en ambientes acuáticos (Hoftman y Raat, 1981). Este modelo cobra importancia por la gran similitud entre el sistema enzimático del metabolismo del pez y de los vertebrados superiores, que a menudo responde a los químicos tóxicos de manera muy parecida (Yang et al., 1990; (Washburn and Di Giulio, 1989; Stageman and Lech, 1991) y por lo tanto pueden emplearse para determinar el potencial efecto mutagénico, carcinogénico y teratogénico a mediano y largo plazo en el hombre.

En este proyecto se utilizó el biomarcador Micronúcleos (Mn) en eritrocitos de branquias de Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). El desarrollo de la prueba con organismos acuáticos en especial especies ícticas se constituye como ventajosa respecto a otras pruebas, como las aberraciones cromosómicas, porque es una prueba simple, de fácil ejecución y lectura. La literatura soporta su confiabilidad debido a que la mayoría de estudios de genotoxicidad en peces utilizan micronúcleos, en donde se obtuvieron resultados que demuestran la genotoxicidad de sustancias, dándole mucha más validación, además los costos son muy bajos respecto a las pruebas clásicas; el interés científico que existe por la prueba de micronúcleos es tan amplio que se ha establecido el gran “Proyecto de Micronúcleos”, en donde se busca validar el biomarcador ([URL:http://www.elsevier.nl/gej-ng/10/32/31/52/23/50/abstract.html](http://www.elsevier.nl/gej-ng/10/32/31/52/23/50/abstract.html)). La determinación del efecto del Roundup sobre los parámetros fisicoquímicos universales del agua da a conocer de una forma más amplia el efecto de sustancias químicas que alteran la calidad del agua, de este modo afecta los ecosistemas acuáticos y causa un deterioro de la salud y del ambiente.

La prueba de micronúcleos en peces, fortalece e incrementa la variedad de pruebas que existen actualmente en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, para evaluar los efectos genotóxicos *in vivo* e *in vitro* y potencialmente *in situ*.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto genotóxico *in vivo* del Roundup en eritrocitos de branquias de Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) mediante el biomarcador de micronúcleos.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Establecer la concentración letal cincuenta (CL₅₀) de Roundup en Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) como punto de referencia para seleccionar las concentraciones experimentales alta, media y baja.
- Determinar si Roundup altera las condiciones físico-químicas afectando la calidad del agua en condiciones de laboratorio.
- Establecer la frecuencia de micronúcleos de peces tratados en relación con la frecuencia de micronúcleos de peces no tratados.

4. ANTECEDENTES

La experimentación con especies ícticas tiene sus inicios en el campo de la Toxicología Acuática (URL <http://www.ag.arizona.edu/azaqua/lista/reports/castillo.pdf>). En el año 1863 se realizaron las primeras pruebas de toxicidad aguda en peces. A partir de 1940, se incrementa el uso de sustancias químicas como los plaguicidas, lo cual aumenta los niveles de contaminación en ecosistemas acuáticos, creando la necesidad de realizar numerosos trabajos experimentales con peces. En 1960 se establecen las dosis letales en experimentos de toxicidad aguda y crónica y de esta forma determinar los efectos genotóxicos, patológicos, comportamentales, u otros de determinados xenobióticos. A partir de 1970 y sobre todo a partir de los 90, los peces son cada vez más utilizados como modelos experimentales, sobre todo en estudios de biomedicina. La prueba de micronúcleos con peces es útil para evaluar genotoxicidad de sustancias potencialmente tóxicas en los ambientes acuáticos y además se considera muy importante para demostrar las condiciones de calidad de agua (Al-Sabti and Metcalfe, 1995).

La prueba de micronúcleos se ha empleado desde 1959 (Evans *et al*), quienes utilizaron la frecuencia de micronúcleos para medir el daño citogenético inducido en los meristemas de raíces por efecto de rayos x y en ausencia y presencia de oxígeno, desde entonces ha sido considerada como biomarcador de efecto citogenético. Posteriormente en 1966-1970 Schroder, empleó médula ósea para determinar el daño *in vivo* que podían causar algunos mutágenos y relacionar el daño citogenético con el origen de micronúcleos en células de médula ósea.

Se ha reportado una variedad de ensayos con peces (ver cuadro 1), los cuales son usados como sistemas modelos para desarrollar estudios referentes a la toxicidad y bioquímica. (Yang *et al*, 1990). Los peces han sido ampliamente utilizados para determinar el desarrollo de las fases tempranas del crecimiento y los efectos teratogénicos que pueden causar los contaminantes ambientales (Weis and Wies, 1989); (Wisk and Cooper, 1990).

Kligerman *et al* (1975), Prein *et al* (1978), Hooftman and Vink (1981) realizaron las primeras investigaciones citogenéticas con peces, induciendo aberraciones cromosómicas como una prueba útil para detectar actividad genotóxica en ambientes acuáticos, emplearon agentes mutagénicos conocidos, obteniendo resultados positivos.

La prueba de micronúcleos fue modificada por Hoftman y Raat en el año 1981, quienes fueron los primeros investigadores que utilizaron esta prueba en eritrocitos de sangre periférica de peces bajo condiciones de laboratorio, evaluaron el Etilmetanosulfonato en *Umbra pygmaea*, la ruta de exposición utilizada fue intraperitoneal, obteniendo resultados positivos. En los años

posteriores Al-Sabti en el año 1986 continúa desarrollando varios estudios utilizando la prueba de micronúcleos en eritrocitos de peces de diferentes especies para evaluar compuestos genotóxicos como el Benzo-a-pireno comprobando su genotoxicidad con una frecuencia estadísticamente significativa entre 21,1‰ y 27,0 ‰ \pm 1,4 Mn a 10 mg/Kg de Benzo-a-pireno, en eritrocitos de carpa herbívora (*Ctenopharyngodon idella*), en carpa común (*Cyprinus carpio*) y Tilapia mossambica (*Oreochromis mossambicus*), en este año también investigó la genotoxicidad del Aroclor 1254 a diferentes concentraciones en *Cyprinus carpio*, *Tinca tinca* y *Ctenopharyngodon idella*, registrándose una alta frecuencia de micronúcleos que oscilan entre 16‰ \pm 1,3 y 97.6‰ \pm 1,8 en las tres especies.

En 1986, Manna y Sadhukhan , evaluaron el efecto genotóxico en eritrocitos de branquias de Tilapia mossambica (*Oreochromis mossambicus*) con Cloruro de Cadmio vía intraperitoneal encontrando una frecuencia de 127 Mn comparado con un número espontáneo de 10 Mn en 1000 células. Simultáneamente extrajeron las células del riñón, donde encontraron frecuencias de 91 ‰ Mn en peces expuestos y 8‰ Mn en peces expuestos al control negativo.

Das y Nanda en 1986, estudiaron los desechos contaminantes de ríos de una fábrica de papel utilizando eritrocitos del pez gato (*Heteropneustes fossilis*), donde obtuvieron 0.69‰, 1.25‰, 0.5‰ y 0.3 ‰ \pm 0.2 Mn a concentraciones de 10 mg/L, 20 mg/L, 40 mg/L y 60 mg/L.

Hose *et al* en 1987 en un estudio *in situ* investigaron la genotoxicidad de hidrocarburos clorinados DDT y PCB encontrando una frecuencia de 3.4‰ \pm 2.7‰ y 6.8 ‰ \pm 5.8, en eritrocitos de Corvina blanca (*Genyonemus lineatus*) y en Cabrilla sargacera (*Paralabrax clathratus*) respectivamente y en ambas especies una frecuencia basal de Mn de 0.8 ‰ \pm 1.1. En el mismo año Hose *et al* también evaluó el efecto de contaminantes ambientales (mezcla de hidrocarburos aromáticos policíclicos) con las especies utilizadas en el anterior estudio y obtuvo las mismas frecuencias de micronúcleos tanto en peces expuestos como en los no tratados.

Metcalfé en 1988, determinó el efecto genotóxico del compuesto Etilmetanosulfonato en condiciones de laboratorio aplicando el compuesto por vía intraperitoneal en los peces *Umbra limmi* y Bagre (*Ictalurus nebulosus*) a 25 ug/g, 50 ug/g, y 100 ug/g. Para Bagre (*Ictalurus nebulosus*) y se obtuvo una frecuencia de Mn de 1.71‰, 0.50‰ y 0.43 ‰; para *Umbra limmi* la frecuencia de Mn fue de 3.71‰, 2.0‰, 0.86 ‰, la frecuencia basal de Mn para ambas especies es de 0.14 ‰ . También en el mismo año Metcalfé evalúa el efecto genotóxico del Benzo-a-pireno en eritrocitos de Bagre (*Ictalurus nebulosus*) obteniendo una frecuencia de Mn de 0.43‰, 1.0‰ y 2.2‰ a concentraciones de 5 ug/g, 25 ug/g y 50 ug/g.

Utilizando eritrocitos de Perca (*Perca fluviatilis*) en un estudio *in situ* , Al-Sabti y Harding en 1990 determinaron el efecto genotóxico de hidrocarburos aromáticos policíclicos y registraron una frecuencia de 18‰ \pm 3.2 micronúcleos.

Ueda *et al* en 1992, determinó los efectos clastogénicos de la Mitomicina C por ruta intraperitoneal, induciendo micronúcleos en eritrocitos de carpa prusiana (*Carassius auratus*) tratados a los 2 días con concentraciones de 0.2 mg/Kg, 2 mg/Kg, 20 mg/Kg y 200 mg/Kg, obtuvo una frecuencia de 34‰, 72.2‰, 24.3‰ y 18.8‰ Mn de los peces expuestos, los

controles presentaron un valor de 0.0 ‰; un segundo grupo fue muestreado a los 4 días, estos estaban expuestos a concentraciones de 2 mg/Kg, 4 mg/Kg, 10 mg/Kg y 20 mg/Kg, registraron una frecuencia de 4.4 ‰, 22.4 ‰, 50.3 ‰, 182.8 ‰ Mn respectivamente.

Williams y Metcalfe en 1992, utilizaron los hepatocitos de Trucha arco iris (*Oncorhynchus mikiss*), aplicaron por vía intraperitoneal Dietilnitrosamina a una concentración de 100 mg/g, la frecuencia espontánea de Mn fué de 0.0‰ y la de los peces expuestos es de 5 ‰. Otro grupo de *Oncorhynchus mikiss* fue expuesto a 50 mg/g y 100 mg/g del compuesto Etilmetanosulfonato, que arrojó un valor de micronúcleos de 3.6 ‰ y 4.2‰ respectivamente.

Radiaciones gama fueron evaluadas por Kurihara y otros en 1992, la especie ictica que utilizaron fué Carpa prusiana (*Carassius auratus*) y umbra (*Umbra limi*), en células de la aleta, ambas especies fueron irradiadas con rayos X (1.9 Gy), se reportó una frecuencia de Mn 33.60 ‰, .Al-Sabti investigó *in situ* la genotoxicidad del cesio-137 presente en un lago, empleó eritrocitos de *Exos Lucius* donde encontró una frecuencia de Mn 10.1 ± 0.8 ‰, la frecuencia de Mn espontáneos fué de $5.3‰ \pm 1.1$. Shultz *et al* en 1993, irradiaron la Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) con rayos X (4 Gy), determinaron la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos, donde obtuvieron un valor de 6 ‰ Mn, el valor de Mn espontáneo fué de 1 ‰.

En 1993, De flora *et al*, emplearon eritrocitos de Trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*) para determinar si en un río Italiano existen compuestos contaminantes, encontraron una frecuencia de 1.1, ‰ Mn, se presentó una frecuencia de micronúcleos espontáneos de 0.33 ± 0.49 ‰. Un año mas tarde Al-sabti *et al* realizó un estudio similar en un rio de Eslovenia, donde empleó eritrocitos de carpa prusiana (*Carassius auratus gibelio*), en el que se presentó una frecuencia de exposición de $27.0‰ \pm 2.0$ Mn y de control negativo 13.0 ± 1.0 ‰.

Al-Sabti en 1994 evaluó el efecto de varios metales pesados en eritrocitos de carpa prusiana (*Carassius auratus gibelio*). Con cromo VI por exposición en condiciones de laboratorio a concentraciones de 25 ng/mL, 50 ng/mL y 100 ng/mL durante 7 días, encontró una frecuencia de 14‰, 23‰ y 30 ‰ Mn. En el mismo año realizó un estudio *in vitro* en la misma especie para evaluar el efecto genotóxico del metil-mercurio a concentraciones de 10 ng/5mL, 25 ng/5mL y 50 ng/5mL, donde la frecuencia espontánea de micronúcleos es 5.2 ‰ y la frecuencia arrojada en los individuos tratados es de 52.6‰, 80.7‰, 113.1‰ Mn respectivamente a las concentraciones. Simultáneamente se evaluó el efecto del mercurio a las mismas concentraciones anteriores obteniendo frecuencias de 38‰, 57.6‰, 69.3‰ Mn. En el estudio *in vitro* con Selenio IV a concentraciones de 250 ng/5ml, 500 ng/5ml, 100 ng/5ml encontró una frecuencia de 25.3 ‰, 38.6 ‰, 69.2 ‰ Mn/1000 eritrocitos. Los efectos genotoxicos a baja concentraciones de Mercurio Hg^{2+} , Selenio IV, Cloruro de Metilmercurio (CH_3HgCl) fueron analizados por Al-Sabti en 1994, en una prueba *in vitro* con eritrocitos binucleados de Carpa prusiana (*Carassius auratus gibelio*), en donde utilizó citocalasina para bloquear la citocinesis.

En 1995, Minissi *et al*, emplearon eritocitos de Barbo (*Barbus perplejus*) de dos ambientes naturales, y detectaron mutagenos en agua natural en riveras del Tiber y Mignone mediante un muestreo en diferentes épocas del año. En este mismo año Al-Sabti desarrolló la técnica del

bloqueo de la citocinesis de células hepáticas de trucha arco iris (*Oncorhynchus mikiss*), evaluando metales pesados como el selenio, mercurio y metil-mercurio. Odeigah and Osanyinpeju determinaron el potencial genotóxico de efluentes industriales y Etilmetanosulfonato en eritrocitos de Barbudo (*Clarias lazera*) bajo condiciones de laboratorio expusieron a los peces 2 y 3 semanas respectivamente.

En 1996 Poongothaik, et al. Evaluaron el efecto genotóxico de aguas contaminadas y metales pesados en cinco especies diferentes de peces, obteniendo una alta sensibilidad a la prueba de micronúcleos principalmente en el género *Lepidocephalus*.

Nepomuceno *et al*, en 1997, detectó la frecuencia de micronúcleos en eritrocitos de carpa común (*Cyprinus carpio*), que estaban expuestas a concentraciones de 2.0 mg/L, 20.0 mg/L y 200.0 mg/L de HgO, en las concentraciones mas altas se encontró un incremento significativo de Mn. En el mismo año Sánchez *et al*, determinaron el número de micronúcleos en eritrocitos de riñón de Salmon (*Salmo trutta*), expuestas a contaminantes por influencia antrópica en los diferentes ecosistemas acuáticos de Asturias (España).

En marzo de 2000, F. Ayllon y E. García evaluaron eritrocitos de riñón de Piscardo (*Phoxinus phoxinus*) y Gupy (*Phoecilia latipinna*) varios compuestos aplicados por via intraperitoneal; Colchicina 10mg/Kg, ciclofosfamida 40mg/kg y mitomicina C 20mg/Kg. Comprobando la genotoxicidad de los tres compuestos catalogados como carcinogénicos. También analizaron la frecuencia de micronúcleos y anomalías nucleares de Trucha arco iris (*Oncorhynchus mikiss*) expuestos a seis compuestos (mutagénicos, agentes alquilantes) que son frecuentemente usados como controles positivos en la prueba de micronúcleos por su potencial clastogénico: Colchicina, Ciclofosfamida, mitomicina C, acrilamida, Etilmetanolsulfonato, N-etilnitrosourea. (Miller and Adler, 1990; Lynch y Parry,1993, Suzuki *et al.*,1995; Pacheco y Santos, 1997; Parton y Garito, 1997; Campana *et al.*,1999) encontrando que la ciclofosfamida induce la formación de micronúcleos y anomalías nucleares; N-etilnitrosourea, acrilamida y Colchicina inducen unicamente micronúcleos; mitomicina C induce solamente anomalías nucleares pero no micronucleos. Metilmetanelsulfonato no induce anomalías nucleares en este experimento.

Grisolia y Starling en el año 2000, monitorearon tres sitios del lago Paranoá en Brasil, los cuales representan diferentes estados de antropización (alto, medio y bajo), las especies muestreadas fueron Tilapia herbívora (*Tilapia rendalli*) y carpa común (*Cyprinus carpio*), de las cuales se encontró un número considerado de individuos y una de las características a tener en cuenta es que estas especies no migran en todo el año. La frecuencia de micronúcleos fue muy baja en las especies estudiadas con una diferencia estadística no significativa entre los sitios muestreados. La frecuencia de micronúcleos en los peces tratados con ciclofosfamida fue muy alta.

Grisolia y Cordero en el año 2000, indujeron micronúcleos en Tilapia (*Tilapia rendalli*), Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) y carpa común (*Cyprinus carpio*) colectadas en el lago Paranoá y aclimatadas en el laboratorio durante 10 días en tanques con agua de clorada a 20°C y pH=7. Los peces fueron tratados con Bleomicina, ciclofosfamida, 5-fluoracil y mitomicina C, por periodos de 2, 7, 14, 30 días después de la inyección intraperitoneal. Hubo una diferencia

significativa entre especies y los químicos pero a los 30 días no se observó diferencia significativa entre especies. La especie mas sensible fue Tilapia (*Tilapia rendalli*).

En 2002, Grisolia y Palhares, realizaron una comparación entre la frecuencia de micronúcleos de eritrocitos de riñón y agalla en tilapia (*Tilapia rendalli*), tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) con tratamiento de mitomicina C y ciclofosfamida. La frecuencia de eritrocitos micronucleados varió significativamente entre los individuos tratados pero no se observó diferencia significativa entre la frecuencia de micronúcleos de eritrocitos de riñón y agalla. Tilapia (*Tilapia rendalli*) presentó altos niveles de eritrocitos micronucleados en comparación con tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). Únicamente en Tilapia (*Tilapia rendalli*) se observó eritrocitos con deformaciones nucleares.

Cavas T, Gözükar S, analizaron eritrocitos en Chipe (*Garra rufa*) expuesta a concentraciones de 0.005 ug/l, 0.01 ug/L y 0.005 ug/l de Lambda-cyhalothrin por 36 horas, la frecuencia de micronúcleos tuvo un incremento significativo. En el mismo año Gravato C, Santos M, evaluaron en Robalos (*Dicentrarchus labrax*) varios biomarcadores como la prueba de Micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica para evaluar la genotoxicidad de benzo-a-pireno (B(a)P) y la biotransformación de B(a)P mediante las enzimas del metabolismo en hígado (P450 y GST). Simultáneamente a estos dos experimentos Cesar Koppe Grisolia, realizo un estudio en el que comparó la frecuencia de micronúcleos arrojada en Tilapia (*Tilapia rendalli*) y en Albino suizo por exposición a mitomicina C a tres concentraciones diferentes, la frecuencia de micronúcleos fue poco significativa en ratón y muy significativa en el pez.

Gravato C, y Santos M, en el año 2003, determinaron el efecto de efluentes de un río influenciado por contaminación urbana e industrial mediante la genotipificación de los genes del metabolismo relacionados con las enzimas del metabolismo (P450 y GST) en Robalos (*Dicentrarchus labrax*). En este año Cavas T, indicó el efecto cito-genotóxico de efluentes de industrias textiles en Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) mediante la prueba de micronúcleos en eritrocitos de branquia, observó una frecuencia de micronúcleos significativa.

En Colombia se desarrollaron dos investigaciones en el 2003, en las cuales se empleó la técnica de Micronúcleos en eritrocitos de branquias de peces. En la Universidad de Antioquia, Peñalosa, Camargo y Palacio, 2003; determinaron el efecto genotóxico del cloruro de mercurio en Bocachico (*Prochilodus magdalence*), donde encontraron una relación dosis-efecto a concentraciones de 0.001 mg/L, 0.003 mg/L, 0.027 mg/L durante 7 días. En la Universidad del Quindío, Hoyos y López, evaluaron el efecto genotóxico de los efluentes de zonas con influencia agrícola en *Cariassius caucanus*, los resultados revelaron que existe una frecuencia significativa de micronúcleos tanto en las estaciones muestreadas como en diferentes épocas del año.

Cuadro 1. Estudios con pruebas de genotoxicidad y parámetros físico-químicos* (1982 - 2003).

SISTEMA	RUTA /EXPOSICION	BIOMARCADOR	SUSTANCIA	RESULTADO	REFERENCIA
Eritrocitos de Umbra (<i>Umbra pygmaea</i>)	Intraperitoneal (i.p.)	Micronucleos (Mn)	Etilmetanosulfonato (EMS)	Positivo	Hoofman, R. Y Raat, W. 1981
Eritrocitos de carpa herbívora (<i>Ctenopharyngodon idella</i>)	i.p.	Mn	Benzo-a-pireno	Positivo	Al-Sabti, 1986
Eritrocitos de Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>)	i.p.	Mn	Aroclor 1254	Positivo	Al-Sabti, 1986
Eritrocitos de Tilapia mossambica (<i>Oreochromis mossambicus</i>)	i.p.	Mn	Cloruro de Cadmio	Positivo	Manna and Sadhukhan, 1986
Eritrocitos de Pez gato (<i>Heteropneustes fossilis</i>)	i.p.	Mn	MMC	Positivo	Das y Nanda,1986
Eritrocitos (<i>in situ</i>) de Corvineta blanca (<i>Genyonemus lineatus</i>) y Cabrilla sargacera (<i>Paralabrax clathratus</i>)	Exposición en condiciones de laboratorio	Mn	DDT	Positivo	Hose et al 1987
Eritrocitos de Umbra (<i>Umbra limi</i>)	i.p.	Mn	ETM	Positivo	Metcalf, 1988
Eritrocitos de Perca (<i>Perca fluviatilis</i>)	Exposición <i>in situ</i>	Mn	Efluentes de fabrica de papel	Positivo	Al-Sabti y Hardig, 1990
Eritrocitos de Perca (<i>Perca fluviatilis</i>)	i.p.	Mn	Efluentes de fabrica de papel	Positivo	Al Sabti y Hardig, 1990
Eritrocitos de Platija (<i>Pseudopleuronectes americanus</i>)	Exposicion <i>in situ</i>	Mn	hidrocarbomos clorinados	Negativo	Longwell et al, 1983; Hughes and Hebert, 1991

SISTEMA	RUTA /EXPOSICION	BIOMARCADOR	SUSTANCIA	RESULTADO	REFERENCIA
Eritrocitos de carpa prusiana (<i>Carassius auratus</i>)	i.p.	Mn	Mitomicina C	Positivo	Ueda, et al, 1992
Hepatocitos (<i>in vivo</i>) y Trucha arco iris(<i>Oncorhynchus mikiss</i>)	i.p.	Mn	Diethilnitrosaminas	Positivo	Williams y Metcalfe. 1992
Hepatocitos de trucha arco iris <i>Oncorhynchus mikiss</i>	i.p.	Mn	EMS	Positivo	Williams y Metcalfe. 1992
Eritrocitos de Lucio (<i>Esox lucius</i>)	Iradiación	Mn	Radiación Cesio-137	Positivo	Al-Sabti,1992
Eritrocitos de carpa prusiana (<i>Carassius auratus</i>) y Umbra (<i>Umbra limi</i>)	Irradiación	Mn	Rayos X	Positivo	Kurihara.,et al. 1992
Eritrocitos de trucha arcoiris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Irradiación	Mn	con rayos X(4 Gy	Positivo	Shultz <i>et al</i> en 1993.
Linfocitos Humanos	<i>in vitro</i>	Intercambio de Cromatidas Hermanas	GLIFOSATO (2.5mg/L)	Negativo	RODRIGUEZ, Janeth, et al. 1993
Eritrocitos de Trucha arco iris (<i>Oncorhynchus mikiss</i>)	Exposición <i>in situ</i>	Mn	Agua Natural Rio Lambro	Negativo	De Flora, S <i>et al</i> , 1993.
Eritrocitos de carpa prusiana (<i>Carassius auratus gibelio</i>)	Exposición en condiciones de laboratorio	Mn	Cromo VI 25ng/mL T= 7 dias	Positivo	Al-Sabti, 1994
Eritrocitos de carpa prusiana (<i>Carassius auratus gibelio</i>)	Exposición en condiciones de laboratorio	Mn	Cromo(III)	Positivo	Al Sabti et al.1994
Eritrocitos de carpa prusiana (<i>Carassius auratus gibelio</i>)	<i>in vitro</i>	Mn	Mercurio	Positivo	Al Sabti et al.1994
Eritrocitos de carpa prusiana (<i>Carassius auratus gibelio</i>)	<i>in vitro</i>	Mn	Selenio(IV)	Positivo	Al Sabti et al.1994

SISTEMA	RUTA /EXPOSICION	BIOMARCADOR	SUSTANCIA	RESULTADO	REFERENCIA
Eritrocitos de Carpa (<i>Carassius auratus gibelio</i>)	<i>in vitro</i>	Mn	Selenio, Cloruro de metilmercurio, Mercurio	Positivo	Al-Sabti, 1994.
Microsommas <i>Salmonella sp.</i>	Exposición en condiciones de laboratorio	Test de Ames	Pesticidas DDT, Aldrin, a-BHC, DDD	Positivo	Zehra, R.et al, 1995
Eritrocitos de Barbo (<i>Barbus plebejus</i>)	Exposición <i>in situ</i>	Mn	Mutágenos en aguas frescas	Positivo	Minissi, Sandra <i>et al</i> 1995
Eritrocitos Hígado de Trucha arcoiris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	<i>in vitro</i>	Mn	Selenio, Mercurio y metilos	Positivo	Al-Sabti, K. 1995.
Eritrocitos de barbudo (<i>Clarias lazera</i>)	Exposición en condiciones de laboratorio	Mn	Efluentes industriales, EMS	positivo	Odeigah and Osanyinpeju, 1995
Eritrocitos cinco especies de peces	<i>in situ</i>	Mn	Aguas contaminadas y metales pesados	Positivo	Poongothaik, et al. 1996.
Eritrocitos de Carpa común (<i>Cyprinus carpio</i>)	Exposición <i>in situ</i>	Mn	Mercurio	Positivo	Nepomuseno JC. et al.1997
Eritrocitos de trucha comun (<i>Salmo trutta</i>)	Exposición <i>in situ</i>	Mn	Polucion agua	Positivo	Sanchez,S.et al.1997
Linfocitos humanos	<i>in vitro</i>	Cometa	Aflotoxina B ₁	Positivo	Gamal A.et al.1999
Eritrocitos de riñon de Trucha común (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	I.p	Mn y anomalidades nucleares	Colchicina, Ciclofosfmida, mitomicina C, acrilamida, EMS, N-etilnitrosourea	Positivo	Ayllon and García. 2000
Eritrocitos <i>Tilapia. Rendalli, Oreochromis niloticus</i> y <i>Cirpinus carpio.</i>	i.p	Mn	Descarga de alcantarillado	positivo	Grisolia y Starling. 2000
Eritrocitos <i>Tilapia rendalli</i> y <i>O. niloticus</i>	i.p	Mn	Ciclofosfamida, Bleomicina y mitomicina C.	Positivo	Grisolia y Cordeiro. 2000

SISTEMA	RUTA /EXPOSICION	BIOMARCADOR	SUSTANCIA	RESULTADO	REFERENCIA
Eritrocitos de <i>Oreochromis niloticus</i> y Ratón albino suizo	I.p	Mn	Ciclofosfamida, Mitomicina C, Deltanmetrina, dicofol, glifosato y mazapyr	Negativo	Grisolia y Countinho. 2000
*Rio tejo area catchment	Medición	Analisis parámetros fisico-quimicos	Pesticidas, clorofevifos, endosulfan, metoalclor	Positivo	Carejeira, M, 2001
Eritrocitos de Tilapia (<i>Tilapia Rendalli</i>)	i.p.	Mn	GLIFOSATO(50 mg/Kg)	Positivo	Grisolia, K.C. 2002
Eritrocitos de agalla y riñon <i>Oreochromis niloticus</i> y <i>Tilapia rendalli</i>	i.p.	Mn	Ciclofosfamida, Mitomicina C	Positivo	Grisolia y Dario Palhares, 2002
Eritrocitos de Tilapia (<i>Tilapia rendalli</i>)	i.p.	Mn	Mitomicina C	Positivo	Grisolia, K.C. 2002
Eritrocitos de Tilapia nilotica (<i>Oreochromis niloticus</i>)	i.p.	Mn	Mitomicina C	Positivo	Grisolia, K.C. 2002
Eritrocitos de branquias de <i>Garra rufa</i>	Exposición en condiciones de laboratorio	Mn	Lambda-cyhalothrin	Positivo	Cavas T and Gosukara, S, 2002
Eritrocitos de robalo (<i>Dicentrachus labrax</i>)	Exposición en condiciones de laboratorio	Mn y Enzimas del metabolismo	Benzoapireno	Positivo	Gravato y Santos. 2003
Eritrocitos de tilapia nilotica (<i>Oreochromis niloticus</i>)	Exposición en condiciones de laboratorio	Mn	Effluent mill textil	Positivo	Cavas T and Gosukara, S, 2003
Eritrocitos de Robalo (<i>Dicentrachus labrax</i>)	Exposición en condiciones de laboratorio	Mn y Genes del metabolismo (GST y P-450)	Effluent mill textil	Positivo	Gravato y Santos. 2003
Eritrocitos de Bocachico (<i>Prochilodus magdalence</i>)	Exposición en condiciones de laboratorio	Mn	Cloruro de Mercurio	Positivo	Peñalosa, M; Camargo, M y Palacio. .2003
Eritrocitos de branquias de <i>Carassius caucanus</i>	Exposición en condiciones de laboratorio	Mn	Efluentes en zonas agricolas	Positivo	Hoyos, C. Y López M. 2003

5. MARCO TEÓRICO

Una gran variedad de químicos industriales y ambientales pueden causar daños citogenéticos en animales experimentales. Efectos genotóxicos pueden ocurrir en humanos expuestos ocupacionalmente, por su estilo de vida o por la contaminación ambiental. (Heddle. *et al.*,1983). Los métodos clásicos utilizan el estadio de metafase para observar las aberraciones cromosómicas (AC) y así determinar los efectos genotóxicos que ha ocurrido en las células de personas u organismos expuestos. Una alternativa al uso de metafases para análisis citogenético es la Prueba de micronúcleos, que permite en forma más rápida y menos tediosa en peces para evaluar el efecto genotóxico de aguas contaminadas *in vivo* y potencialmente *in situ*.

5.1 ROUNDUP.

El Roundup es un herbicida catalogado en categoría IV de toxicidad (baja), se caracteriza por ser sistémico, porque ataca el xilema y floema de las plantas; no selectivo, es decir no discrimina vegetales; de amplio espectro y se esparce con facilidad en el ambiente; Es usado para eliminar maleza perenne y anual de los cultivos, también es utilizado como madurante de caña, yuca, plátano y en los últimos años se ha implementado en el Plan Colombia para erradicar cultivos ilícitos como la marihuana, la coca y la amapola. Es altamente soluble en agua, prácticamente insoluble en solventes orgánicos. Su compuesto activo es la sal N-fosfometilglicina que viene en forma de sal isopropilamida (IPA), cuando cae al suelo se metaboliza en AMPA (ácido aminometilfosfónico), y formaldehído y con la saliva en N-nitroso glifosato, los tres con la característica común de ser cancerígenos, a este se le adicionan una serie de compuestos inertes para volverlo más efectivo como: **POEA** (surfactante) que produce daño gastrointestinal, alteraciones del Sistema Nervioso Central (SNC), problemas respiratorios, destrucción de los glóbulos rojos, daños al hígado y riñones, corrosivo de ojos y fuertemente irritante de piel. Además es cancerígeno y puede aumentar entre 7 y 22 veces la toxicidad oral aguda del Roundup en humanos respecto a la toxicidad del glifosato en ratas; **Cosmo Flux 411F** (surfactante), sin que se hayan hecho estudios sobre sus posibles efectos tóxicos, ha sido aprobado su uso en Colombia. No forma parte de la formulación comercial, pero se le añade para aumentar el nivel de acción del herbicida. Se ha demostrado que aumenta en 4 veces el efecto del Roundup al incrementar el poder de penetración del Glifosato (citado por: Elsa Nivia, 2000).

Roundup y Roundup ultra de Monsanto son los nombres como comercialmente se conoce al Glifosato, del cual existen varias formulaciones, que generalmente contiene 480 g/L de sal IPA de Glifosato y el surfactante POEA (polioxietyl amina), existen diferencias en las concentraciones de los ingredientes y en la clase o mezclas de POEA, el cual es una familia

de alquilaminas polietoxiladas sintetizadas de ácidos grasos de origen animal. En algunos casos pueden contener surfactantes adicionales (citado por: Elsa Nivia, 2000).

Las fumigaciones aéreas para erradicar cultivos ilícitos empezaron con el programa del gobierno del Plan Colombia, las primeras fumigaciones se hicieron en la región del Putumayo del 22 de diciembre del 2000 hasta el 28 de enero del 2001 y se fumigaron de 25.000 a 29.000 hectáreas, según el Summary Counternarcotics Operations in Putumayo de la Embajada de los Estados Unidos en Colombia. Las fumigaciones se realizaron con Roundup-Ultra, el cual contiene Glifosato y POEA en su formulación comercial. Adicionalmente se ha añadido Cosmoflux 411F para que actúe como surfactante (citado por: Maldonado *et al.* 2001).

A pesar de que solamente se cuenta con datos débiles positivos o negativos sobre la mutagénesis de Glifosato, hay datos epidemiológicos que sugieren relación entre carcinogénesis y la exposición a Glifosato aún cuando los mecanismos no se conocen, hay algunas hipótesis, como la del mecanismo epigenético: en donde el Glifosato ha demostrado disminuir tanto los niveles del citocromo P-450 en los microsomas de las Células hepáticas y las actividades de la etoxicumarina O-detilasa y la PPO hidroxilasa en el hígado (citado por: García, M y Mejía, N 2001).

Varios reportes hablan de poblaciones indígenas de Colombia que habían sufrido náuseas, sarpullidos y problemas estomacales después de que los aviones fumigarán sobrevolando sus comunidades. Campesinos del Río Blanco de Sotar (Nariño), denunciaban también quejarse de vómitos, náuseas, mareos, sarpullido, problemas de la visión y dolores de oído y estómago. Otros informes reportan que el Glifosato es el tercer plaguicida que provoca más problemas de salud entre los trabajadores rurales de California: “su aplicación produce fitoestrógenos en las verduras, que actúan como las hormonas en los mamíferos y podrían causar graves alteraciones en el sistema reproductivo” (citado por: Elsa Nivia, 2001).

El Roundup Ultra se caracteriza por afectar al aparato digestivo con mareos, náuseas, vómitos, dolor gástrico y diarreas; problemas respiratorios con rinitis, tos seca o productiva que puede llegar a neumonía y disnea; puede generar fiebre, taquicardias y aumento de la presión arterial por la penetración del químico en la sangre así como decaimiento general, pérdida de fuerzas, alergias y lesiones de piel y ojos, incluso hasta el fallo renal, todos estos síntomas han sido reportados por las personas que han sido afectadas después de las aspersiones aéreas. También se han presentado quejas de comunidades ecuatorianas que limitan con regiones colombianas donde se realizan aspersiones, presentando sintomatologías debidas al Glifosato, especialmente edemas en la piel (URL: [www. acción ecológica](http://www.accionecologica.com), Reporte 2001).

5.2 TILAPIA NILOTICA (*Oreochromis niloticus*)

Figura 1. Tilapia nilotica *Oreochromis niloticus*

Fuente: URL http://www.mag.go.cr/incopesca/acui_foto4.htm



Oreochromis niloticus.

Familia: Cichlidae

Subfamilia: Pseudocrenilabrinae

Nombre común: Tilapia nilótica

La Tilapia nilótica es originaria de África central y del Norte, ha sido introducida en la zona subtropical y tropical, adaptándose muy bien y constituyéndose en una especie euriótica, ya que resiste cambios en las condiciones físico-químicas del ambiente donde se desarrolla. Esta especie íctica se puede encontrar en temperaturas que varían de 8 a 42 °C aunque su temperatura ideal es 28,5 °C; el pH del medio donde habita es de 7,2, es una especie ovípara. Se introdujo en nuestro país desde los años ochenta. Fue utilizado por primera vez el vocablo tilapia por Smith en 1840, perteneciente al idioma Swahili que significa pez (URL <http://www.ag.arizona.edu/azaqua/lista/reports/castillo.pdf>).

Se han reportado fósiles de Tilapia que datan 18 millones de años de antigüedad cerca al Lago Victoria en África, tomaron mayor importancia desde su redescubrimiento en el siglo pasado. Las tilapias tienen ancestros netamente marinos adaptados a los ambientes lóticos y lénticos de aguas continentales, lo que la hace una especie óptima para la producción en proyectos de piscicultura, siendo la segunda especie más importante a nivel mundial con una producción de 1.000.000 toneladas métricas a partir del año 2000. La producción de tilapia se incrementa continuamente en cantidades significativas ubicando a Colombia en uno de los principales productores de las Américas.

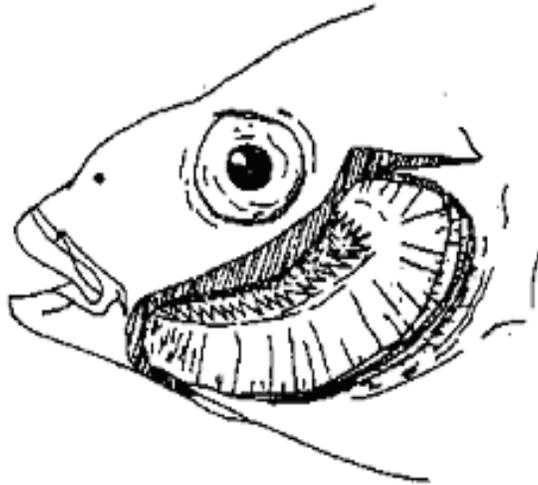
La sensibilidad del género *Oreochromis* a la contaminación de sistemas acuáticos, la ha convertido en un organismo centinela, óptimo para llevar a cabo investigaciones sobre los efectos genotóxicos por exposición ambiental además de su fácil adaptación en condiciones

de laboratorio (Manna y Sadhukhan, 1986; Grisolia y Starling, 2000; Cavas y Gozukara, 2001), que previamente fue corroborado en este estudio.

Estas características hacen que la Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) sea una de las especies ícticas más utilizadas en las investigaciones sobre genotoxicidad acuática, empleando los eritrocitos de las branquias.

Figura 2. Branquia de *Oreochromis niloticus* (órgano empleado en el estudio).

Fuente: URL <http://www.ag.arizona.edu/azaqua/lista/reports/castillo.pdf>



5.3 PRUEBA DE MICRONÚCLEOS

Un micronúcleo es considerado una aberración cromosómica que se forma cuando un fragmento acéntromérico o un cromosoma rezagado no es halado por el huso acromático en la etapa de anafase en la mitosis, en su lugar, estos son envueltos por una membrana en la etapa de telofase y después de darse la citocinesis es cuando se va a observar que una de las dos células hijas tiene el micronúcleo, el cual se tiñe igual que el núcleo corroborando que es material genético (cromatina), razón por la cual los micronúcleos se registran en células interfásicas a diferencia de las aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas que se registran en células metafásicas,

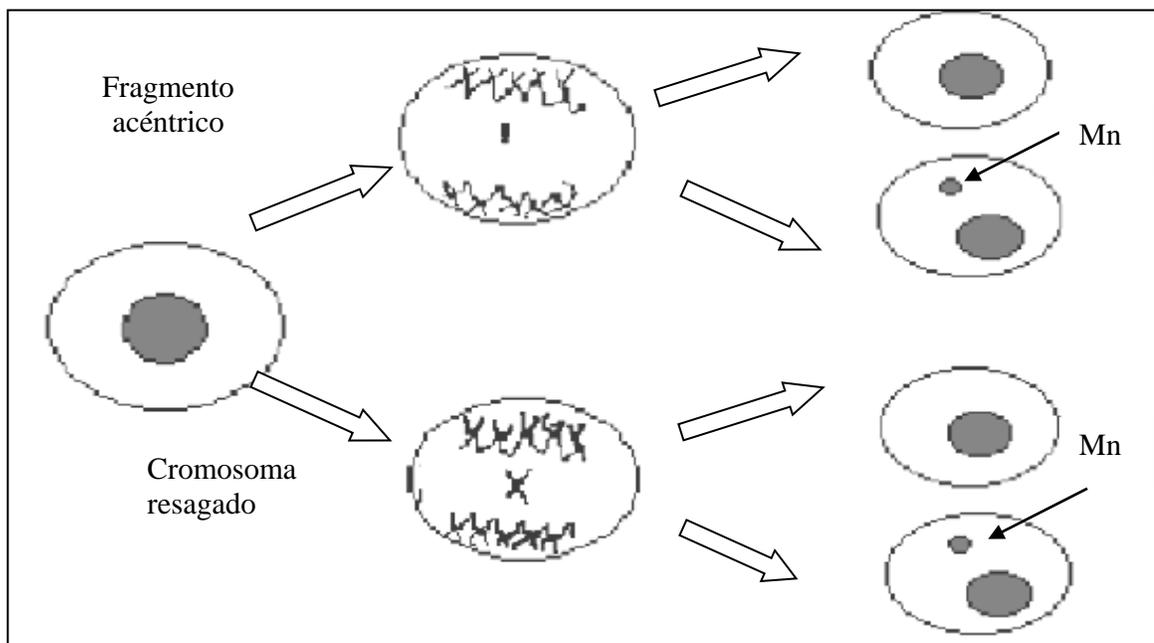
La prueba de micronúcleos es una prueba que esta en proceso de validación, ya que en la comunidad científica tiene gran aceptación por las ventajas que presenta como: **Sensibilidad** porque responde a bajas concentraciones de diferentes sustancias, **confiabilidad** debido a que esta prueba es respaldada por varios estudios, **economía** porque se utilizan pocos reactivos y **facilidad** al desarrollarla (Hoftman y Raat, 1981). La prueba de micronúcleos en peces tiene ventajas sobre técnicas como aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas, debido a que son pruebas

metafásicas. En peces el número y tamaño de cariotipo varía dependiendo de la especie, razón por la cual se dificulta la lectura de las metafases para análisis de genotoxicidad (Kligerman, 1982).

La prueba de micronúcleos es útil para determinar el efecto genotóxico de sustancias contaminantes en organismos de ecosistemas acuáticos y de esta forma poder establecer el riesgo potencial en el hombre, el cual en muchas ocasiones puede conllevar al desarrollo de enfermedades como el cáncer. La mayor ruta de exposición de poblaciones humanas a químicos tóxicos es la comida y los peces son los principales vectores para transferir contaminantes a humanos, por ejemplo en los peces marinos y mariscos, que son la principal fuente de proteína en muchos países, se ha detectado que están contaminados con altas concentraciones de metil mercurio (WHO, 1990).

Figura 3. esquema que ilustra la formación de micronúcleos.

Fuente: Reformado de (Al-Sabti, 1995)



5.4 EFECTO DEL ROUNDUP EN LA CALIDAD FISICO-QUIMICA DE LAS AGUAS NATURALES.

Es indispensable analizar en detalle, el eventual efecto que sobre los parámetros físico-químicos hídricos se consideran como indicadores de calidad de aguas naturales que puedan causar diferentes concentraciones del Roundup (Glifosato). Se pretende determinar hasta qué punto, esta sustancia de naturaleza organofosforada actúa como "tensor" e incide en variaciones significativas en los valores que se consideran como "estándar" bajo el punto de vista de calidad de aguas naturales.

5.4.1 Parámetros físico-químicos a analizar.

A continuación se relacionan los parámetros que se consideran como fundamentales en los estudios de calidad de aguas naturales y sobre los cuales, se hará el estudio de los posibles efectos del Glifosato, así:

- **Relación térmica ambiental e hídrica.** De qué manera la sustancia problema afecta las relaciones térmicas, las cuales a su vez, podrían afectar otros parámetros, ej: tasas de degradación de materia orgánica, porcentaje de saturación de OD.

- **Turbiedad y su relación con sólidos suspendidos totales, capacidad de penetración lumínica.** Hasta qué punto, la presencia del Glifosato incrementa los niveles de sólidos suspendidos y por ende, afecta los procesos lumínicos y bioenergéticos que se generan en medio natural.

- **Concentración de oxígeno disuelto, su porcentaje de saturación y gas carbónico disuelto.** Cómo afecta las concentraciones de estos gases, los cuales son indicativos de las relaciones producción-respiración en los ecosistemas acuáticos, de los niveles trofodinámicos de la biota acuática y en general, del estado trófico del sistema.

- **pH y su relación con la acidez total y alcalinidad total.** Es necesario establecer la incidencia del ingrediente activo (sal-isopropilamida glicina) y sus compuestos inertes de diferente naturaleza (Roundup) en la composición ácida y/o alcalina del sistema hídrico y la eventual sinergia que podría afectar otros parámetros.

- **Dureza total y carbonácea.** A la vez, muy importante es determinar la influencia que podría ejercer sobre la capacidad amortiguadora del sistema (relación en términos de % entre la dureza total y la temporal) y; sobre los niveles de productividad natural, con base en las concentraciones de los iones Ca^{2+} el cual forma parte integral de los procesos metabólicos de la biota acuática y Mg^{2+} que forma parte integral de la molécula de clorofila.

- **Conductividad y su relación con la concentración de sólidos disueltos totales.** De qué manera, la presencia del compuesto puede afectar el estado trófico del sistema hídrico en función de la actividad iónica que se genera como producto de los procesos naturales de transferencia de materia y energía.

- **Nutrientes.** Al analizar los eventuales efectos sobre el estado trófico del sistema hídrico, es indispensable conocer la influencia sobre el desarrollo normal de los ciclos de nutrientes, principalmente compuestos nitrogenados y fosforados. A la vez, esto permite establecer las variaciones de las concentraciones de los iones que se consideran como indicadores químicos de procesos de degradación de materia orgánica: Amonio, Nitritos, Nitratos, Fosfatos y Cloruros. Dichas variaciones, en términos de porcentaje, permitirán dimensionar espacio-temporalmente, el desarrollo del ciclo de vida, los procesos de oxidación, las

demandas de oxígeno y las eventuales alteraciones de otros parámetros indicadores de calidad e agua naturales.

- **Relación entre DBO₅ y DQO.** Como consecuencia de lo anterior, es fundamental establecer las respectivas demandas de oxígeno, bien sea por parte de los microorganismos bacterianos que intervienen en los procesos de degradación de materia orgánica (DBO₅) y/o por todos los procesos de oxidación que ocurren tanto en la columna de agua como en el sustrato.

6. METODOLOGÍA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

En el estudio se tuvo en cuenta dos variables, una de tipo dependiente que es el número de Micronúcleos, la cual toma esta clasificación porque su frecuencia va a depender de las 3 concentraciones de Roundup, constituyéndose esta última en una variable de tipo independiente. Ambas variables son de naturaleza cuantitativa debido a que se puede cuantificar haciendo que su nivel de medición sea de razón numérica. Las concentraciones de Roundup también se pueden considerar como tipo categórico (nominal) cuando se las clasifica como concentración alta, media, baja y control negativo.

El análisis estadístico se hizo mediante pruebas no paramétricas debido a su naturaleza y tamaño de la muestra, no cumplen con todas las asunciones respectivas para aplicarle prueba paramétrica.

Los parámetros fisicoquímicos se analizarán mediante una estadística descriptiva.

Cuadro 2. Variables

NOMBRE	TIPO DE VARIABLE	NATURALEZA	NIVEL DE MEDICION	ANALISIS ESTADISTICO
MICRONÚCLEO (Mn)	DEPENDIENTE	CUANTITATIVA	RAZON	REGRESION LINEAL
3 CONCENTRACIONES	INDEPENDIENTE	CUANTITATIVA	RAZON	REGRESION LINEAL

Para identificar la concentración letal cincuenta (CL₅₀) de Roundup en tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*), se utilizó 8 individuos para cada uno de los experimentos ensayo-error, el Roundup que se utilizó en su presentación comercial, viene en formulación líquida con 480g/L del compuesto activo (sal N-fosfonometilglicina). Esta prueba se inicio con 25 mL del compuesto puro, agregados a 12 litros de agua natural del acuario, a una concentración de 2,08 mL/L y para genotoxicidad utilizamos 8 individuos en cada uno de los 12 acuarios para un total de 96 peces .

Cuadro 3. Evaluación de letalidad y genotoxicidad

GRUPO	TRATAMIENTO	No ANIMALES	No REPETICIONES	No CELL ANALIZADAS	No PLACAS
CL ₅₀	Roundup	8	9	-	-
CONTROL -	Agua Natural	8	3	4000/TTO	4
EXPERIMENTAL	Dosis Alta	8	3	4000/TTO	4
	Dosis Media	8	3	4000/TTO	4
	Dosis baja	8	3	4000/TTO	4

Cuadro 4 . Parámetros físico-químicos hídricos a evaluar.

PARAMETRO
Relaciones térmicas: ambiental e hídrica.
Gases disueltos: O.D; % sat. OD y CO ₂
pH y relación con Acidez total y Alcalinidad total.
Turbiedad y sólidos suspendidos totales.
Dureza total y Carbonácea. Capacidad “buffer” del sistema.
Conductividad y sólidos disueltos totales.
Indicadores químicos de procesos de degradación materia orgánica: Amonio, Nitritos, Nitratos, Fosfatos, Cloruros.
Relación entre DBO ₅ . y DQO.

6.1 SELECCIÓN DE LOS PECES OBJETO DE ESTUDIO (*Oreochromis niloticus*).

Los peces objeto de estudio, *Oreochromis niloticus*, después de ser colectados en una estación piscícola de Timbio (Cauca) (ver figura 4), fueron llevados al laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la Universidad del Cauca, donde se aclimataron en un acuario con capacidad de 200 litros de agua natural aireada continuamente, alimentados 4 días a la semana con pescarina. Todos los individuos presentaban una longitud de 4.5 a 6 cm, un peso de 5 a 8 gramos, se encontraban en etapa alevina y el sexo fue tomado en forma aleatoria. Transcurridos 7 días, tiempo que se considera adecuado para la adaptación en condiciones de laboratorio (Countiño y Grisolia, 2000), se inició con los experimentos de toxicidad, genotoxicidad y evaluación de los parámetros fisicoquímicos para determinar el efecto del Roundup sobre la calidad de las aguas.

El agua que se utilizó en el experimento tenía condiciones físico-químicas adecuadas para los peces. Fue recolectada en el Río Molino parte alta, este se encuentra ubicado a 5 Km de la ciudad de Popayán, vía al Huila (ver figuras 5 y 6); se caracteriza por ser un río en el que no se observa una influencia antrópica directa, el agua natural fue transportada al laboratorio y aireada constantemente para el desarrollo del estudio.

Figura 4. Estanque de la estación piscícola de Timbio-Cauca (C.R.C.), donde se obtuvieron los peces *Oreochromis niloticus* del estudio.



Figura 5. Rio Molino (Sitio de recolección del Agua).



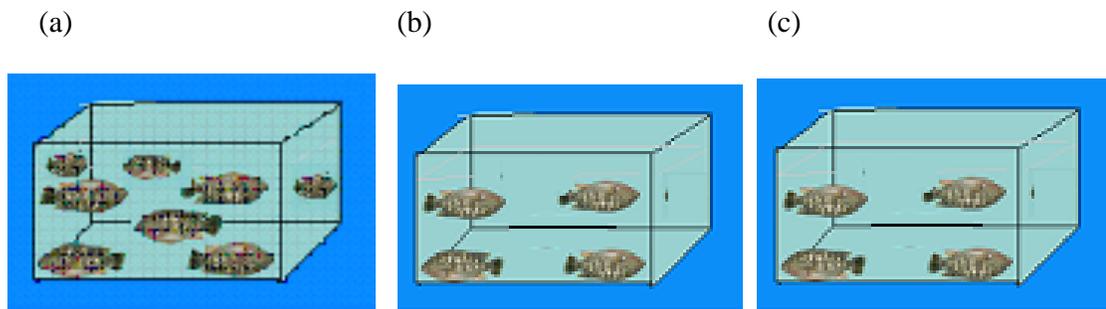
Figura 6. Rio Molino Km 5 via al Huila



6.2 PRUEBA CL_{50} (Concentración Letal cincuenta)

En un acuario se colocaron 8 peces en 12 litros de agua natural recolectada en el Río Molino Km. 5 vía al Huila. El tratamiento inicial fué 25mL de Roundup (2.08mL/L). Se Observó el comportamiento de los animales por 72 horas. Según los resultados de la prueba anterior se aumentó o disminuyó la concentración mediante ensayo-error, hasta que al menos la mitad de los individuos (4 peces) muera. Después de encontrar la concentración letal cincuenta de Roundup (CL_{50}) en *Oreochromis niloticus*, se confirmó esta concentración con dos experimentos más. Simultáneamente se tomaron datos de los parámetros físico-químicos fundamentales. Las condiciones de luz y oscuridad fueron adaptadas (12 horas luz y 12 horas de oscuridad), debido a que el laboratorio se acondicionó con tejas translúcidas, condiciones que se asemejan a la realidad.

Figura 7. (a) Un acuario con 8 peces para realizar prueba CL_{50} , (b) La mitad de la población se muere (CL_{50}), (c) Se comprueba la CL_{50} con un nuevo experimento.



6.3 SELECCION DE LAS CONCENTRACIONES EXPERIMENTALES

El Roundup se disolvió en agua natural para obtener la concentración final esperada para cada tratamiento, y se las obtuvo de la siguiente manera:

La Concentración alta (C.Alta): El 80% de la CL_{50} se seleccionó como la concentración experimental alta, que constituye la Concentración Máxima Tolerada. Esto se determinó mediante la siguiente fórmula: $C.Alta = 80\% (CL_{50}) = CMT$

La Concentración media (C.Media): La mitad de la concentración máxima tolerada se estableció como la concentración media, se calculó mediante la siguiente fórmula: $C.Media = (80\% CL_{50})/2$.

La Concentración baja (C.Baja): La cuarta parte de la concentración máxima tolerada se estableció como la concentración baja, se calculó mediante la siguiente fórmula: $C.Baja = (80\% CL_{50})/4$.

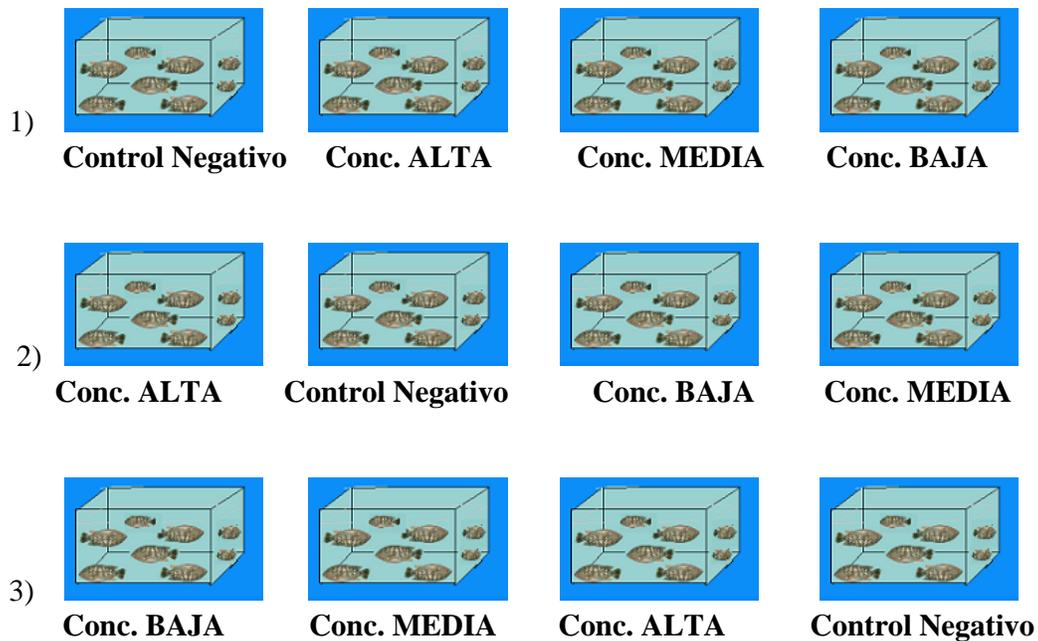
6.4 SELECCIÓN DE LA CONCENTRACION CONTROL

Control negativo: Los peces se sometieron al control negativo que es agua natural, el disolvente empleado. En este control lo único que varía de los demás tratamientos es la ausencia de plaguicida.

6.5 PRUEBA DE GENOTOXICIDAD

Antes de iniciar con los experimentos, los responsables de este trabajo de grado estandarizaron la técnica de Micronúcleos en eritrocitos de peces en el laboratorio. Se trabajó con un diseño de bloques aleatorizados y se utilizaron 12 acuarios distribuidos en 3 bloques de 4 acuarios cada uno. La distribución de los bloques se realizó de la siguiente manera. El bloque 1: Tenía 4 acuarios, de los cuales a 3 se les aplicó las concentraciones Alta, Media y Baja de Roundup respectivamente y 1 acuario con el control Negativo. El bloque 2 y 3: llevaron la misma distribución del bloque 1 con la única diferencia de que los tratamientos se dispusieron de forma aleatoria en cada acuario. En cada acuario se colocaron 8 peces de la misma edad, se sacrificaron 2 peces por acuario con un intervalo de 48 horas, por lo tanto se realizaron 4 muestreos con una duración total de 8 días.

Figura 8. Distribución de los tratamientos en bloques aleatorizados para la evaluación del efecto genotóxico.



6.5.1 Distribución de los bloques en el laboratorio.

La distribución de los tratamientos se realizó de forma aleatorizada en cada acuario (ver fig.10), un total de 12 acuarios divididos en 3 bloques de 4 acuarios (ver fig. 11) para los distribuir los tratamientos y un acuario grande (ver fig.9) en el cual los peces se aclimataron por 15 días y se alimentaron durante el transcurso del experimento.

Figura. 9. Distribución de 3 bloques con sus respectivos acuarios (4) de forma aleatorizada y un acuario grande de aclimatación y alimentación.



Figura 10. Distribución de acuarios por cada bloque.



Figura.11. Distribución aleatorizada de los 4 acuarios por cada bloque.



6.5.2 Protocolo de micronúcleos en eritrocitos de las branquias de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*)

Para la obtención de eritrocitos de branquia en peces, se llevó a cabo el desarrollo de un protocolo, el cual fué enseñado en el laboratorio de citogenética y genética molecular de la Universidad de Antioquia por la Mg. Mercedes Peñalosa, este protocolo fue estandarizado en el laboratorio de Toxicología Genética y Citogenética de la investigación, se realizaron algunas variaciones en el tiempo de envejecimiento de las placas, y el tiempo requerido para una optima tinción.

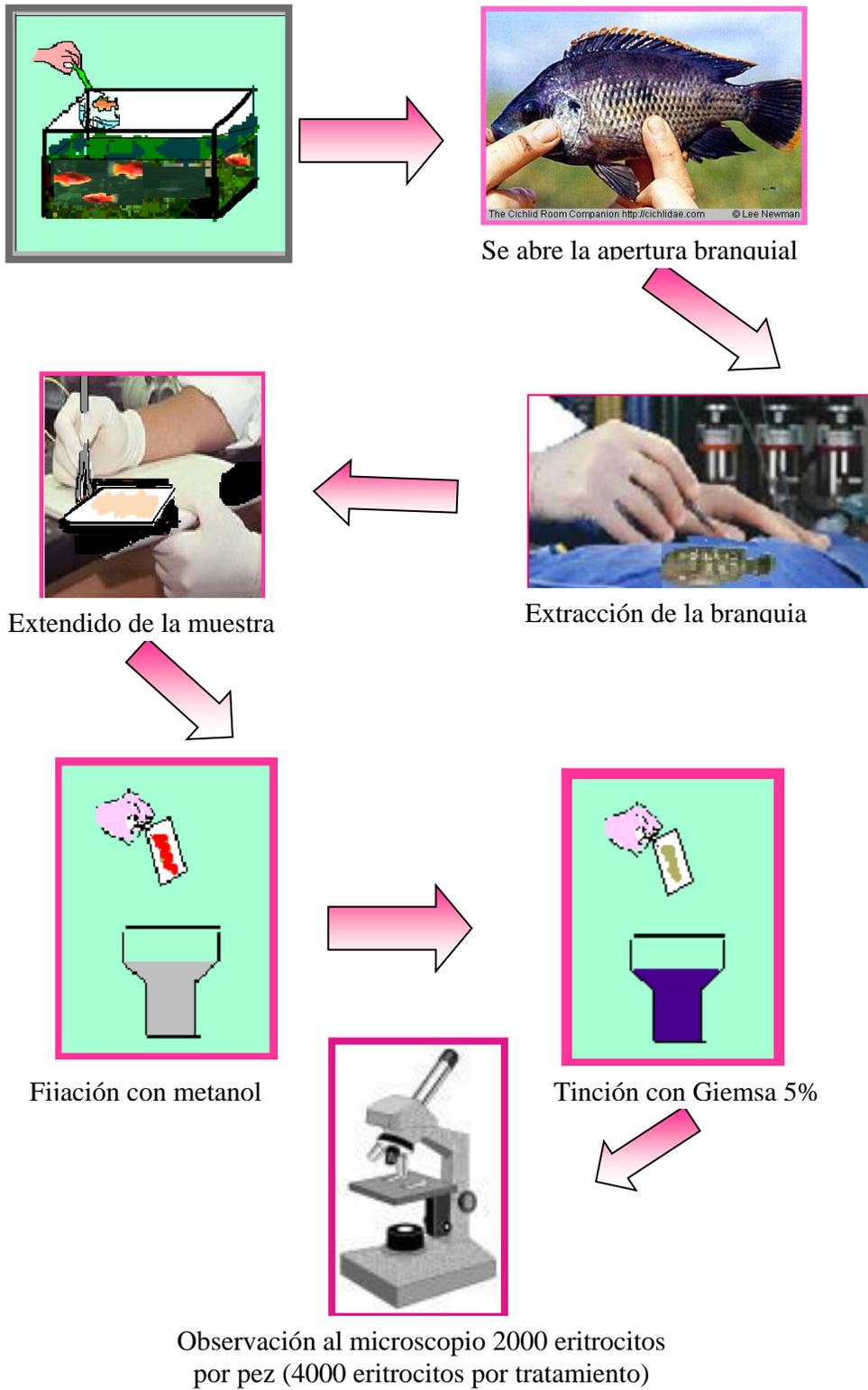
A continuación se citan los pasos requeridos para realizar el protocolo de .micronúcleos en eritrocitos de las branquias de pez (ver figura 12).

Para obtener los eritrocitos de las branquias del pez, se abre el opérculo branquial y se corta con un bisturí la branquia desde la parte basal, la cual se puede identificar porque es de color rosado claro, con la ayuda de una pinza la retiramos con mucho cuidado. Inmediatamente se saca una gota de sangre de la branquia y se coloca en un portaobjetos que previamente ha sido limpiado y codificado para luego realizar doble ciego en la lectura de las placas y de esta forma evitar sesgos que puedan alterar los resultados. Con un cubreobjetos se realiza un extendido muy fino con el fin de que las células no se traslapen y así obtener una buena visualización al microscopio. Luego se seca la placa por unos 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, es importante fijar la placa con metanol por 5 segundos. Al día siguiente se tiñe con Giemsa al 5% por 7 minutos. Se observa al microscopio donde se analizan 4000 células por tratamiento (2000 células por pez) con objetivo de 100x.

Cuadro 5. Actividades para realizar en el protocolo.

ACTIVIDAD	MATERIALES Y EACTIVOS	TIEMPO
Extracción de branquia	Bisturí, tabla de disección y pinza	--
Colocar una gota de sangre en el portaobjeto	Portaobjeto	--
Realizar un extendido	Cubreobjeto	--
Secado de la placa a °T ambiente		30 minutos
Fijación de la placa	Metanol	5 segundos
Tinción	5%	7 minutos

Figura 12. Protocolo de la prueba de micronúcleos en branquias de pez.



6.6 PRUEBA “CALIDAD DE AGUAS”

Las concentraciones experimentales (Alta, Media y Baja) y control Negativo, se distribuyeron en 4 acuarios en 12 litros de agua natural, los cuales eran oxigenados constantemente, todos los acuarios tuvieron las mismas condiciones (luz, temperatura, sustrato entre otros). La medición de los parámetros físico-químicos se realizó de forma simultánea al desarrollo del experimento de genotoxicidad, con equipos adecuados y calibrados, para asegurar datos confiables.

Los parámetros físico-químicos universales que se evaluaron a diario fueron la temperatura (Ambiental y Agua), concentración de oxígeno disuelto (mg/L), conductividad (uMhos/cm), sólidos disueltos totales (mg/L), concentración de gas carbónico disuelto (mg/L), porcentaje de saturación de oxígeno(%), pH (Unidades).

Los parámetros que se evaluaron tanto al inicio como al final del experimento fueron la turbiedad (NTU), amonio (NH_4), nitritos (NO_2), nitratos (NO_3), fosfatos (PO_4), demanda biológica de oxígeno (DBO_5) y la demanda química de oxígeno (DQO).

El análisis estadístico para los parámetros físico-químicos del experimento, fue realizado mediante un análisis descriptivo (Cualitativo).

6.7 REGISTRO Y PROCESAMIENTO DE DATOS.

Los datos se registraron en cuadros individuales para cada prueba (ver cuadros 6, 7, 8 y 9). Para la prueba de letalidad CL_{50} , los datos tanto de parámetros físico-químicos como las observaciones de toxicidad fueron registrados en cuadros (ver cuadros 6 y 7).

En la prueba de genotoxicidad (Prueba de micronúcleos), las placas obtenidas en los muestreos fueron codificadas y analizadas al microscopio con doble ciego para eliminar algún tipo de sesgo y garantizar la confiabilidad de los resultados, teniendo en cuenta los mejores campos para el conteo y el registro fotográfico. Simultáneamente se analizó y registró los parámetros físico-químicos del agua y los datos obtenidos de micronúcleos.

Los datos de frecuencia de micronúcleos en 2000 eritrocitos por pez fueron llevados a cuadros maestros (ver cuadro 9). Luego los datos fueron ingresados a programa excel y una vez organizados se transfirieron al paquete estadístico SPSS (Statistical Package for Social Scientific), para el análisis estadístico descriptivo y referencial. Se aplicaron pruebas de normalidad, independencia y homogeneidad de varianza para determinar si los datos cumplieron con los requerimientos para aplicar pruebas paramétricas. El número promedio de Micronúcleos correspondiente a la concentración de Roundup cumple con la asunción de igualdad de varianza (Levene: $p > 0.05$), pero no se adapta a la distribución normal (Shapiro-Wilk: $p < 0.05$); por lo tanto el análisis estadístico de los datos se realizó mediante las pruebas no paramétricas como la de Kruskal-wallis (homóloga de la ANOVA, prueba paramétrica).

7. RESULTADOS

7.1 TOXICIDAD DE ROUNDUP (CL₅₀) EN TILAPIA NILÓTICA (*Oreochromis niloticus*)

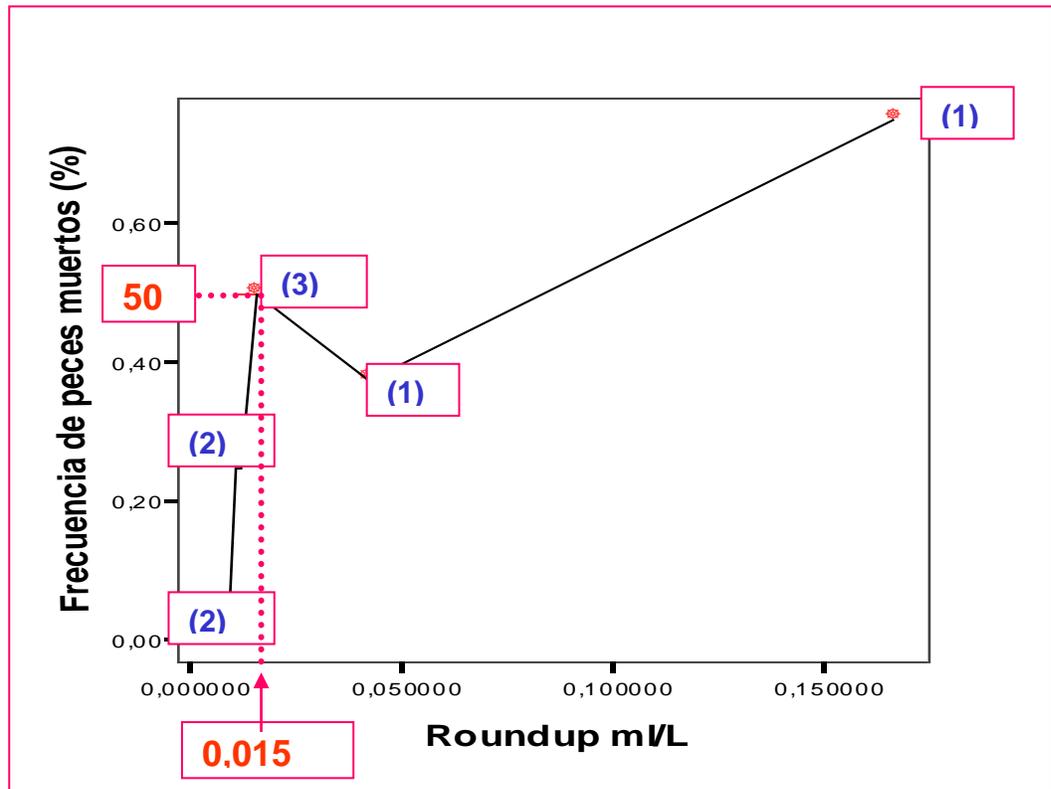
En el cuadro 10 y figura 13, se presentan los resultados del análisis de toxicidad del Roundup en Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*), con el fin de identificar la concentración letal cincuenta (CL₅₀) y la Concentración Máxima Tolerada (CMT).

Cuadro 10. Datos de Toxicidad CL₅₀

EXPERIMENTO	ml de Roundup/L agua	Tiempo(horas)	Total peces	No muertos	No Vivos
1	2.0833	72	8	6	2
2	0.041666667	72	8	3	5
3	0.005	72	8	0	8
4	0.008333333	72	8	0	8
5	0.01	72	8	2	6
6	0.011666667	72	8	2	6
7	* 0.015	72	8	4	4
8	0.015	72	8	4	4
9	0.015	72	8	4	4

*** 0.015 mL/L, es la concentración letal cincuenta.**

Figura 13. Frecuencia de peces muertos vrs concentraciones de Roundup.



- | | | | |
|-----|-----------------------------|-------|------------------------|
| () | Número de experimentos | 0,015 | Concentración letal 50 |
| 50 | Porcentaje de peces muertos | | |

Con base en la figura 13 y cuadro 10, se observa una relación dosis-efecto o asociación positiva ya que a medida que la concentración de Roundup aumenta, la letalidad también aumenta a las 72 horas.

Para identificar la CL_{50} se hicieron un total de 9 experimentos, cada uno de ellos con 8 peces, la experimentación se inició con una concentración de Roundup al azar (2.083 ml/L) que provocó la muerte de 6 individuos, es decir una letalidad del 75%, con base en esta información se realizaron 6 experimentos más disminuyendo o aumentando la concentración hasta lograr identificar la concentración de **0.015 mL/L** que mató a la mitad de los animales tratados. Esta concentración fue confirmada con dos experimentos.

A partir de esta concentración letal cincuenta de Roundup (0.015 mL/L) se seleccionó la concentración alta (0.012 mL/L), media (0.006 mL/L) y baja (0.003 mL/L) de Roundup, esta selección se hizo teniendo en cuenta el 80% de CL_{50} , para concentración alta, el 50% de concentración máxima tolerada para concentración media y el 25% de la concentración máxima tolerada para concentración baja de Roundup.

7.2 PRUEBA DE GENOTOXICIDAD DEL ROUNDUP EN TILAPIA NILÓTICA (*Oreochromis niloticus*).

En la Tabla 1. y Figura 14 se presenta, el número promedio de micronúcleos en 2000 eritrocitos; con su respectivo error estándar, desviación estándar y el tamaño de la muestra (n), correspondiente a las diferentes concentraciones de Roundup y diferentes días de muestreo.

El número promedio de Micronúcleos correspondiente a la concentración de Roundup cumple con la asunción de igualdad de varianza (Levene: $p > 0.05$), pero no se adapta a la distribución normal (Shaphiro-Wilk: $p < 0.05$); por lo tanto el análisis de los datos se hizo principalmente mediante pruebas no paramétricas.

Tabla 1 .Concentraciones de muestreo vs Tiempo de muestreo en días.

Concentración (mL/L)	Tiempo de muestreo(días)	MEDIA	ERROR ESTANDAR	DESVIACIÓN ESTANDAR	N
0	2	2.500	1.220	1.51658	6
	4	3.167	1.220	2.99444	6
	6	2.167	1.220	2.04124	6
	8	0.333	1.220	0.51640	6
	Total	2,0417	0,643		24
0,003	2	5.833	1.220	3.86868	6
	4	6.500	1.220	2.88097	6
	6	3.333	1.220	1.75119	6
	8	1.500	1.220	0.83666	6
	Total	4,292	0,634		24
0,006 ^b	2	7.500	1.220	1.37840	6
	4	9.667	1.220	6.83130	6
	6	3.167	1.220	2.71416	6
	8	6.000	1.220	2.75681	6
	Total	6,583	0,634		24
0,012 ^b	2	10.167	1.220	2.92689	6
	4	9.333	1.220	4.27395	6
	6	5.333	1.220	2.65832	6
	8	5.667	1.220	1.63299	6
	Total	7,625	0,634		24

$p^a = 0.000$ $p < 0.05$

- Nivel de Significancia[®] para comparar las concentraciones, calculado mediante la prueba no paramétrica de Kruskal-wallis.
- El número promedio de Micronucleos de las diferentes concentraciones difiere significativamente ($p < 0.05$) de los tratamientos 0 y 0.003 mL/L, calculado mediante la prueba de correlación múltiple de Duncan.

Figura 14 . Frecuencia de Micronucleos / 2000m eritrocitos de branquias de Tilapia nilótica vrs Concentraciones de Roundup (mL/L).

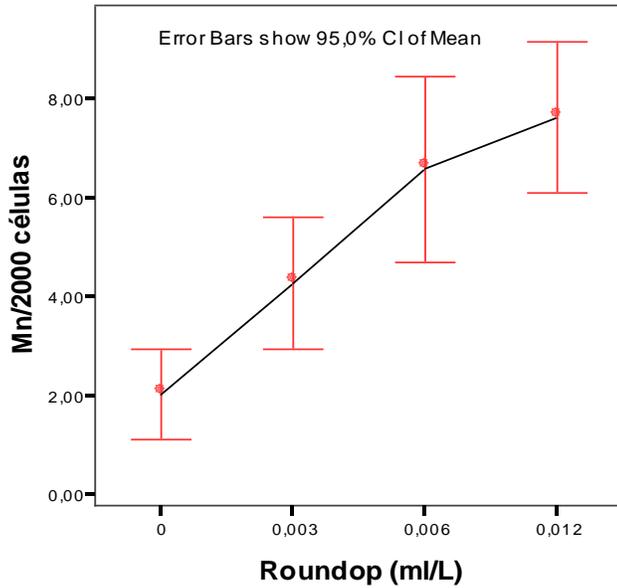
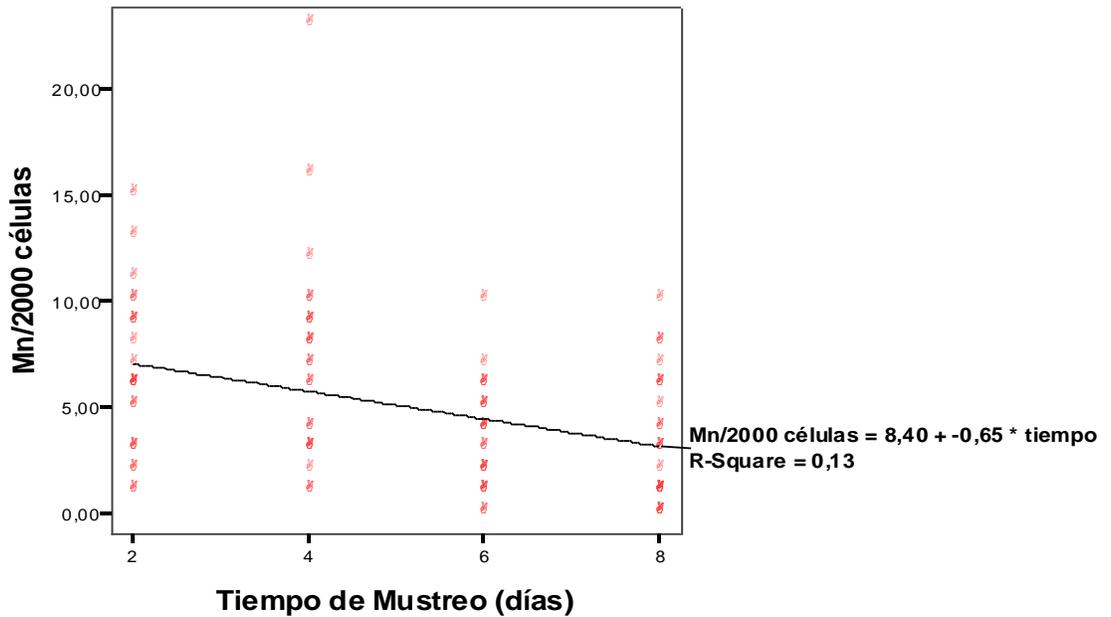


Figura 15 . Frecuencia de Micronúcleos en los diferentes días de muestreo



En la tabla 1. Se observa que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en el número promedio de micronúcleos en 2000 eritrocitos entre los cuatro tratamientos de Roundup incluido el control negativo. En la figura 14. se observa una respuesta dosis-efecto, porque a medida que aumenta la concentración de Roundup hay un incremento en la frecuencia de micronúcleos. La concentración de Roundup que presentó la mayor frecuencia de micronúcleos (7.625 Mn/2000) fue la concentración 0.012 mL/L. Hubo una diferencia estadísticamente significativa entre el número promedio de micronúcleos (n° XMn/2000 eritrocitos) registrada para las concentraciones alta y media (7.625 y 6.583 XMn/2000 eritrocitos) (ver Figura 16 y 17) respecto de la concentración baja y control negativo (4.292 y 2.0417 XMn/2000 eritrocitos) (ver Figura 18).

En la Tabla 1 y Figura 15 se observa que en general el número de micronúcleos por 2000 eritrocitos disminuye al transcurrir el tiempo (días) de muestreo.

Mediante análisis de regresión (ver figura 15) se puede inferir que la variabilidad observada en el número de Mn/2000 eritrocitos se debe en un 13% al tiempo de exposición, es decir que sobra un 87% sin explicar, que posiblemente se debe a otros factores no considerados en el experimento.

El experimento se hizo mediante un diseño de bloques aleatorizados, el cual no influyó en la inducción de micronúcleos por el Roundup, ya que no hubo diferencia significativa (Kruskal-Wallis: $p > 0.05$) entre ellos.

Con base en los análisis estadísticos realizados podemos concluir que Roundup resultó genotóxico en *Oreochromis niloticus* incrementando la frecuencia de micronúcleos a medida que se aumentan las concentraciones (0.003, 0.006, 0.012 mL/L) del compuesto, este efecto genotóxico se observó especialmente para las concentraciones alta (0.012 mL/L) y media (0.006 mL/L). Se observó que hubo una disminución en la frecuencia de micronúcleos al pasar los diferentes muestreos (días).

Figura 16. Micronúcleos observados en sangre periférica de branquias de *Oreochromis niloticus* con concentración alta (0.012mL/L) de Roundup.

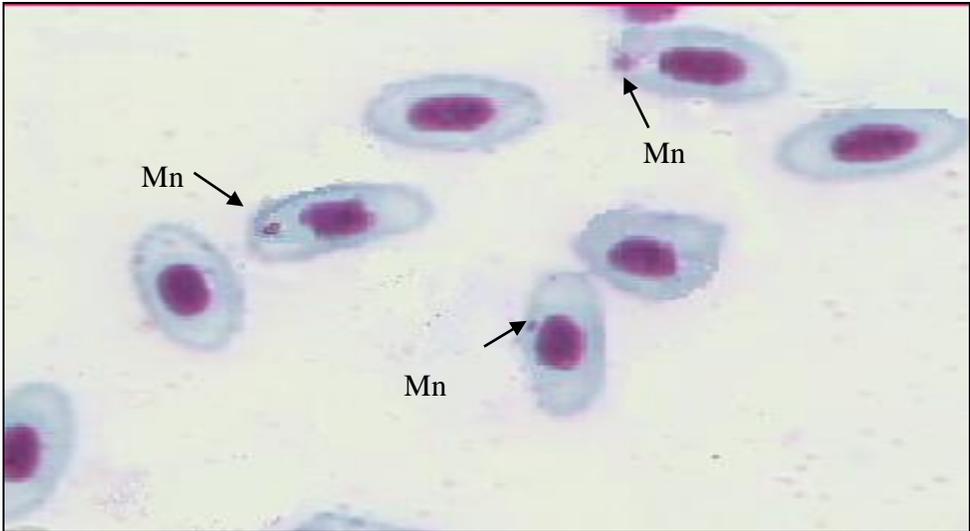


Figura 17. Micronúcleos observados en sangre periférica de branquias de *Oreochromis niloticus* con concentración media (0.006 mL/L) de Roundup.

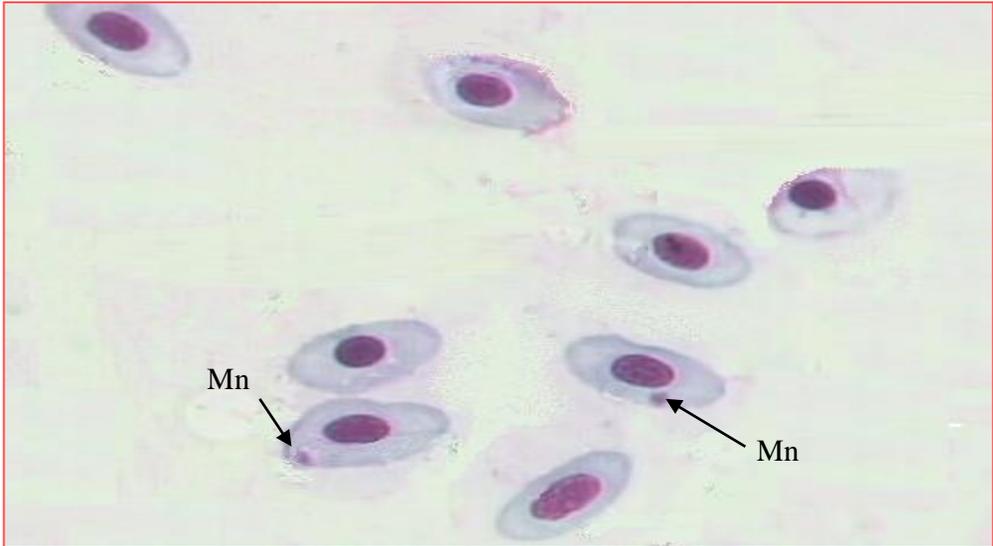


Figura 18. Micronúcleo observado en sangre periférica de branquias de *Oreochromis niloticus* con concentración baja de Roundup.

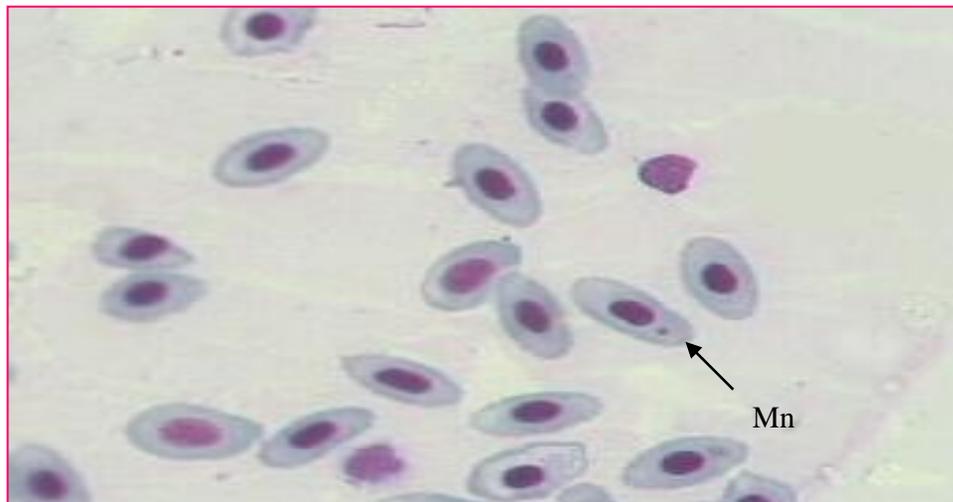
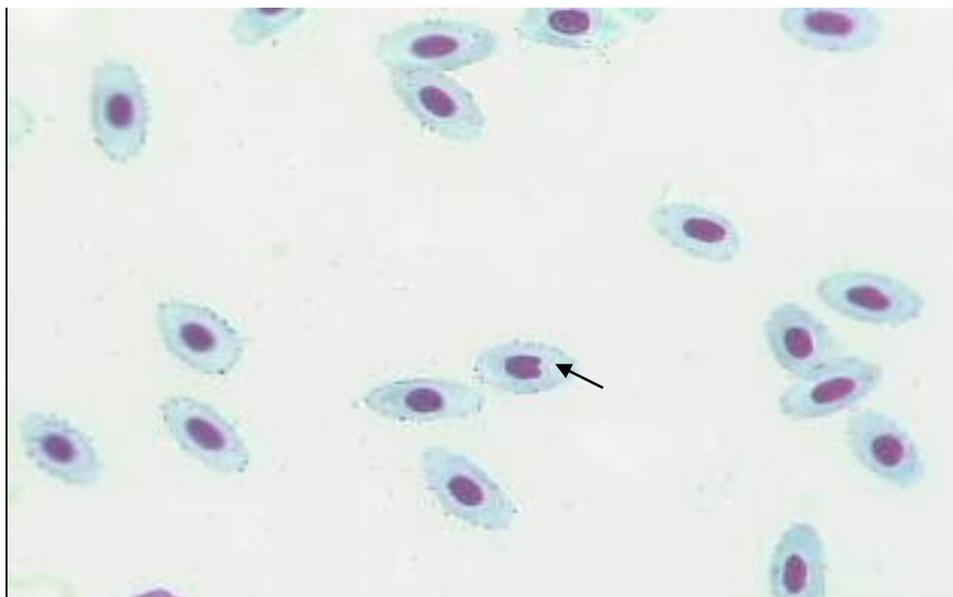


Figura 19. Anomalías o deformaciones nucleares observadas en algunas placas.



7.3 PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS PARA DETERMINACIÓN DE CALIDAD DEL AGUA.

Al comparar los parámetros físico-químicos del control negativo (agua natural) con los tratamientos en concentraciones altas, media y baja, se observa que en estos últimos hubo un cambio significativo durante el transcurso del experimento en parámetros tales como: turbiedad, concentración de gas carbónico disuelto, pH, conductividad, concentración de sólidos disueltos totales, amonio, fosfatos y fósforo.

No se apreció incidencia directa negativa sobre la concentración de oxígeno disuelto inicial, excepto en el tratamiento con la concentración mas baja, igual situación sucedió en relación con el porcentaje de saturación de oxígeno disuelto y su porcentaje de saturación, DBO₅ y DQO (ver cuadro N° 12).

Los valores registrados para el agua natural (control), indican un índice de calidad adecuado para el normal desarrollo y distribución de la biota acuática y de los normales flujos de materia y energía, en donde se puede apreciar baja turbiedad, porcentaje de saturación de oxígeno disuelto que alcanzó el mínimo óptimo (80%), concentración de gas carbónico disuelto que indica procesos normales de respiración, pH ligeramente ácido, conductividad y concentración de sólidos disueltos totales, lo cual se puede verificar al analizar los valores hallados para los indicadores químicos de procesos de degradación de materia orgánica (amonio, nitritos, nitratos), DBO₅, DQO y ausencia en la columna de agua de compuestos a base de fósforo.

Los valores arrojados en la dosis alta (0.012ml/L), muestran un incremento en los siguientes parámetros: turbiedad, pH (tendencia a la alcalinidad), conductividad, sólidos disueltos totales, DBO₅, amonio; y significativamente fosfatos y fósforo total; disminuyendo curiosamente la DQO. Con la dosis media (0.006mL/L), se puede apreciar disminución en la concentración de oxígeno disuelto y leve incremento en la de gas carbónico disuelto, lo que refleja cierto tipo de actividad de oxidación y/o respiración, puesto que se registraron valores para fosfatos, fósforo total y amonio. Con la dosis baja (0.003mL/L), se observa un incremento significativo de la turbiedad, del gas carbónico disuelto, de la conductividad, sólidos disueltos totales, DBO₅, DQO, fosfatos y fósforo total y disminución marcada de la concentración de oxígeno disuelto y del pH.

Cuadro 11. Parámetros físico-químicos en el experimento Concentración Letal 50.

EXPERIMENTO	Tto mL de Roundup/ L agua	Temperatura (°C)	Salinidad (%)	Conductividad (uMhos/cm)	PH (unidades)	Concent CO ₂ (mg/L)	Concent. O ₂ (mg/L)	Saturación de O ₂ (%)
1	0,1666	17,5	0	200	6,38	0,9	3,5	39
2	0,041666667	17,5	0	200	6,05	1,1	3,3	37
3	0,005	17	0	200	6,04	1,5	3,4	38
4	0,008333333	17	0	200	6	2	3,9	40
5	0,01	17,8	0	190	6	1,75	4,1	42
6	0,011666667	17,8	0	180	5,5	1	3,9	39
7	*0,015	17,5	0	170	5,57	1,5	4,1	41
8	*0,015	17,5	0	170	5,57	1,5	4,1	41
9	*0,015	17,5	0	170	5,57	1,5	4,1	41

* **0.015** = Concentración Letal cincuenta (CL₅₀)

Cuadro 12 . Parámetros físico-químicos analizados (valores promedio) para la prueba de genotoxicidad.

PARAMETRO	TRATAMIENTO (mL/L)			
	ALTA (0,012)	MEDIA(0,006)	BAJA (0,003)	(Agua natural)
Temperatura(°C)	17.5	17.5	17.5	17.5
Turbiedad (NTU)	6	5	15	1
Oxígeno disuelto (mg/L)	6.6	6.2	3.7	7.1
% Saturación Oxígeno	71	68	40	80
CO ₂ (mg/L)	2	2.5	3.80	2
pH (Unidades)	7.18	7.31	6.70	6.74
Conductividad (uMhos/cm)	90	96	100	62
Sólidos disueltos totales (mg/L)	36	38.4	40	24.8
Salinidad (‰)	0	0	0	0
DBO ₅ (mg/L)	2.5	2.0	3.5	1.5
DQO (Mg/L)	66	43	85	76
Amonio(mg/L)	7	7	7	0.25
Nitritos(mg/L)	0.01	0.01	0.01	0.01
Nitratos(mg/L)	90	90	65	90
Fosfatos(mg/L)	0.88	0.072	2.11	No se detectó
Fósforo(mg/L)	0.32	0.24	0.69	No se detectó

Figura. 20 . Valores de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) versus concentraciones de Roundup.

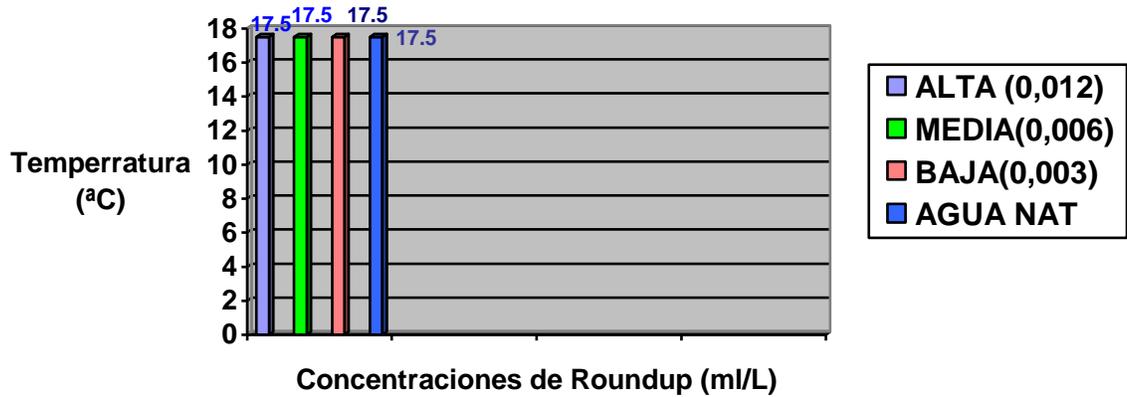


Figura. 21 . Valores de turbiedad (NTU) versus concentraciones de Roundup

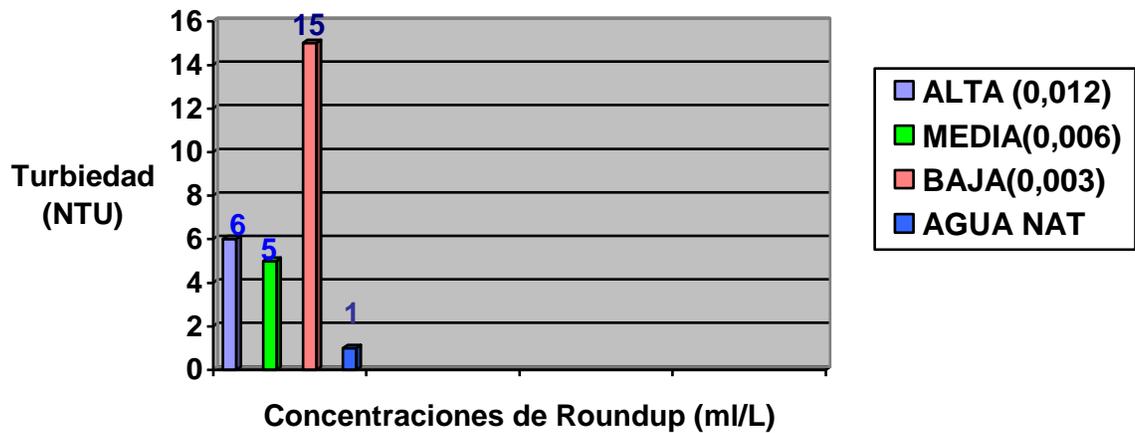


Figura 22 . Valores de Oxigeno Disuelto (mg/L) versus concentraciones de Roundup.

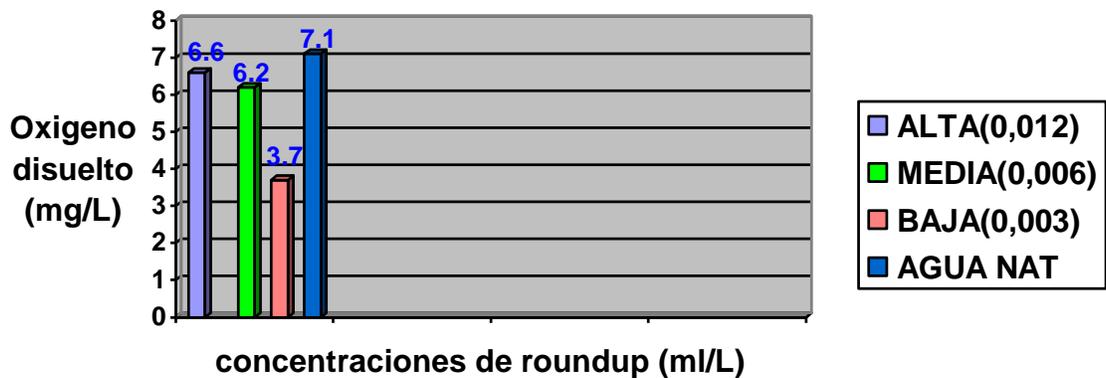


Figura. 23. Valores de % de Saturación de Oxígeno versus concentraciones de Roundup.

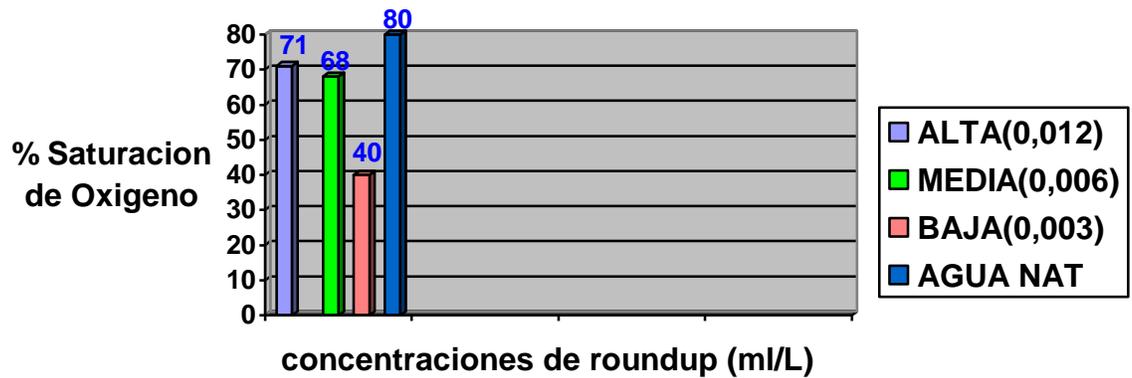


Figura 24. Valores Concentración de CO₂ (mg/L) versus Concentraciones de Roundup.

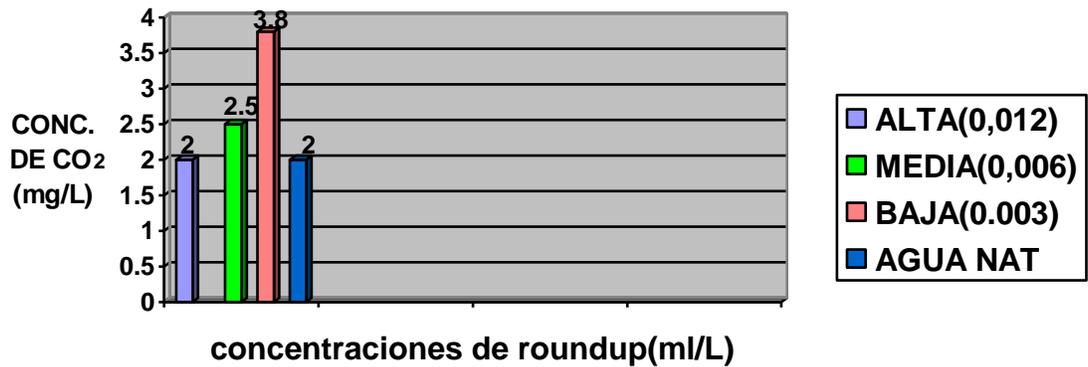


Figura. 25. valores de pH(Unidades) versus concentraciones de Roundup.

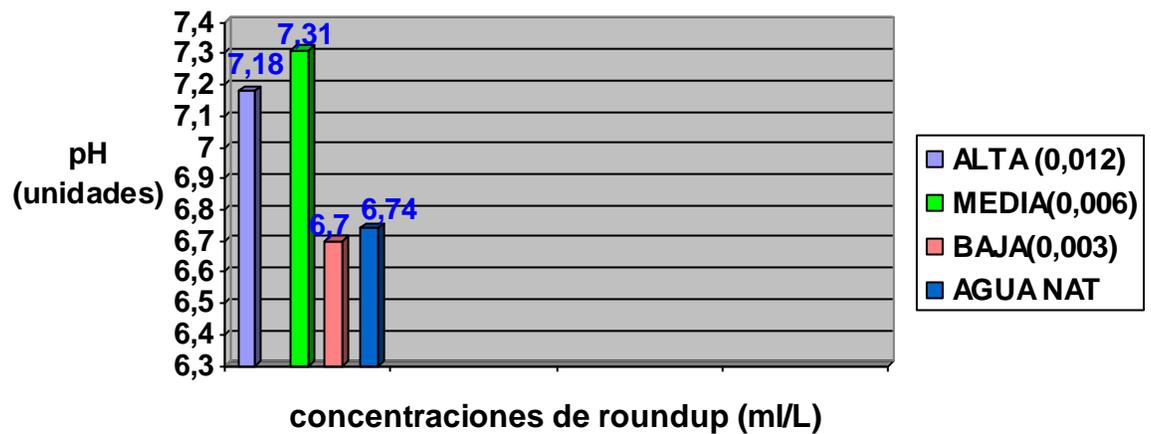


Figura. 26. valores Conductividad (uMhos/cm) versus concentraciones de Roundup.

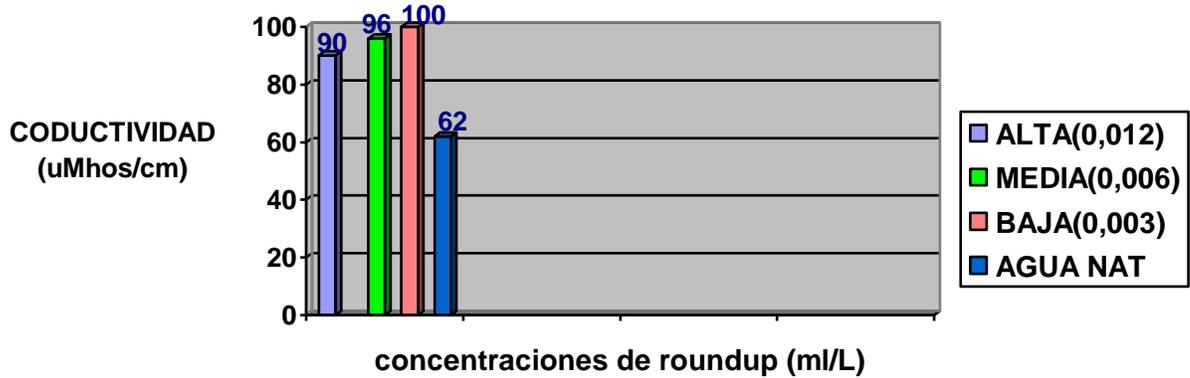


Figura 27. Valores Sólidos disueltos totales (mg/L) versus concentraciones de Roundup.

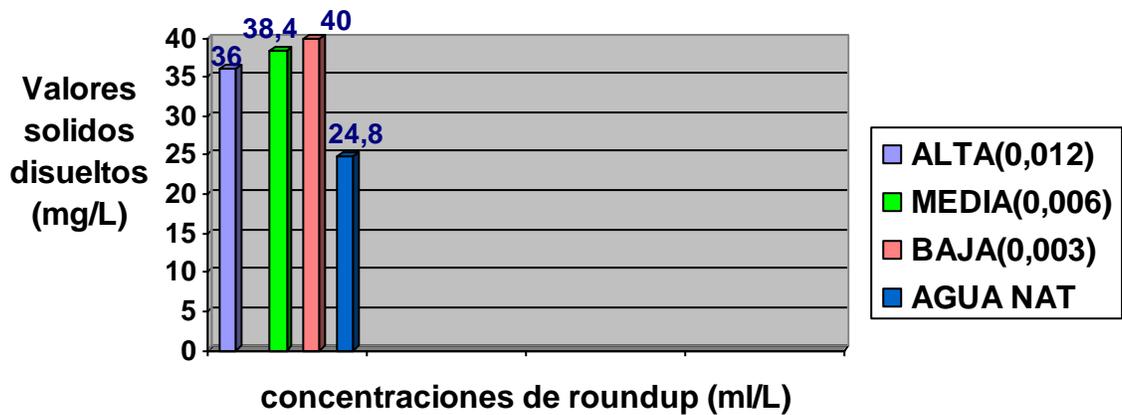


Figura. 28. valores de salinidad ‰ versus concentraciones de Roundup.

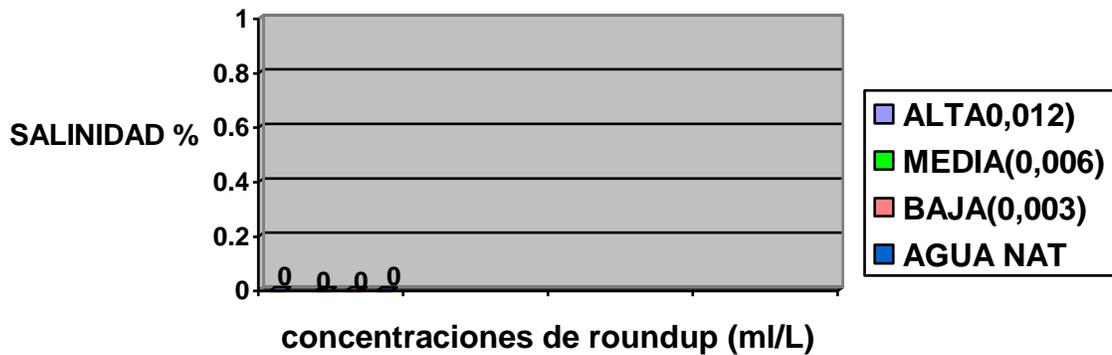


Figura. 29. valores de DQO (mg/L) versus concentraciones de Roundup.

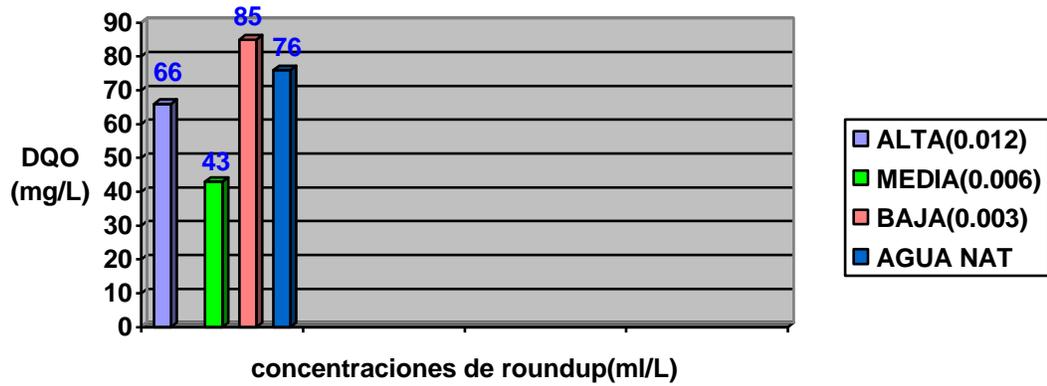


Figura. 30. Valores Concentración de DBO₅ (mg/L) versus concentraciones de Roundup.

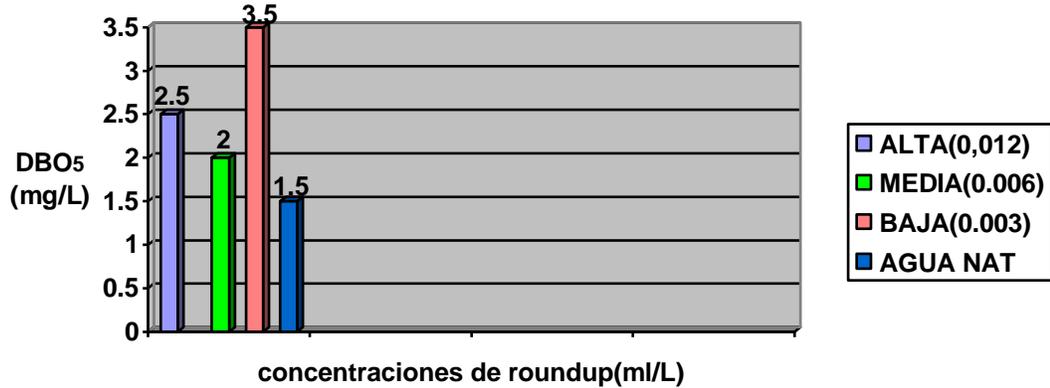


Figura. 31 . Valores de Amonio (mg/L) vrs concentraciones de Roundup.

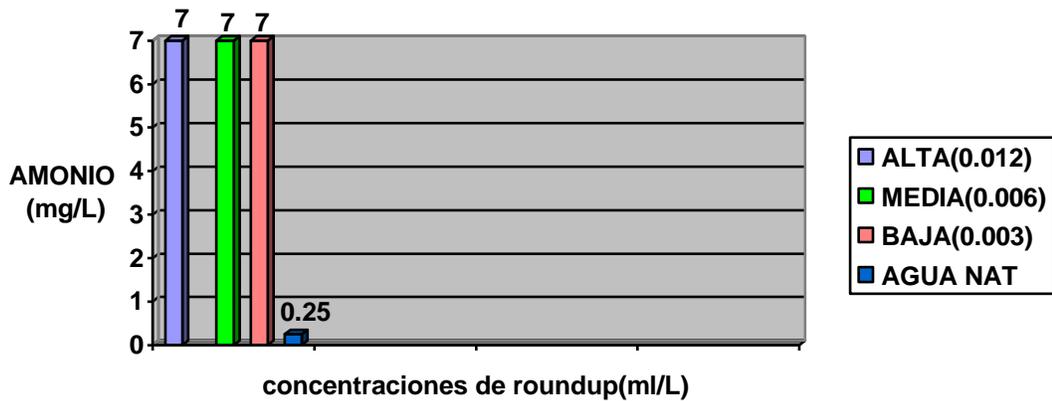


Figura 32 . valores de Nitritos (mg/L) vrs concentraciones de Roundup.

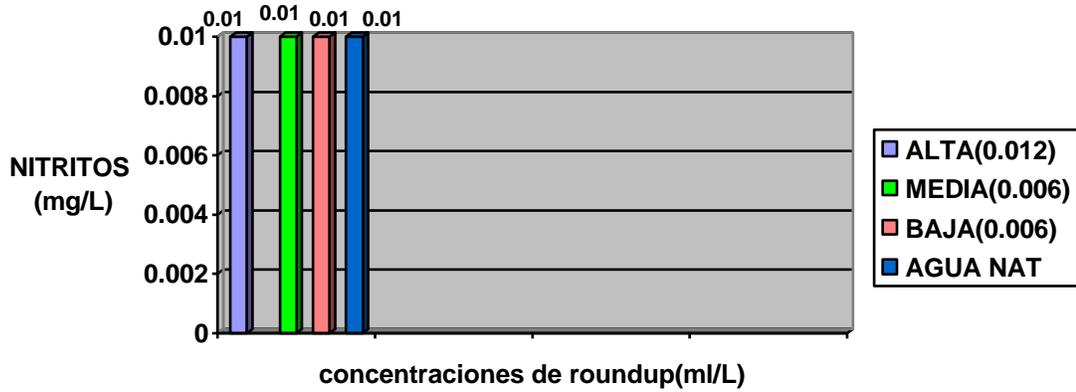


Figura 33. valores de Nitratos (mg/L) vrs concentraciones de Roundup.

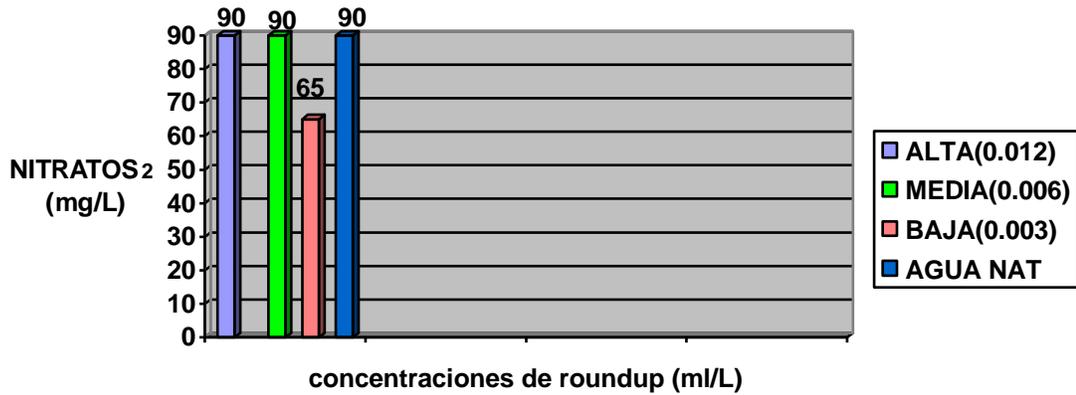


Figura. 34. valores de Fosfatos (mg/L) vrs concentraciones de Roundup.

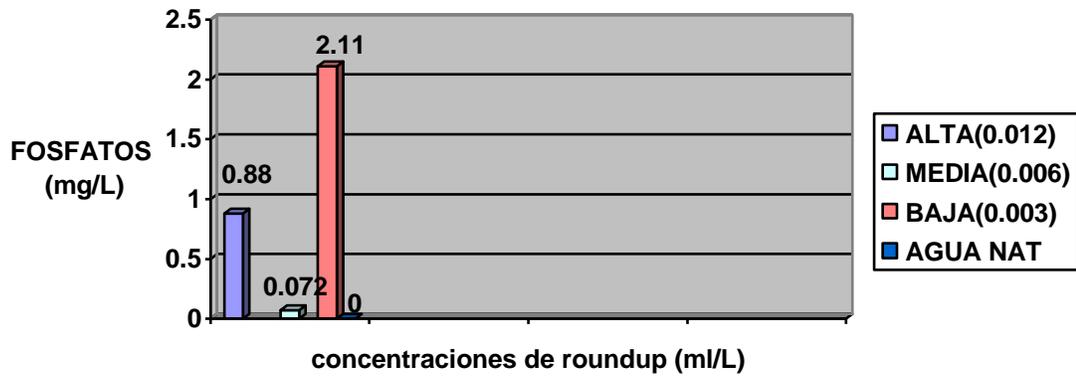
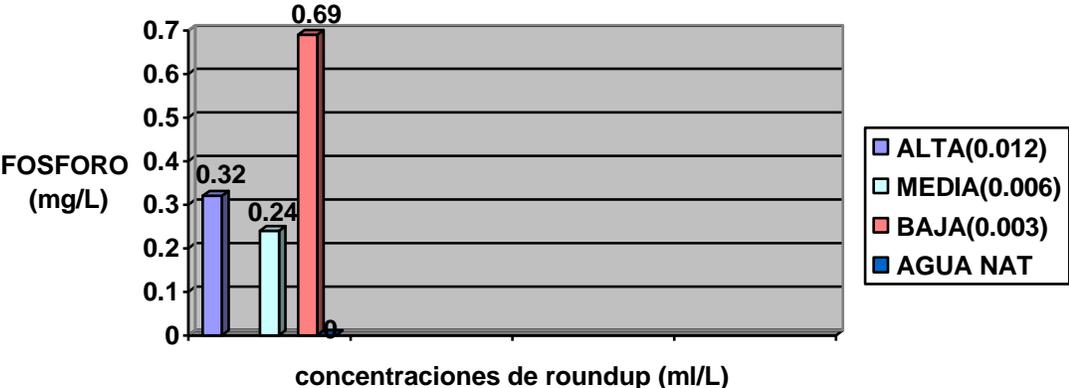


Figura 35 . valores de Fosforo (mg/L) vrs concentraciones de Roundup.



8. DISCUSION

El extensivo uso del plaguicida Roundup en la erradicación de cultivos ilícitos, ha sido el punto central de polémicas sobre todo por su toxicidad, aunque sus efectos a corto plazo se conocen (dolor de cabeza, dermatitis, problemas respiratorios, conjuntivitis, mareos, etc.), los efectos a largo plazo como los mutagénicos, carcinogénicos, teratogénicos son poco conocidos; luego es importante y prioritario realizar investigaciones para evaluar el efecto genotóxico de los plaguicidas como el Roundup no solo *in vitro* como se han realizado algunos estudios, sino también *in vivo* y lo que es mas importante en sistemas acuáticos, que permitan predecir los potenciales efectos genotóxicos no solo en humanos que consumen aguas contaminadas por efecto de escorrentía de los plaguicidas sino también ambientes acuáticos. Existe una gran similitud en el sistema enzimático del metabolismo de los peces, que a menudo responde a los químicos tóxicos de manera similar a los vertebrados superiores, característica que los hace un modelo de experimentación adecuado (Yang et al., 1990; Washburn and Di Giulio, 1989; Stegeman and Lech, 1991). En consecuencia, al evaluar el efecto genotóxico del Roundup en los peces, se podría establecer el potencial efecto en humanos. La toxicidad de los plaguicidas muestran diferencias cuando se emplean los ingredientes activos y la formulación comercial, debido a que esta última contiene ingredientes activos, compuestos inertes o surfactantes que pueden tener un efecto aditivo, sinérgico o potenciador del ingrediente activo (plaguicida). Este estudio muestra la importancia de evaluar la genotoxicidad de la formulación comercial de Roundup, que es la que realmente se aplica a los cultivos.

Es claro que *Oreochromis niloticus* y *Tilapia rendalli* presentan alta sensibilidad a compuestos químicos como pesticidas (Grisolia y Palhares, 2002; Grisolia y Cordeiro, 2000). En condiciones de laboratorio la *Tilapia rendalli* muestra dificultades para adaptarse, ya que como fase previa al experimento de toxicidad, genotoxicidad y parámetros fisicoquímicos del agua, sometimos individuos de *tilapia rendalli* y de *Oreochromis niloticus* a una etapa de aclimatación y adaptación en las mismas condiciones, observando que *Tilapia rendalli* fue mas vulnerable y la mayoría de individuos murieron al poco tiempo, mientras que *Oreochromis niloticus* respondió positivamente a la adaptación.

El pez objeto de estudio fue la Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*). Los animales fueron colectados en la estación piscícola de la CRC (Timbio-Cauca) (ver figura 4), nacidos y criados bajo las mismas condiciones ambientales controladas sin influencia de sustancias químicas en los efluentes naturales que surten de agua a los estanques. Los peces fueron cuidadosamente trasladados al laboratorio, donde se aclimataron en un acuario aireado constantemente y con suficiente capacidad durante siete días. Los peces se mantuvieron a condiciones lumínicas naturales (12 horas luz-12 h oscuridad). Aspectos como la edad, talla

y el peso fueron tenidos en cuenta antes de iniciar el experimento. El agua que se utilizó en el experimento tenía las condiciones físico-químicas óptimas para los peces (pH: 7.0), fue recolectada y llevada al laboratorio desde un punto del río molino sin influencia antrópica directa. Todos estos aspectos se implementaron en base a la revisión bibliográfica, donde autores como Grisolia (2000), Grisolia y Palhares, (2002) De flora *et al*, (1993) los recomiendan.

Con Tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*) se han reportado varios estudios en donde se evalúan compuestos como los efluentes de industrias textiles (Cavas y Ergene-Gozukara, 2003), químicos carcinogénicos como mitomicina C y ciclofosfamida (Grisolia y Starling, 2000; Grisolia y Palhares, 2002), donde se demostró la sensibilidad que tiene esta especie para ser usada en la determinación de compuestos genotóxicos como contaminantes de ambientes acuáticos (Grisolia y Contiho, 2000).

El Roundup que se utilizó en el experimento tenía como componente activo 480g/L de N-fosfometilglicina. El compuesto empleado tenía una presentación líquida. En la prueba CL₅₀ se inició con 25 ml del compuesto puro, los cuales se agregaron en los 12 litros de agua natural del acuario a una concentración de 2.08ml/L. Ocho peces se emplearon para cada experimento de letalidad, donde se esperó 72 horas para observar lo que ocurría con los individuos, este tiempo fue basado en el reportado por Tolga y Ergene-Gozukara, 2003. el cual fue de 48 horas. Se realizaron siete experimentos para llegar a la CL₅₀ (0.015 ml/L de Roundup) y se confirmó con dos experimentos más. Los datos sobre los efectos tóxicos del Roundup en tilapia nilótica, confirma la sensibilidad que tiene esta especie, debido a que la concentración letal cincuenta fue baja teniendo en cuenta las concentraciones que se aplica vía intraperitoneal (Grisolia, 2002).

En la prueba de genotoxicidad, los tratamiento en los acuarios se distribuyeron en bloques aleatorizados, lo que permitió eliminar factores externos como luz, temperatura, humedad; que pueden influenciar en el experimento. Se utilizaron ocho peces en cada uno de los doce acuario, para un total de 96 peces. De cada uno se analizaron 2000 células, que es un numero apropiado para un análisis estadístico con buen poder, teniendo en cuenta que se han contado 1000 eritrocitos por pez (Ayllon y Garcia, 2000). Varias estudios con la prueba de micronúcleos en varias especies de peces han demostrado que el umbral para la formación de Mn es entre el 1° y 5° día después del tratamiento (Al-Sabti y Metcalfe, 1995; Grisolia y Cordeiro, 2000). En nuestro estudio muestreamos a los 2, 4, 6, 8 días, en donde encontramos que el número promedio de Mn en 2000 eritrocitos ($n^{\circ}XMn/2000eritrocitos$) de Mn (7.625) disminuyo al transcurrir el tiempo, datos similares reportaron Grisolia y Palhares con eritrocitos de riñón y de agalla de *Tilapia rendalli* y *Oreochromis niloticus* expuestos a mitomicina c por 1, 3 ,5, 7, 15 días, respuesta que no presentaron con ciclofosfamida ya que con este compuesto se incrementó la frecuencia de micronúcleos al pasar el tiempo; este tipo de variaciones en la frecuencia de Micronúcleos probablemente ocurrió debido a la farmacocinesis de los compuestos usados y la velocidad del ciclo hematopoyetico en cada especie (Grisolia y Palhares, 2002).

En este estudio el número promedio de micronúcleos ($n^{\circ}XMn/2000$ eritrocitos) fue estadísticamente significativo en las concentraciones de Roundup (7.625, 6,583, 4.292 Mn) respecto al control (2.0417 Mn), mostrando una respuesta dosis-efecto. Grisolia(2002) reportó que Roundup en *Tilapia rendalli* indujo un incremento significativo de micronúcleos en las tres dosis (42, 85, 170mg/Kg), observándose que Roundup incrementó la inducción de Mn tanto a dosis altas como bajas, mientras que el herbicida Imazapir sólo indujo micronúcleos a dosis altas. En un trabajo anterior, Grisolia y Continho (2000) reportaron resultados negativos en *Oreochromis niloticus* y Ratón suizo expuesto via intraperitoneal a cuatro agrotóxicos dentro de los que se encuentra el Roundup

Según Grisolia y Starling (2000) *Oreochromis niloticus* y *Tilapia rendalli* presentaron una alta frecuencia de micronúcleos inducidos por la ciclofosfamida pero en la exposición a la mitomicina C *Tilapia rendalli* fue más sensible a este compuesto que *Oreochromis niloticus*, al igual que un estudio comparativo realizado por Grisolia (2002) en donde se observa que *Tilapia rendalli* incrementa la frecuencia de micronúcleos a dosis bajas de Roundup y en ratón se observaba que había incremento de micronúcleos a dosis altas (Dosis máxima Tolerada); comparando ambos sistemas se concluye que la *Tilapia rendalli* es más sensible que el ratón para realizar estudios de evaluación genotóxica como este. Luego los peces son organismos centinelas de la polución ambiental para la evaluación de efecto genotóxico en ecosistemas acuáticos (Hergene-Gozukara, 2001; Grisolia y Starling, 2001; Guha et al, 2002).

Los eritrocitos de agallas son células centinelas muy apropiadas para evaluar la genotoxicidad de químicos; por lo tanto se escogió este tipo de células para determinar la genotoxicidad del Roundup en *Oreochromis niloticus*. Grisolia y Palhares (2002) no encontraron diferencia significativa entre la frecuencia de micronúcleos de eritrocitos de riñón y agallas, teniendo en cuenta que el riñón es el principal órgano hematopoyético en los peces, en donde se esperaría encontrar mas eritrocitos micronucleados, debido a que los micronúcleos se forman durante la proliferación celular.

Los estudios reportados en el cuadro 1 muestran que los peces son generalmente expuestos a los compuestos químicos por vía intraperitoneal y expuestos directamente en el agua por un determinado tiempo. Esta última es una forma de exposición que se acerca mucho mas a la realidad, ya que mientras el pez capta el oxígeno por medio del agua también está absorbiendo el químico presente en ella mediante las branquias, que por lo general son plaguicidas, desechos de fábricas etc.

Las anomalías nucleares son deformaciones que se observan en el núcleo de la célula (ver figura 19), es importante considerar este tipo de anomalías, ya que hasta el momento no se tiene certeza de que su origen se deba directamente al químico evaluado o sea causa de una deficiencia de ácido fólico como lo reporta Yokote (1982). En el análisis de los eritrocitos de *Oreochromis niloticus* expuestos a Roundup, se encontró algunas anomalías nucleares, las cuales han sido reportadas en varias investigaciones (Ayllon y Garcia. 2000; Grisolia y Palhares, 2002) Ayllon y Garcia (2000) consideran que estas anomalías pueden ser un

complemento a la prueba de micronúcleos en peces para la evaluación de agentes genotóxicos en ambientes acuáticos, ya que encontraron una alta frecuencia de anomalías nucleares en eritrocitos de *Phoxinus phoxinus* expuesto a mitomicina c por 24 horas.

Gravato y Santos en el año 2003, determinaron el efecto de efluentes de un río influenciado por contaminación urbana e industrial mediante la genotipificación de los genes del metabolismo relacionados con las enzimas del metabolismo (P450 y GST) en *Dicentrarchus labrax*. Es importante realizar este tipo de estudios basados en genética molecular, donde se pueda evaluar la susceptibilidad de las especies ícticas a diferentes contaminantes del agua, constituyéndose como herramienta para la conservación de especies y la salud humana.

Los estudios reportados por Hoftman y Ratt en el año 1981, Al-Sabti en el año 1986, Hose *et al* en 1987, Metcalfe en 1988, Al-Sabti y Harding en 1990, Ueda *et al* en 1992, Williams y Metcalfe en 1992, Kurihara y otros en 1992, En 1993, De flora *et al*, Al-sabti en 1994, Minissi *et al* 1995, Nepomuceno *et al*, en 1997, Sánchez *et al* con varias especies como *Umbra pigmaea*, *Oreochromis mossambicus*, *Genyonemus lineatus*, *Ictalurus nebulosus*, *Perca fluviatilis*, *Carassius auratus*, *Oncorhynchus mikiss*, *Carassius auratus*, *Oncorhynchus mykiss*, *Carassius auratus gibelio* *Barbus perplejus*, *Cyprinus carpio*, *Salmo trutta*. respectivamente, en donde evaluaron varios compuestos, algunos carcinogenicos como mitomicina C, corroborando el potencial mutagénico de estas sustancias. Como se puede observar, los estudios con sistemas acuáticos, se han incrementado al transcurrir el tiempo, ya que en la época actual esta prueba es muy utilizada por investigadores que se dedican a evaluar la polución acuática.

Esta investigación hace un gran aporte a la literatura científica, y los resultados son de gran interés en nuestro país. Se han reportado dos investigaciones mas, en las cuales se empleó la técnica de Micronúcleos en eritrocitos de branquias de peces. En la Universidad de Antioquia, Peñalosa y Camargo (2003) determinaron el efecto genotóxico del cloruro de mercurio en Bocachico, quienes encontraron una relación dosis-efecto empleando la prueba de micronúcleos. En la Universidad del Quindío, Hoyos y López (2003), evaluaron el efecto genotóxico de los efluentes de zonas con influencia agrícola, los resultados revelan que existe una frecuencia significativa de micronúcleos en peces en las estaciones muestreadas en relacion al control.

Es importante complementar las pruebas de genotoxicidad en organismos acuáticos como los peces con la medición y análisis de los parámetros físico-químicos hídricos universales, pues estos pueden ayudar a entender de mejor forma la dinámica del compuesto dentro del sistema acuático que se está estudiando. Se observa un efecto directo del Glifosato sobre algunos parámetros indicadores de calidad de aguas naturales, que más adelante se mencionara en la discusión. No se puede aseverar que en este caso, el deterioro de la calidad del agua incida directamente en la genotoxicidad de la fauna íctica, pero aspectos

de genotoxicidad en ella pueden ser indicativos de deterioro de la calidad de las aguas naturales por aplicación de este compuesto. Sería indispensable continuar con este tipo de estudios, con el fin de determinar con mayor precisión, para saber si estos efectos se dan en ambas vías.

Al comparar la calidad de las aguas naturales en donde se aplicó cada uno de los de los diferentes tratamientos con Roundup y la no tratada, que sirvió como marco de referencia, se puede indicar lo siguiente: los parámetros físico-químicos de los tratamientos en concentraciones altas, media y baja mostraron un cambio significativo durante el transcurso del experimento, comparando con la caracterización físico-química del tratamiento del agua natural en parámetros tales como: turbiedad, concentración de gas carbónico disuelto, pH, conductividad, concentración de sólidos disueltos totales, amonio, fosfatos y fósforo.

No se apreció incidencia directa negativa sobre la concentración de oxígeno disuelto inicial, excepto en el tratamiento con la concentración mas baja, igual situación en relación con el porcentaje de saturación de oxígeno disuelto y su porcentaje de saturación, DBO₅ y DQO (ver cuadro 12). Esta condición es curiosa, puesto que la aplicación del Roundup en las aguas naturales inhibe el proceso de degradación de la materia orgánica presente, sobretodo en relación con los compuestos a base de fósforo, si se analiza puntualmente la aplicación y el efecto inmediato. No obstante, a menores cantidades se nota un incremento de los procesos de degradación de la materia orgánica; razón por la cual, las demandas de oxígeno disuelto son mayores y la concentración de iones indicadores químicos de procesos de degradación de materia orgánica aumentan progresivamente, lo cual a la vez, se puede corroborar con el incremento en la concentración del gas carbónico disuelto y su incidencia directa en la baja del pH (aumento de la acidez total) y del estado trófico del sistema hídrico, en cuanto a los valores registrados para la conductividad y en la concentración de los sólidos disueltos totales (TDS).

Los valores registrados para el agua natural sin ningún tipo de tratamiento con Roundup (control), indican un índice de calidad adecuado para el normal desarrollo y distribución de la biota acuática y de los normales flujos de materia y energía, en donde se puede apreciar baja turbiedad, porcentaje de saturación de oxígeno disuelto por encima del mínimo óptimo (80%), concentración de gas carbónico disuelto que indica procesos normales de respiración, pH ligeramente ácido, condición natural de este tipo de aguas que provienen de la vertiente occidental de la cordillera central, por incidencia de los suelos de origen volcánico en atención a la presencia de la cadena volcánica de Los Coconucos, conductividad y concentración de sólidos disueltos totales que reflejan actividad iónica por tratarse de aguas naturales en donde se presentan flujos normales de materia y energía, lo cual se puede verificar al analizar los valores hallados para los indicadores químicos de procesos de degradación de materia orgánica (amonio, nitritos, nitratos), DBO₅, DQO y ausencia en la columna de agua de compuestos a base de fósforo.

No obstante, al aplicar los diferentes tratamientos, se pudieron apreciar las siguientes variaciones: para el tratamiento con la dosis alta (0.012ml/L), se incrementaron los

siguientes parámetros: turbiedad, pH (tendencia a la alcalinidad), conductividad, sólidos disueltos totales, DBO₅, amonio; y significativamente fosfatos y fósforo total; disminuyendo curiosamente la DQO, lo cual explica que el Roundup incide más como tensor orgánico que inorgánico. A la vez, aunque baja un poco la concentración de oxígeno disuelto, no se presentó variación alguna en relación con la concentración de gas carbónico disuelto, lo cual explica disminución en el proceso normal de degradación de materia orgánica, pues era de esperarse incremento en la concentración de este gas por procesos de respiración y/o oxidación y alta demanda oxígeno disuelto.

Para el tratamiento con la dosis media (0.006mL/L), se puede apreciar disminución en la concentración de oxígeno disuelto y leve incremento en la de gas carbónico disuelto, lo que refleja cierto tipo de actividad de oxidación y/o respiración, puesto que se registraron valores para fosfatos, fósforo total y amonio, parámetros que se consideran como indicadores químicos de procesos de degradación de materia orgánica, marcando actividad iónica lo cual se puede corroborar con los registros de conductividad y de sólidos disueltos totales.

Para el tratamiento con la dosis baja (0.003mL/L), se observa un incremento significativo de la turbiedad, del gas carbónico disuelto, de la conductividad, sólidos disueltos totales, DBO₅, DQO, fosfatos y fósforo total y disminución marcada de la concentración de oxígeno disuelto y del pH. Lo anterior corrobora que en el sistema se presenta actividad de oxidación de materia orgánica y en este tratamiento en donde el Roundup disminuye su acción inhibitoria del proceso de degradación de materia orgánica, permitiendo que ése se desarrolle normalmente.

De todas maneras, la presencia en los sistemas de acuarios de una biota acuática representada por la especie íctica objeto de la investigación, *Tilapia nilótica* (*Oreochromis niloticus*), además de una microbiota natural acompañante (por tratarse precisamente de aguas naturales), la cual elimina permanentemente residuos provenientes de sus procesos metabólicos, hace que las descargas orgánicas se den progresivamente; esto se refleja en los valores registrados en los diferentes tratamientos para amonio, nitritos y nitratos. Su presencia daría a pensar que en función del tiempo y con la presencia del oxígeno disuelto, los ciclos naturales del nitrógeno y del fósforo se dieran en la medida del incremento de la carga orgánica. Sin embargo, se puede apreciar que los valores de amonio y nitritos permanecen constantes en los tres tratamientos, con disminución de nitratos en la aplicación de la dosis baja. Esta última situación obedece posiblemente a que el ciclo del nitrógeno no se cumplió totalmente en el momento del muestreo. Pero el incremento significativo de fosfatos y de fósforo total en la columna de agua, es indicativo para los diferentes tratamientos, en especial el de dosis baja, de actividad de degradación, con procesos de oxidación (degradación), que marcan DBO₅, DQO y actividad iónica en el medio acuático.

Es de esperarse que en función del tiempo, con el aumento del grado de dilución de la columna de agua, al disminuir la concentración del Glifosato, los procesos de oxidación se

den mas acentuadamente en el ecosistema acuático; razón por la cual, los efectos de la aplicación de este compuesto se van a reflejar en un tiempo posterior a la aplicación y uso del mismo. En otras palabras, los efectos negativos no se aprecian inmediatamente, sino con el correr del tiempo, condición típica de tóxicos que se camuflan (solapan) momentáneamente y los efectos sinérgicos se presentan en un tiempo posterior, aspecto importante a tener en cuenta en los análisis de calidad de aguas naturales y su evaluación en estudios de impacto ambiental sobre los recursos hidrobiológicos.

Estas investigaciones contribuyen a fortalecer la validación de la prueba de micronúcleos en peces por parte de la comunidad científica del mundo. Con este tipo de trabajos se puede incentivar a los investigadores de nuestro país a adelantar más estudios relacionados con los efectos de los plaguicidas en especial del Roundup (Glifosato) en diferentes ecosistemas y organismos que en él interactúan, de esta forma determinar efectos tanto a corto como a largo plazo (mutagénicos, carcinogénicos, teratogénicos). Principalmente previniendo el deterioro de la salud humana y sistemas acuáticos..

Los resultados de este estudio serán divulgados en eventos científicos y comunicados a las entidades que regulan y manejan el control de los plaguicidas con el propósito de motivarlos a la reflexión crítica y al diseño de estrategias de prevención, control y reducción del uso de plaguicidas como el Roundup, que es empleado extensivamente en la eliminación de cultivos ilícitos.

9. ALCANCES

Esta investigación servirá como pauta para posteriores trabajos donde se pueda determinar el efecto genotóxico de sustancias en especies ícticas como las estenotópicas (sensibles a pequeñas alteraciones fisicoquímicas) y especies nativas para evaluar los efectos del Roundup.

Con este tipo de trabajos se puede incentivar a la comunidad científica de nuestro país a adelantar más estudios relacionados con los efectos de los plaguicidas en especial Roundup (Glifosato) en diferentes ecosistemas y organismos que en él interactúan, de esta forma determinar efectos tanto a corto como a largo plazo (mutagénicos, carcinogénicos, teratogénicos). Principalmente previniendo el deterioro de la salud humana.

Con la realización de estudios encaminados a determinar la influencia de Roundup (Glifosato) en los parámetros físico-químicos del agua, se visualizaría y confirmaría el efecto directo o indirecto que altera la fisiología del pez.

Esta investigación puede aplicarse en proyectos de saneamiento ambiental para iniciar procesos de tipo reglamentario por parte de las entidades que vigilan y controlan el ambiente.

10. RECOMENDACIONES

Mediante un estudio de espectroscopia de masas, sería interesante evaluar la influencia del tiempo en la concentración del Roundup (Glifosato) en estudios *in vivo* e *in situ*.

Sería de gran importancia evaluar los efectos de Roundup (Glifosato) en ambientes acuáticos aledaños o pertenecientes a zonas donde se aplican el plaguicida tanto para erradicar cultivos ilícitos como para la agricultura, con el fin de acercarse mas a la realidad ambiental.

11. CONCLUSIONES

- La concentración letal cincuenta en *Oreochromis niloticus* fue de 0.015 mL/L de Roundup.
- En este experimento *in vivo* se demostró que Roundup (Glifosato) es genotóxico para *Oreochromis niloticus*.
- Roundup puede tener un efecto potencialmente genotóxico en el hombre a largo plazo, desarrollando procesos mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos.
- El número promedio de micronúcleos se incrementa significativamente respecto a las concentraciones de Roundup que varía entre 4,242 y 7,645 Mn/2000 células.
- La frecuencia de micronúcleos disminuye respecto al tiempo en todas las concentraciones del experimento.
- La distribución de los bloques no muestra estadísticamente una influencia para la frecuencia de micronúcleos.
- Por los resultados de la caracterización físico-química hídrica, el Roundup (Glifosato) en las aguas naturales inhibe transitoriamente el proceso de degradación de la materia orgánica presente, sobretodo en relación con los compuestos a base de fósforo, si se analiza puntualmente la aplicación en altas concentraciones y el efecto inmediato.
- Los efectos del Roundup (Glifosato) sobre la calidad de las aguas naturales se pueden reflejar en tiempo posterior a su aplicación, razón por la cual, a grandes concentraciones no se puede detectar el efecto inmediato, pero al aumentar la capacidad de dilución en el sistema por incremento hidrológico, o sea, disminución de la concentración del compuesto, estos efectos se reflejan en los procesos de oxidación y degradación de la materia orgánica

BIBLIOGRAFIA

AL-SABTI, K. Clastogenic effects of five carcinogenic-mutagenic chemicals on the cells of the common carp *Ciprinus carpio*. En: Comp. Biochemistry and Physiology. Vol. 85C (1986); p. 5-9.

AL-SABTI, K. and HARDIG, J. Micronucleus test in fish for monitoring the genotoxic effects of the industrial waste products in the Baltic sea (Sweden). En: Comp Biochemistry and Physiology. Vol. 97C (1990); p. 179-182.

AL-SABTI, K. Micronuclei induction in pike (*Exos lucius*) in Swedish lakes contaminated with radiocesium. En: Cytobios. Vol. 70 (1992); p. 101-106.

AL-SABTI, K. Micronuclei induced by selenium, mercury, methylmercury and their mixtures in binucleated blocked fish eythrocyte cells. En: Mutation Research. Vol. 320 (1994); p. 157-163.

AL-SABTI, K. An in vitro binucleated blocked hepatic cell technniquel for genotoxicity testing in fish. En: Mutation Research. Vol. 335(February, 1995);p.109-120

AL-SABTI, K. and METCALFE, C. Fish micronuclei for assesing genotoxicity in water. En: Mutation Research. Vol 343 (February, 1995); p.122-135.

AYLLON, F. and GARCÍA, E. Induction of Micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latipinna*: An Assessment of the fish micronucleus test. En: Mutation Research. Vol. 467(March, 2000); p.177-186

BAHARI, I. NOOR, F. and DAUD N. Micronucleated erythrocytes as an assay to assess actions by physical and chemical genotoxic agents in *Clarias gariepinus*. En: Mutation Research. Vol 313 (August, 1994); p. 1-5.

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

BROWN, L. Pesticides Exposure and other agricultural risk factors for leukemia among men in low a and Minnesota. En: Cancer Research (1990). Vol. 50; p.65-85-65-91.

CAMPANA, M; PANZERI, A; MORENO, V and DULOUT, F. Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalotrin using the the micronucleus test in erythrocytes of a fish. En: Mutation Research. Vol 438 (1999); p. 261-269.

CARRASCO, K; TILBURY, K and MYERS, M. An assessment of the piscine micronuclei test as an *In situ* biological indicator of chemical contaminant effects, Can. J. En: Fish aquat. Science. (1990). Vol. 47; p. 2123-2136.

CASTILLO, L.F. 1990. Historia del cultivo de la tilapia roja en Colombia. Memorias II Seminario de Acuicultura, Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Medellín. http://ag.arizona.edu/azaqua/ista/Colombia/TILAPIA_ROJA.doc.

CAVAS, T. and ERGENE-GOZUKARA, S. Evaluation of the genotoxic potencial of lambda-cyhalothrin using nuclear and nucleolar biomarkers on fish cells. En: Mutation Research. Vol 534 (september, 2001); p. 93-99.

CAVAS, T. and ERGENE-GUZUKARA, S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-satined nucleolar organizer regions as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to text mill effluent. En: Mutation Research. Vol 538 (april, 2003); p. 81-91.

CEREJEIRA, M; VIANA, P; BATISTA, S; PEREIRA, T; SILVA, E; VALERIO, M; SILVA, A; FERRERIRA, M and SILVA, A.M. Pesticedes in portuguese surface and ground waters. En: Water Research. Vol 37 (October, 2001);p. 1055-1063.

COUNTINHO, C. and GRISOLIA , C. Analise comparativa netre os testes micronucleos em camadungos e em eritrocites periféricos de *Oreochromis niloticus* na avalao do potencial mutagenico dos agratoxicos deltametrina, difocol, glifosato e imazapyr. En: Ecotoxicol e Medio Ambiente. Vol 10 (2000); p. 41-48.

DAS, R. and NANDA, N. Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of fish *Heteropneustes fossilis* by mitomicin c an paper mill effluent. En: Mutation Research. Vol. 175(1986); p.67-71.

DE FLORA, S; VIGANO, L; D'AGOSTINI, F; CAMOIRANO, A; BAGNASCO, M; BENNICELLI, C; MELODIA, F and ARILLO, A. Multiple genotoxicity biomarkers in fishes exposed in situ to polluted river water. En: Mutation Research. Vol. 319 (April, 1993). p.167-177.

Dirección Nacional de Estupefacientes. Informe de actividades y funciones de auditoria ambiental. Ministerio de Justicia y Derecho de Colombia. Santa é de Bogotá, Noviembre de 1999. Ecotoxicol Environ Saf. 1981 Sep;5(3):261-9.

EPA. Technical Fact Sheets on: Glyphosate. National Primary Drinking Water Regulations. 1999.<http://www.epa.gov/español/>.

ERGENE-GOKUZARA, S, CAVAS, T; AYMAK, C. Genotoxic evaluation of cypermethrin using the micronuclei test on *Oreochromis niloticus*. En: Proceedings of the 11th National Aquaculture Symposium. Vol. 2 (2001); p. 765-771.

EVANS, H; NEARY, J and WILLIAMSON. En: Intern. J. radiation biol. Vol 1 (1959); p.216-222.

FENECH, M. and MORLEY A. Kinetochores Detection in micronuclei: and Alternative method for measuring chromosome loss. En: Mutagénesis Vol. 4, 98-104.

GARCIA, M. and MEJIA, N. El impacto de las fumigaciones aéreas. <http://www.mamacoca.org/ed-especial1/tcap05.htm#fn1>

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

GRAVATO, C. and SANTOS, M. *Dicentrarchus labrax* biotransformation and genotoxicity responses after exposure to a secondary treated industrial/urban effluent. En: Ecotoxicology and Environmental Safety. Vol 55 (2003); p. 300-306.

GRISOLIA, C and STARLING, F. Micronuclei monitoring of fishes from lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. En: Mutation Research. Vol 491(November, 2002) p. 39-44.

GRISOLIA, C. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomicin C and various pesticides. En: Mutation Research. Vol 518 (Apryl, 2002); p. 145-150.

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.

GRISOLIA, C. and PALHARES, D. Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in *Tilapia*, following mitomicin C treatment. En: Genetics Molecular and Biology. Vol 3 (3) (2000); p. 281-284.

GUSTAVINO, B; SCORNAJENGI, K; MINISSI, S and CICCOTTI, E. Micronuclei induced in erythrocytes of *Cyprinus carpio* (teleostei, pisces) by X-rays and colchicine. En: Mutation Research. Vol 494(July, 2001); p.151-159.

HEDDLE, J; HITE, M; KIRKHART, B; MAVOURNIN, K; MAC GREGOR, J; NEWELL, G and SALAMONE, M. 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(March, 1983). p.61-118.

HEDDLE, J.A. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. En: Mutation Research. Vol 18, (1973); p. 307-317.

HEDDLE, JA.; HITE, M; KIRKHART, B; MAVOURNIN, K; MACGREGOR, JT; NEWELL, GW; SALAMONE, MF;. 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 (September, 1983); p. 61-118

HENAO, S *et al.* Plaguicidas inhibidores de la colinesterasa. En: Serie vigilancia. Organizacion Panamericana de la Salud. No 11(1991).

HOFTMAN, R and RAAT, W. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. En: Mutation Research. Vol.104 (October, 1982). p.147-152

HOOFTMAN RN, VINK GJ. Cytogenetic effects on the eastern mudminnow, *Umbra pygmaea*, exposed to ethyl methanesulfonate, benzo[a]pyrene, and river water.En: IARC. Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42.

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

HOSE, J; CROSS, S; SMITH and DIEHL,D. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites of southern California. En: Environmental Research. Vol 22 (1987); p. 167-176.

HOSE, J; HANNAH, H; PUFFER and LANDOLT, M. Histological and skeletal abnormalities in benzo-a-pyrene treated rainbow trout alevins. En: Environmental Contamination Toxicology. Vol 13 (1984); p. 675-684.

HOYOS G; Luz Stella. Genotoxicidad de los plaguicidas mutagenicidad, carcinogenicidad y teratogenicidad. En: CORDOBA Dario. Toxicología. Medellín Colombia.1994. p 169-184.

HOYOS, C. and LOPEZ, M. Determinación *in situ* del efecto de los plaguicidas en *Cariassus caucanus* en una zona del Quindío. Universidad del Quindío. 2003.

KLIGERMAN, A. Fishes as biological detectors of the effects of genotoxic agents. En: Mutagenicity. New Horizons in genetic toxicology. 1992 p. 435-453.

KLIGERMAN, A; BLOOM, S and HOWELL, M. Umbra limi a model for the study of chromisomic aberrations in fishes. En: Mutation research. Vol. 31(1975); p. 225-233.

KURIHARA, Y. RIENKJKARN, M. and ETHO, H. Cytogenetic adaptive response of cultured fish cells to low doses of X-rays. En: Journal Radiation Research. Vol 33 (1992); p. 267-274.

LADOU, J. Medicina laboral. Editorial: el manual moderno, Mexico - Bogotá (1993).

LINCH, A and PARRY, J. The cytochalasine- b micronucleus /kinetochore assays *in vitro*. Studies with 10 suspected aneugens. En: Mutation Research. Vol 287(1993); p. 71-86.

MACCONELL, R. Una epidemia de intoxicaciones por furadan y metamidofos en el cultivo de maiz. Recomendaciones para una política de prevención (1990).

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

MANNA, G. and SHADUKAN, A. Use of cell of gill and kidney of Tilapia fish in micronucleus test (MNT). En: Current Science. Vol. 55(1986). p. 498-501.

METCALFE, C. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of mudminnows (*Umbra limi*) and brown bullheads (*Ictalurus nebulosus*). En: Environmental Contaminat Toxicology. Vol. 40 (1988); p. 489-495.

MINISSI, S; CICCOTTI, E and RIZZONI, M. Micronucleus test in erytheocytes of Barbus plebejus (Teleostei, Pisces) from two natural environments: a bioassay for the in situ detection of mutagens in freshwater. En: Mutatation Research. Vol. 367. (April, 1995); p. 245-251.

Municipio del Guamués, Personería. Personas afectad0as por la fumigación. Departamento del Putumayo, 2001. Colombia. p. 14

MILLER, B. and ADLER, I. Aplication of antikinetochoe antibody staning to micronuclei in erythrocytes induce in vivo. En: Mutagénesis. Vol 4-5 (1990); p. 411-415.

NEPOMUCENO JC, FERRARI I, SPANO MA, CENTENO AJ. Detection of micronuclei in peripheral erythrocytes of Cyprinus carpio exposed to metallic mercury. En: Environtal Molecular Mutagen. Vol. 30 (1997); p. 293-297

NIVIA, E. Mujeres y plaguicidas. Una mirada a la situación actual, tendencias y riesgos de los plaguicidas. Rapalmira-Ecofondo-PAN. Cali, Colombia, 2000. 113 p.

ODEIGAH PG, OSANYINPEJU AO, OSANYIPEJU AO. Genotoxic effects of two industrial effluents and ethyl methane sulfonate in *Clarias lazera*. En: Food Chem Toxicol. Vol33(June, 1995); p.501-5.

PACHECO, M and SANTOS, M. Induction of EROD activity and genotoxic effects by polycyclic aromatic hydrocarbons and resins acids on juvenile eel. En: Ecotoxicol Environmental safety. Vol 38 (1998);p. 252-259.

PARRA, D. El uso de los coadyuvantes en la formulación de agroquímicos. Cosmoagro. Memorias Curso Internacional de Protección Vegetal. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. (Noviembre, 1995). p. 89-129

Pesticide Action Network, PAN UK. Glyphosate. Active ingredient fact sheet. En: Pesticides News 33: 28-29. September 1996. London.

PARTON, J and GARRIOT, M. An evaluation of micronucleus induction in bone marrow and hepatocytes isolated from collagenase perfused liver or from formalin-fixed liver using 4 week old rats treated with known clastogens. En: Environmental Molecular Mutagenesis. Vol 29 (1997); p. 379-385.

PEÑALOSA, M; CAMARGO, M y PALACIO, J. Determinación del efecto genotóxico de sales de mercurio en *Prochilodus magdalence*. Universidad de Antioquia. 2003.

POONGOTHAI K, SHAYIN S, USHARANI MV. Induction of micronuclei in fish by polluted water and heavy metals. Cytobios. 1996;86(344):17-22

PREIN, A; THIER, G; ALINK, G; POELS, C and KOEMAN, J. Cytotoxic changes in fish exposed to water of the river RHINE. En: Science toxicology environmental. Vol. 9(1978); p. 287-291

REHANA, Z; MALIK, A and AHMAD, M. Mutagenic activity of the ganges water with special reference to the pesticides pollution in the river between Kachla to Kannauj (U.P), India. En: Mutation Research. Vol. 343(January, 1995). p. 137-144.

SANCHEZ, S; LINDE, A; IZQUIERDO, J and GARCIA, E. Micronuclei and fluctuating asymmetry in brown trout (*Salmo trutta*): Complementary methods to biomonitor fresh water ecosystem. En: Mutation Research. Vol. 412 (October, 1998). p.212-225.

SCHULTZ, M; NORRGREN, J; GRAWE, A; JOHANNINSON, A and MEDHAGE, O. Micronuclei frequency in circulating erythrocytes from *Oncorinchus mikiss* subject to irradiation, an image analysis and flow cytometric study. En: Biochemistry Physiology. Vol 105C (1993); p. 207-211.

SHORDER, J. Archived Toxicology. Vol 3(1966); p. 187-197. .

STEGEMAN, J and LECH, J. Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen exposure. En: Environ. Health Persp. Vol 90 (1991); p. 101-109.

SUZUKI, T; HAYASHI, M, HAKURA, A; ASITA, O; KODAMA, Y; HONMA, M and SOFUNI, T. Combinations affects of clostogenens in the mouse peripheral blood micronucleus assays. En: Mutagénesis. Vol 10 (1) (1995), p. 31-36.

UEDA, T. HAYASHI, M. OHTSUKA, Y. NAKAMURA, T. KOBAYASHI, J. And SOFUNI, T. A preliminary study of the micronucleus test by acridin orange fluorescent staining compared with chromosomal aberration test using fish erythropoietic and embryonic cells. En: Water Science. Tech. Vol 25(11) (1992); p. 235-240.

WASHBURN, P.C and DU GIULIO, R.T. Stimulation of uperoxide prodection by nitrofurantoin, p-nitrobenzoic acid and m-dinitrobenzene in hepatic microsomes of three species of freshwater fish. En: Enviromental Toxicology. Chem., vol 8, (1989); p.171-180.

WEIS, J.S and WEIS, P. Effects of enviromental pollutants on early fish development. En: Aquatic Science. Vol 1 (1989); p.45-74.

WILLIAMS, R.C and METCALFE, C.D. Development of an *in vivo* hepatic micronucleus assays whit rainbow trout. En: Aquatic Toxicology. Vol 23 (1992); p. 193-202.

WISK, J.D. and COOPER, K.R. . The stage specific toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in embryos of the Japanesse medaka (*Oryzias latipes*) En: Enviromental Toxicology. Chem, vol 9 (1990); p.1159-1169.

WHO. Environmental health criteria for mehylmercury. En: Environmental Health Criteria. Vol 101(1990);p. 144.

YANG, J.H. KOSTECKI, R.J. and L.A BALDWIN. Induction of peroxisomes proliferation in rainbow trout exposed to ciprofibrate, En: Toxicology Applicated Pharmacology. Vol 104(1990); p. 476-482.

YOKOTE, M. An atlas of fish histology, normal and phatological features. Capitulo 1-4. Ed. Hybia. Tokio. 1982.

URL: www.accionecologica.org. Reporte 2001.

URL:<http://www.mamacoca.org/ed-especial1/tcap05.htm#fn1>

URL: <http://www.elsevier.nl/genjng/10/32/31/52/23/50/abstract.html>.