

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS
DIVISIÓN DE BIOLOGÍA



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD GENOTÓXICA DEL GLIFOSATO
MEDIANTE LA PRUEBA DE MUTACIÓN ROSA Y LA PRUEBA DEL
COMETA EN *Tradescantia* Y LINFOCITOS HUMANOS**

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

SERGIO OCHOA HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:
CARLOS ALVAREZ MOYA

GUADALAJARA, JALISCO OCTUBRE DEL 2004.

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD GENOTÓXICA DEL
GLIFOSATO MEDIANTE LA PRUEBA DE MUTACIÓN ROSA Y LA
PRUEBA DEL COMETA EN *Tradescantia* Y LINFOCITOS HUMANOS**



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

COORDINACIÓN DE CARRERA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

COMITÉ DE TITULACIÓN

C. SERGIO OCHOA HERNÁNDEZ
PRESENTE.

Manifestamos a Usted que con esta fecha ha sido aprobado su tema de titulación en la modalidad de **TESIS E INFORMES** opción **Tesis** con el título: "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD GENOTÓXICA DEL GLIFOSATO MEDIANTE LA PRUEBA DE MUTACIÓN ROSA Y LA PRUEBA DEL COMETA EN *Tradescantia* Y LINFOCITOS HUMANOS", para obtener la Licenciatura en Biología.

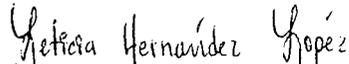
Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado/a como Director de dicho trabajo el/la **DR. CARLOS ALVAREZ MOYA**.

ATENTAMENTE
"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas, Zapopan, Jal., 10 de diciembre del 2003


DRA. MÓNICA ELIZABETH RÍOS LÓPEZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN


COORDINACIÓN DE LA CARRERA DE
LICENCIADO EN BIOLOGÍA


M.C. LETICIA HERNÁNDEZ LÓPEZ
SECRETARIO DEL COMITÉ DE TITULACIÓN

c.c.p. DR. CARLOS ALVAREZ MOYA.-Director del Trabajo.
c.c.p. Expediente del alumno

MERL/LHL/mam

C. DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE TITULACIÓN
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA
PRESENTE.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a usted, que habiendo revisado el trabajo de titulación, modalidad TESIS que realizó el pasante: C. SERGIO OCHOA HERNÁNDEZ. Código 395540015 con el título: “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD GENOTÓXICA DEL GLIFOSATO MEDIANTE LA PRUEBA DE MUTACIÓN ROSA Y LA PRUEBA DEL COMETA EN *Tradescantia* y LINFOCITOS HUMANOS”, consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para la autorización de impresión y, en su caso, programación de la fecha de examen respectivo.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que sirva brindar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Las Agujas, Zapopan, Jal., 18-10- del 2004.

DR. CARLOS ÁLVAREZ MOYA
Director de la tesis

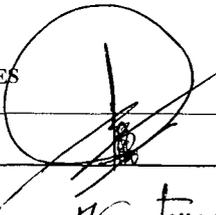

FIRMA

SINODALES

1. DR. ALFREDO FERIA VELAZCO

2. DRA. ANNE SANTERRE LUCAS

3. M.C. RAMON REYNOSO OROZCO





AGRADECIMIENTOS:

A mi padre, **Gustavo Ochoa Domínguez**, a quien le debo todo en mi vida, quien ha estado a mi lado en las buenas y en las malas siempre, muchas gracias.

A mi madre, **Maria Esther Hernández Salvador**, quien en vida, me impulso a seguir adelante en el estudio, con su amor y confianza. †

A mis suegros, **Rubén Ayala y Guadalupe Chávez**, quienes han estado pendientes de mis avances en mi carrera, y me han animado a seguir adelante.

A mi novia, **Mina Ayala Chávez**, quien ha sido desde el inicio de mi carrera, amiga, compañera, mi confidente. Gracias mi amor, por ser de las personas más importantes de mi vida.

A mi Director de tesis, Dr. **Carlos Álvarez Moya**, gracias por su gran apoyo en la realización de mi trabajo y desarrollo profesional.

Al maestro, **Miguel Carvajal Soria**, muchas gracias por ser mi maestro, pero sobretodo, por saber ser un gran amigo en el cual pude confiar siempre. Gracias por sus consejos, su apoyo y tiempo.

Mis sinodales:

Dr. **Alfredo Feria Velasco**, agradezco su ayuda en al revisión de mi trabajo de tesis. Fue un gusto enorme el conocerlo, gracias doctor.

Dra. **Anne Santerre Lucas**, le agradezco enormemente su paciencia y ayuda en la revisión de mi trabajo, así como su tiempo y enseñanza que me ofreció como maestra en clase, por medio de estas líneas le hago saber mi gran admiración.

MC. **Ramón Reynoso Orozco**, Gracias por su tiempo en la revisión de este trabajo, mil gracias por su apoyo, consejos y amistad, que siempre me ha dado desde el inicio de mi carrera. Gracias por ser un excelente amigo.

Queridos padres:

*Ustedes me han conducido por la vida
con amor y paciencia, hoy ven forjado un
anhelo, una ilusión y un deseo.*

*Gracias por enseñarme lo que han
recogido a su paso por la vida.
Gracias por ayudarme a hacer de mi lo
que soy, gente de provecho, de
grades ideales y noble corazón.*

*No les defraudaré, los haré sentirse
satisfechos y verán que todo mejora en la
vida.*

*¡Que Dios los bendiga
y los guarde para siempre!*

CONTENIDO

RESUMEN

1 INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Contaminación ambiental.....	2
2.2 Contaminación por plaguicidas	3
2.3 El glifosato.....	6
2.3.1 Modo de acción y efectos en plantas	7
2.3.2 Efectos en animales.....	7
2.3.3 El glifosato y su genotoxicidad	7
2.4 Mutaciones	8
2.4.1 Mutaciones cromosómicas	8
2.4.1.1 Poliploidías	8
2.4.1.2 Aneuploidías.....	9
2.4.1.3 Deleción, inversión, translocación	9
2.4.2 Mutaciones génicas.....	9
2.5 Mutágenos	10
2.5.1 Mutágenos físicos	10
2.5.1.1 Rayos X.....	10
2.5.1.2 Rayos UV	10
2.5.1.3 Ondas Ultrasónicas	10
2.5.2 Mutágenos Químicos	10
2.5.2.1 Arilaminas y arilamidas	11
2.5.2.2 Carbamatos.....	11
2.5.2.3 Hidrazidas	11
2.5.2.4 N-Nitrosaminas.....	11
2.5.3 Mutágenos biológicos.....	11
2.6 Bioensayos genéticos	12
2.6.1 Prueba de mutación rosa	13
2.6.2 Prueba del cometa	15

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
4 OBJETIVOS	18
4.1 General	18
4.2 Particular.....	18
5 HIPOTESIS.....	19
6 MATERIALES Y METODOS	20
6.1 Prueba de mutación rosa en Tradescantia (clon 4430).....	20
6.2 Prueba del cometa en núcleos estaminales de tradescantia <i>in vivo</i>	21
6.3 Prueba del cometa en núcleos estaminales de tradescantia <i>in vitro</i>	23
6.4 Prueba del cometa en linfocitos humanos.....	24
7 DISCUSIÓN Y RESULTADOS	26
7.1 Prueba de mutación rosa	26
7.2 Prueba del cometa en núcleos estaminales de <i>Tradescantia</i> (<i>in vivo e in vitro</i>).....	30
7.3 Prueba cometa en linfocitos humanos	34
8 CONCLUSIONES.....	38
9 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICA.....	39

LISTA DE CUADROS

Cuadro N° 1.- Grupo de pesticidas más abundantes, clasificados por su composición química.....	5
Cuadro N° 2.- Composición y características fisicoquímicas del glifosato, obtenidos de Du pont, hoja de seguridad.....	6
Cuadro N° 3.- Datos obtenidos de la frecuencia de mutación rosa inducida en <i>Tradescantia</i> por exposición a las diferentes diluciones del Glifosato	28
Cuadro N° 4.- Datos obtenidos de las migraciones de ADN en la prueba cometa aplicada a pelos estaminales de <i>Tradescantia</i> in vivo e in vitro	31
Cuadro N° 5.- Resultados obtenidos de linfocitos expuestos al glifosato in vitro	35

LISTA DE FIGURAS

Figura N° 1.- Vía de transferencia de los pesticidas en el ambiente al hombre.....	4
Figura N° 1.- Estructura molecular del glifosato.....	6
Figura N° 2.- Flor de <i>Tradescantia</i> clon 4430.....	14
Figura N° 3.- Pelos estaminales de <i>Tradescantia</i> clon 4430.....	14
Figura N° 4.- Linfocitos humanos cometizados.....	16
Figura N° 5.- Software especial para prueba cometa.....	16
Figura N° 6.- Planta de <i>Tradescantia</i> expuesta al herbicida.....	20
Figura N° 7.- Preparación de la muestra.....	21
Figura N° 8.- Grafica resultante, datos de la prueba de mutación rosa en <i>Tradescantia</i>	29
Figura N° 9a.- Longitud de la migración de ADN en cada tratamiento, prueba del cometa en núcleos de <i>Tradescantia</i> in vivo.....	32
Figura N° 9b.- Longitud de la migración de ADN en cada tratamiento, prueba del cometa en núcleos de <i>Tradescantia</i> in vitro.....	33
Figura N° 10.- Longitud de la migración de ADN en cada tratamiento, prueba del cometa en linfocitos humanos.....	36

RESUMEN

El glifosato es uno de los herbicidas más utilizados en todo el mundo, sin embargo, existen serias contradicciones acerca de su genotoxicidad, por lo anterior es necesario utilizar nueva metodología para evaluar la actividad genotóxica de esta sustancia. En el presente trabajo, se emplearon las pruebas de mutación rosa en *Tradescantia* (clon 4430) y la prueba del cometa en núcleos de células estaminales de la misma planta, así como, en linfocitos humanos, tratados con glifosato. La frecuencia de mutación rosa no se incrementó significativamente ($p > 0.05$) después del tratamiento con diferentes concentraciones de glifosato, en cambio con la prueba del cometa en los núcleos estaminales de *Tradescantia* y en los linfocitos expuestos se observó una actividad genotóxica estadísticamente significativa. Nuestras observaciones demuestran la genotoxicidad del glifosato y que además su detección depende del bioensayo empleado, lo cual puede explicar el por qué de la polémica. Se confirma que la prueba del cometa es una excelente herramienta para detectar daño genético directo inducido por agentes químicos. Por lo anterior, se recomienda para valorar adecuadamente actividad genotóxica de algún agente químico, escoger adecuadamente los sistemas de prueba y utilizar por lo menos dos de ellos.

1. INTRODUCCIÓN

Los humanos y otros organismos pueden desarrollar tumores o presentar daño en su material genético después de la exposición continua a pesticidas; el peligro es particularmente alto en el caso de trabajadores agropecuarios. El glifosato es un herbicida ampliamente utilizado aun cuando existe una gran polémica con respecto a su genotoxicidad. Estas diferencias pueden atribuirse a la distinta sensibilidad de los sistemas de prueba empleados y también depende de factores como el manejo experimental. Existen distintas metodologías para evaluar la actividad genotóxica de los compuestos químicos. Una prueba muy empleada y confiable para este propósito es la prueba de mutación rosa en los pelos estaminales de *Tradescantia*. Otro sistema sensible es la prueba del cometa, que permite la visualización de daño directamente en el material genético mediante la observación en el microscopio de núcleos individuales sometidos a electroforesis. En el presente trabajo se emplearon estos dos sistemas de prueba, para evaluar la genotoxicidad de varias concentraciones de glifosato en su forma comercial (FAENA).

2. ANTECEDENTES

2.1. CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

El desarrollo de las sociedades humanas se acompaña del uso y desecho de gran cantidad de compuestos químicos (Grimmer, 1983). Nuestros hábitos y un ambiente cargado de contaminantes físicos, químicos y hasta biológicos, pueden afectar nuestro organismo. Se calcula que un ser humano puede estar expuesto de manera cotidiana a un promedio de 35,000 agentes químicos diferentes (Albert, 1990). Algunas sustancias pueden causar daño fisiológico e incluso alterar nuestro material genético (ácido desoxirribonucleico, ADN). Cuando esto último ocurre se dice que es una sustancia mutagénica. Ésta entra a través de la membrana celular y puede provocar mutaciones puntuales y aberraciones cromosómicas, entre otras (Heflich, 1991). Existen varios grupos de sustancias potencialmente peligrosas desde al punto de vista genético, por mencionar solo algunas: a) las farmacéuticas, b) los plaguicidas y c) las emisiones gaseosas. El cáncer y los efectos teratogénicos son algunos de los peligros para la salud, consecuencia de la exposición a sustancias mutagénicas durante plazos largos (Montesano y Tomatitis, 1977). Por lo anterior, es necesario el uso de indicadores biológicos para evaluar la calidad del ambiente a través de diferentes sistemas de prueba o bioensayos que detecten daño genético inducido por agentes químicos y físicos en plantas (Grant y Salamone, 1994; Ichikawa, 1992; Grant, 1994; Grant *et al.*, 1992), en insectos (Graf y Singer, 1992; Graf *et al.*, 1984) y en bacterias (Ames *et al.*, 1973). Los sistemas de prueba antes mencionados poseen ventajas y desventajas que deben de ser consideradas seriamente para obtener mejores resultados.

2.2. CONTAMINACIÓN POR PLAGUICIDAS

Con el incremento de la contaminación por pesticidas aumentó la necesidad por conocer los efectos causados por dichas sustancias (Carrillo y Vélez, 1996). Los pesticidas o plaguicidas son sustancia que se utiliza para controlar, evitar o destruir plagas animales, microbianas o vegetales como son: los fungicidas, herbicidas e insecticidas entre otros (Repetto y Sanz, 1993). Son ampliamente utilizados en todo el mundo a pesar del daño ecológico que muchos han provocado debido a su baja tasa de biodegradabilidad, son ejemplos: el DDT, aldrín y dieldrín. Muchos de estos compuestos han sido prohibidos, pero algunos otros continúan utilizándose. Existen diferentes tipos de pesticidas; los organoclorados, organofosforados y carbamatos son los más representativos (cuadro 1). Se han detectado pozos de agua contaminados con 1,2 dibromo-3-cloropropano, insecticida organoclorado, en el área metropolitana de Fresno, California (Grella *et al.*, 1994; Zou *et al.*, 1995; Kloos, 1996). En México se detectaron plaguicidas organoclorados en aguas de riego en el Valle de Mexicali (Carrillo y Vélez, 1996). Varios tipos de pesticidas fueron encontrados en granjas acuícola de camarón del centro de Sinaloa y el puerto de San Blas, Nayarit (Ramírez *et al.*, 1996). Otros plaguicidas organoclorados se encuentran como contaminantes en leche materna de mujeres que habitan en zonas cercanas Veracruz (Waliszewski *et al.*, 1996).

Los efectos directos de la exposición a plaguicidas en el hombre comprenden daños que van desde simples irritaciones epidérmicas hasta envenenamientos, mutaciones genéticas, cáncer e incluso la muerte (Gómez *et al.*, 1992; Moses, 1992; IARC 1991). Al mismo tiempo, los efectos genotóxicos de pesticidas y sus mezclas se reportan *in vitro* (Dolara *et al.*, 1994). Se ha comprobado que la contaminación del suelo, aire y agua por pesticidas es un riesgo para los seres vivos. La exposición a estas sustancias ocurre de múltiples formas: ocupacional, ambiental o a través de su incorporación a la cadena alimenticia (Figura 1).

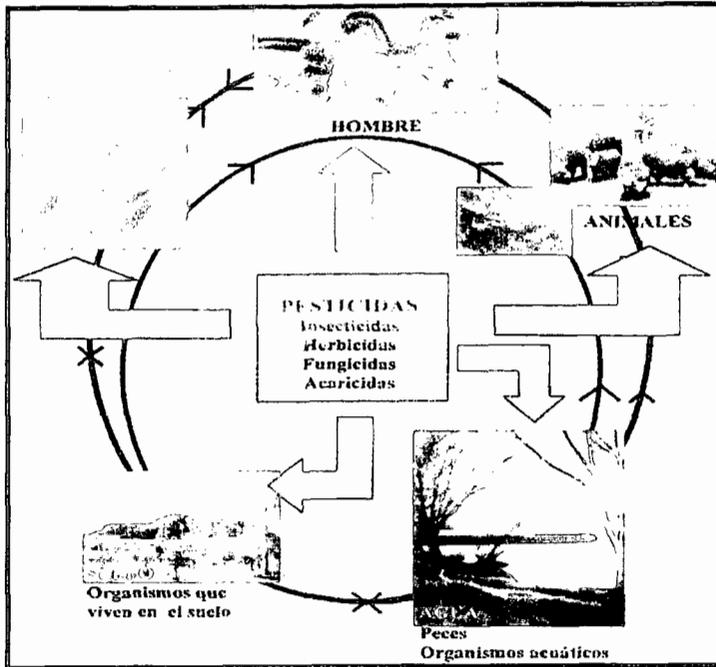


Figura 1. Vías de transferencia de los pesticidas en el ambiente y al hombre

(<http://iibce.edu.uy/posdata/drit.htm>)

<i>ORGANOCLOREDADOS</i>	<i>ORGANOFOSFORADOS</i>	<i>CARBAMATOS Y TIOCARBAMATOS</i>
CLOROFENOTANO	GLIFOSATO	DIMETANO
ALDRIN	PARATION	CARBARIL
DIELDRIN	MALATION	ISOLAN
CLOORDANO	METIL-PARATION	ALICARB
HEPTACLORO	BROMORFOS	COMPUESTO DINITRO
TOXAFENO	ETIL-BROMORFOS	DNOC (DINITRO-ORTO-CRESOL)
ENDOSULFAN	FENITROTHION	DNBP (DINITRO-BUTIL-FENOL)
METOXICLORO	DIMETOATO	DINOSEB, ACETAT
HEXACLOROBENZOL	CLOROTHION	NITROBENZOLES SUSTITUIDOS
PCB (PBB)	DIAZINON	QUINTOZEN
CUMAROL-DERIVADOS	DEMETON	COMPUESTOS DIPIRINA
CUMACLOR	DEMETON-S-METIL	PARAQUIAT
CUMATETRALYL	DICLORFOS	DERIVADOS DE UREA
WARFARINA	MEVINFOS	ALFA NAFTIL TIUREA
AC. CARBÓNICOS	DIBROM	COMPUESTOS HETEROCICLICOS
CLORADOS	FOSFAMIDON	NITROGENADOS
AC.	TRICLORFON	DIAZINA
PEROXICARBONICO	FENCLORFOS	TRIAZINA
2,4,D	AZINFOS	TRIAZOLES
MCPA(AC.	COUMAFOS	
METOXICLOR - FENOAXIACÉTICO) 2, 4, 5, -T		

Cuadro 1. Grupo de pesticidas más abundantes, clasificados por su composición química. (Ramírez y Hernández, 2001).

2.3. EL GLIFOSATO

El glifosato se introdujo en el mercado en 1971, hoy en día es el herbicida más utilizado a nivel mundial aún cuando existe una gran polémica sobre su actividad genotóxica (Figura 2, Cuadro 2). Algunos de sus nombres comerciales son: Round-up, Glicepe, Stirrup, Herbolex, Faena, entre otros. El glifosato controla la mayoría de las especies gramíneas y dicotiledóneas consideradas como malas hierbas y es particularmente activo sobre especies perennes, por ello, es conocido como un herbicida total.

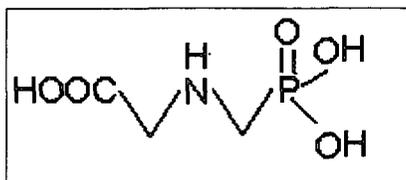


Figura 2. Molécula del glifosato

<i>COMPOSICIÓN / INGREDIENTES</i>	<i>CARACTERÍSTICAS FÍSICO - QUÍMICAS</i>
Nombre Químico: N-(fosfonometil) glicina; sal isopropilamina	Estado físico: Líquido límpido, solución
Sinónimo del principio activo: Glifosato	Apariencia y olor: Líquido claro, ambarino, inodoro
Formulación : SL	Densidad relativa: 1.17 a (20/20°C)
N° CAS : 1071-83-6	pH : 4.7 a 20°C
N° CAS: (Sal Isopropilamina): 38641-94-0	Solubilidad en agua: Soluble.
Concentración : 48%P/V de la sal	

Cuadro 2. Composición y características fisicoquímicas, tomado de Glifosato Du Pont, hoja de datos de seguridad.

2.3.1. MODO DE ACCIÓN Y ALGUNOS EFECTOS EN PLANTAS

La acción herbicida del glifosato se debe a la inhibición de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano), utilizados en la síntesis de proteínas y que son esenciales para el crecimiento y sobrevivencia de las plantas. El glifosato inhibe la enzima enolpiruvilchiquimato-fosfato sintasa (EPSPS), importante en la síntesis de aminoácidos aromáticos; también puede inhibir o reprimir la acción de otras dos enzimas involucradas en otros pasos de la síntesis de los mismos aminoácidos, la clorismato mutasa y prefrenato hidratasa. Estas enzimas forman parte de la vía del ácido químico, presente en plantas superiores o microorganismos pero no en animales. En caña de azúcar reduce la actividad de una de las enzimas involucradas en el metabolismo del azúcar, la ácido invertasa. Esta reducción parece estar mediada por auxinas, hormonas de las plantas (Nivia, 2001).

2.3.2. EFECTOS EN ANIMALES

El glifosato también puede afectar sistemas enzimáticos en animales y humanos. En ratas, cuando se les inyectó en el abdomen, disminuyó la actividad de dos enzimas detoxificantes, el citocromo P-450 y una monooxigenasa; también disminuyó la actividad intestinal de otra enzima detoxificante, la aril hidrocarbano hidroxilasa (Nivia, 2001).

2.3.3. EL GLIFOSATO Y SU GENOTOXICIDAD

Existen diversas contradicciones sobre la existencia de actividad genotóxica del glifosato. Clements *et al.* (1997) y Peluso *et al.* (1998) demostraron con la prueba del cometa, que el glifosato induce rupturas en el ADN en células de ratón y *Rana catesbeiana*. Li y Long (1998) también reportaron su efecto mutagénico en *S. typhimurium*, *E. coli*, *B. Subtilis*, hámster chino y médula ósea de ratón. The International Program Chemical Safety's (IPCS) (1994) reportó un incremento en la incidencia de tumores testiculares de ratón. En *Drosophila melanogaster*, Kaya *et al.* (2000), encontraron efecto genotóxico directo del glifosato. Álvarez *et al.* (2001a) asociaron el daño genético y la "marchites del agave" con el uso del glifosato en cultivos de *Agave tequilana*. Sin embargo, Busse *et al.* (2001), Owczarek *et al.* (1999), Williams *et al.* (2000), Rodríguez (2004), así como las empresas Monsanto (1998), Du Pont (2002), entre otras,

han reportado la ausencia de genotoxicidad del glifosato. Estas diferencias pueden atribuirse a la distinta sensibilidad de los sistemas de prueba, misma que depende de factores como el manejo experimental y tipo de organismo utilizado (Zúñiga, 2001). Por todo lo anterior es recomendable la utilización de más de una metodología para evaluar el posible efecto mutagénico de este herbicida.

2.4. MUTACIONES

Una mutación es cualquier cambio heredable del material genético, puede ser una transformación química de un gen individual (mutación génica o puntual) que altera su función, o un reordenamiento, ganancia o pérdida de un cromosoma, visible al microscopio (mutación cromosómica). Las mutaciones pueden ocurrir en células germinales y transmitirse a la descendencia o en células somáticas y pasar de una célula a otra al dividirse éstas (Repetto y Sanz, 1995).

La exposición de los seres vivos a las diversas sustancias químicas encontradas en nuestro entorno puede inducir el desarrollo de cáncer; sin embargo, un peligro más es la aparición de enfermedades genéticas en la descendencia del individuo expuesto cuando los gametos son los afectados. La exposición de los humanos u otros seres vivos a los agentes mutagénicos puede ocurrir de diversas formas: ingestión de medicamentos, exposición directa a través de la piel e inhalación. (Álvarez y Zaitseva, 2001).

Las mutaciones se pueden clasificar en:

- a) Cromosómicas numéricas o estructurales (aneuploidia, poliploidia, translocación, delección e inversión)
- b) Génicas (inserción, delección, sustitución de bases y rearrreglos).

2.4.1 MUTACIONES CROMOSÓMICAS

Las mutaciones cromosómicas se pueden presentar como una alteración en número o estructura de los cromosomas.

2.4.1.1 Poliploidias. Se refiere a la existencia de múltiplos exactos de la dotación genética, es decir la alteración en el número normal; por ejemplo, en el humano el número diploide (2N) consta de 46 cromosomas y el haploide (N)

solo de 23. Por lo tanto, una poliploidia sería un aumento a 69 a 92 cromosomas en el hombre, lo cual es incompatible con la vida (Álvarez y Zaitseva, 2001).

2.4.1.2 Aneuploidias. Consisten en la alteración en el número los cromosomas (no múltiplos). En el humano se pueden encontrar casos de 25 cromosomas en lugar de 46, así como 47, 48 o más (Álvarez y Zaitseva, 2001; Repetto y Sanz, 1995).

2.4.1.3 Delección, inserción, inversión y translocación. Otras alteraciones que podemos observar son los cambios en su estructura. Cuando los cromosomas carecen de ciertas regiones se dice que existe una **delección**, por el contrario, cuando poseen fragmento extras se le llama **inserción**. Cuando entre un cromosoma y otro se da un intercambio de fragmentos se dice que se efectuó una **translocación**. Cuando un fragmento esta en un lugar correcto pero no se encuentra en la orientación adecuada, dando la impresión de haber efectuado un giro, se le denomina **inversión** (Álvarez y Zaitseva, 2001; Repetto y Sanz, 1995).

2.4.2. MUTACIONES GÉNICAS

La mutación génica se refiere a la alteración de uno o más genes. Cuando un pequeño fragmento del gene se pierde se dice que existe una **delección** o, por el contrario se inserta, se denomina **inserción**. Cuando se pierde por lo menos una base nitrogenada se efectúa una delección. En otras ocasiones se puede presentar una **inserción de bases** que puede ocasionar de igual manera efectos desastrosos. En todos los casos, el efecto de una mutación génica dependerá de la región afectada del gen y de la importancia del producto génico (Álvarez y Zaitseva, 2001; Repetto y Sanz, 1995).

2.5. MUTÁGENOS

Los mutágenos son agentes que pueden ocasionar cambios en el material genético de células (Ramírez, 2001), debido a esto, la frecuencia de mutación puede incrementarse con la exposición a ellos. Se dividen en tres grupos: físicos, químicos y biológicos.

2.5.1. MUTÁGENOS FÍSICOS

Aquí se agrupan varios tipos de radiaciones que elevan la frecuencia de eventos mutacionales como: rompimientos, rearrreglos y/o distorsión de la cadena de ADN al alterar las bases (dímeros de timina) bloqueando así futuras replicaciones (Ramírez, 2001).

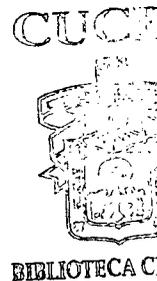
2.5.1.1. Rayos X. Fueron descubiertos por Muller en 1927, desde entonces, la *Drosophila melanogaster* es el modelo más utilizado para estudiar las mutaciones causadas por las radiaciones, y con ella, se obtuvieron gran cantidad de datos sobre la inducción de mutaciones génicas y variaciones estructurales por estos agentes (Lindsley y Grell, 1968).

2.5.1.2. Rayos Ultravioleta (UV). Los rayos ultravioleta inducen mutaciones de tipo puntual y cromosómica (Griggs y Bender, 1973; Meltz, 1991); por ejemplo, se han obtenido un gran número de mutantes en *Neurospora* en diversas levaduras (Lí y Loretz, 1991). En adición, el sistemático deterioro de la capa de ozono ha incrementado la penetración de este tipo de radiación y algunos estudios señalan la relación entre la exposición solar y el incremento de cáncer de piel.

2.5.1.3. Ondas Ultrasónicas. Las ondas ultrasónicas con una frecuencia de 400.000 ciclos por segundo pueden producir mutaciones letales en *Drosophila melanogaster* (Ciaravino, 1986), así como variaciones estructurales en los cromosomas somáticos de plantas (Meltz, 1991).

2.5.2. MUTÁGENOS QUÍMICOS

Los mutágenos químicos producen cambios en el ADN como son las sustituciones de bases y errores de apareamiento. Se calcula que un ser humano común puede estar expuesto a un promedio de 100 mil diferentes



sustancias. En la actualidad existen aproximadamente 10 millones de compuestos químicos diferentes como pesticidas, medicamentos, bencenos, conservadores de alimentos enlatados, solo por mencionar algunos, y la velocidad con la que se diagnostica su peligrosidad genética es notablemente inferior a la cantidad de nuevas sustancias producida (Ramírez, 2001).

2.5.2.1. Arilaminas y arilamidas. Las arilamidas estuvieron entre los primeros carcinógenos reconocidos. Existen estudios epidemiológicos que relacionan la exposición a 2-naftilamina, benzidina y 4-aminobifelino con incidencias de cáncer en la vejiga. En este caso, esta implicada la activación metabólica de procarcinógenos y promutágenos (Aguilera, 1996).

2.5.2.2. Carbamatos. Un gran número de químicos agrícolas se clasifican dentro de los carbamatos, ésteres y derivados del ácido carbámico. El etilcarbamato-uretano presenta gran actividad mutagénica; este agente se usó como anestésico de tejidos y conservador en jugo de naranja y se detectó su presencia en cigarrillos y en los procesos de elaboración de cerveza (Solonesky *et al.*, 2002).

2.5.2.3. Hidrazidas. Algunas se producen naturalmente en el tabaco y hongos comestibles. Son utilizadas en la industria como producto intermedio. También se emplean como agentes quimioterapéuticos y en ocasiones como aditivo a pesar de ser extremadamente mutagénicas, por esta característica frecuentemente son utilizadas como testigos positivos en estudios de genotoxicidad (Álvarez *et al.*, 2001b).

2.5.2.4. N-Nitrosamina. La exposición a este químico ocurre concretamente a través del consumo de alimentos, tabaco, cosméticos y algunos productos de gomas. La N-Nitrosamina resulta mutagénica en numerosos sistemas de prueba y carcinogénica en diferentes variedades y especies de plantas (Álvarez *et al.*, 2001b).

2.5.3. MUTÁGENOS BIOLÓGICOS

Respecto a los mutágenos biológicos, éstos producen cambios que van desde "simples" rompimientos cromosómicos hasta la pulverización total del complemento cromosómico (Ramírez, 2001). Los virus pueden producir diferentes tipos de cánceres en animales, por ejemplo, en el ser humano, el

virus de Epstein-Barr se asocia con el linfoma de Burkitt, el carcinoma nasofaríngeo y los linfopiteliomas; el virus de la hepatitis B está implicado con el hepatocarcinoma; y el virus del herpes simple (tipo 2) y varios tipos de papiloma virus humanos están relacionados con el cáncer de cérvix (Ramírez, 2001).

2.6. BIOENSAYOS GENÉTICOS

El sistema más adecuado para detectar actividad mutagénica es aquel que localiza los mutágenos antes de que se manifiesten sus efectos en los seres humanos. Por lo anterior, resulta apropiado basarse en datos obtenidos en sistemas de prueba sobre otros organismos (bioensayos), siempre y cuando estén expresadas las limitaciones y diferencias en el metabolismo y en los sistemas de reparación del ADN (Li y Loretz, 1991). Algunos autores opinan que tales diferencias no son tan evidentes y que los resultados pueden extrapolarse inclusive al hombre, de tal suerte que, estos tipos de estudios se han recomendado a la Organización Mundial de la Salud (Grant, 1994).

En muchos países se establecieron los requisitos de ensayos (agudo o de corto plazo y crónico o de largo plazo) y se fijaron normas y niveles de tolerancia, así como, el desarrollo de una serie de bioensayos de tiempos cortos para la observación de cambios genéticos. Estos sistemas de prueba tienen diferentes propósitos como son: (1) búsqueda de productos ambientales con propiedades carcinogénicas, (2) identificación de carcinógenos en fluidos del cuerpo, (3) entendimiento de los mecanismos de la activación química de carcinógenos y sus reacciones con el ADN y (4) predicción de carcinogenicidad de sustancias. Generalmente se requieren de 2 o 3 bioensayos para afirmar que una sustancia química es carcinogénica (Casiano, 1991).

Actualmente se cuenta con una gran variedad de pruebas con las que se puede determinar daño genético o detectar compuestos genotóxicos, estas pruebas pueden ser bioquímicas, realizarse *in vivo* o *in vitro*, con microorganismos o macroorganismos, y pueden determinar daño microscópico o molecular (Seraj *et al.*, 1996).

2.6.1. PRUEBA DE MUTACIÓN ROSA EN *Tradescantia* (CLON 4430)

La prueba de mutación rosa es un excelente bioensayo para la detección de cambios genéticos provocados por diferentes compuestos químicos y físicos en el medio ambiente. Sin embargo, los resultados pueden variar de acuerdo a la naturaleza de los agentes (Gichner *et al.*, 1982).

Algunas especies de *Tradescantia*, entre ellas, *Tradescantia virginiana* tienen la característica de poseer pocos cromosomas. Existen otras especies, como son: *Tradescantia occidentalis*, *Tradescantia ohioensis*, *Tradescantia subcaulis* y *Tradescantia hirsutiflora*, con las dos últimas se logró obtener un híbrido conocido como clon 4430 (Figura 3). Éste se propaga vegetativamente, es decir, sin unión de células o núcleos de células germinales, de manera que el individuo resultante es, desde el punto de vista genético, idéntico al parental. Se puede mantener en condiciones de invernadero donde florece por largos periodos de tiempo. El principio básico de la prueba de mutación rosa en *Tradescantia* (clon 4430) se basa en el color de las células estaminales de la flor como criterio para determinar mutaciones (Figura 4). El clon es heterocigoto para el color de la flor (Aa) en la que se expresa el color azul de los pelos estaminales como dominante y el color rosa como recesivo (Mericle y Mericle, 1967). Cuando los pelos estaminales son jóvenes se encuentran en división celular activa, esta etapa es adecuada para la inducción de mutaciones. Cada pelo estaminal se deriva de una célula epidérmica simple y crece a través de divisiones sucesivas de células terminales y subterminales. En la madurez los estambres muestran un rango de 40-70 pelos cada uno conteniendo arriba de 32 células aproximadamente (Aguilera, 1996).



Figura 3. Flor de *Tradescantia* clon 4430



Figura 4. Pelos estaminales de *Tradescantia* clon 4430

2.6.2. PRUEBA DEL COMETA

En 1988 se mejoró una técnica que detecta alteraciones del ADN en células individuales conocida como "prueba del cometa alcalino" (PCA) o electroforesis de células individuales (Singh *et al.*, 1988). La PCA, permite medir el rompimiento en el ADN y detectar sitios sensibles al álcali en células de mamífero y algunas plantas (Arévalo, 1999; Tebbs *et al.*, 1999; Wagner *et al.*, 1998; Koppen y Vershaeve, 1996) y es muy empleada ya que es rápida, simple y sensible. Ésta ha sido ampliamente utilizada en células animales. En plantas la PCA es menos frecuente sin embargo ha aumentado el número de reportes en los últimos años (Álvarez *et al.*, 2001a). Es una excelente herramienta para la detección de agentes genotóxicos, bastan sólo "unas cuantas células" (1-10,000) para realizar el ensayo y los resultados se obtienen en un día (McKelvey, 1993; Fairbair, 1995). Con esta prueba se han estudiado la inducción de daño sobre el ADN en células cultivadas y en suspensión, así como en sistemas *in vivo*. La PCA tiene varias ventajas: (A) Es posible investigar el grado de rompimiento del ADN en pequeñas muestras de tejidos animales y biopsias humanas; (B) Se lleva a cabo en pocas horas y, si se cuenta con un analizador de imágenes, los resultados son obtenidos y evaluados inmediatamente; (C) En términos generales, el equipamiento es el mismo utilizado para otros ensayos de poca duración con excepción del analizador de imágenes, el cual es costoso, pero es de gran ventaja tenerlo.

En esta técnica los núcleos de las células o las células mismas se colocan dentro de un gel de agarosa sobre un portaobjetos, posteriormente son sometidas a electroforesis por poco tiempo, bajo condiciones alcalinas. El resultado de lo anterior es un núcleo con apariencia de un cometa, en el cual pueden analizarse distintos parámetros que miden el daño genético (Figura 5a y 5b). Las células con un incremento de daño en su material genético presentan una mayor migración de los fragmentos de ADN hacia el ánodo o bien, una mayor intensidad de fluorescencia de la cauda (cola del cometa) con respecto a las células normales. La longitud de la migración se cuantifica en el microscopio de fluorescencia una vez que se han teñido los núcleos con bromuro de etidio (Singh *et al.*, 1988).

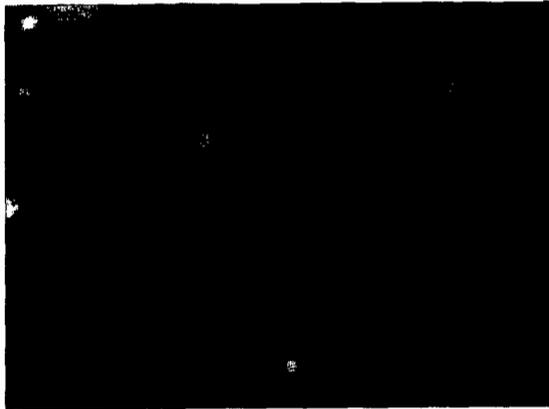


Figura 5a. Linfocitos humanos en la prueba cometa.

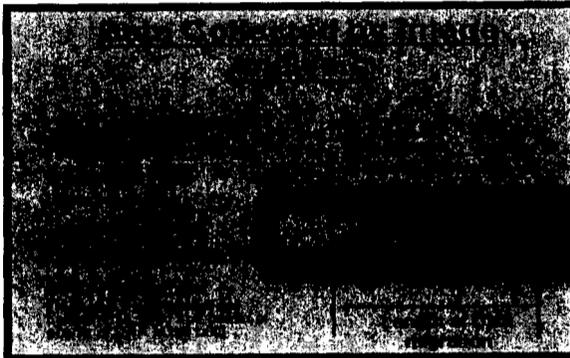


Figura 5b. Software especial para prueba del cometa (*cometassay*), la imagen muestra algunos de los parámetros utilizados para la prueba.

Figura 5. (a) Núcleos “cometizados” observados con microscopía de fluorescencia donde se observa el típico “cometa”. **(b)** Parámetros analizados sobre la imagen de un cometa mediante el análisis de imágenes (www.cometassay.com).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El glifosato es uno de los herbicidas más utilizados, sin embargo existen grandes contradicciones con respecto a su actividad genotóxica, debidas quizá a la utilización de sistemas de prueba no adecuados. Por lo anterior, en el presente trabajo se propone utilizar simultáneamente dos o más pruebas en células vegetales y animales para evaluar el efecto mutagénico de éste herbicida.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad mutagénica del glifosato a diferentes diluciones (1/10,000; 1/100,000; 1/1, 000,000; 10, 000,000) mediante la prueba tradicional de *Tradescantia* (clon 4430), así como, en la prueba del cometa, aplicada en núcleos de células estaminales de *Tradescantia* y en linfocitos humanos.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.1 Determinar las **frecuencias de mutación rosa** en plantas de *Tradescantia* expuestas a las diferentes diluciones de glifosato.
- 1.2 Detectar con la prueba del cometa, el daño genético inducido en núcleos de las **plantas de *Tradescantia* expuestas** a las diferentes diluciones de glifosato (prueba *in vivo*)
- 1.3 Detectar con la prueba del cometa, el daño genético inducido en **núcleos de *Tradescantia* expuestos** a las diferentes diluciones de glifosato (prueba *in vitro*).
- 1.4 Detectar con la prueba del cometa el **daño genético en linfocitos humanos** expuestos a las diferentes diluciones de glifosato (*in vitro*).
- 1.5 Establecer comparaciones entre los resultados de las pruebas.

5. HIPÓTESIS

El glifosato posee actividad mutagénica detectable con prueba de mutación rosa en *Tradescantia* y la prueba del cometa aplicada a los núcleos estaminales de la *Tradescantia*, así como, en linfocitos humanos.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. PRUEBA DE MUTACION ROSA EN *Tradescantia* (clon 4430)

Químicos. El glifosato en su forma comercial (FAENA) fue obtenido de Monsanto.

Tratamiento. Para la prueba se utilizaron plantas de *Tradescantia* pertenecientes al clon 4430 (*T. subacaulis* X *T. hirsutiflora*), altamente sensible a mutágenos ambientales. Las plantas crecieron en condiciones controladas: 22°C durante el día y 16-18°C en la noche y 60% de humedad ambiental relativa. Las diluciones de glifosato/agua estudiadas fueron: 1/10,000, 1/100,000, 1/1000,000, 1/10,000,000; obtenidas a partir de una solución madre, preparada de acuerdo a la dosis recomendadas por Monsanto para su uso en el campo (1.5 ml de glifosato/100 ml de agua). Para el testigo negativo se utilizó una solución de Hoagland's.

Los cortes de *Tradescantia*, con sus inflorescencias, se sumergieron en 50 ml de las concentraciones de glifosato durante 3 horas, al término de las cuales, se lavaron con agua destilada para colocarlos en solución de Hoagland's hasta el momento de la lectura (Figura 6). Es importante señalar que parte de las inflorescencias de las plantas tratadas se emplearon en la obtención de núcleos para la prueba del cometa (*in vivo*) descrita más adelante.



Figura 6. Plantas de *Tradescantia* expuestas al herbicida.

Para cada experimento, incluyendo el testigo negativo, se emplearon los tallos más vigorosos (de 25-30) conteniendo las inflorescencias, que proporcionaron alrededor de 15 flores diarias (de 1500 a 3000 pelos estaminales). Los pelos estaminales se colectaron y colocaron diariamente

sobre un portaobjetos con aceite de parafina, peinándose con una aguja, para facilitar el conteo (Figura 7).



Figura 7. Preparación de la muestra

La observación se realizó en un microscopio estereoscópico obteniéndose la frecuencia de mutación por 1000 pelos diariamente en los días 7 al 14 después del tratamiento, determinado como periodo óptimo para esta prueba (Ma *et al.*, 1994). Para el conteo de los eventos rosa se empleó el siguiente criterio: una célula rosa o un grupo unido de células rosa se consideró como un evento de mutación simple. Cuando las células rosas estuvieron separadas por células azules se consideraron como eventos mutacionales distintos. La frecuencia de mutación rosa se estableció de acuerdo con Underbrink *et al.* (1973). La media de la frecuencia de mutación rosa se calculó con un intervalo de confianza $p < 0.05$.

6.2. PRUEBA DEL COMETA EN NÚCLEOS ESTAMINALES DE *Tradescantia IN VIVO*

Obtención de núcleos. Los núcleos de los pelos estaminales se separaron de la siguiente manera: 24 estambres de cada una las **plantas expuestas a las diluciones de glifosato**, ya mencionadas, fueron tomadas en el décimo día después del tratamiento. También se tomaron 25 estambres de una planta no expuesta al glifosato (testigo negativo), mantenida en las mismas condiciones de las plantas expuestas al herbicida. Los estambres fueron colocados en morteros fríos distintos y se les añadió a cada uno 440 μ l de amortiguador Honda (0.44 M sucrosa, 2.5% Ficoll (type 400), 5% Dextran T-40, 25 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM $MgCl_2$, 10 mM β -mercaptoetanol, y 2.5% Triton X-100). Las células

estaminales fueron maceradas cuidadosamente en el mortero para romperlas y liberar sus núcleos.

Después de homogenizar, cada una de las mezclas fueron filtradas en una malla de nylon de 80 μm de apertura de poro. Los núcleos se separaron por centrifugación a 3000 rpm (4°C) por 3 minutos y luego se lavaron 3 veces en 5 ml de solución salina fisiológica (0.9% NaCl), finalmente se resuspendió en 200 μl de amortiguador de fosfatos (160 Mm NaCl, 8 mM NaH_2PO_4 (fosfato dibásico), 5 mM NaH_2PO_4 (fosfato monobásico), pH 7.0) conservándose así hasta el momento de la electroforesis.

Preparación de la muestra. Las suspensiones nucleares obtenidas se utilizaron en la prueba alcalina del cometa como describieron Alvarez-Moya *et al.* (2001b). Los portaobjetos fueron cubiertos con agarosa tipo "Normal Melting Point" (NMP) (gelificación a temperatura normal) al 1 % (50 mg de agarosa /5 ml H_2O), se permitió que solidificara y luego fue retirada para tener una superficie completamente limpia. Después de esto, 300 μl de agarosa NMP al 0.6 % (30 mg de agarosa/5 ml H_2O) se colocaron en el portaobjetos. Enseguida, 100 μl de agarosa de tipo Low Melting Point (LMP) (gelificación abaja temperatura) al 0.5% (25 mg de agarosa/5 ml H_2O) fueron mezclados con 10 μl de la suspensión nuclear y la mezcla se colocó sobre la primera capa. Finalmente una tercera capa de 100 μl de agarosa LMP al 0.5 % (25 mg de agarosa/5 ml H_2O) fue añadida para cubrir la segunda capa. Se prepararon portaobjetos con agarosas y núcleos por duplicado para cada muestra.

Los portaobjetos preparados con agarosa y núcleos, fueron sumergidas en solución de lisis (2.5 mM NaCl, 10 mM Na_2EDTA , 10 mM Tris-HCl, 1% lauril sarcosinato, 1% Tritón X-100 y 10% DMSO, pH 10) por 60 min. a 4°C. Después de la lisis, se colocaron en un sistema de electroforesis horizontal con amortiguador de pH alcalino (30mM NaOH, 1mM Na_2EDTA , pH 13) por 45 min. a 4°C. La electroforesis se llevó a cabo por 10 min. a 200 mA y 9 voltios. Una vez terminada los portaobjetos fueron sumergidos en un amortiguador neutro (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) por 15 min. y posteriormente lavadas con agua destilada, para proceder a teñir con 0.5 ml de bromuro de etidio (20 μl / 1ml H_2O) por 5 minutos. Finalmente, se procedió a lavar los portaobjetos 2 veces con agua destilada y un cubreobjetos se colocó sobre el gel para su observación en el microscopio.

6.3. PRUEBA DEL COMETA EN NÚCLEOS ESTAMINALES DE *Tradescantia* IN VITRO

Obtención de núcleos. Se colocaron 24 estambres de una planta de tradescantia, **no expuesta al herbicida**, en un mortero frío y se le añadió 440 µl de amortiguador Honda (0.44 M sucrosa, 2.5% Ficoll (type 400), 5% Dextran T-40, 25 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM MgCl₂, 10 mM β-mercaptoetanol, y 2.5% Triton X-100). Las células estaminales fueron maceradas cuidadosamente en mortero para romperlas y liberar sus núcleos.

Después de homogenizar, la mezcla fue filtrada en una malla de nylon de 80 µm de apertura de poro. Los núcleos fueron separados por centrifugación a 3000 rpm (4°C) por 3 min. y luego se lavaron 3 veces en 5 ml de solución salina fisiológica (0.9% NaCl), finalmente se resuspendió en 200 µl de amortiguador de fosfatos (160 mM NaCl, 8 mM. Na₂HPO₄ (fosfato dibasico), 5 mM. NaH₂PO₂ (fosfato monobasico), pH 7.0, conservándose así hasta el momento de la electroforesis.

Preparación de la muestra. La suspensión nuclear obtenida se usó en la prueba alcalina del cometa como describieron Alvarez-Moya *et al.* (2001b). Los portaobjetos fueron cubiertos con agarosa tipo "Normal Melting Point" (gelificación a temperatura normal) (NMP) al 1 % (50 mg de agarosa/5 ml H₂O) se solidificó y luego fue retirada para tener una superficie completamente limpia. Después de esto, 300 µl de agarosa NMP al 0.6 % (30 mg de agarosa/5 ml H₂O) se colocaron en el portaobjetos. Enseguida, 100 µl de agarosa de tipo Low Melting Point (gelificación abaja temperatura) (LMP) al 0.5% (25 mg de agarosa/5 ml H₂O) fueron mezclados con 10 µl de la suspensión nuclear y la mezcla se colocó sobre la primera capa, en el centro del portaobjeto. Finalmente una tercera capa de 100 µl de agarosa LMP al 0.5 % (25 mg de agarosa/5 ml H₂O) fue añadida para cubrir la segunda capa. Se prepararon portaobjetos por duplicado con agarosa y núcleos para cada concentración de glifosato.

Para realizar la exposición de los núcleos al glifosato *in vitro*, los portaobjetos preparados **fueron sumergidos en cada una de las diluciones del glifosato por 3 horas** (exposición al herbicida *in vitro*), también se utilizó agua destilada para el testigo negativo, al finalizar este tiempo, fueron lavadas

con agua destilada. Posteriormente, las muestras se colocaron en una solución de lisis (NaCl 2.5 mM, Na₂EDTA 10 mM, Tris-HCl 10 mM, lauril sarcosinato 1%, Tritón X-100 1% y DMSO 10%, pH 10) por 60 min. a 4°C. Después de la lisis, se colocaron en un sistema de electroforesis horizontal con amortiguador de pH alcalino (NaOH 30 mM, Na₂EDTA 1mM, pH 13) por 45 min. a 4°C. La electroforesis se llevó a cabo por 10 minutos a 200 mA y 9 voltios; una vez terminada los portaobjetos fueron sumergidos en un amortiguador neutro (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) por 15 min. y posteriormente lavadas con agua destilada, para proceder a teñir con 0.5 ml de bromuro de etidio (20 µl/1 ml de H₂O) por 5 min. Finalmente, se procedió a lavar, los portaobjetos, 2 veces con agua destilada y un cubreobjetos se colocó sobre el gel para su observación en el microscopio.

6.4. PRUEBA DEL COMETA EN LINFOCITOS HUMANOS IN VITRO

Obtención de los linfocitos. Frecuentemente se ha utilizado la prueba del cometa en sangre total, cuando se trabaja en linfocitos (Poli *et al.*, 1999; Udumudi *et al.*, 1998). En nuestro caso, para la obtención de los linfocitos, se colocó 1 ml de una muestra de sangre humana en tubos capilares, posteriormente fue centrifugada a 5000 rpm por 10 min. Con este procedimiento los eritrocitos, linfocitos y el plasma fueron separados, posteriormente se tomaron cuidadosamente las células de nuestro interés con una pipeta paster. La muestra fue colocada en una solución amortiguadora de fosfatos (Na₂PO₄ 4 mM, Na₂H₂PO₄ 8 mM, NaCl 160 mM, pH 7) conservándose así hasta el momento de la electroforesis.

Preparación de la muestra. La suspensión celular obtenida se usó en la prueba del cometa como describieron Álvarez *et al.* (2001b). Los portaobjetos fueron primero cubiertos con agarosa tipo "Normal Melting Point" (gelificación a temperatura normal) (NMP) al 1 % (50 mg. de agarosa/5 ml. H₂O) se permitió que solidificara y luego fue retirada para tener una superficie completamente limpia. Después de esto, 300 µl de agarosa NMP al 0.6 % (30mg. de agarosa/5ml H₂O) se colocaron en el portaobjetos. Enseguida, 100 µl de agarosa de tipo Low Melting Point (gelificación abaja temperatura) (LMP) al 0.5% (25 mg. de agarosa/5 ml H₂O) fueron mezclados con 10 µl de la suspensión celular y la mezcla se colocó sobre la primera capa, en el centro del portaobjeto. Finalmente una tercera capa de 100 µl de agarosa LMP al 0.5 %

(25 mg. de agarosa/5 ml H₂O) fue añadida para cubrir la segunda capa. Se preparo un duplicado de portaobjetos con agarosa y linfocitos para cada concentración del herbicida.

Los portaobjetos preparados **fueron sumergidos en cada una de las concentraciones del glifosato por 3 horas** (exposición al herbicida *in vitro*), al término de este tiempo, fueron lavadas con agua destilada. Posteriormente las muestras se colocaron en una solución de lisis (NaCl 2.5 mM, Na₂EDTA 10 mM, Tris-HCl 10 mM, lauril sarcosinato 1%, Tritón X-100 1% y DMSO 10%, pH 10) por 1 hora a 4°C. Después de la lisis, se colocaron en un sistema de electroforesis horizontal con amortiguador de pH alcalino (NaOH 30 mM, Na₂EDTA 1mM, pH 13) por 45 minutos a 4°C. La electroforesis se llevó a cabo por 10 min. a 200 mA y 9 voltios; una vez terminada, los portaobjetos fueron sumergidos en amortiguador neutro (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) por 15 min. y posteriormente lavadas con agua destilada, para proceder a teñir con 0.5 ml de bromuro de etidio (20 µl/ 1 ml de H₂O) por 5 minutos. Finalmente, se procedió a lavar, los portaobjetos, 2 veces con agua destilada y un cubreobjetos se colocó sobre el gel para su observación en el microscopio.

7. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

Los bioensayos o sistemas de prueba son excelentes herramientas utilizadas en la toxicología ambiental y carcinogénesis (Ames, 1983; Li and Loretz, 1991). Con estos tipos de ensayos, se han realizado diversos estudios en donde se reporta daño ecológico y alteraciones en la salud humana originada por pesticidas (Ahmed and Grant, 1992; Gómez *et al.*, 1992; Dolara *et al.*, 1994; Clements *et al.*, 1997).

La prueba de mutación rosa en *Tradescantia* es un excelente bioensayo, ya que es económica y sencilla, a demás produce resultados entre los once y catorce días (Underbrink *et al.*, 1972). Otro sistema eficaz en la detección de daño génico o actividad mutagénica de agentes químicos y físicos, es la prueba del cometa (Narendra *et al.*, 1988). Esta prueba del cometa ha sido utilizada principalmente en animales, sin embargo, los reportes en plantas han aumentado considerablemente (Koppen y Vershaeve, 1996; Koppen *et al.*, 1999; Poli *et al.*, 1999; Álvarez *et al.*, 2001a; Álvarez *et al.*, 2001b). Aunque lo importante en las pruebas de genotoxicidad es determinar si un agente es o no genotóxico, siempre es deseable medir la relación lineal dosis-respuesta. Debido a que esta condición no se cumple con la PCA se sugiere que el área o momento de cola se utilicen para una mejor edición en la determinación de la genotoxicidad (Mckelvey *et al.*, 1993).

En el presente trabajo se utilizaron: a) la prueba de mutación rosa en *Tradescantia* (clon 4430), b) la prueba del cometa en núcleos de pelos estaminales de *Tradescantia* *in vivo* e *in vitro* y c) la prueba del cometa en linfocitos humanos. Las diluciones de glifosato 1/ 10,000, 1/100,000, 1/1000,000 y 1/10, 000,000 se emplearon con el fin de evaluar el posible daño genético inducido por la exposición al mismo.

7.1. PRUEBA DE MUTACION ROSA EN *Tradescantia*

Los datos obtenidos, de la actividad mutagénica inducida por varias diluciones de glifosato se muestran en la **cuadro 3**. Como se observa, las frecuencias promedio de mutación rosa presentan una considerable desviación estándar y el análisis de varianza no mostró diferencia estadísticamente significativa. Aunque esta prueba es altamente eficiente para evaluar genotoxicidad

(Underbrink *et al.* 1973; Shairer *et al.* 1982; Ahmed y Grant, 1992; Grant y Salamote, 1994; Ma *et al.* 1994; Sandhu *et al.* 1994 y Álvarez, 1998) es evidente que en este caso resultó inadecuada, debido a que el glifosato induce aclaración de los pelos estaminales y hace difícil distinguir entre células rosas y azules, criterio fundamental para determinar la actividad mutagénica. También se presentó muerte de gran número de las plantas tratadas con las concentraciones más altas del glifosato (1/10,000, 1/100,000, 1/1000,000). Por todo lo anterior, los resultados obtenidos en la prueba de mutación rosa no son confiables, excepto en la concentración menor (1/10, 000,000) donde no se presentaron los problemas ya mencionados. La gráfica nos muestra una comparación entre las frecuencias de mutación resultante y sus respectivas desviaciones estándar (Figura 8).

Dia de lectura	Testigo negativo (solución de Hougland's)	Diluciones de glifosato en agua			
		1/10,000	1/100,000	1/1,000,000	1/10,000,000
	a	a	a	a	a
7	1.968	21.148	1.697	1.517	2.617
8	2.02	243.498	1.756	1.12	1.804
9	2.412	3.508	1.816	1.832	29.842
10	3.467	3.236	2.275	2.544	119.358
11	2.607	3.175	3.256	3.71	16.282
12	3.219	3.145	4.237	16.76	150.49
13	6.25	3.115	3.921	29.81	4.587
14		2.403	4.405	17.347	212.034
15			13.274	4.884	
Media	b	b	b	b	b
	3.1347	35.4035	4.0707	8.836	67.1272
Desviación estándar	1.485	84.320	3.620	10.117	81.933

a. Frecuencia media diaria de mutación rosa por cada mil pelos estaminales.

b. Frecuencia promedio de los días 7-15. $P > 0.05$

Cuadro 3. Datos obtenidos de la frecuencia de mutación rosa inducida en *Tradescantia*, expuesta a diferentes diluciones de glifosato.

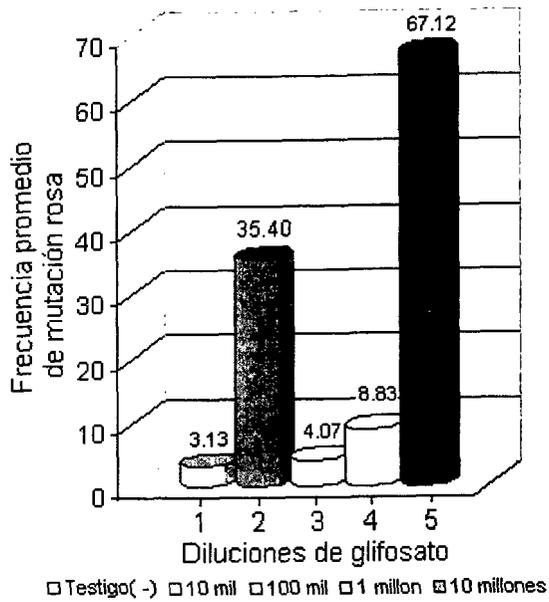


Figura 8. Grafica resultante del promedio de las frecuencias mutación rosa (días 7 al 15).

7.2. PRUEBA DEL COMETA EN NÚCLEOS ESTAMINALES DE *Tradescantia* IN VIVO E INVITRO

En los cuadros 4a y 4b se presentan los datos resultantes de la prueba del cometa en plantas y núcleos de *Tradescantia* expuestos a diluciones de glifosato. La longitud de la cola se utilizó como parámetro principal.

El estudio se dividió en dos partes: a) plantas expuestas a glifosato *in vivo* y b) núcleos aislados de planta sanas que fueron expuestos a glifosato *in vitro*. La comparación con ANOVA de las 9 columnas de los dos grupos, mostró una diferencia extremadamente significativa ($p < 0.0001$) y pone de manifiesto que la prueba del cometa en los pelos estaminales de *Tradescantia* es muy sensible. Como se observa, existen también diferencias (T de Dunnett) entre los promedios de migración de las distintas dosis y vías de exposición. Se observó un incremento significativo ($p < 0.01$) con respecto a la dosis en ambos grupos (*in vivo* e *in vitro*). También se evidenció mayor migración de acuerdo a la forma de exposición, siendo mayor el daño en la prueba *in vitro*, debido, probablemente al contacto directo del glifosato con el ADN de los núcleos. En las graficas podemos observar una comparación entre las migraciones de ADN obtenidas en cada tratamiento (Figura 9a y 9b).

Los resultados de nuestra investigación en la prueba cometa aplicada a los pelos estaminales de *Tradescantia in vivo e in vitro*, nos muestran que pueden ser una buena alternativa en la detección de daño genético producido por el glifosato y otras sustancias químicas.

(a) Núcleos de plantas expuestas (*in vivo*)**(b) Núcleos expuestos (*in vitro*)**

Testigo	1/10 000	1/100 000	1/1000 000	1/10 000 000	1/10 000	1/100 000	1/1 000 000	1/10 000 000	
N - L	N - L	N - L	N - L	N - L	N - L	N - L	N - L	N - L	
1 - 30	3 - 40	2 - 50	6 - 40	4 - 40	1 - 140	1 - 100	1 - 160	1 - 130	
2 - 37.5	11 - 50	1 - 70	8 - 50	5 - 50	2 - 150	2 - 190	1 - 170	2 - 100	
3 - 30	4 - 60	1 - 80	5 - 60	1 - 70	1 - 160	4 - 500	2 - 190	2 - 140	
10 - 50	1 - 70	7 - 100	2 - 70	5 - 80	4 - 170	2 - 220	4 - 200	2 - 150	
9 - 62	2 - 75	6 - 120	5 - 100	3 - 90	1 - 180	3 - 230	1 - 210	2 - 160	
3 - 75	1 - 80	2 - 150	1 - 120	12 - 100	2 - 190	2 - 250	2 - 220	2 - 190	
	1 - 88	2 - 200		11 - 150	2 - 200	1 - 260	2 - 250	3 - 200	
	15 - 100	1 - 220		2 - 200	1 - 210	1 - 290		2 - 220	
	2 - 110				1 - 220	3 - 300			
	2 - 112				1 - 230	1 - 310			
	3 - 120				1 - 240				
	2 - 150				4 - 250				
	2 - 200				1 - 290				
	1 - 300				1 - 280				
					1 - 300				
					1 - 320				
					1 - 350				
Nº 28	50	22	27	43	26	20	13	16	
\bar{X}	53.60	92.04	117.72	62.96	102.32	222.30	233.5	204.61	165.62
	±	±	±	±	±	±	±	±	±
SD	12.13	47.57	44.28	23.82	42.91	59.95	51.32	26.33	38.63
TD	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p>0.05	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.01

Nº Total del número de núcleos estudiados

\bar{X} Media

SD Desviación estándar

TD Test De Dunnett

ANOVA p < 0.0001

Cuadro 4a y 4b: Número de núcleos (N) y su respectiva longitud de migración del ADN (en micras) (L). Ambos parámetros se obtuvieron a partir de: (a) plantas de *Tradescantia* sanas expuestas a glifosato (prueba *in vivo*) y (b) núcleos de plantas de *Tradescantia* sanas expuestos (prueba *in vitro*). Las diluciones corresponden a partes de glifosato comercial en agua.

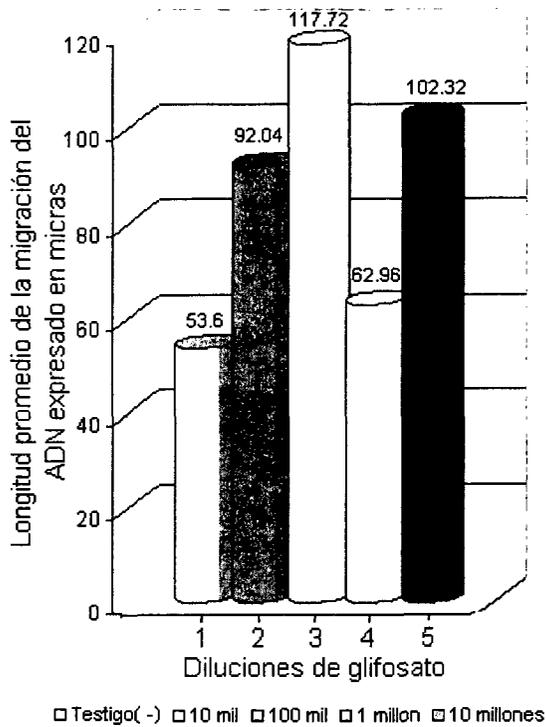


Figura 9a. Longitud promedio de la migración de ADN en cada tratamiento, (prueba cometa en núcleos de *Tradescantia in vivo*).

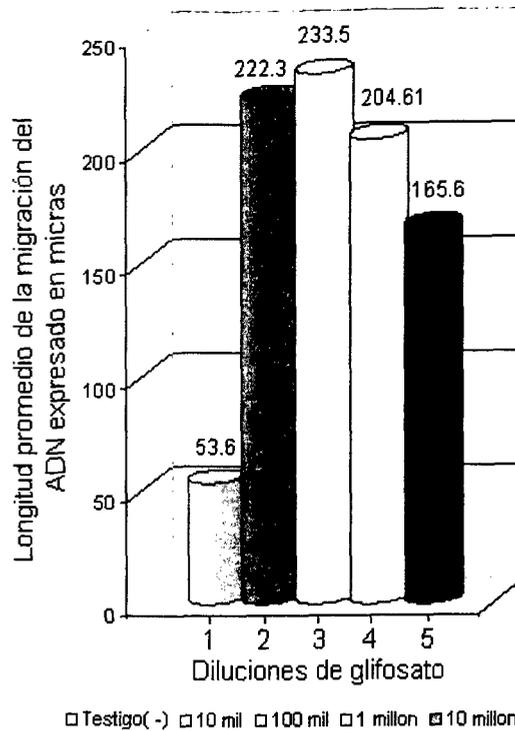


Figura 9b. Longitud promedio de la migración de ADN en cada tratamiento, prueba cometa en núcleos de *Tradescantia in vitro*.

7.3. PRUEBA DEL COMETA EN LINFOCITOS HUMANOS IN VITRO

Se colectaron datos de la prueba del cometa en células de linfocitos tratados con glifosato *in vitro*, nuevamente se utilizó a longitud de la cola de los cometas como parámetro principal (Cuadro 5).

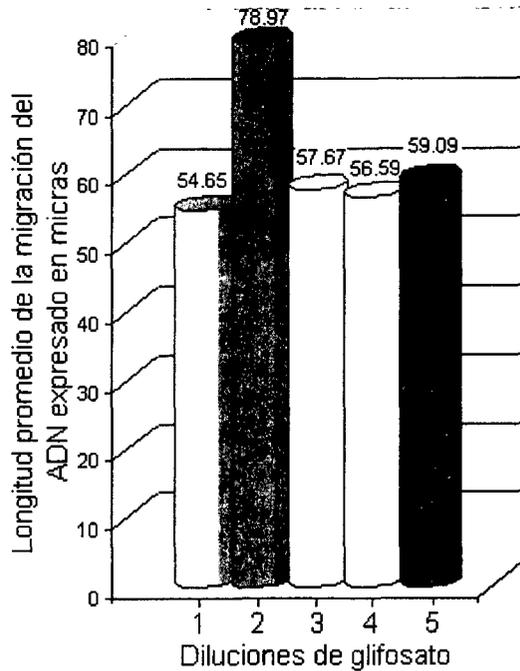
La comparación de las 5 columnas (ANOVA) de los dos grupos mostró una diferencia extremadamente significativa ($p < 0.0001$) por lo tanto la prueba del cometa en células de linfocitos demostró ser sensible. Se observaron diferencias (T de Dunnett) entre los promedios de migración de las distintas dosis, además un incremento significativo ($p < 0.01$) con respecto a la dosis. En la grafica podemos observar una comparación entre los datos obtenidos (Figura 10).

Los resultados en esta investigación sugieren que el uso de la prueba cometa en linfocitos humanos expuestos al herbicida *in vitro*, puede ser útil para detectar y evaluar la actividad mutagénica de sustancias químicas peligrosas para los seres humanos y otros seres vivos.

Testigo	1/10 000	1/100 000	1/1000 000	1/10 000 000
N - L	N - L	N - L	N - L	N - L
1 - 37.3	1 - 37.5	2 - 37.5	1 - 20	5 - 35
3 - 40	1 - 40	2 - 40	1 - 27.5	1 - 40
1 - 42.5	2 - 45	2 - 42.5	7 - 32.5	1 - 42.5
4 - 45	1 - 47.5	6 - 45	1 - 35	1 - 47.5
2 - 47.5	1 - 50	3 - 47.5	1 - 37.5	2 - 50
12 - 50	1 - 55	4 - 50	2 - 40	1 - 52.5
1 - 52.5	1 - 62.5	1 - 52.5	1 - 42.5	4 - 55
4 - 55	3 - 70	3 - 55	3 - 45	3 - 57.5
2 - 57.5	2 - 72.5	1 - 57.5	2 - 47.5	4 - 60
1 - 60	2 - 75	2 - 60	2 - 50	6 - 62.5
9 - 62.5	1 - 77.5	2 - 62.5	1 - 57.5	2 - 65
2 - 75	1 - 80	1 - 65	2 - 60	6 - 67.5
1 - 82.5	6 - 82.5	3 - 67.5	2 - 62.5	3 - 70
	2 - 85	3 - 70	2 - 65	2 - 72.5
	7 - 87.5	3 - 72.5	2 - 67.5	2 - 75
	2 - 90	2 - 75	3 - 70	1 - 95
	2 - 95	1 - 77.5	2 - 72.5	
	2 - 95.5	2 - 82.5	1 - 75	
	2 - 100	1 - 87.5	2 - 82.5	
	2 - 105		1 - 80	
	1 - 120		1 - 85	
			3 - 87.5	
			1 - 90	
Nº 43	43	44	44	44
\bar{x}	54.69	78.97	57.67	56.59
	±	±	±	±
SD	10.89	18.31	13.58	19.52
				12.79

N = Número de núcleos
L = longitud de migración del ADN en micras
Nº = Total del número de núcleos estudiados
ANOVA = $p < 0.0001$
 \bar{x} = Media.

Cuadro 5. Datos obtenidos de linfocitos expuestos a glifosato *in vitro*, analizados con Test De Dunnett.



□ Testigo (-) □ 10 mil □ 100 mil □ 1 millón □ 10 millones

Figura 10. Longitud promedio de la migración de ADN en cada tratamiento, prueba cometa en linfocitos humanos, prueba *in vitro*.

Como ya se menciona, la prueba del cometa se ha realizado principalmente en células animales, sin embargo, han aumentado los reportes de la prueba en plantas. Recientemente Álvarez *et al.* (2001b) desarrolló la prueba del cometa en células de partes florales de *Tradescantia*, este es un modelo que simplifica considerablemente su estudio.

En este trabajo se decidió realizar la prueba cometa en linfocitos humanos y comparar los resultados obtenidos con los de la prueba cometa en plantas de *Tradescantia*.

La PCA es una valiosa y sensible herramienta que detecta daño genético en células individuales (Singh *et al.* 1988). En este sistema se asume que una mayor migración del ADN con respecto a los testigos se debe a anomalías del material genético.

Los resultados del presente trabajo muestran que la prueba del cometa en los núcleos de las células estaminales de *Tradescantia* es un buen sistema para detectar daño genético inducido. Los datos obtenidos en la prueba del cometa con sus tres variantes, sugieren que el glifosato comercial actúa como un mutágeno directo y coinciden con los reportados por varios autores (Clements *et al.* 1997; Peluso *et al.* 1998; Li y Long 1998; Kaya *et al.* 2000 y Álvarez *et al.*, 2001a). Es claro que la detección de la genotoxicidad del glifosato depende del sistema de prueba empleado, lo cual puede explicar las discrepancias reportadas respecto a la genotoxicidad del glifosato (Busse *et al.*, 2001; Owczarek *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 2000; Rodríguez, (2004); Monsanto, 1998 y Du Pont, 2002).

8. CONCLUSIONES

- 1 Aun que se ha reportado que la prueba de mutación rosa en *Tradescantia* es una excelente alternativa para evaluar la actividad mutagénica de agentes químicos, en éste sistema no fue posible determinar la actividad genotóxica del glifosato, porque el fenotipo mutante (color rosa) desaparece por la aclaración de los pelos estaminales.
- 2 Con la prueba del cometa en los núcleos estaminales de *Tradescantia* y en los linfocitos humanos, sí se detectó daño genético. Por lo tanto, el glifosato posee actividad genotóxica.
- 3 De acuerdo con lo resultado de nuestros experimentos, podemos decir que, la detección de la genotoxicidad del glifosato está sujeta al sistema de evaluación empleado.
- 4 La utilización de dos o más prueba diferentes para detectar genotoxicidad ofrece un alto grado de certeza para determinar la naturaleza mutagénica de un agente específico, sea químico o físico, encontrado en alimentos, en el ambiente, hogar, lugar de trabajo etc.

9. REFERENCIAS

1. Aguilera R. (1996). Evaluación de la prueba de *Tradescantia* para la detección de daño mutagénico (Tesis de licenciatura). Universidad de Guadalajara. Guadalajara, P 47.
2. Ahmed M. and Grant W.F. (1992). Cytological effects of the pesticides phodrin and bladex on *Tradescantia* and *Vicia faba* root tips. Canadian Journal of Genetic Cytology 14: 157-165.
3. Alvarez M.C. (1998). Comportamiento genotóxico de tres agentes xenobióticos en *Drosophila melanogaster* y en *Tradescantia*. Tesis de Doctorado en Ciencias. Universidad de Guadalajara. Guadalajara, 14 p.
4. Álvarez M.C. y Galina Z.P. (2001). Enfermedades genéticas causadas por mutaciones. In: Álvarez-Moya C. (Ed.). Genética Ambiente y Salud. Universidad de Guadalajara, Guadalajara. p. 103-116.
5. Álvarez, M.C., Santerre L.A., Zúñiga G.G., Padilla C.E., and Feria V.A. (2001^a). A model on Agave tequilana Weber for detection of damaged DNA from diseased cells and cells exposed to glyphosate. Revista Mexicana de Fitopatología 19: 78-83.
6. Álvarez M.C., Santerre L.A., Zúñiga G.G., Torres B.O., Padilla C.E., and Feria V.A. (2001b). Evaluation of genotoxic activity of maleic hydrazide, ethyl methane sulfonate, and N-nitrosodiethylamine in *Tradescantia*. Salud Pública de México 43: 563-569.
7. Álvarez M.C., García C.S., Castañeda V.H., y Romero R.H. (2000). Estudio de la genotoxicidad del glifosato con la prueba de mutación rosa en los pelos estaminales de *Tradescantia*. Scientia-CUCBA 2: 38-43.
8. Albert A.L. (1990). Toxicología Ambiental. Editorial Limusa. México, D.F., 7 p.
9. Ames D.N., Durston W.R., Yamasaki E., Lee F.D. (1973). Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Natl Acad Sci (USA). 69: 3128-3132.
10. Arévalo H A. (1999). Evaluación de daño genético en células de *Agave tequilana* con "marchitez del agave": uso de la prueba del cometa (Tesis de maestría). Guadalajara: Universidad de Guadalajara.

11. Busse M.D., Ratcliff A.W., Shestak C.J. and Powers R.F. (2001). Glyphosate toxicity and the effects on a long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biology and Chemistry* 33: 1777-1789.
12. Carrillo-Cedillo E. y Velez L.E (1996). Plaguicidas organofosforados en aguas de riego del Valle de Mexicali, II Congreso Nacional de Ciencias Ambientales, Mazatlán, México, diciembre, 15.
13. Casiano A.D. (1991). Introduction: historical perspectives of the genetic toxicology. En: Genetic Toxicology. (Li. P.A. y Heflich R.H., Eds.) CRC Press, Nueva Jersey, pp. 1-12.
14. Ciaravino V., Miller M.W. and Carstensen E.L. (1986). Sister- chromatid exchanges in human lymphocytes exposed in vitro to therapeutic ultrasound. *Mutation Res.* 172: 185-188.
15. Clements C., Ralph S., and Petras M. (1997). Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. *Environmental Molecular mutagenesis* 29: 277-288.
16. Dolara P., Torricelli F. and Antonelli N. (1994). Cytogenetic effects on human lymphocytes of a mixture of fifteen pesticides commonly used in Italy, *Mutation Res.* 325: 47-51.
17. Du Pont Chile. (2002). Hoja de seguridad. Buenos Aires, Argentina. 4 p.
18. Fairbair D.W., Olive P.L., O'neill K.L. (1995). The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Res.* 339:37-59.
19. Gómez A.S., Noriega, A.N., Osorio A., Galicia F., Ling S. and Villalobos-Pietrini R. (1992). Sister chromatid exchanges analysis in a rural population of México exposed to pesticides. *Mutation Res.* 281: 173-179.
20. Graf V., and Singer D. (1992). Genotoxicity testing of promutagens in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila Melanogaster*. *Rev Int Contam Ambient.* 8 : 15-27.
21. Graf U., Würgler F.F., Katz A.J., Frei H., Juon H., Hall C.B. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila Melanogaster*. *Mutagenesis.* 6: 153-188.
22. Grant W.F., Lee H.G., Logan D.M., Salamone M.F. (1992). *The use of Tradescantia and Vicia faba* bioassay for the in situ detection of mutagens in an aquatic environment. *Mutation Res.* 270:53-64.

23. Grant W.F. (1994). The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutation Res.* 310: 175-185.
24. Grant W.F. and Salamone M.F. (1994). Comparative mutagenicity of chemical selected for test in the International Program on Chemical Safety's collaborative study on plant system for the detection on environmental mutagens. *Mutation Res.* 310: 187-209.
25. Grella A., Spinaci A., De Filippis P. (1994). Volatile organic halogen compounds in the drinking water of the city of Rome. *Annali di Igiene* 6:909-919.
26. Griggs, H.G. and Bender M.A. (1973). Photoreactivation of ultraviolet induced chromosomes aberrations. *Science* 179 : 86-88.
27. Gichner T, Veleminsky J, and Pokorny P. (1982). Somatic mutations induced by maleic hydrazide and its potassium and diethanolamine salts in the *Tradescantia* mutation assay. *Mutation Res*, 103 (1982):289-293 pp.
28. Grimmer G. (1983). Chemistry. En *Environmental carcinogen*. (G. Grimmer, Ed.). Boca raton, Florida, pp. 200-216.
29. Heflich H. R. (1991). Chemical mutagens. En: *Genetic Toxicology*. (Li P.A., Heflich R.H. Ed.) CRC Press, New Jersey, pp. 143-202.
30. IARC (1991). Occupational exposures in insecticide application and some pesticides. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks on humans. Vol 53, Lyon.
31. Ichikawa, S. (1992). *Tradescantia* stamen-hair system as excellent botanical tests of mutagenicity: Its responses to ionizing radiation and chemical mutagens and some synergistic effects found. *Mutation Res.* 270: 3-22.
32. International Program Chemical Safety's. (1994). *Environmental Health Criteria 159: Glyphosate*. World health organization. Geneva. 77 p.
33. Kaya B., Creus A., Yanikoglu A., Cabre O. and Marcos R. (2000). Use of the *Drosophila* wing spot test in the genotoxicity testing of different herbicides. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 36: 40-46.
34. Koppen G. and Verschaeve L. (1996). The alkaline comet on plant cells: A new genotoxicity test for DNA breaks in *Vicia faba* roots cells. *Mutation Res.* 360: 193-200.

35. Koppen G, Toncelli L.M., Triest L., Verschaeve L., (1999) The comet assay: a tool to study alteration of DNA integrity in developing plant leaves. *Mech Ageing Dev.* 110: 13-24.
36. Kloos H. (1996). 1,2 Dibromo-3-Chloropropane (DBCP) and the ethylene dibromide (EDB) in well water in the Fresno/Clovis metropolitan area, California. *Arch. Environ. Health* 51: 291-299.
37. Li A.P., Loretz L.J. (1991). Assay genetic. En *Genetic toxicology* (P.: A. Li, R.H. Heflich, Ed.) CRC. Press, New Jersey, pp. 119-142.
38. Li A.P., and Long T.J. (1998). An evaluation of the genotoxic potential of glyphosate. *Fundamental Application on Toxicology* 10: 537-546.
39. Lindsley D.L., y Grell E.H. (1968). Genetic variation of the *Drosophila melanogaster*. *Carnegi Instit. Public.* 627, 1-62 p.
40. Ma T.H., Cabrera G.L., Cebulska-Wasilewska A., Chen R., Loarca F., Vandenberg A.L. and Salamone, M.F. (1994). *Tradescantia* stamen hair mutation bioassay. *Mutation Res.* 310: 211-220.
41. Mckelvey-Martin V.J., Green MHL, ScMHezer P., Pool-Zobel B.L., De Méo M.P. and Collins A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutation Res.* 288:47-63.
42. Meltz M.L. (1991). Physical mutagens. En: *Genetic Toxicology* (P.A. Li y R.H. Heflich, Eds.). CRC. Press, Nueva Jersey, pp. 143-202.
43. Mericle M.W., y Mericle R.P. (1967). Genetic nature of somatic mutation of flowers color in *Tradescantia* clon 02. *Rad. Bot.* 7, 449-464.
44. Moses, M.D. (1992). *Cosecha dolorosa*. Pesticide Educación Center, San Francisco, 114p.
45. Montesano R. y Tomatits L. (1977). Les cancerogenes chimiques. *Lyon Med.* 14, 107-117.
46. Monsanto Europe. (1998). Ficha de seguridad. Bruselas, Bélgica. 7 p.
47. Narendra P.S., McCoy M.T., Tice R.R. and Schneider L.E. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell. Res.* 175, 184-1991.
48. Nivia E. (2001). Conferencia. Las guerras en Colombia: Drogas, armas y petróleo, Universidad de California. Mayo 17-19.
49. Owczarek M., De Marco A., De Simone C., and D'Ambrosio C. (1999). Evaluation of the toxic and genotoxic activity of some pesticides in a soil-

- plant system. Human and Environmental Exposure to Xenobiotics, 755-762.
50. Peluso M., Munnia A., Bolognesi C., and Parodi S. (1998). P³²-postlabeling detection of DNA adducts in mice treated with the herbicide roundup. *Environmental Molecular Mutagenesis* 31:55-59.
51. Poli P., Buschini A., Restivo F.M., Ficarelli A., Cassoni F., Ferrero I., and Rossi C. (1999). Comet assay application in environmental monitoring: DNA damage in human leukocytes and plant cell in comparison with bacterial and yeast tests. *Mutation Res.* 14: 547-556.
52. Ramírez E., and Cuenca P. (2002). DNA damage in banana farm workers exposed to insecticides in limón, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 50 (2): 507-518.
53. Ramírez C.J., Ordorica F.C., López J.O., Ríos M.A., Osuna, R.I. and Uribe, B.M. (1996). Plaguicidas en agua y camarón capturados en granjas acuícolas del centro de Sinaloa, II Congreso Nacional de Ciencias Ambientales, Mazatlán, México, 9.
54. Ramírez M.M. (2001). Mutágenos químicos, físicos y biológicos. In: Álvarez-Moya C. (Ed.). Genética, Ambiente y Salud. Universidad de Guadalajara, Guadalajara. p. 51-69
55. Ramírez A. y Hernández G. (2001). Ocurrencia de compuestos potencialmente tóxicos en alimentos. In: Alvarez-Moya C. (Ed.). Genética, Ambiente y Salud. Universidad de Guadalajara, Guadalajara. p.169 -180.
56. Repetto M. y Sanz P. (1995). Glosario de términos usados en toxicología. versión española. AET. p. 77
57. Rodríguez S.F. (2004). Recomendaciones para el uso adecuado de plaguicidas, IV curso integral de áreas verdes y Urbanas, Guadalajara Jal.
58. Sandhu S.S., De-Serres F.J., Gopalan H.N., Grant W.F., Svendsgaard D., Veleminsky J. and Becking G.C. (1994). Environmental monitoring of genotoxicity with plant systems. *Mutation Res.* 310: 257-263.
59. Schairer L.A., Sautkulis R.C. and Tempel N.R. (1982). Monitoring ambient air for mutagenicity using the higher plant *Tradescantia*. In: Genotoxic effects of airborne agents. (R.R. Tice, D.L. Costa and K.M. Schaich. (eds). Plenum Press, N.Y. p.123-140

60. Seraj M.J., Unemoto A., Tanaka M., Kajikawa A., Hamada K. and Monden Y. (1996). DNA adduct formation by hormonal steroids in vitro. *Mutation Res.* 370: 49-49.
61. Singh N., McCoy M., Tice R., and Schneider L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175: 184-199.
62. Solonesky S., Gonzalez M. y Piaggio E. (2002). Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation, azzurro III. Genotoxic evaluation on Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Mutation Res.* 514: 201-212.
63. Tebbs R.S., Cleaver J.E., Pedersen R.A. and Hartmann A. (1999). Modification of the comet assay for the detection of DNA strand break in extremely small tissue sample. *Mutagenesis* 14: 437-438.
64. Udumudi A., Jaiswal M., Rajeswari N., DESAI N., Jain S., Balakrishna. N., Visweswara R. y Ahuja Y.R. (1998). Risk assessment in cervical displasia patients by single cell gel electrophoresis assay: a study of DNA damage and repair. *Mutation Res.* 412: 195-205.
65. Underbrink A.C., Schairer L.A., and Sparrow A.H. (1973). *Tradescantia* stamen hairs: a radiobiological test system applicable to chemical mutagenesis. In: A. Hollaender (ed.). *Chemical mutagens: principles and methods for their detection*. Vol. 3. Plenum Press, N. Y., p. 71-207.
66. Underger U. and Besarlan N. (2002). Assessment of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures by the alkaline comet assay. *Archives of Toxicology* 76: 430-436.
67. Wagner E.D., Rayburn A.L., Anderson D., Plewa M.J. (1998) Calibration of the single cell gel electrophoresis assay, flow cytometric analysis and forward mutation in chinese hamster ovary cells. *Mutagenesis* 13: 81-84.
68. Waliszewski S.M., Pardió T.V. Chantiri N.J., Aguirre A.A. Infanzon R. y Rivera J. (1996). Contaminación de leche materna por plaguicidas organoclorados en Veracruz. II Congreso Nacional de Ciencias Ambientales. Mazatlán, México, 22.
69. Williams G.M., Kroes R., and Munro I.C. (2000). Safety evaluation and risk assessment of the herbicide roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 31: 117-165.

70. Zou X. x., Xu X., Zhang J., y Zhu Z. (1995) The determination of strong mutagen MX (3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2 (5H)-furanone in drinking water in China. *Chemosphere* 30:2219-2225.
71. Zúñiga, G.G. (2001). Sistemas de detección de daño genético. In: Alvarez-Moya C. (Ed.). Genética, Ambiente y Salud. Universidad de Guadalajara, Guadalajara. p.127-150