

**EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO DE LA MEZCLA ROUNDUP® SL -  
COSMOFLUX® 411F EN LA RANA DE DESARROLLO DIRECTO  
*Eleutherodactylus johnstonei* (ANURA: ELEUTHERODACTYLIDAE)  
MEDIANTE EL ENSAYO COMETA**

**FABIO LEONARDO MEZA JOYA**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
BUCARAMANGA  
2010**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO DE LA MEZCLA ROUNDUP® SL -  
COSMOFLUX® 411F EN LA RANA DE DESARROLLO DIRECTO  
*Eleutherodactylus johnstonei* (ANURA: ELEUTHERODACTYLIDAE)  
MEDIANTE EL ENSAYO COMETA**

**FABIO LEONARDO MEZA JOYA**

**Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al título de Biólogo**

**DIRECTOR:**

**MARTHA PATRICIA RAMÍREZ PINILLA, BIÓLOGO, Ph.D.**

**CO-DIRECTOR:**

**JORGE LUIS FUENTES, MICROBIÓLOGO, M.Sc., Ph.D.**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA  
BUCARAMANGA**

**2010**

## **AGRADECIMIENTOS**

Los autores expresan sus agradecimientos a:

La Vicerrectoría de Investigaciones y Extensión de la UIS por la financiación de este proyecto.

Al Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis ambiental.

Al Laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados.

Al profesor Jorge Luis Fuentes Lorenzo y a la profesora Martha Patricia Ramírez Pinilla, por aportar su experiencia y asesoría en esta investigación.

A Eliana Patricia Ramos Pallares por su desinteresada colaboración en todas las etapas de este trabajo.

Al personal del Parque de las Orquídeas y a todas las personas que colaboraron en las colectas del material biológico (Eliana Ramos, Monica A. Meza y William D. Quiñónez).

A todas las personas que colaboraron de una u otra forma en la realización de este proyecto.

## TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	13
1. MARCO TEÓRICO	16
1.1. GLIFOSATO: FÓRMULAS COMERCIALES	16
1.2. ERRADICACIÓN DE CULTIVOS ILÍCITOS	17
1.3. BIOINDICADORES ECOTOXICOLÓGICOS: ANFIBIOS	19
1.4. GENOTOXICIDAD: ENSAYO COMETA	20
1.5. <i>Eleutherodactylus johnstonei</i> : ASPECTOS GENERALES	22
2. METODOLOGÍA	23
2.1. SUSTANCIA EXPERIMENTAL	23
2.2. COLECTA Y CRÍA DEL MATERIAL BIOLÓGICO	23
2.3. MEDIDAS MORFOMÉTRICAS PARA ENSAYOS BIOLÓGICOS	24
2.4. ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA	24
2.5. ENSAYOS DE GENOTOXICIDAD	25
2.6. ESTIMADOS DE DAÑO GENÉTICO	28
2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	29
3. RESULTADOS	31
3.1. MEDIDAS MORFOMÉTRICAS	31
3.2. ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA	32
3.3. ESTIMADOS DE GENOTOXICIDAD <i>IN VITRO</i>	34
3.4. ESTIMADOS DE GENOTOXICIDAD <i>IN VIVO</i>	36
4. DISCUSIÓN	39
4.1. ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA	39

4.2. ESTIMADOS DE GENOTOXICIDAD	43
5. CONCLUSIONES	49
6. SUGERENCIAS	50
BIBLIOGRAFÍA	51
ANEXOS	74

## LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1. Efecto tóxico de la mezcla Roundup<sup>®</sup> SL - Cosmoflux<sup>®</sup> 411F en *Eleutherodactylus johnstonei* 32
- Fig. 2. Efectos sub-letales de toxicidad observados en individuos adultos de *Eleutherodactylus johnstonei* expuestos a la mezcla Roundup<sup>®</sup> SL - Cosmoflux<sup>®</sup> 411F 34
- Fig. 3. Citotoxicidad *in vitro* de la mezcla Roundup<sup>®</sup> SL - Cosmoflux<sup>®</sup> 411F 35
- Fig. 4. Genotoxicidad de la mezcla Roundup<sup>®</sup> SL - Cosmoflux<sup>®</sup> 411F en células sanguíneas de *Eleutherodactylus johnstonei* expuestas *in vitro* 36
- Fig. 5. Citotoxicidad *in vivo* de la mezcla Roundup<sup>®</sup> SL - Cosmoflux<sup>®</sup> 411F 37
- Fig. 6. Genotoxicidad de la mezcla Roundup<sup>®</sup> SL - Cosmoflux<sup>®</sup> 411F en células sanguíneas de *Eleutherodactylus johnstonei* expuestas *in vivo* 38

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Media y error estándar de las variables LRC y masa de los individuos de <i>Eleutherodactylus johnstonei</i> analizados en los ensayos de toxicidad	31
Tabla 2. Toxicidad de la mezcla Roundup® SL - Cosmoflux 411F® en individuos adultos y eclosionantes de <i>Eleutherodactylus johnstonei</i>	33
Tabla 3. Comparación de los valores de toxicidad (LC <sub>50</sub> a 96 h) para especies de anuros expuestos a la mezcla glifosato - Cosmoflux® 411F bajo diferentes condiciones experimentales y en diferentes estados de vida	40

## LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Caracterización visual de los grados de daño utilizados en el presente estudio	74
Anexo 2. Porcentaje de mortalidad aproximado en individuos adultos y neonatos de <i>Eleutherodactylus johnstonei</i> expuestos a diferentes concentraciones de la mezcla Roundup® SL - Cosmoflux 411F®	75
Anexo 3. Daño en el ADN de células sanguíneas nucleadas de <i>Eleutherodactylus johnstonei</i> expuestas <i>in vitro</i> , a un rango de concentraciones de la mezcla Roundup® SL - Cosmoflux 411F®	76
Anexo 4. Daño en el ADN de células sanguíneas nucleadas de <i>Eleutherodactylus johnstonei</i> expuestas <i>in vivo</i> , a un rango de concentraciones de la mezcla Roundup® SL - Cosmoflux 411F®	77

## RESUMEN

**TITULO:** EVALUACIÓN DEL EFECTO GENOTÓXICO DE LA MEZCLA ROUNDUP® SL - COSMOFLUX® 411F EN LA RANA DE DESARROLLO DIRECTO *Eleutherodactylus johnstonei* (ANURA: ELEUTHERODACTYLIDAE) MEDIANTE EL ENSAYO COMETA\*

**AUTOR:** FABIO LEONARDO MEZA JOYA\*\*

**PALABRAS CLAVE:** Toxicidad, Ensayo Cometa, glifosato, roturas en el ADN, eritrocitos, *Eleutherodactylus johnstonei*.

La aspersión aérea en Colombia de herbicidas con base en glifosato (Ej: mezcla Roundup SL® - Cosmoflux® 411F) con el fin de erradicar cultivos ilícitos ha despertado gran preocupación por su posible impacto sobre organismos no blanco, especialmente anfibios. El presente trabajo evalúa el efecto tóxico y genotóxico del mencionado herbicida sobre la rana de desarrollo directo *Eleutherodactylus johnstonei*, estimando la dosis letal media (LD<sub>50</sub>) y el nivel de roturas en el ADN (*in vitro* e *in vivo*) mediante el Ensayo Cometa, respectivamente. Los resultados de toxicidad en hembras y machos indicaron que la dosis del herbicida con base en glifosato usada durante las aspersiones aéreas (3,69 Kg e.a/ha) no es letal para el modelo biológico en estudio. En contraste, individuos neonatos fueron muy sensibles a los efectos tóxicos de la mezcla. En todos los casos, se evidenciaron signos de toxicidad sub-letal tales como desplazamiento errático y pérdida de reflejos, a dosis inferiores a las utilizadas en la erradicación de cultivos ilícitos. La exposición *in vitro* e *in vivo* de eritrocitos de *Eleutherodactylus johnstonei* al herbicida, indujo roturas en el ADN celular de una manera dosis-dependiente, siendo significativo respecto al control negativo a partir de una dosis de 4.625 µg e.a/mL y 0.055 Kg e.a/ha, respectivamente. Dosis superiores a 100 µg e.a/mL (*in vitro*) y 0.74 Kg e.a/ha (*in vivo*), mostraron claras evidencias de toxicidad celular. Los resultados son discutidos considerando los posibles riesgos ecotoxicológicos de las especies de anuros por exposición al glifosato.

---

\* Proyecto de Grado.

\*\* Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Director: Martha Patricia Ramírez Pinilla (Ph.D.) y Co-Director: Jorge Luis Fuentes (M.Sc, Ph.D.).

## ABSTRACT

**TITLE: EVALUATION OF GENOTOXIC EFFECTS OF MIXING ROUNDUP® SL - COSMOFLUX® 411 IN THE DIRECT DEVELOPING FROG *Eleutherodactylus johnstonei* (ANURA: ELEUTHERODACTYLIDAE) BY THE COMET ASSAY\***

**AUTOR: FABIO LEONARDO MEZA JOYA\*\***

**PALABRAS CLAVE:** Toxicity, Comet Assay, glyphosate, DNA break, erythrocytes, *Eleutherodactylus johnstonei*.

The aerial spraying in Colombia of glyphosate-based herbicides (eg., mixing Roundup SL® - Cosmoflux® 411) in order to eradicate illegal crops has aroused great concern about its possible impact on non-target organisms, particularly amphibians. This study evaluates the toxic and genotoxic effects of that herbicide in the direct developing frog *Eleutherodactylus johnstonei*, estimating the median lethal dose (LD<sub>50</sub>) and the level of DNA breaks (*in vitro* and *in vivo*) by the Comet Assay, respectively. The results of toxicity in males and females indicated that the dose of glyphosate-based herbicide used for aerial spraying (3.69 kg a.e/ha) is not lethal to the biological model studied. In contrast, neonates were highly sensitive to the toxic effects of the mixture. In all cases, there was evidence of sub-lethal toxicity signs such as erratic movement and loss of reflexes, at lower doses than those used in the eradication of illicit crops. Exposure *in vitro* and *in vivo* of erythrocytes of *Eleutherodactylus johnstonei* to herbicide, induce breaks in cellular DNA in a dose-dependent way, being significant compared to negative controls after a dose of 4.625 mg a.e/mL and 0.055 kg a.e/ha, respectively. Doses above 100 µg a.e/mL (*in vitro*) and 0.74 kg a.e/ha (*in vivo*) showed clear evidence of cellular toxicity. The results are discussed considering the possible ecotoxicologic risks of anuran species from exposure to glyphosate.

---

\* Proyecto de Grado.

\*\* Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, Director: Martha Patricia Ramírez Pinilla (Ph.D.) y Co-Director: Jorge Luis Fuentes (M.Sc, Ph.D.).

## INTRODUCCIÓN

Existe una creciente preocupación por el deterioro ambiental asociado al uso indiscriminado de agroquímicos, ya que estos terminan acumulándose en el medio produciendo efectos deletéreos sobre los ecosistemas y los organismos que los habitan (Clements *et al.*, 1997; Pimentel *et al.* 1998; Lajmanovich *et al.*, 2005; Rohr y Crumrine, 2005; Dimitrov *et al.*, 2006; Dhawan *et al.*, 2009). En el ámbito agrícola, los pesticidas son generalmente usados como fórmulas comerciales, las cuales, además del principio activo, contienen adyuvantes y surfactantes; algunos de los cuales incrementan significativamente su potencial tóxico (Cox, 1998, 2004; Sobrero *et al.*, 2007; Poletta *et al.*, 2009; Vera-Candioti *et al.*, 2010).

En Colombia, entre los herbicidas cuyo uso causan mayor preocupación se encuentran aquellos que poseen como principio activo el glifosato, ya que estos son aplicados en volúmenes importantes tanto para el control de malezas agrícolas como para la erradicación de cultivos ilícitos mediante aspersión aérea (Samuel, 2001; Fjeldså *et al.*, 2005; Solomon *et al.*, 2005, 2009). Entre las fórmulas comerciales basadas en glifosato, la más popular es el Roundup® (Monsanto Company, St. Louis, MO, USA). Esta formulación, además del principio activo, contiene el surfactante polioxietil amina (POEA) (Cox, 1998, Giesy *et al.*, 2000; Tsui y Chu, 2004; Relyea, 2005 a,b; Dinehart *et al.*, 2009; Relyea y Jones, 2009).

Diversos estudios han evaluado el efecto tóxico de diferentes fórmulas comerciales de glifosato en anuros (ej., Mann y Bidwell, 1999; Lajmanovich *et al.*, 2003; Howe *et al.*, 2004; Cauble y Wagner, 2005; Relyea, 2005 a,b; Dinehart *et al.*, 2009, 2010; entre otros). Sin embargo, la información con respecto a la toxicidad de la mezcla glifosato - Cosmoflux® 411F, utilizada para el control de cultivos

ilícitos, es contradictoria. Por ejemplo, estudios recientes han sugerido que la toxicidad (LC<sub>50</sub>) de la mezcla de aspersión en anuros colombianos, no es ecológicamente letal (Bernal *et al.*, 2009b). No obstante, el mismo estudio reportó que en algunas de las especies estudiadas (ej., *Pristimantis taeniatus*, *Rhinella granulosa*, *Scinax ruber* y *Centrolene prosoblepon*), la mortalidad a la dosis utilizada en las aspersiones aéreas osciló entre 15.4 y 35%. A la fecha, sólo existe un reporte que demuestra que la formulación comercial Roundup® induce roturas en el ADN de larvas de anuros de manera dosis dependiente, específicamente en *Lithobates catesbeianus* (*Rana catesbeiana*; Clements *et al.*, 1997). Además, no existen reportes acerca de las propiedades citotóxicas y genotóxicas de la mezcla de aspersión utilizada en la erradicación de cultivos ilícitos en Colombia. En tal sentido, es importante profundizar en el conocimiento sobre la toxicidad y genotoxicidad de este herbicida en anuros, para aportar información que ayude a esclarecer la discusión en torno a sus efectos.

La sensibilidad de los anfibios a los xenobióticos ambientales, hacen de ellos modelos muy efectivos para el monitoreo del grado de deterioro ambiental existente en los ecosistemas que habitan (Blaustein *et al.*, 1994; Blaustein y Wake, 1995; Burkhart *et al.*, 1998; Rajaguru *et al.*, 2001; Relyea *et al.*, 2005; Mouchet *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007; Frenzilli *et al.*, 2009). La mayoría de los estudios que utilizan anuros como bioindicadores se han enfocado en la utilización de estados larvales de especies metamórficas, restringiendo sus resultados a ecosistemas acuáticos. Por tal motivo, el uso de anuros con desarrollo directo como modelos biológicos, podría ofrecer una excelente oportunidad para medir el impacto de las actividades antropogénicas en ecosistemas terrestres.

*Eleutherodactylus johnstonei* es una rana colonizadora originaria de las Antillas Menores, en Colombia actualmente se encuentra establecida en ciudades como Barranquilla, Cali y Bucaramanga (Ruiz-Carranza *et al.*, 1996; Ortega *et al.*, 2001; Ortega *et al.*, 2005). El éxito colonizador de esta especie parece estar asociado

con su actividad reproductiva flexible, desarrollo directo no asociado a ambientes acuáticos y cuidado parental de las posturas (Kaiser, 1997; Bourne, 1998; Kaiser *et al.*, 2002; Ortega *et al.*, 2005). Adicionalmente, y a diferencia de otros anuros, es capaz de colonizar y sobrevivir exitosamente en áreas perturbadas por la actividad humana (Kaiser 1997, Kaiser *et al.* 2002, Ortega *et al.*, 2005). Estas características, hacen de esta especie un interesante modelo para la evaluación del impacto de contaminantes ambientales en sistemas terrestres.

De las diversas pruebas disponibles para la detección de daños genéticos, la Electroforesis en Gel de Células Individuales (SCGE, de sus siglas en inglés) o Ensayo Cometa, se encuentra entre las más usadas (Tice *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2003; Jha, 2008). Considerando que el Ensayo cometa es una prueba altamente sensible para detectar y cuantificar daño en el ADN ocasionado por agentes contaminantes (Olive *et al.*, 1992; Collins, 2004; Brendler-Schwaab *et al.*, 2005; Lovell y Omori, 2008); el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto tóxico y genotóxico de la mezcla Roundup® SL - Cosmoflux® 411F en la rana de desarrollo directo *Eleutherodactylus johnstonei*.

Para cumplir este objetivo general nos trazamos los siguientes objetivos específicos: 1) Evaluar la toxicidad aguda de la mezcla Roundup® SL - Cosmoflux® 411F en individuos adultos y neonatos de la rana de desarrollo directo *E. johnstonei*. 2) Evaluar el efecto genotóxico *in vitro* e *in vivo* de la mezcla Roundup® SL - Cosmoflux® 411F en células sanguíneas nucleadas de *E. johnstonei*.

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1. GLIFOSATO: FÓRMULAS COMERCIALES

El glifosato es un herbicida de amplio espectro, no selectivo, post-emergente y de acción sistémica, ampliamente utilizado a nivel mundial para el control de plantas indeseables, anuales y perennes, en ambientes agrícolas y forestales (Cox, 1998, 2004; Eslava-Mocha *et al.*, 2007; Langiano y Martinez, 2008; Rampoldi *et al.*, 2008). En Colombia, su uso incluye manejo agrícola, industrial, ornamental, entre otros; y es el componente principal de la mezcla utilizada en el Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos con Glifosato (PECIG) mediante aspersión aérea (Samuel, 2001; Fjeldså *et al.*, 2005; Solomon *et al.*, 2005; Casale y Lydon, 2007; Walsh *et al.*, 2008; Marshall *et al.*, 2009).

El mecanismo de acción del glifosato es la inhibición de la síntesis de aminoácidos aromáticos esenciales por medio de la inactivación de la enzima 5-enolpiruvil shikimato-3-P-sintetasa, pero también promueve la reducción en la tasa de síntesis de proteínas, ácido indol acético y clorofila (De Ross *et al.*, 2005; Monroy *et al.*, 2005; Richard *et al.*, 2005; Solomon *et al.*, 2005; Casale y Lydon, 2007; Eslava-Mocha *et al.*, 2007; Vera-Candioti *et al.*, 2010). Dado que esta ruta metabólica es característica de plantas y algunos microorganismos, se ha asumido que este compuesto no presenta efectos adversos en animales, incluido el hombre (De Ross *et al.*, 2005; Solomon *et al.*, 2005; Govindarajulu, 2008; Vera-Candioti *et al.*, 2010).

Sin embargo, la mayoría de las presentaciones comerciales con base en glifosato son mezclas complejas que adicionalmente contienen surfactantes y adyuvantes, los cuales disminuyen la tensión superficial de la solución final e incrementan la

penetración del principio activo en los tejidos de la planta (Giesy *et al.*, 2000; Ramírez-Duarte *et al.*, 2005; Solomon *et al.*, 2005). En general, los surfactantes poseen una mezcla de compuestos que proporcionan propiedades características a cada formulación del herbicida (Govindarajulu, 2008). El surfactante más popular en los productos formulados con base en glifosato (ej., Vision<sup>®</sup>, Roundup<sup>®</sup>, Glyphos<sup>®</sup>, entre otros) es la polioxietil amina (POEA), una mezcla de alquilaminas polietoxiladas de cadena larga derivadas de ácidos grasos de origen animal (Giesy *et al.*, 2000; Samuel, 2001; Walsh *et al.*, 2008).

Los surfactantes presentes en las formulaciones comerciales de glifosato han sido tradicionalmente descritos como “ingredientes inertes”, cuya composición no se encuentra disponible en las etiquetas de los productos ya que es considerada información confidencial (Cox, 1998, 2004; Howe *et al.*, 2004; Govindarajulu, 2008; Relyea y Jones, 2009). Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que la toxicidad de las diferentes formulaciones con base en glifosato está relacionada con el porcentaje del surfactante POEA presente en la fórmula comercial, siendo estas últimas más tóxicas que el principio activo (Mann y Bidwell, 1999; Giesy *et al.*, 2000; Perkins *et al.*, 2000; Tsui y Chu, 2004; Howe *et al.*, 2004; Relyea, 2005 a,b; Dinehart *et al.*, 2009; Relyea y Jones, 2009).

## **1.2. ERRADICACIÓN DE CULTIVOS ILÍCITOS**

En nuestro país, la aspersión aérea de cultivos de coca (*Erythroxylum coca*) se lleva a cabo con una mezcla de una formulación comercial de glifosato y el coadyuvante Cosmoflux<sup>®</sup> 411F (U.S. Department of State, 2002; Solomon *et al.*, 2007). Pese a la existencia de cierta incertidumbre en torno a la presentación comercial de glifosato utilizada (ver Samuel, 2001; Oldham y Massey, 2002; Fjeldså *et al.*, 2005; Eslava-Mocha *et al.*, 2007; Bernal *et al.*, 2009a), tal fórmula se caracteriza por contener 44% de agua, 41% de glifosato (como sal de isopropilamina) y 15% del surfactante POEA (Giesy *et al.*, 2000; U.S. Department

of State, 2002). El otro componente de la mezcla, el Cosmoflux<sup>®</sup> 411F, es un adyuvante no iónico que contiene un 17% de una mezcla de alcoholes lineales etoxilados y aril etoxilados y 83% de isoparafinas líquidas (Solomon *et al.*, 2005); del cual se desconocen virtualmente todas sus propiedades ecotoxicológicas.

Según datos oficiales (UNODC, 2010), se estima que en Colombia el Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos con Glifosato (PECIG) ha utilizado alrededor de 14 millones de litros de la fórmula comercial de glifosato a partir del año 2000 hasta la fecha. Durante este tiempo, se ha observado un incremento abrupto en el total de hectáreas asperjadas anualmente (de 58.073 en el año 2000 a 104.771 en el año 2009), para un total aproximado de 1.254.155 hectáreas asperjadas durante la última década. Estas áreas corresponden a diversos tipos de bosques, principalmente a bosques húmedos tropicales, ubicados en la Amazonía y en áreas forestales del sur y noroccidente de los Andes y tierras bajas adyacentes al Darién, así como en la sierra Nevada de Santa Marta, la serranía del Perijá y la serranía de San Lucas (Fjeldså *et al.*, 2005; Solomon *et al.*, 2005; León *et al.*, 2005; Eslava-Mocha *et al.*, 2007).

En la actualidad, el Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos con Glifosato (PECIG) ha generado cierta preocupación en Colombia y otros países, en lo que respecta a los posibles riesgos humanos y ambientales asociados al uso de la mezcla glifosato - Cosmoflux<sup>®</sup> 411F para el control de cultivos ilícitos (Solomon y Marshall, 2009; Solomon *et al.*, 2009). Como resultado, una serie de artículos concernientes al tema han sido publicados recientemente como parte del estudio gubernamental titulado “La Producción de Drogas Ilícitas, el Medioambiente y la Salud Humana”. Todos estos trabajos sugieren, que el glifosato, tal y como se usa en las aspersiones aéreas en Colombia, no representa un riesgo potencial sobre la salud humana y la de los ecosistemas (Bernal *et al.*, 2009 a,b; Bolognesi *et al.*, 2009; Marshall *et al.*, 2009; Solomon *et al.*, 2009; entre otros).

No obstante, diversos estudios han demostrado que a bajas concentraciones los herbicidas con base en glifosato son citotóxicos y genotóxicos en células humanas, afectan la regulación del ciclo celular, inducen un desacople de la fosforilación oxidativa, disrumpen la actividad de la enzima aromatasa, responsable de la síntesis de estrógenos en células placentarias humanas, provocan alteraciones en la expresión de genes regulados por estrógeno en células humanas, promueven apoptosis y necrosis e inducen desórdenes endocrinos en diferentes líneas celulares humanas (Marc *et al.*, 2004 a,b; Monroy *et al.*, 2005; Peixoto, 2005; Richard *et al.*, 2005; Hokanson *et al.*, 2007; Martínez *et al.*, 2007; Benachour y Séralini, 2009; Gasnier *et al.*, 2009).

Algunos autores han sugerido que en humanos la exposición al glifosato aumenta la incidencia de linfoma no-Hodgkin y mieloma múltiple (De Ross *et al.*, 2003, 2005; Eriksson *et al.*, 2008). De igual forma, estudios recientes indican que las aspersiones aéreas dirigidas al control de cultivos ilícitos en Colombia, inducen daños genéticos en las poblaciones humanas que son expuestas a tales aplicaciones (Maldonado, 2003; Paz-y-Miño *et al.*, 2007). Adicionalmente, existen claras evidencias que demuestran que herbicidas con base en glifosato (ej., Glyphos<sup>®</sup>, Roundup<sup>®</sup>, Vision<sup>®</sup>, entre otros), pueden producir efectos adversos (ej., tóxicos, genotóxicos, teratogénicos, entre otros) en diferentes especies no blanco, especialmente anfibios (Clements *et al.*, 1997; Mann y Bidwell, 1999; Lajmanovich *et al.*, 2003; Howe *et al.*, 2004; Cauble y Wagner, 2005; Relyea *et al.*, 2005; Langiano y Martínez, 2008; Dinehart *et al.*, 2009; Poletta *et al.*, 2009; Lushchak *et al.*, 2009; Relyea y Jones, 2009; entre otros).

### **1.3. BIOINDICADORES ECOTOXICOLÓGICOS: ANFIBIOS**

Los anfibios son componentes críticos de muchas comunidades terrestres y acuáticas, ocupan una gran variedad de nichos y contribuyen a la dinámica trófica de los ecosistemas; por lo tanto, los factores antropogénicos que los afectan

negativamente pueden perturbar en la misma vía a otros organismos (Blaustein *et al.*, 1994; Blaustein y Jonson, 2003; Hopkins, 2007). En general, los anfibios son más sensibles a xenobióticos ambientales que aves y mamíferos, principalmente debido a la permeabilidad de su piel, la cual está directamente involucrada en procesos fisiológicos tales como el intercambio de gas, agua y electrolitos con el medio circundante (Huang *et al.*, 2007; Halliday, 2008; Quaranta *et al.*, 2009; Hayes *et al.*, 2010).

En el caso particular de Colombia, los estudios realizados hasta el momento en anuros sugieren que la mezcla glifosato - Cosmoflux<sup>®</sup> 411F posee una baja toxicidad (LC<sub>50</sub>) para estos organismos (Bernal *et al.*, 2009b; Solomon *et al.*, 2009). Sin embargo, dado que las exposiciones ambientales a pesticidas normalmente ocurren a bajas concentraciones, los efectos sub-letales en los organismos suelen ser más pronunciados (Connors y Black, 2004; Mann *et al.*, 2009). Tales efectos incluyen: reducción en la esperanza de vida de los individuos, inmunodepresión, hermafroditismo, mutaciones en la descendencia por inducción de daños genéticos, reducción en la fecundidad debido a cambios en las tasas de fertilidad y cambios en los tiempos de oviposición y desarrollo, entre otros (Govindarajulu, 2008; Halliday, 2008; Schneider *et al.*, 2009).

#### **1.4. GENOTOXICIDAD: ENSAYO COMETA**

De los diversos biomarcadores que existen en la actualidad para evaluar el daño genético, la Electroforesis en Gel de Células Individuales o Ensayo Cometa, es uno de los más utilizados y recomendados para detectar el nivel de fragmentación del ADN nuclear tanto *in vitro* como *in vivo* (Tice *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2003, 2004; Jha, 2008; Yin *et al.*, 2009). Esta técnica fue desarrollada por Singh *et al.* (1988) para la detección de roturas de simple y doble cadena de ADN y sitios lábiles a los álcali bajo condiciones alcalinas.

El principio básico del Ensayo Cometa es la migración del ADN en una matriz de agarosa bajo condiciones electroforéticas (Singh *et al.*, 1988; Kobayashi *et al.*, 1995; Hartmann *et al.*, 2003). La longitud de la migración es un indicativo de la cantidad de roturas en el ADN y está directamente relacionada con el nivel de daño genético encontrado en la célula, el cual puede ser estimado en categorías al observarlo directamente al microscopio o mediante el análisis de imágenes computarizadas (Singh *et al.*, 1988; Olive *et al.*, 1990; McKelvey-Martin *et al.*, 1993; Fairbairn *et al.*, 1995; Kobayashi *et al.*, 1995; Lovell y Omori, 2008).

El amplio uso de esta técnica en estudios de biomonitorio se debe a su simplicidad, bajo costo y alta sensibilidad para detectar el daño producido por una gran variedad de xenobióticos cuando es comparado con otras técnicas (Mitchelmore y Chipman, 1998; Cotelle y Férard, 1999; Lee y Steinert, 2003; Lovell y Omori, 2008). Sin embargo, el uso del Ensayo Cometa en estudios de biomonitorio ha sido cuestionado debido a que en algunos casos los resultados positivos pueden estar asociados a procesos tales como la apoptosis o necrosis (Olive *et al.*, 1993; Olive y Banath, 1995; Tice *et al.*, 2000; Hartmann *et al.*, 2003; Meintières *et al.*, 2003; Wada *et al.*, 2003; Frenzilli *et al.*, 2009).

Para superar esta limitación, el Ensayo Cometa puede ser usado en paralelo con metodologías desarrolladas para estimar la fragmentación de ADN asociada a tales eventos celulares, como el Ensayo de Difusión de ADN en Gel de Agarosa (Singh, 2000 a,b, 2005; Gichner *et al.*, 2005; Frenzilli *et al.*, 2009). El principio básico de este ensayo es similar al reportado para el Ensayo Cometa, exceptuando el paso de electroforesis alcalina (Singh, 2000 a,b, 2005; Zeljezic *et al.*, 2006). Cabe resaltar, que pese a que este ensayo permite detectar eventos de apoptosis y necrosis, no permite una distinción obvia entre tales procesos celulares (O'Callaghan *et al.*, 2001; Wilkins *et al.*, 2002; Gichner *et al.*, 2005).

En cuanto a anfibios se refiere, diversos estudios han utilizado el Ensayo Cometa para evaluar el potencial genotóxico de una gran variedad de compuestos xenobióticos en algunas especies de anuros (ej., *Rana clamitans*, *Rana catesbeiana*, *Rana hexadactyla*, *Bufo americanus*, *Bufo raddeis*, *Xenopus laevis*) (Ralph *et al.*, 1996; Clements *et al.*, 1997; Ralph y Petras, 1998 a,b; Rajaguru *et al.*, 2001; Mouchet *et al.*, 2006; Huang *et al.*, 2007; Yin *et al.*, 2008, 2009). No obstante, la mayoría de los estudios desarrollados hasta el momento han sido encaminados hacia la evaluación del impacto de posibles compuestos genotóxicos en ecosistemas acuáticos (para excepciones ver Huang *et al.*, 2007), obviando el impacto de los mismos en ecosistemas terrestres.

### **1.5. *Eleutherodactylus johnstonei*: ASPECTOS GENERALES**

*Eleutherodactylus johnstonei* es un rana perteneciente a la familia Eleutherodactylidae, la cual junto a Craugastoridae, Strabomantidae y Ceuthomantidae agrupan la mayor parte del antiguo género *Eleutherodactylus* (Eleutherodactylinae; Lynch, 1971), el cual en la actualidad hace parte del clado monofilético Terrarana (Hedges *et al.*, 2008; Heinicke *et al.*, 2009; Frost, 2010). Todas las ranas pertenecientes a este linaje se caracterizan por presentar desarrollo directo no asociado a ambientes acuáticos (Hedges *et al.*, 2008; Heinicke *et al.*, 2009). Este taxón representa aproximadamente el 34% de la diversidad total de anuros de Colombia (236 especies) (Acosta-Galvis, 2000; Frost, 2010), siendo el linaje de anfibios más diverso del país. El importante aporte de este grupo a la diversidad de la fauna de anfibios de Colombia, el fácil mantenimiento de algunas de sus especies bajo condiciones de laboratorio (ej., *E. coqui*, Elinson *et al.*, 1990; *E. johnstonei*, observación personal) y sus particularidades reproductivas, hacen de éstas especies interesantes modelos para estudiar el efecto biológico de xenobióticos ambientales en ecosistemas terrestres.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. SUSTANCIA EXPERIMENTAL

La mezcla a estudiar se compuso de glifosato utilizado bajo la presentación comercial Roundup® SL (equivalente a la formula comercial utilizada en el PECIG), el surfactante Cosmoflux® 411F y agua. Estos componentes fueron mezclados en una solución del 55% de agua, 44% de Roundup® SL y 1% de Cosmoflux® 411F, siguiendo los parámetros consignados en el documento “Chemicals Used for the Aerial Eradication of Illicit Coca in Colombia and Conditions of Application” (U.S. Department of State, 2002). En todos los casos, las concentraciones de la sustancia experimental se expresan en kilogramos de equivalente ácido de glifosato por hectárea (Kg e.a/ha) con el fin de establecer una equivalencia con las concentraciones nominales utilizadas en campo y comparaciones con los datos toxicológicos para anuros reportados en la literatura.

### 2.2. COLECTA Y CRÍA DEL MATERIAL BIOLÓGICO

Especímenes adultos de *Eleutherodactylus johnstonei* fueron colectados en el “Parque de las Orquídeas” ubicado en el área metropolitana del municipio de Bucaramanga, Santander - Colombia (07° 07' 47" N, 73° 07' 33" W), a una altitud promedio de 960 m. Los individuos fueron sexados *in situ* teniendo como criterio en el caso de las hembras su mayor tamaño corporal y la presencia de folículos vitelogénicos; y la presencia de canto en el caso de los machos. Los ejemplares fueron trasladados al Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental de la Escuela de Biología de la Universidad Industrial de Santander, donde fueron mantenidos en terrarios de vidrio simulando condiciones de humedad e iluminación similares a las de su hábitat hasta la realización de los bioensayos.

Los neonatos utilizados en los ensayos de toxicidad fueron obtenidos a partir de apareamientos entre pares reproductivos bajo condiciones de laboratorio. La dieta *ad libitum* de las ranas consistió principalmente de dípteros, ortópteros y arácnidos capturados en el Campus Universitario.

### **2.3. MEDIDAS MORFOMÉTRICAS PARA ENSAYOS BIOLÓGICOS**

Para la realización de los ensayos de toxicidad y genotoxicidad se utilizaron individuos de similar peso y tamaño. Para tal fin, se registró la longitud rostro-cloaca (LRC) con un calibrador tipo vernier ( $\pm 0.02$  mm) y la masa corporal con una balanza analítica ( $\pm 0.001$  g), de cada uno de los especímenes estudiados. Una vez finalizados los diferentes ensayos de toxicidad, los individuos sobrevivientes fueron eutanizados por inmersión en alcohol al 20%. Todos los especímenes fueron fijados en formol al 10% y preservados en etanol al 70%. Finalmente, los individuos fueron depositados en la Colección Herpetológica del Museo de Historia Natural de la Universidad Industrial de Santander (UIS-A).

### **2.4. ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA**

Para los ensayos de toxicidad se utilizaron acuarios de vidrio de 25 x 12 cm (300 cm<sup>2</sup> de área interna) con ventilación. Los recipientes fueron posicionados aleatoriamente por tratamiento en el Laboratorio de Biología Reproductiva de Vertebrados de la Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga (Colombia) a una temperatura media de 24°C y un fotoperiodo de aproximadamente 12:12 horas (luz:oscuridad). Los experimentos de toxicidad (un mínimo de tres experimentos independientes), se realizaron utilizando un sistema estático y consistieron de curva dosis-efecto con seis tratamientos (dosis) incluyendo el control no tratado.

Durante el ensayo, los acuarios fueron humedecidos cada 24 horas con 10 mL de agua destilada por tratamiento para prevenir la deshidratación de los individuos. Las observaciones se realizaron durante las 96 horas de duración del ensayo, a intervalos de 24 horas. Los criterios para definir la ocurrencia de mortalidad fueron pérdida de movimiento y falta de reacción al contacto. Adicionalmente, se definieron tres parámetros de toxicidad sub-letal. Los criterios para definir estos parámetros fueron: Postura corporal anormal (PCA), pérdida de reflejos (PR) y desplazamiento errático (DE).

Con el objetivo de establecer si el sexo y el estado de desarrollo de los individuos influyen en los resultados de toxicidad, los especímenes a tratar fueron divididos en tres grupos: hembras adultas, machos adultos y neonatos ( $\pm$  3 días posteclosión). En el último caso, no se identificó el sexo de los individuos. En los experimentos realizados con machos adultos y neonatos, fueron expuestos un total de 8 individuos por tratamiento (n total = 144). En el caso de las hembras adultas se expusieron un total de 6 individuos por tratamiento (n total = 106). Previo a la realización de los diferentes bioensayos, se efectuó un ensayo piloto para determinar el rango de dosis a estudiar.

Una vez establecido este rango, se realizaron las pruebas definitivas para individuos adultos utilizando las siguientes concentraciones: 0 (control negativo), 3.69, 4.94, 6.19, 7.38 y 11.07 Kg e.a/ha. En el caso de individuos neonatos las concentraciones a utilizar fueron las siguientes: 0 (control negativo), 3.69, 2.95, 2.21, 1.48 y 0.74 Kg e.a/ha. Todas las soluciones fueron preparadas justo antes de cada ensayo y se asperjaron 3 mL de solución sobre las ranas utilizando aspersores domésticos acoplados a un tubo reservorio.

## **2.5. ENSAYOS DE GENOTOXICIDAD**

Todos los ensayos de genotoxicidad se desarrollaron en el Laboratorio de Microbiología y Mutagénesis Ambiental de la Escuela de Biología de la UIS. Las muestras sanguíneas fueron tomadas de machos adultos mediante punción cardiaca de individuos previamente anestesiados por hipotermia (4-8°C) y colectadas en tubos Eppendorff heparinizados a una temperatura entre 4-8°C. Para establecer la densidad celular óptima del ensayo ( $3.55 \times 10^6$  células/mL), se realizó un recuento de células sanguíneas usando una Cámara de Neubauer. Es importante resaltar que en anfibios las células sanguíneas son nucleadas y sufren divisiones celulares en la circulación, particularmente durante su desarrollo (Duellman y Trueb, 1986; Lajmanovich *et al.*, 2005).

Para los ensayos se estudiaron rangos de dosis inferiores al LD<sub>50</sub> derivado a partir de los ensayos de toxicidad. En todos los casos, se desarrollaron al menos tres experimentos independientes con dos replicas (láminas) por tratamiento/individuo. El tiempo de exposición a la sustancia experimental (*in vitro* e *in vivo*) se determinó empíricamente a partir de la realización de curvas dosis-efecto considerando diferentes tiempos de exposición. Las soluciones de la sustancia a estudiar fueron preparadas justo antes de la realización de cada ensayo. El Ensayo Cometa se realizó siguiendo el protocolo descrito por Singh *et al.* (1988) con las modificaciones propuestas por Valencia-Otero *et al.* (2010) para la rana *Eleutherodactylus johnstonei*, las cuales consisten principalmente en la sustitución de la lisis alcalina por un paso de lisis enzimática usando Proteinasa K.

En los ensayos *in vitro*, las exposiciones se realizaron mezclando 4 µL de la suspensión celular ( $3.55 \times 10^6$  células/mL) y 20 µL de la sustancia experimental en un rango de concentraciones entre 4.63 - 74 µg e.a/mL. Posteriormente, las células fueron centrifugadas a 10.000 rpm y el pellet se resuspendió en 20 µL de una solución de Proteinasa K (0.19 mg/mL) en Buffer PK (50mM Tris-HCl, 10mM CaCl<sub>2</sub>, pH 8). En todos los ensayos se incluyó un control negativo, el cual consistió en células suspendidas en 20 µL de NaCl 0.9 %.

Para los ensayos *in vivo*, los individuos fueron expuestos de la forma anteriormente descrita para los ensayos de toxicidad a un rango de concentraciones entre 0.055 - 0.166 Kg e.a/ha. Seguidamente, se colectó la muestra sanguínea, se ajustó la densidad celular ( $3.55 \times 10^6$  células/mL) y se mezclaron 4  $\mu$ L de la suspensión celular con 20  $\mu$ L de una solución de Proteinasa K (0.19 mg/mL). En todos los ensayos se incluyó un control negativo, el cual consistió de individuos asperjados con 3 mL de agua destilada. Para los ensayos definitivos de genotoxicidad fueron expuestos por cada tratamiento 4 machos adultos de similar peso y tamaño (n total = 72).

En ambos casos (*in vitro* e *in vivo*), la suspensión celular fue mezclada con 75  $\mu$ L de agarosa de bajo punto de fusión (1%) y extendidas sobre láminas portaobjeto previamente cubiertas con una capa de 400  $\mu$ L agarosa de grado molecular (1.3%). Posteriormente, las láminas fueron cubiertas con laminillas cubreobjeto (22 x 40 mm) y refrigeradas durante 10 minutos. A continuación, se retiraron las laminillas y las láminas fueron colocadas a 4°C durante aproximadamente 25 minutos, en una cámara electroforética conteniendo buffer de corrida (0.3 N NaOH, 1 mM EDTA, pH 13). Seguidamente, se desarrolló la electroforesis a 300 mA y 25 V durante 30 minutos. Finalmente, las láminas fueron sumergidas durante 5 minutos en solución neutralizante (0.4 M TRIS, pH 7.5), enjuagadas con agua destilada y secadas en la incubadora a 37°C durante la noche. Todo el ensayo se realizó a una temperatura de 4°C con el fin de minimizar daños celulares no asociados a genotoxicidad.

La tinción con Nitrato de Plata se desarrolló siguiendo el protocolo descrito por Díaz *et al.* (2009). Las láminas fueron inmersas durante 10 minutos en solución de fijación (15% Ácido Tricloroacético, 5% Sulfato de Zinc heptahidratado, 5% Glicerol), enjuagadas con agua destilada e incubadas a 37°C durante 3 horas. La solución de tinción se preparó al momento de utilizarse y consistió de una mezcla

de 66 mL de una solución al 5% de Carbonato de Sodio y 34 mL de una solución al 0.1% de Nitrato de Amonio, 0.2% de Nitrato de Plata, 0.125% de Ácido Tungstofosfórico y 0.2% de Formaldehido. Previo a la tinción, las láminas fueron rehidratadas en agua destilada por 5 minutos. La tinción se llevó a cabo bajo condiciones de oscuridad durante 20 minutos. La tinción fue detenida sumergiendo las láminas en una solución al 1% de Ácido Acético durante 5 minutos. Finalmente, las láminas se secaron a temperatura ambiente.

## 2.6. ESTIMADOS DE DAÑO GENÉTICO

Las láminas se analizaron usando un microscopio Nikon Eclipse E200 con una magnificación de 400X mediante el conteo de 100 células por lámina y dos láminas por cada tratamiento/individuo. El nivel de daño en el ADN fue determinado visualmente con la tipificación de los núcleos en cinco categorías de daño (0 - 4) (Anexo 1) según lo indicado por Collins (2004). El daño en el ADN fue expresado en unidades arbitrarias totales ( $AU_T$ ) de la siguiente manera:

$$AU_T = \sum_{i=0}^4 n_i \times i$$

Donde  $n_i$  es el número de núcleos en cada categoría  $i$  (Feng *et al.*, 2005).

La detección de citotoxicidad asociada con eventos de apoptosis o necrosis se llevó a cabo usando el Ensayo de Difusión de ADN en Gel de Agarosa (Singh, 2000a). Los núcleos que mostraron una alta dispersión del ADN nuclear (diámetro aproximadamente 3 veces mayor al núcleo promedio del control negativo), fueron considerados como núcleos apoptóticos o necróticos (Nigro *et al.*, 2002). El porcentaje de núcleos con apoptosis o necrosis ( $\%N_{A/N}$ ) fue considerado en los estimados de daños genéticos según lo indicado en la siguiente fórmula por Díaz *et al.* (2009):

$$AU_R = AU_T - \frac{\%N_{A/N} \times AU_T}{100}$$

Donde las unidades arbitrarias remanentes ( $AU_R$ ) corresponde a roturas en el ADN no asociadas a eventos apoptóticos o necróticos. Las  $AU_R$  por tratamientos se promediaron utilizando el siguiente criterio de daño: no hay daño (entre 0-100  $AU_R$ ), poco daño (entre 101-200  $AU_R$ ), daño moderado (entre 201-300  $AU_R$ ) y daño severo (entre 301-400  $AU_R$ ).

## **2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos obtenidos en cada uno los diferentes tratamientos de toxicidad y genotoxicidad fueron sometidos a pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas con el fin de establecer el tipo de análisis estadístico a emplear (paramétrico o no paramétrico).

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía utilizando como variables dependientes la LRC - masa y como variable categórica los diferentes tratamientos y ensayos, con el fin de establecer la existencia de diferencias significativas en estas dos variables dentro y entre los ensayos de toxicidad.

Los resultados obtenidos de los ensayos de toxicidad se analizaron utilizando dos métodos: 1) Método Probit: Transforma los datos del eje X (concentración) a una escala logarítmica y los datos del eje Y (mortalidad) son transformados a unidades Probit (unidades de desviación estándar). Esta transformación permite el ajuste a una relación lineal ( $y = a+bx$ ), en donde la concentración perteneciente al Probit 0.5 corresponde al  $LC_{50}$  (Finney, 1971). Estos cálculos y sus límites de confianza (95%) se realizaron utilizando el programa estadístico Probit Versión 1.5 (U.S. E.P.A, 1993b). 2) Método gráfico: Representa la mortalidad de los individuos en forma de supervivencia ( $S= N/N_0$ ), en función lineal de la concentración de la sustancia, utilizando ejes con escala lineal a partir de los cuales se estima el parámetro de toxicidad ( $LC_{50}$ ) y sus límites de confianza por interpolación.

Para los resultados obtenidos a partir de los ensayos de genotoxicidad (*in vitro* e *in vivo*), se desarrolló un test de Dunnett con el fin de comparar las medias de los grupos tratados con la media del grupo control, mediante el programa Dunnett Versión 1.5 (U.S. E.P.A, 1993a). Se efectuó un análisis de correlación producto momento de Pearson para determinar la relación entre el estimado de daño genético y las concentraciones de la sustancia experimental. Los análisis estadísticos se realizaron por medio del programa STATISTICA V.6 (STATSOFT, Inc, 2003) con una significación  $p < 0.05$ .

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. MEDIDAS MORFOMÉTRICAS

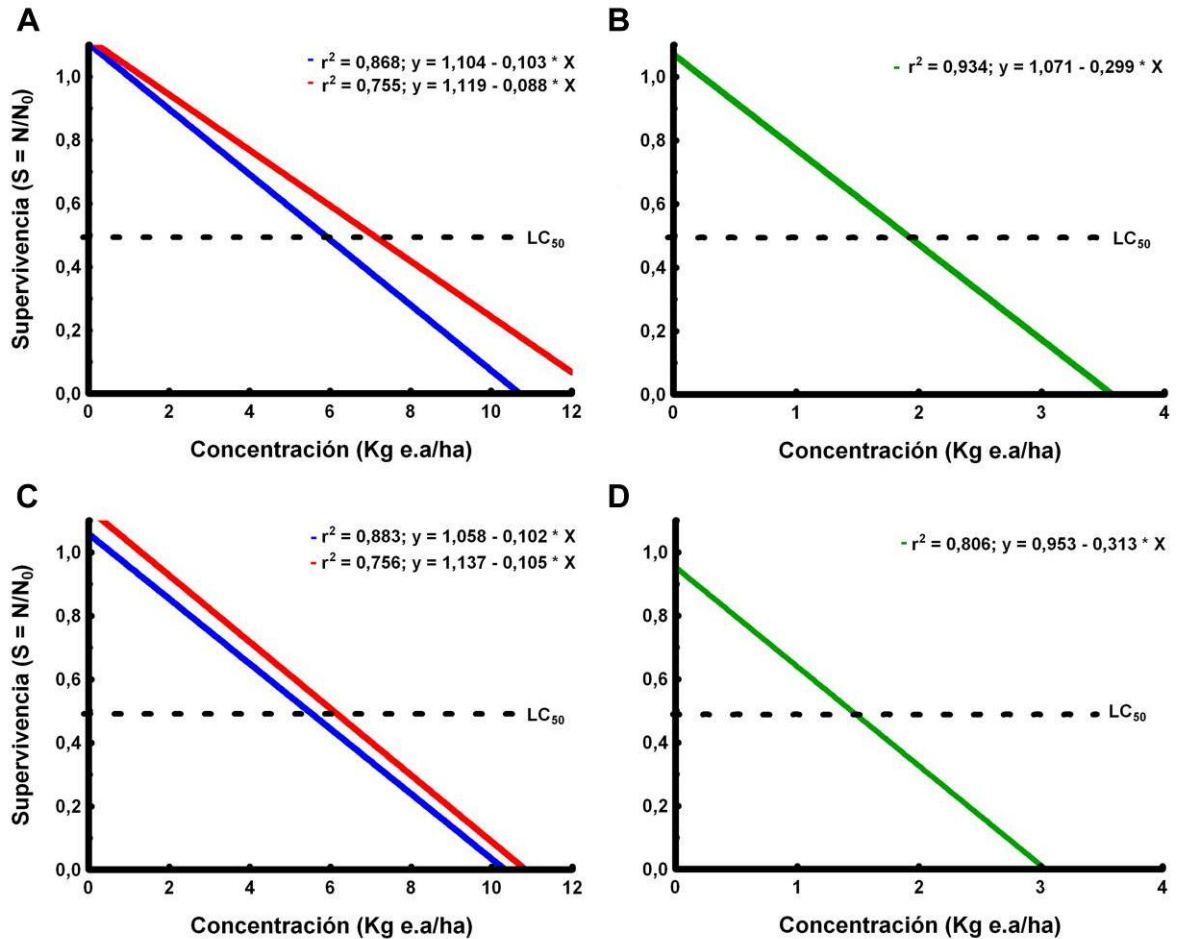
Como se indicó en materiales y métodos, se registraron los valores masa corporal y LRC para los grupos machos adultos, hembras adultas y neonatos. En el caso de los machos, los individuos estudiados presentaron valores promedio de masa y LRC, con sus errores estándar, de  $1,07 \pm 0.002$  g y  $22,15 \pm 0,049$  mm, respectivamente; mientras las hembras estudiadas presentaron una una masa promedio de  $1,50 \pm 0,003$  g y una LRC promedio de  $25,48 \pm 0,078$  mm. Los individuos neonatos registraron una masa promedio de  $0.014 \pm 0.0001$  g y una LRC promedio de  $5.25 \pm 0.0043$  mm (Tabla 1). Ninguno de los tres grupos estudiados (hembras adultas, machos adultos y neonatos), mostraron diferencias significativas en los valores medios de masa corporal y LRC en las pruebas de comparación de medias (n.s.,  $p > 0.05$ ).

Variable	Media $\pm$ S.E.M	Valor Max.	Valor Min.	n
<b>Machos</b>				
LRC	$22,15 \pm 0,049$ mm	22,99 mm	21,09 mm	144
Masa	$1,07 \pm 0.002$ g	1.13 g	1.04 g	144
<b>Hembras</b>				
LRC	$25,48 \pm 0.078$ mm	26,96 mm	24,14 mm	106
Masa	$1,50 \pm 0.003$ g	1,58 g	1,42 g	106
<b>Eclosionantes</b>				
LRC	$5.25 \pm 0.0043$ mm	5.36 mm	5.14 mm	144
Masa	$0.014 \pm 0.0001$ g	0.017 g	0.011 g	144

**Tabla 1.** Media y error estándar de las variables LRC y masa de los individuos de *Eleutherodactylus johnstonei* analizados en los diferentes ensayos de toxicidad.

### 3.2. ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA

Los resultados de toxicidad en los tres grupos de estudio fueron variables, siendo las hembras y machos adultos mucho menos sensibles a los efectos tóxicos de la mezcla que los neonatos (Fig. 1).



**Fig. 1.** Efecto tóxico de la mezcla Roundup® SL - Cosmoflux® 411F en individuos de *Eleutherodactylus johnstonei*. A y B) 48 horas. C y D) 96 horas. La línea azul denota individuos machos adultos, la roja hembras adultas y la verde individuos neonatos.

En la Tabla 2, se muestran los valores de  $LC_{50}$  obtenidos de los ajustes de las curvas de toxicidad para cada grupo. Los valores de toxicidad ( $LC_{50}$ ) para hembras y machos adultos estuvieron siempre por encima de la dosis de aplicación para la

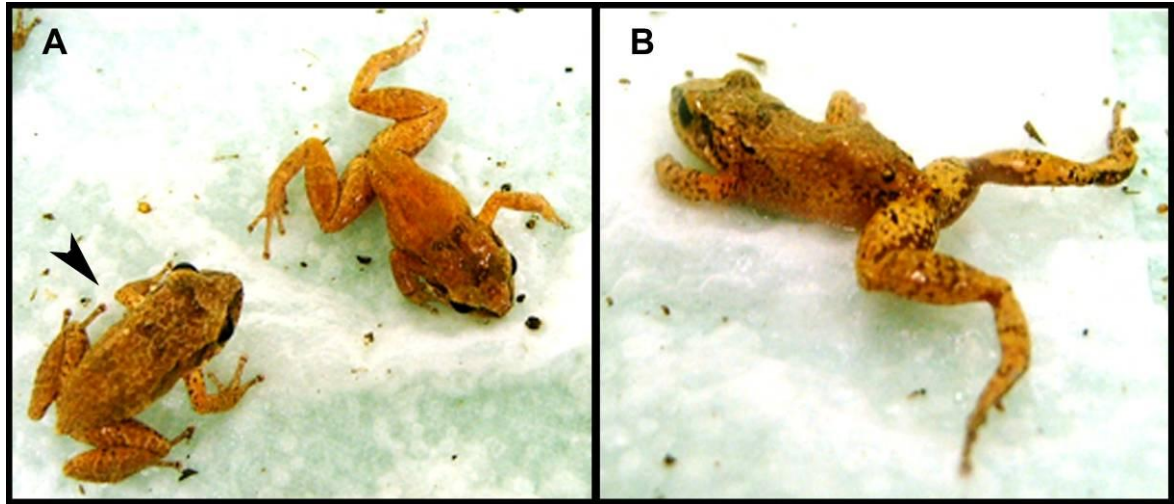
erradicación de cultivos ilícitos (3,69 Kg e.a/ha) y su mortalidad a tal concentración fue consistentemente baja (cercasas a 0 - 6% y 4 – 13% para hembras y machos, respectivamente). En contraste, en individuos neonatos los valores de toxicidad (LC<sub>50</sub>) fueron siempre inferiores a la concentración utilizada para la aspersion aérea y la mortalidad durante el ensayo a dicha dosis fue muy alta (alrededor del 67– 100%) (Anexo 2).

<b>Método Probit</b>			
<b>LC<sub>50</sub></b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>
<b>Machos</b>	7.63 (6.7 - 9.1)	5.68 (5.2 – 6.2)	5.28 (4.8 – 5.8)
<b>Hembras</b>	8.76 (7.4 - 11.9)	6.75 (5.9 – 7.8)	5.92 (5.4 – 6.5)
<b>Neonatos</b>	3.09 (2.8 – 3.6)	1.79 (1.5 – 2.0)	1.57 (1.4 – 1.8)
<b>Método Gráfico</b>			
<b>LC<sub>50</sub></b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>72 h</b>
<b>Machos</b>	7.9 (7.2 – 9.2)	5.8 (5.2 – 6.5)	5.4 (4.8 – 6.1)
<b>Hembras</b>	9.4 (7.2 – 13.8)	7.1 (5.3 – 8.4)	6.1 (5.2 – 7.2)
<b>Neonatos</b>	3.3 (2.9 – 3.8)	1.9 (1.7 – 2.1)	1.7 (1.5 – 1.9)

**Tabla 2.** Toxicidad de la mezcla Roundup® SL - Cosmoflux 411F® en individuos adultos y eclosionantes de *Eleutherodactylus johnstonei*. Las concentraciones se expresan en kilogramos de equivalente ácido de glifosato por hectárea (Kg e.a/ha). Entre paréntesis se encuentran los límites de confianza inferior y superior, respectivamente.

Algunos indicadores de toxicidad sub-letal como pérdida de reflejos y desplazamiento errático, fueron observados en hembras y machos adultos a partir de la concentración usada en la erradicación de cultivos ilícitos (3,69 Kg e.a/ha). En individuos neonatos, estos indicadores de toxicidad sub-letal, fueron registrados a partir de concentraciones iguales o superiores a 0.74 Kg e.a/ha. En todos los experimentos, fueron evidentes individuos con posturas corporales anormales a concentraciones cercanas a los diferentes LC<sub>50</sub> derivados (Fig. 2). En términos generales, la mayor proporción de la respuesta tóxica fue expresada

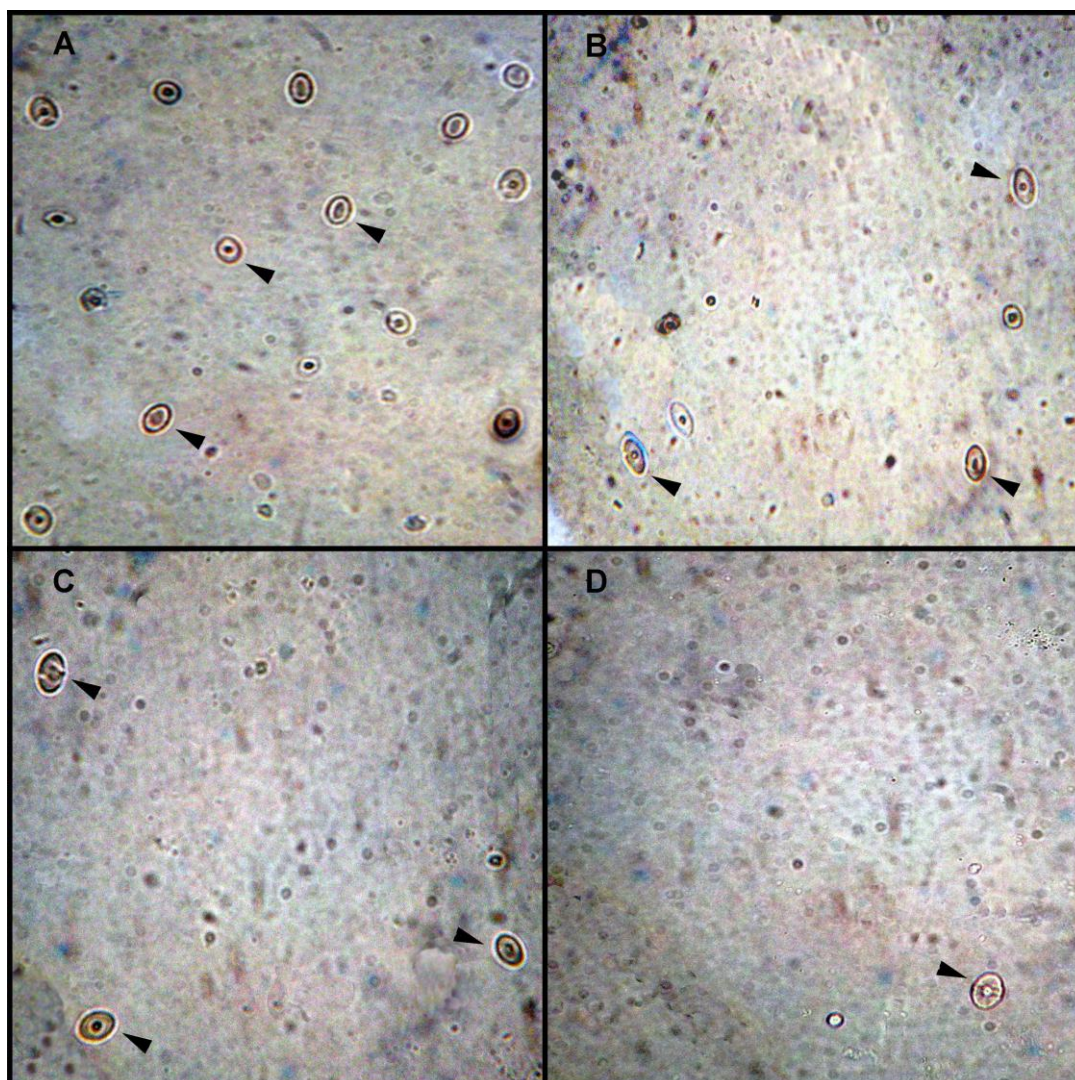
durante las primeras 48 horas de iniciado el ensayo. En ninguno de los casos, se observaron signos de toxicidad o mortalidad en los grupos de controles negativo.



**Fig. 2.** Efectos sub-letales de toxicidad observados en individuos adultos de *Eleutherodactylus johnstonei* expuestos a la mezcla Roundup® SL - Cosmoflux® 411F. A) Individuos expuestos a 4.94 Kg e.a/ha. La flecha denota un individuo con postura corporal normal. B) Individuos expuestos a 7.38 Kg e.a/ha.

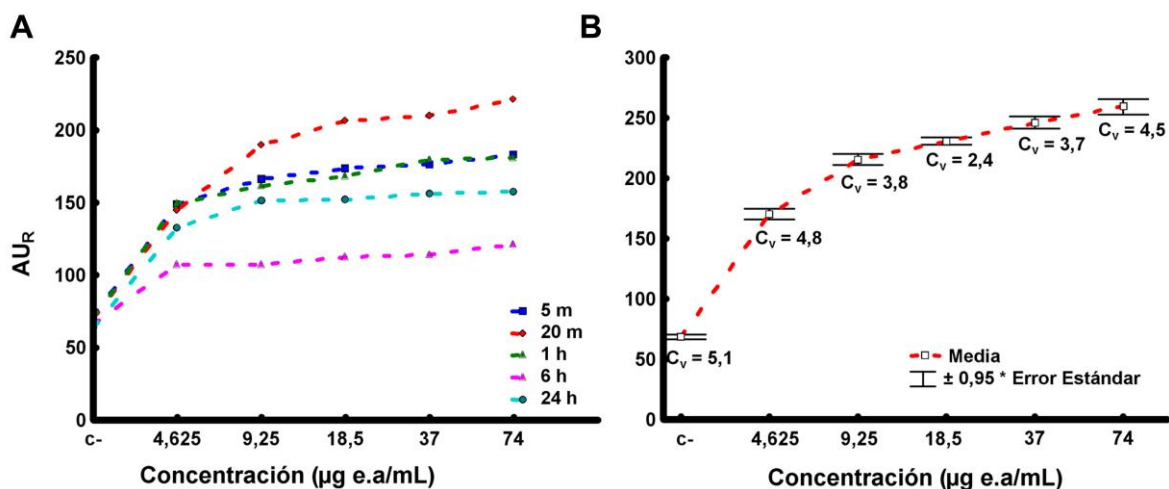
### 3.3. ESTIMADOS DE GENOTOXICIDAD *IN VITRO*

El rango de concentraciones estudiado en los ensayos de genotoxicidad fue elegido basados en la respuesta citotóxica evidenciada para concentraciones superiores a 100 µg e.a/mL, en la cual se observó una disminución dramática en la densidad celular ( $3.55 \times 10^6$  células/mL) a un tiempo de exposición de 20 minutos. Dosis superiores a 200 µg e.a/mL, causaron la destrucción total de la población celular, evidenciada por la ausencia de pellet después de la centrifugación y por la ausencia de células al observar al microscopio (Fig. 3). Pese a que no se cuantificó el efecto citotóxico de la mezcla de aspersión, nuestras observaciones sugieren una posible relación dosis- respuesta.



**Fig. 3.** Citotóxicidad *in vitro* de la mezcla Roundup® SL - Cosmoflux® 411F. A) Control negativo (células mantenidas en 0.9 % de NaCl). B) 100 µg e.a./mL. C) 150 µg e.a./mL. D) 200 µg e.a./mL. Las puntas de flecha indican células sanguíneas. 100 X.

Niveles significativos ( $p \leq 0.05$ ) de daño en el ADN de células sanguíneas de *E. johnstonei* fueron detectados a concentraciones sub-letales de la mezcla Roundup® SL - Cosmoflux® 411F ( $\geq 4.625$  µg e.a./mL) con respecto a los controles negativos. Los resultados obtenidos, demuestran una clara relación dosis-efecto para el rango de dosis y tiempos de exposición celular ensayados (Fig. 4A).



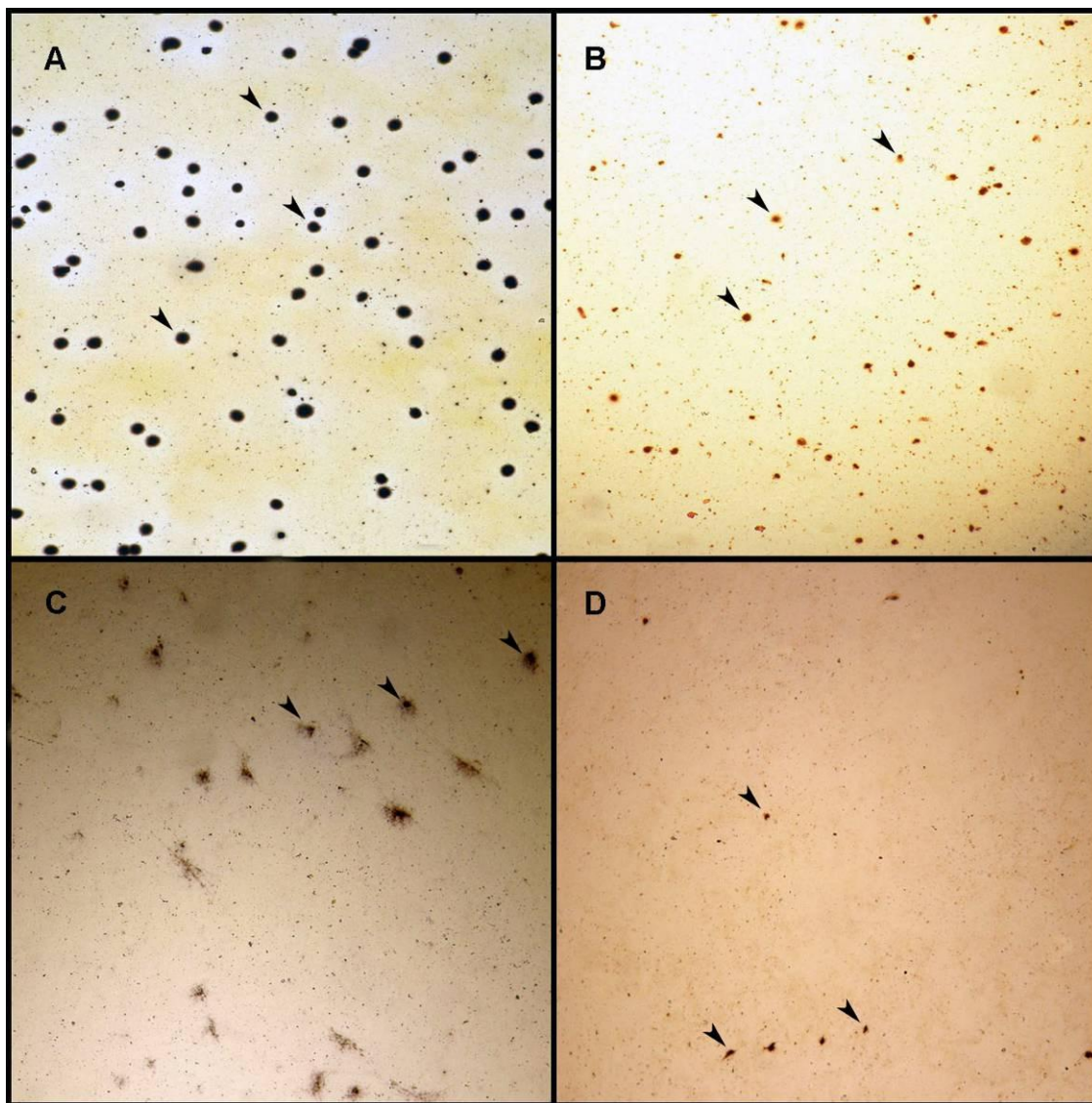
**Fig. 4.** Genotóxicidad de la mezcla mezcla Roundup® SL - Cosmoflux® 411F en células sanguíneas de *Eleutherodactylus johnstonei* expuestas *in vitro*. A) Relación dosis-efecto a diferentes tiempos de exposición para cada dosis. B) Curva dosis-efecto para un tiempo de 20 minutos. Las barras y Cv representan respectivamente el error estándar y el coeficiente de variación, respectivamente; calculado a partir de tres experimentos independientes. En ambos casos c- representa el control negativo.

La curva dosis-efecto desarrollada para un tiempo de exposición celular de 20 minutos (Fig. 4B), mostró los valores de daño genético (AU<sub>R</sub>) más altos y una clara correlación entre los estimados de daños y la concentración de la mezcla ensayada ( $R = 0.7$ ,  $p < 0.05$ ). La trazabilidad en los estimados de daño genético fue alta, con errores estándar y coeficientes de variación consistentemente bajos. El porcentaje de núcleos con apoptosis o necrosis (%N<sub>A/N</sub>) observado en el Ensayo de Difusión en Gel fue relativamente bajo, con valores entre 5.5 - 10.5%, con un valor promedio de 8.3% (Anexo 3).

### 3.4. ESTIMADOS DE GENOTOXICIDAD *IN VIVO*

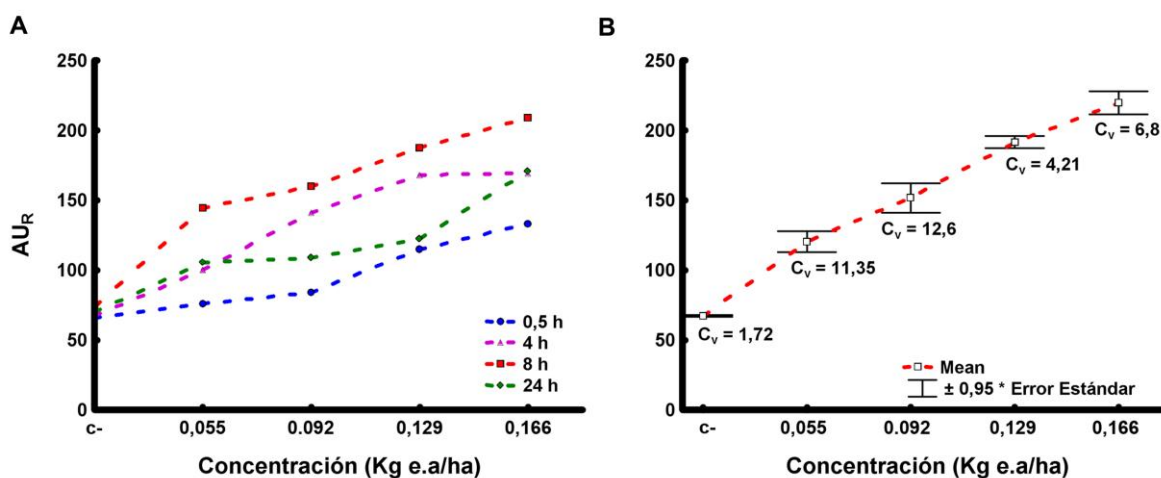
Para los ensayo de genotoxicidad *in vivo*, el rango de concentraciones estudiado fue elegido en base a la presencia de una marcada respuesta citotóxica, al parecer dosis-dependiente, a concentraciones superiores a 0.74 Kg e.a/ha, la cual

provocó una disminución significativa en la densidad celular de ensayo ( $3.55 \times 10^6$  células/mL) en los grupos tratados con respecto al grupo control, evidenciado mediante el Ensayo de Difusión de ADN en Gel con un tiempo de exposición de 1 hora (Fig. 5).



**Fig. 5.** Citotóxicidad *in vivo* de la mezcla Roundup® SL - Cosmoflux® 411F. A) Control negativo (Ensayo de Difusión en Gel) B) 0.74 Kg e.a/ha. C) 1.48 Kg e.a/ha. D) 2.96 Kg e.a/ha. Las punta de flecha indican los núcleos con diferentes grado de daño. 100 X.

La exposición *in vivo* de individuos de *E. johnstonei* a concentraciones sub-letales de mezcla Roundup® SL - Cosmoflux® 411F ( $\geq 0.055$  Kg e.a/mL), incrementó significativamente ( $p \leq 0.05$ ) los niveles de daño en el ADN de células sanguíneas, con respecto a los controles negativos. Los resultados derivados de los diferentes ensayos, demuestran una clara relación dosis-efecto para el rango de dosis y tiempos de exposición ensayados (Fig. 6A).



**Fig. 6.** Genotoxicidad de la mezcla Roundup® SL - Cosmoflux® 411F en células sanguíneas de *Eleutherodactylus johnstonei* expuestas *in vivo*. A) Relación dosis-efecto a diferentes tiempos de exposición para cada dosis. B) Curva dosis-efecto para un tiempo de 8 horas. C<sub>v</sub> representa el coeficiente de variación, calculado a partir de tres experimentos independientes.

La curva dosis-efecto desarrollada para un tiempo de exposición de 8 horas (Fig. 6B), mostró los valores de daño genético (AU<sub>R</sub>) más altos y una clara correlación entre los estimados de daños y la concentración de la mezcla ensayada ( $R = 0.98$ ,  $p < 0.05$ ). Al igual que en los ensayos de genotoxicidad *in vitro*, el porcentaje de núcleos apoptóticos o necróticos (%N<sub>A/N</sub>) observado en el Ensayo de Difusión en Gel fue relativamente bajo, con valores entre 3.75 - 6.75%, con un valor promedio de 4.96% (Anexo 4). Comparativamente, la trazabilidad en los estimados de daño genético *in vivo* fue menor que los estimados en *in vitro*; sin embargo, los valores estuvieron en los rangos esperados para un modelo *in vivo* con coeficiente de variación inferiores al 12,6 % y con un valor promedio de 7.34 (Fig. 6B).

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA

Existe relativamente poca información con respecto al potencial tóxico de la mezcla glifosato - Cosmoflux<sup>®</sup> 411F en anuros colombianos. A la fecha, los estudios encaminados hacia tal fin se han hecho con diferentes especies de anuros, en diferentes etapas de desarrollo y bajo diferentes condiciones experimentales. Sin embargo, ninguno ha tenido en cuenta importantes aspectos ecológicos (ej., efectos sub-letales, impactos indirectos, etc.), los cuales pueden tener un efecto negativo en la supervivencia de los organismos.

En individuos adultos de *Eleutherodactylus johnstonei*, la toxicidad de la mezcla Roundup<sup>®</sup> SL - Cosmoflux<sup>®</sup> 411F fue relativamente baja comparada con la dosis utilizada en la erradicación aérea de cultivos ilícitos. Estos resultados son congruentes con los obtenidos por Bernal *et al.* (2009b) en individuos adultos de dos especies de anuros colombianos (*Pristimantis taeniatus* y *Dendrobates truncatus*) expuestos a la mezcla Glyphos<sup>®</sup> - Cosmoflux<sup>®</sup> 411F. En contraste, en individuos neonatos de *E. johnstonei*, la mortalidad a la concentración utilizada en la aspersión aérea de cultivos ilícitos fue muy alta, con valores de LC<sub>50</sub> hasta 3 veces menores que la dosis de aplicación (Tabla 3). Estos resultados sugieren que individuos en este estado de desarrollo son muy sensibles a los efectos tóxicos de la mezcla de aspersión. En tal sentido, Bernal *et al.* (2009b) asoció la alta sensibilidad encontrada en individuos pequeños, a su menor tamaño corporal, lo cual les confiere una mayor relación superficie-volumen, incrementando la tasa de absorción del herbicida.

Especie	Tipo de Ensayo	Mortalidad a la dosis de aspersión aérea	LC <sub>50</sub> (Kg e.a/ha)	Referencia
<i>Eleutherodactylus johnstonei</i> <sup>2</sup>	Laboratorio	100%	1.23	Este estudio
<i>Eleutherodactylus johnstonei</i> <sup>4</sup>	Laboratorio	12.5%	5.28	Este estudio
<i>Pristimantis taeniatus</i> <sup>4</sup>	Microcosmos terrestre	20%	5.6	Bernal <i>et al.</i> , 2009b
<i>Dendrobates truncatus</i> <sup>4</sup>	Microcosmos terrestre	0%	>7.4	Bernal <i>et al.</i> , 2009b
<i>Rhinella granulosa</i> <sup>1</sup>	Laboratorio	-	3.5	Bernal <i>et al.</i> , 2009a
<i>Rhinella granulosa</i> <sup>1</sup>	Microcosmos acuático	21%	10.7	Bernal <i>et al.</i> , 2009b
<i>Rhinella granulosa</i> <sup>3</sup>	Microcosmos terrestre	35%	6.5	Bernal <i>et al.</i> , 2009b
<i>Scinax ruber</i> <sup>1</sup>	Laboratorio	-	2.45	Bernal <i>et al.</i> , 2009a
<i>Scinax ruber</i> <sup>1</sup>	Microcosmos acuático	15.4%	10.3	Bernal <i>et al.</i> , 2009b
<i>Scinax ruber</i> <sup>3</sup>	Microcosmos terrestre	33%	7.3	Bernal <i>et al.</i> , 2009b
<i>Rhinella marina</i> <sup>1</sup>	Laboratorio	-	4.08	Bernal <i>et al.</i> , 2009a
<i>Rhinella marina</i> <sup>1</sup>	Microcosmos acuático	25%	8.9	Bernal <i>et al.</i> , 2009b
<i>Rhinella marina</i> <sup>3</sup>	Microcosmos terrestre	0%	22.8	Bernal <i>et al.</i> , 2009b
<i>Centrolene prosoblepon</i> <sup>3</sup>	Microcosmos terrestre	30%	4.5	Bernal <i>et al.</i> , 2009b

**Tabla 3.** Comparación de los valores de toxicidad (LC<sub>50</sub> a 96 h) para especies de anuros expuestos a la mezcla glifosato - Cosmoflux<sup>®</sup> 411F bajo diferentes condiciones experimentales y en diferentes estados de vida. Las concentraciones se expresan en kilogramos de equivalente ácido de glifosato por hectárea (Kg e.a/ha). <sup>1</sup> Estados larvales, <sup>2</sup> Eclosionantes, <sup>3</sup> Juveniles, <sup>4</sup> Adultos.

Los valores de toxicidad encontrados en individuos neonatos de *E. johnstonei* son consistentemente más bajos con respecto a los reportados por Bernal *et al.* (2009b), bajo condiciones de microcosmos, en estados larvales y juveniles de especies metamórficas de anuros colombianos (ej., *Rhinella granulosa*, *Engystomops pustulosus*, *Scinax ruber*, *Centrolene prosoblepon*, entre otras). Estos resultados sugieren que los anuros con desarrollo directo, especialmente individuos neonatos y posiblemente juveniles, son más sensibles a los efectos tóxicos de la mezcla de aspersion, comparados con anuros de ciclo de vida bifásico.

Diversos efectos sub-letales (ej., alteraciones en los patrones normales de movimiento y nado) han sido descritos en diversas especies de anuros expuestos a bajas dosis de la mezcla glifosato - Cosmoflux<sup>®</sup> 411F (Bernal *et al.*, 2009b). Estas alteraciones son similares a las observadas en individuos de *E. johnstonei* expuestos a bajas concentraciones de la mezcla Roundup<sup>®</sup> SL - Cosmoflux<sup>®</sup> 411F, los cuales presentaron signos sub-letales de toxicidad que afectaban negativamente su locomoción (ej., pérdida de reflejos, desplazamiento errático y posturas corporales anormales). Es claro, que bajo condiciones naturales, estas alteraciones pueden tener efectos adversos en la dinámica de las especies y los ecosistemas (ej., alterando las tasas de depredación, competencia, etc.).

Estos resultados sugieren que el impacto de la mezcla glifosato - Cosmoflux<sup>®</sup> 411F en anfibios podría depender de una combinación de efectos directos e indirectos, los cuales son mediados por la susceptibilidad de la especie *per se* y la interacción de múltiples especies en un contexto de comunidad ecológica. Pese a que los signos de toxicidad sub-letal reportados hasta en momento, pueden traducirse en diversos efectos negativos que pueden afectar en diferentes vías la supervivencia de los individuos, las consecuencias a nivel poblacional de los mismos no han sido investigadas.

Signos de toxicidad sub-letal similares (ej., parálisis y alteraciones en la respuesta de evasión de depredadores), los cuales se encuentran asociados a incrementos en las tasas de depredación (Govindarajulu, 2008); han sido reportados en otras especies de anuros expuestos a bajas dosis de herbicidas con base en glifosato (Pauli *et al.*, 2001; Wojtaszek *et al.*, 2004). Otros signos de toxicidad sub-letal derivados de la exposición de anuros a bajas concentraciones de diferentes formulaciones de glifosato, incluyen alteraciones que afectan negativamente las tasas de crecimiento y desarrollo, inmunosupresión, defectos teratogénicos, entre otros (Lajmanovich *et al.*, 2003; Howe *et al.*, 2004; Cauble y Wagner, 2005; Rohr *et al.*, 2008).

En la actualidad, es ampliamente aceptado que los declives en las poblaciones de anuros son producto de la interacción de diversos factores bióticos y abióticos, los cuales pueden tener un efecto indirecto positivo sobre el potencial tóxico de los pesticidas (Boone y Semlitsch, 2001; Relyea, 2003; Sih *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2008; entre otros). Bajo condiciones naturales, los efectos indirectos pueden ser más comunes y complejos, ya que estos pueden ser transmitidos a diferentes niveles dentro del ecosistema (Rohr *et al.*, 2006; Relyea y Hovermar, 2008; Clements y Rohr, 2009). Esto es especialmente cierto para poblaciones de anuros asociadas a cultivos ilícitos o zonas aledañas, las cuales además de las actividades físicas y químicas encaminadas a la producción de coca y amapola, son blanco del programa de aspersiones aéreas con glifosato.

A la fecha, ningún estudio ha examinado los efectos aditivos, sinérgicos y antagónicos, derivados de la exposición de anuros a mezclas de los plaguicidas más utilizados en el establecimiento y control de cultivos ilícitos en Colombia (ej., glifosato - Cosmoflux<sup>®</sup> 411F - Paraquat<sup>®</sup>), ni los efectos que las mismas puedan tener a diferentes niveles jerárquicos de organización biológica (ej., célula, individuo, especie, población, comunidad y ecosistema). De igual forma, nada se conoce acerca de cómo se lleva a cabo el proceso de bioacumulación y

degradación del glifosato y los coadyuvantes presentes en las mezclas de aspersión, en las zonas en donde se centra la erradicación aérea, las cuales se encuentran asociadas a hotspots de biodiversidad (hotspot Chocó-Darién-Ecuador Occidental y hotspot Andes Tropicales).

Estudios recientes han puesto en evidencia que los efectos sinérgicos derivados de la producción de coca y las aspersiones aéreas para su erradicación, representan una de las principales amenazas para diversas especies de anuros de diferentes regiones del territorio nacional como son Nariño, Putumayo, Cauca, Caquetá y Valle del Cauca (Lynch y Arroyo, 2009; Castro-Herrera y Bolívar-García, 2010); siendo las ranas con desarrollo directo uno de los grupos más sensibles a tales prácticas. Sin embargo, la falta de investigaciones durante los últimos 30 años en las áreas de conflicto no permite conocer la cifra exacta de especies amenazadas por estas actividades en nuestro país (Lynch y Arroyo, 2009).

Cabe resaltar que los resultados de toxicidad obtenidos en nuestro estudio representan el peor escenario de exposición al herbicida, ya que asume la ausencia de diversos factores asociados a las aspersiones aéreas (ej., intercepción por vegetación, presencia de materia orgánica en el medio, etc.). En tal sentido, estudios bajo condiciones más realistas de exposición, con un diseño experimental basado en el contexto de comunidad ecológica (Relyea y Mills, 2001; Boone y Semlitsch, 2002; Chen *et al.*, 2008; Relyea y Diecks, 2008; Relyea y Hoverman, 2008; entre otros), son necesarios para direccionar adecuadamente el impacto de la mezcla de aspersión aérea sobre anuros colombianos.

#### **4.2. ESTIMADOS DE GENOTOXICIDAD**

Pese a que diversos estudios han evaluado el efecto tóxico del glifosato y algunas de sus formulaciones comerciales en anuros, la información con respecto a su

potencial genotóxico y citotóxico, es virtualmente desconocida. Esta situación es aún más crítica en nuestro país, en donde la información con respecto a los riesgos derivados de las aspersiones aéreas con la mezcla glifosato - Cosmoflux<sup>®</sup> 411F, sobre algunas especies de anuros colombianos, se basa en un limitado número de estudios de toxicidad (Wildlife International, 2006; Bernal *et al.*, 2009 a,b).

Los resultados del presente estudio demuestran que células sanguíneas de *Eleutherodactylus johnstonei* expuestas *in vitro* a bajas concentraciones ( $\geq 4.625$   $\mu\text{g e.a/mL}$ ) de la mezcla Roundup<sup>®</sup> SL - Cosmoflux<sup>®</sup> 411F exhiben roturas en el ADN de forma dosis-dependiente. Estos resultados son congruentes con los reportados por Monroy *et al.* (2005) y Mañas *et al.* (2009) quienes evidenciaron daño en el ADN producto de la exposición *in vitro* de células humanas a bajas concentraciones de glifosato. De igual forma, Gasnier *et al.* (2009) reportaron que células humanas HepG2 expuestas a 5 - 10 ppm de una fórmula de glifosato (Grands Travaux<sup>®</sup>), exhiben un incremento en el nivel de roturas en el ADN.

En cuanto a genotoxicidad *in vivo* se refiere, individuos adultos de *E. johnstonei* expuestos a concentraciones sub-letales ( $\geq 0.055$  Kg e.a/ha) de la mezcla de aspersión, presentan roturas en el ADN de células sanguíneas de forma dosis-dependiente. Estos resultados son similares a los reportados anteriormente para eritrocitos de larvas de rana toro (*Litobathes catesbaianus*) expuestas *in vivo* a concentraciones sub-letales ( $\geq 6.75$   $\mu\text{g/mL}$ ) de Roundup<sup>®</sup> (Clements *et al.*, 1997). No obstante, en nuestro estudio se requirieron tiempos más cortos de exposición, para evidenciar daño genético producto de la exposición al herbicida. Tal efecto podría estar asociado a la presencia de un segundo surfactante (Cosmoflux<sup>®</sup> 411F) en la mezcla para la erradicación de cultivos ilícitos, del cual se desconocen sus propiedades genotóxicas.

Otros biomarcadores de genotoxicidad (ej., aberraciones cromosómicas, intercambio de cromátides hermanas, inducción de micronúcleos, etc.) han puesto en evidencia alteraciones en el ADN de diferentes líneas celulares expuestas *in vitro* a bajas concentraciones de glifosato (Lioi *et al.*, 1998; Piešova, 2005; Holečková, 2006). Así mismo, diversos estudios *in vivo* han documentado efectos clastogénicos y genotóxicos de bajas dosis de glifosato y algunas de sus fórmulas comerciales (ej., Roundup®), en un amplio rango de organismos, entre los cuales se destacan bacterias (Raipulis *et al.*, 2009), peces (Çavaş y Könen, 2007; Cavalcante *et al.*, 2008), reptiles (Poletta *et al.*, 2009), roedores (Mañas *et al.*, 2006; Prasad *et al.*, 2009) y humanos (Maldonado, 2003; Paz-y-Miño *et al.*, 2007).

No obstante, los resultados de los estudios sobre los efectos citogenéticos del glifosato han producido resultados controvertidos, asociados a la sensibilidad de los ensayos empleados, el sistema biológico utilizado, las dosis de aplicación y las características del herbicida o de la fórmula comercial utilizada (Çavaş y Könen, 2007; Cavalcante *et al.*, 2008; Prasad *et al.*, 2009). Por ejemplo, algunos estudios que han concluido que a dosis relevantes de exposición el herbicida no representa un riesgo para la salud humana y la de los ecosistemas (ej., Dimitrov *et al.*, 2006; Mladinic *et al.*, 2009; Casabé *et al.*, 2007; Bolognesi *et al.*, 2009), han reportado algún efecto adverso producto de la exposición al mismo (ej., incremento en la frecuencia de micronúcleos).

Es claro que otros factores (ej., evaluaciones *in vitro* y/o *in vivo*, tiempo de exposición, vías de exposición, entre otros) pueden afectar dramáticamente los resultados. Por ejemplo, en el presente estudio el Ensayo Cometa reveló un aumento significativo en el daño del ADN de células sanguínea expuestas *in vitro* (20 minutos) e *in vivo* (8 horas), a diferentes dosis de la mezcla Roundup® SL - Cosmoflux® 411F; tiempo después del cual, los niveles de daño bajaron significativamente. Este efecto probablemente se deba a la inducción de la

respuesta apóptica y/o necrótica (citotoxicidad), o a una combinación de estos procesos celulares.

El potencial tóxico y genotóxico de herbicidas con base en glifosato, puede estar relacionado a su capacidad para generar especies reactivas de oxígeno (ERO), algunas de las cuales (ej., peróxido de hidrógeno, aniones superóxido y radicales hidroxilo), a niveles supranormales, pueden reaccionar con macromoléculas biológicas (ej., lípidos, proteínas, etc.), lo cual puede traducirse en inactivación enzimática, peroxidación lipídica, daño en el ADN, e incluso muerte celular (Peña-Llopis *et al.*, 2003; Banudevi *et al.*, 2006; Costa *et al.*, 2008). En tal sentido, se ha demostrado que larvas de *Litobathes catesbaianus* expuestas a 1 ppm de la fórmula Roundup original<sup>®</sup>, exhiben disfunciones cardiacas y una inducción en la generación de ERO, y como consecuencia, estrés oxidativo (Costa *et al.*, 2008).

De igual forma, se ha demostrado que herbicidas con base en glifosato, y el principal subproducto de su degradación (ácido aminometilfosfónico), pueden alterar los puntos de control del ciclo celular, interfiriendo con la maquinaria de reparación del ADN, lo cual puede producir un descenso en la tasa de reparación del ADN e inducir inestabilidad genómica celular (Marc *et al.*, 2004 a,b; Bellé *et al.*, 2007; Antoniou *et al.*, 2010). En tal sentido, tiempos de exposición más prolongados al herbicida podrían brindarnos información con respecto a sus efectos sobre la maquinaria de reparación genética y nos permitirían determinar si los organismos expuestos desarrollan estrategias para contrarrestar los efectos nocivos de la mezcla de aspersión.

Es de resaltar que durante los ensayos de genotoxicidad *in vitro*, cuando se expusieron las células a concentraciones superiores a 200 µg e.a/mL, se observó la desintegración total de la población celular. Estos resultados concuerdan con los reportados por Martínez *et al.* (2007), quienes encontraron que la exposición de células de sangre periférica humana, a concentraciones de Roundup<sup>®</sup>

superiores a 100 µg/mL, producía la degradación total de la población celular. Adicionalmente, estudios recientes *in vitro* han demostrado que herbicidas con base en glifosato producen efectos citotóxicos en diversas líneas celulares humanas (Richard *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2007; Benachour y Séralini, 2009; entre otros). La menor sensibilidad al efecto citotóxico observada en células sanguíneas de *E. johnstonei* sugiere que factores adicionales a nivel de la membrana plasmática y el citoesqueleto, contribuyen a una mayor estabilidad celular.

De igual forma, la exposición de individuos adultos de *E. johnstonei*, a concentraciones superiores a 0.74 Kg e.a/ha, induce una respuesta citotóxica al nivel de las células sanguíneas. Estos resultados son congruentes con los reportados por Prasad *et al.* (2009), quienes encontraron un descenso en el índice mitótico (*i.e.*, citotoxicidad) en células de medula ósea de ratón, previa exposición a bajas dosis de Roundup®.

Aunque los mecanismos por los cuales el herbicida causa tal efecto no están claramente definidos, se ha demostrado que formulaciones comerciales de glifosato conteniendo POEA disrumpan las membranas celulares y mitocondriales, inhiben el transporte intracelular a través de la disgregación del citoesqueleto y promueven ataque oxidativo a los lípidos de la membrana celular, induciendo eventos apoptóticos y necróticos (Costa *et al.*, 2008; Benachour y Séralini, 2009; Hedberg y Wallin, 2010); mientras el glifosato *per se*, induce una redistribución de las fibras de tubulina, lo cual conlleva a una desorganización del citoesqueleto y en consecuencia a una pérdida de la integridad celular (Elie-Caille *et al.*, 2010).

La disminución en la viabilidad de células sanguíneas es uno de los principales factores asociados a la inmunosupresión (Rondón-Barragán *et al.*, 2010). En tal sentido, diversos estudios han demostrado que herbicidas con base en glifosato pueden tener un efecto negativo en la respuesta inmune humoral y celular, e

inducir estados inmunosupresivos (El-Gendy *et al.*, 1998; Rohr *et al.*, 2008; Kelly *et al.*, 2010). Estos resultados sugieren que los efectos de las aspersiones aéreas con glifosato, no sólo son importantes por su capacidad para causar mortalidad directa en los organismos, sino por una diversa gama de disturbios a diferentes niveles que pueden alterar las complejas relaciones bióticas.

## 5. CONCLUSIONES

La mezcla Roundup® SL - Cosmoflux® 411F es tóxica para la rana de desarrollo directo *Eleutherodactylus johnstonei*, siendo los individuos neonatos muy sensibles a sus efectos.

Los signos de toxicidad sub-letal derivados de la exposición de individuos de *E. johnstonei* a la mezcla de aspersion pueden tener un efecto indirecto negativo sobre la supervivencia de los individuos.

Concentraciones subletales de la mezcla Roundup® SL - Cosmoflux® 411F inducen, de manera dosis-dependiente, roturas en el ADN de células sanguíneas de *E. johnstonei* expuestas *in vitro* e *in vivo*.

Dosis bajas inferiores a la dosis de aplicación de la mezcla Roundup® SL - Cosmoflux® 411F tienen un efecto citotóxico, tanto *in vitro* como *in vivo*, en células sanguíneas de *E. johnstonei*.

*E. johnstonei* representa un modelo biológico adecuado para el estudio de los posibles efectos asociados a la contaminación con xenobióticos ambientales.

El Ensayo Cometa representa una herramienta eficiente para el monitoreo de contaminantes ambientales en ecosistemas terrestres.

## 6. SUGERENCIAS

Se recomienda el estudio de otros marcadores de genotoxicidad diferentes a las roturas en el ADN, con el fin de establecer si el daño observado mediante el Ensayo Cometa se traduce en otro tipo de alteraciones (ej., cromosomales) que afecten negativamente la supervivencia de los individuos.

Estudiar biomarcadores diferentes a la genotoxicidad (ej., estrés oxidativo, metabólicos, moleculares, etc.), que nos permitan entender los posibles efectos sub-letales y las posibles rutas de acción del herbicida, para poder establecer una estrategia adecuada para la protección de anuros amenazados por esta práctica.

Direccionar estudios que tengan en cuenta los impactos indirectos, acumulativos y a largo plazo del herbicida, y las reacciones sinérgicas que éste puede tener en el ecosistema y en las redes tróficas, y cómo estas pueden afectar el conjunto de comunidades y poblaciones que conforman el ecosistema.

Evaluar el posible efecto inmunosupresor de la mezcla de aspersión, con el fin de entender la dinámica de patógenos asociados a declives de anuros colombianos (ej., *Batrachochytrium dendrobatidis* y ranavirus).

Estudiar las dinámicas de disipación y bioacumulación, y monitorear la biodisponibilidad del herbicida en los suelos de las regiones asociadas a la práctica de aspersión área con glifosato.

Realizar estudios *in situ* de los posibles efectos negativos de la mezcla de aspersión en poblaciones de anuros asociadas a las zonas en donde se centran estas prácticas.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Acosta-Galvis, A.R. 2000. Ranas, salamandras y caecilias (Tetrapoda: Amphibia) de Colombia. *Biota Colombiana*, 1:289–319.

Antoniou, M., P. Brack, A. Carrasco, J. Fagan, M. Habib, P. Kageyama, C. Leifert, R.O. Nodari & W. Pengue. 2010. GM Soy: Sustainable? Responsible? GLS Gemeinschaftsbank and ARGE Gentechnik-frei. Download from: <http://bit.ly/9D9J2k>.

Banudevi, S., G. Krishnamoorthy, P. Venkatataman, C. Vignesh, M.M. Aruldhas & J. Arunakaran. 2006. Role of  $\alpha$ -tocopherol on antioxidant status in liver, lung and kidney of PCB exposed male albino rats. *Food and Chemical Toxicology*, 44:2040–2046.

Bellé, R., R. Le Bouffant, J. Morales, B. Cosson, P. Cormier & O. Mulner-Lorillon. 2007. Sea urchin embryo, DNA-damaged cell cycle checkpoint and the mechanisms initiating cancer development. *Journal de la Société de Biologie*, 201:317–327.

Benachour, N & G.E. Séralini. 2009. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. *Chemical Research in Toxicology*, 22:97–105.

Bernal, M.H., K.R. Solomon & G. Carrasquilla. 2009a. Toxicity of formulated glyphosate (Glyphos) and Cosmo-Flux to larval colombian frogs. 1. Laboratory acute toxicity. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 72:961–965.

Bernal, M.H., K.R. Solomon & G. Carrasquilla. 2009b. Toxicity of formulated glyphosate (Glyphos) and Cosmo-Flux to larval and juvenile colombian frogs. 2. Field and laboratory microcosm acute toxicity. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 72:966–973.

Blaustein, A.R. & D.B. Wake. 1995. The puzzle of declining amphibian populations. *Scientific American*, 272:52–57.

Blaustein, A.R. & P.T. Johnson. 2003. The complexity of deformed amphibians. *Frontiers in the Ecology and Environment*, 1:87–94.

Blaustein, A.R., D.B. Wake & W. P. Sousa. 1994. Amphibian declines: Judging stability, persistence, and susceptibility of populations to local and global extinctions. *Conservation Biology*, 8:60–71.

Bolognesi, C., G. Carrasquilla, S. Volpi, K.R. Solomon & E.J.P Marshall. 2009. Biomonitoring of genotoxic risk in agricultural workers from five Colombian Regions: Association to occupational exposure to glyphosate. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 72:986–997.

Boone, M. D. & R. D. Semlitsch. 2001. Interactions of an insecticide with larval density and predation in experimental amphibian communities. *Conservation Biology*, 15:228–238.

Boone, M.D. & R.D. Semlitsch. 2002. Interactions of an insecticide with competition and pond drying in amphibian communities. *Ecological Applications*, 12:307–316.

Bourne, G.R. 1998. Reproductive behavior of terrestrial breeding frogs *Eleutherodactylus johnstonei* in Guyana. *Behavioral Ecology*, 9:1–7.

Brendler-Schwaab, S., A. Hartmann, S. Pfuhler & G. Speit. 2005. The *in vivo* Comet assay: Use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis*, 20:245–254.

Burkhart, J.G., J.C. Helgen, D.J. Fort, K. Gallagher, D. Bowers, T.L. Propst, M. Gernes, J. Magner, M.D. Shelby & G. Luciert. 1998. Induction of mortality and malformation in *xenopus laevis* embryos by water sources associated with field frog deformities. *Environmental Health Perspectives*, 106:841–848.

Casabé, N., L. Piola, J. Fucks, M.L. Oneto, L. Pamparato, S. Basack, R. Giménez, R. Massaro, J.C. Papa & E. Kesten. 2007. Ecotoxicological assessment of effects of glyphosate and chlorpyrifos in an argentine soya field. *Journal of Soil and Sediment*, 7:232-239.

Casale, J. & J. Lydon. 2007. Apparent effects of glyphosate on alkaloid production in coca plants grown in Colombia. *Journal Forensic Science*, 52:573–578.

Castro-Herrera, F. & W. Bolívar-García. 2010. Libro rojo de los anfibios del Valle del Cauca. Feriva Impresores S.A. Cali - Colombia.

Cauble, K. & R.S. Wagner. 2005. Sublethal effects of the herbicide glyphosate on amphibian metamorphosis and development. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 75:429–435.

Cavalcante, D.G.S.M., C.B.R. Martinez & S.H. Sofia. 2008. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutation Research*, 655:41–46.

Çavaş T. & S. Könen. 2007. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate

formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis*, 22:263–268.

Chen, C.Y., K.M. Hathaway & C.L. Folt. 2004. Multiple stress effects of Vision® herbicide, pH, and food on zooplankton and larval amphibian species from forest wetlands. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23:823–831.

Chen, C.Y., K.M. Hathaway, D.G. Thompson & C.L. Folt. 2008. Multiple stressor effects of herbicide, pH, and food on wetland zooplankton and a larval amphibians. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71:209–218.

Clements, C., S. Ralph & M. Petras. 1997. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (Comet) assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 29:277–288.

Clements, W.H. & J.R. Rohr. 2009. Community responses to contaminants: Using basic ecological principles to predict ecotoxicological effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28:1789–1800.

Collins, A.R. 2004. The Comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology*, 26:249–261.

Conners, D. & M. Black. 2004. Evaluation of lethality and genotoxicity in the freshwater mussel *Utterbackia imbecillis* (Bivalvia: Unionidae) exposed singly and in combination to chemicals used in lawn care. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 46:362–371.

Costa, M.J., D.A. Monteiro, A.L. Oliveira-Neto, F.T. Rantin & A.L. Kalinin. 2008. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original®. *Ecotoxicology*, 17:153–163.

Cotelle, S. & J. Férard. 1999. Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 34:246–255.

Cox, C. 1998. Herbicide factsheet: Glyphosate (Roundup). *Journal of Pesticide Reform*, 15:3–17.

Cox, C. 2004. Herbicide factsheet: Glyphosate. *Journal of Pesticide Reform*, 24:10–15.

De Roos, A. J., S.H. Zahm, K.P. Cantor, D.D. Weisenburger, F.F. Holmes, L.F. Burmeister & A. Blair. 2003. Integrative assessment of multiple pesticides as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men. *Occupational and Environmental Medicine*, 60:E11.

De Roos, A.J., A. Blair, J.A. Rusiecki, J.A. Hoppin, M. Svec, M. Dosemeci, D.P. Sandler & M.C. Alavanja. 2005. Cancer incidence among glyphosate-exposed pesticide applicators in the agricultural health study. *Environmental Health Perspectives*, 13:50–54.

Dhawan, A., M. Bajpayee & D. Parmar. 2009. Comet assay: A reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biology and Toxicology*, 25:5–32.

Díaz, A., S. Carro, L. Santiago, J. Estévez, C. Guevara, M. Blanco, L. Sánchez, L. Sánchez, N. López, D. Cruz, R. López, E.B. Cuetara & J.L. Fuentes. 2009. Estimates of DNA strand breakage in bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) leukocytes measured with the Comet and DNA Diffusion assays. *Genetics and Molecular Biology*, 32:367–372.

Dimitrov, B., P. Gadeva, D. Benova & M. Bineva. 2006. Comparative genotoxicity of the herbicides Roundup, Stomp and Reglone in plant and mammalian test systems. *Mutagenesis*, 21:375–382.

Dinehart, S.K., L.M. Smith, S.T. McMurry, T.A. Anderson, P.N. Smith & D.A. Haukos. 2009. Toxicity of a glufosinate- and several glyphosate-based herbicides to juvenile amphibians from the Southern High Plains, USA. *Science of the Total Environment*, 407:1065–1071.

Dinehart, S.K., L.M. Smith, S.T. McMurry, T.A. Anderson, P.N. Smith & D.A. Haukos. 2010. Acute and chronic toxicity of Roundup Weathermax<sup>®</sup> and Ignite<sup>®</sup> 280 SL to larval *Spea multiplicata* and *S. bombifrons* from the Southern High Plains, USA. *Environmental Pollution*, 158:2610–2617.

Duellman, W.E. & Trueb, L. 1986. *Biology of amphibians*. New York: McGraw-Hill.

El-Gendy, K.S., N.M. Aly & H. El-Sebae. 1998. Effects of edifenphos and glyphosate on the immune response and protein biosynthesis of bolti fish (*Tilapia nilotica*). *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 33:135–149.

Elie-Caille, C., C. Heu, C. Guyon & L. Nicod. 2010. Morphological damages of a glyphosate-treated human keratinocyte cell line revealed by a micro- to nanoscale microscopic investigation. *Cell Biology and Toxicology*, 26:331–339.

Elinson, R., E. Del Pino, D. Townsend, F. Cuesta & P. Eichhorn. 1990. A practical guide to the developmental biology of terrestrial-breeding frogs. *The Biological Bulletin*, 179:163–177.

Eriksson, M., L. Hardell, M. Carlberg & M. Akerman. 2008. Pesticide exposure as risk factor for non-Hodgkin lymphoma including histopathological subgroup analysis. *International Journal of Cancer*, 7:1657–63.

Eslava-Mocha, P.R., W.F. Ramírez-Duarte & I.S. Rondón-Barragán. 2007. Sobre los efectos del glifosato y sus mezclas: Impacto sobre peces nativos. Universidad de los Llanos. Colombia.

Fairbairn, D., P. Olive & K. O'Neill. 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research*, 339:37–59.

Feng, S., Z. Kong, X. Wang, P. Peng & E.Y. Zeng. 2005. Assessing the genotoxicity of imidacloprid and RH-5849 in human peripheral blood lymphocytes in vitro with comet assay and cytogenetic tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61:239–246.

Finney, D.J. 1971. Probit analysis. Cambridge: Cambridge University Press. England.

Fjeldså, J., M.D. Álvarez, J.M. Lazcano & B. León. 2005. Illicit crops and armed conflict as constraints on biodiversity conservation in the Andes Region. *Ambio*, 34:205–211.

Frenzilli, G., M. Nigro & B.P. Lyons. 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research*, 681:80–92.

Frost, D.R. 2010. Amphibian species of the world: An online reference. Version 5.4 (8 April, 2010). Base de datos electrónica disponible en <http://research.amnh.org/vz/herpetology/amphibia/>. American Museum of Natural History, New York, USA.

Gasnier, C., C. Dumont, N. Benachour, E. Clair, M.C. Chagnon & G.E. Séralini. 2009. Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines. *Toxicology*, 262:184–91.

Gichner, T., A. Mukherjee, E.D. Wagner & M.J. Plewa. 2005. Evaluation of the nuclear DNA Diffusion assay to detect apoptosis and necrosis. *Mutation Research*, 586:38–46.

Giesy, J.P., S. Dobson & K.R. Solomon. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup<sup>®</sup> herbicide. *Review of Environmental Contamination and Toxicology*, 167:35–120.

Govindarajulu, P. P. 2008. Literature review of impacts of glyphosate herbicide on amphibians: What risks can the silvicultural use of this herbicide pose for amphibians in B.C.?. B.C. Ministry of Environment, Victoria, BC. Wildlife Report No. R-28.

Halliday, T. R. 2008. Why amphibians are important. *International Zoo Yearbook*, 42:7–14.

Hartmann, A., E. Agurell, C. Beevers, S. Brendler-Schwaab, B. Burlinson, P. Clay, A. Collins, A. Smith, G. Speit, V. Thybaud & R.R. Tice. 2003. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis*, 18:45–51.

Hartmann, A., M. Schumacher, U. Plappert-Helbig, P. Lowe, W. Suter & L. Mueller. 2004. Use of the alkaline in vivo Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. *Mutagenesis*, 19:51–59.

Hayes, T.B., P. Falso, S. Gallipeau & M. Stice. 2010. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *The Journal of Experimental Biology*, 213:921–933.

Hedberg, D. & M. Wallin. 2010. Effects of Roundup and glyphosate formulations on intracellular transport, microtubules and actin filaments in *Xenopus laevis* melanophores. *Toxicology In Vitro*, 24:795–802.

Hedges, S.B., W.E. Duellman & M.P. Heinicke. 2008. New World direct-developing frogs (Anura: Terrarana): molecular phylogeny, classification, biogeography, and conservation. *Zootaxa*, 1737:1–182.

Heinicke, M.P., W.E. Duellman, L. Trueb, D.B. Means, R.D. MacCulloch & S.B. Hedges. 2009. A new frog family (Anura: Terrarana) from South America and an expanded direct-developing clade revealed by molecular phylogeny. *Zootaxa*, 2211:1–35.

Hokanson, R., R. Fudge, R. Chowdhary & D. Busbee. 2007. Alteration of estrogen-regulated gene expression in human cells induced by the agricultural and horticultural herbicide glyphosate. *Human and Experimental Toxicology*, 26:747–752.

Holečková, B. 2006. Evaluation of the *in vitro* effect of glyphosate-based herbicide on bovine lymphocytes using chromosome painting. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 50:533-536.

Hopkins, W.A. 2007. Amphibians as models for studying environmental change. *Institute for Laboratory Animal Research Journal*, 48:270–277.

Howe, C.M., M. Berrill, B.D. Pauli, C.C. Helbring, K. Werry & N. Veldhoen. 2004. Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23:1928–1938.

Huang, D., Y. Zhang, Y. Wang, Z. Xie & W. Ji. 2007. Assessment of the genotoxicity in toad *Bufo raddei* exposed to petrochemical contaminants in Lanzhou Region, China. *Mutation Research*, 629:81–88.

Jha, A.N. 2008. Ecotoxicological applications and significance of the Comet assay. *Mutagenesis*, 23:207–221.

Kaiser, H. 1997. Origins and introductions of the Caribbean frog, *Eleutherodactylus johnstonei* (Leptodactylidae): management and conservation concerns. *Biodiversity and Conservation*, 6:1391–1407.

Kaiser, H., C.L. Barrio-Amorós, J.D. Trujillo, & J.D. Lynch. 2002. Expansion of *Eleutherodactylus johnstonei* in Northern South America: Rapid dispersal through human interactions. *Herpetological Review*, 33:290–294.

Kelly, D.W., R. Poulin, D. Tompkins & C.R. Townsend. 2010. Synergistic effects of glyphosate formulation and parasite infection on fish malformations and survival. *Journal of Applied Ecology*, 47:498–504.

Kobayashi, H., C. Sugiyama, Y. Morikawa, M. Hayashi & T. Sofuni. 1995. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Commun*, 3:103–115.

Lajmanovich, R.C., M. Cabagna, P.M. Peltzer, G.A. Stringhini & A.M. Attademo. 2005. Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles

(Amphibia: Hylidae) exposed to insecticide endosulfan. *Mutation Research*, 587:67–72.

Lajmanovich, R. C., M.T. Sandoval & P.M. Peltzer. 2003. Induction of mortality and malformation in *Scinax nasicus* tadpoles exposed to glyphosate formulations. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 70:612–618.

Langiano, C.V. & C.B.R. Martinez. 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 147:222–231.

Lee, R. & S. Steinert. 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research*, 544:43–64.

León, S.T., S.J. Burgos, P.C. Toro, B.C. Luengas, R.C. Ruiz & H.C. Romero. 2005. Observaciones al “Estudio de los efectos del Programa de Erradicación de Cultivos Ilícitos mediante aspersión aérea con el herbicida Glifosato (PECIG) y de los cultivos ilícitos en la salud humana y en el medio ambiente”. Bogotá, Instituto de Estudios Ambientales (IDEA) – Universidad Nacional de Colombia.

Lioi, M., M. Scarfi, A. Santoro, R. Barbieri, O. Zeni, F. Salvemini, D. Di Berardino & M. Ursini. 1998. Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant state in human lymphocytes exposed *in vitro* to glyphosate, vinclozolin, atrazine, and DPX-E9636. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 32: 39–46.

Lovell, D.P. & T. Omori. 2008. Statistical issues in the use of the Comet assay. *Mutagenesis*, 23:171–182.

Lushchak, O.V., O.I. Kubrak, J.M. Storey, K.B. Storey & V.I. Lushchak. 2009. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere*, 76:932–937.

Lynch, J.D. 1971. Evolutionary relationships, osteology, and zoogeography of leptodactyloid frogs. University of Kansas Museum of Natural History, Miscellaneous Publications, 53:1–238.

Lynch, J.D. & S.B. Arroyo. 2009. Risks to colombian amphibian fauna from cultivation of coca (*Erythroxylum coca*): A geographical análisis. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 72:974–985.

Maldonado, A. 2003. Daños genéticos en la frontera de Ecuador por las fumigaciones del Plan Colombia. Informe para la Defensoría del Pueblo de Ecuador dentro del expediente investigativo N° 9067-DAP-2002 instaurado “para determinar los impactos en el Ecuador, de las fumigaciones realizadas en la zona del Putumayo dentro del Plan Colombia”.

Mann, R.M. & J.R. Bidwell. 1999. The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of Southwestern Australian frogs. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 36:193–199.

Mann, R.M., R.V. Hyne, C.B. Choung & S.P. Wilson. 2009. Amphibians and agricultural chemicals: Review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution*, 157:2903–2927.

Mañas, F., L. Peralta, H. García, A. Weyers, L. Ugnia, I. Larripa, M. Gonzalez & N. Gorla. 2009. Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 28:37–41.

Mañas, F., M. González, H. García, A. Weyers, L. Ugnia, I. Larripa & N. Gorla. 2006. La genotoxicidad del herbicida glifosato evaluada por el ensayo cometa y por la formación de micronúcleos en ratones tratados. *Theoria*, 15:53–60.

Marc, J., O. Mulner-Lorillon & R. Bellé. 2004a. Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. *Biology of the Cell*, 96:245–249.

Marc, J., R. Belle, J. Morales, P. Cormier & O. Mulner-Lorillon. 2004b. Formulated Glyphosate Activates the DNA-Response Checkpoint of the Cell Cycle Leading to the Prevention of G2/M Transition. *Toxicological Sciences*, 82:436–442.

Marshall, E.J.P., K.R. Solomon & G. Carrasquilla. 2009. Coca (*Erythroxylum coca*) control is affected by glyphosate formulations and adjuvants. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 72:930–936.

Martínez, A., I. Reyes & N. Reyes. 2007. Citotoxicidad del glifosato en células mononucleares de sangre periférica humana. *Biomédica*, 27:594–604.

McKelvey-Martin, V.J., M.H.L. Green, P. Schmezer, B.L. Pool-Zobel, M.P. De Meo & A. Collins. 1993. The single cell gel electrophoresis assay (Comet assay): A European review. *Mutation Research*, 288:47–63.

Meintières, S., F. Nessler, M. Pallardy & D. Marzin. 2003. Detection of ghost cells in the standard alkaline Comet assay is not a good measure of apoptosis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 41:260–269.

Mitchelmore, C.L. & J.K. Chipman. 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the Comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research*, 399:135–147.

Mladinic, M., S. Berend, A.L. Vrdoljak, N. Kopjar, B. Radic & D. Zeljezic. 2009. Evaluation of genome damage and its relation to oxidative stress induced by glyphosate in human lymphocytes *in vitro*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 50:800-807.

Monroy, C.M., A.C. Cortés, D.M. Sicard & H.R. Groot. 2005. Cytotoxicity and genotoxicity of human cells exposed *in vitro* to glyphosate. *Biomédica*, 25:335–345.

Mouchet, F., L. Gauthier, C. Mailhes, V. Ferrier & A. Devaux. 2006. Comparative evaluation of genotoxicity of captan in amphibian larvae (*Xenopus laevis* and *Pleurodeles waltl*) using the Comet assay and the Micronucleus test. *Environment toxicology*, 21:264–277.

O’Callaghan, Y.C., J.A. Woods & N.M. O’Brien. 2001. Limitations of the single cell gel electrophoresis assay to monitor apoptosis in U937 and HepG2 cells exposed to 7 $\beta$ -hydroxycholesterol. *Biochemical Pharmacology*, 61:1217–1226.

Oldham, J. & R. Massey. 2002. Aerial spraying in Colombia: Health and environmental effects. Institute for Science and Interdisciplinary Studies. Carleton University. Canada.

Olive, P.L. & J.P. Banáth. 1995. Sizing highly fragmented DNA in individual apoptotic cells using the Comet assay and a DNA crosslinking agent. *Experimental Cell Research*, 221:19–26.

Olive, P.L., D. Wlodek, R.E. Dufund & J.P. Banáth. 1992. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Experimental Cell Research*, 198:259–267.

Olive, P.L., G. Frazer & J.P. Banáth. 1993. Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the Comet assay. *Radiation Research*, 136:130–136.

Olive, P.L., J.P. Banáth & R.E. Durand. 1990. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "Comet" assay. *Radiation Research*, 122:86–94.

Ortega, J.E., A. Jerez & M.P. Ramírez-Pinilla. 2001. Geographic distribution: *Eleutherodactylus johnstonei*. *Herpetological Review*, 32:269.

Ortega, J.E., V.H. Serrano & M.P. Ramírez-Pinilla. 2005. Reproduction of an introduced population of *Eleutherodactylus johnstonei* at Bucaramanga, Colombia. *Copeia*, 3:642–648.

Pauli, B., C.M. Howe & M. Berrill. 2001. Environmental contaminants and amphibians in Canada. Poster presentation at the Society of Environmental Toxicology and Chemistry. Baltimore.

Paz-y-Miño., M.E. Sánchez, M. Arévalo, M.J. Muñoz, T. Witte, G.O. De-la-Carrera & P.E. Leone. 2007. Evaluation of DNA damage in an Ecuadorian population exposed to glyphosate. *Genetics and Molecular Biology*, 30:456–460.

Peixoto, F. 2005. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. *Chemosphere*, 61:1115–1122.

Peña-Llopis, S., M.D. Ferrando & J.B. Peña. 2003. Fish tolerance to organophosphate-induced oxidative stress is dependent on the glutathione metabolism and enhanced by N-acetylcysteine. *Aquatic Toxicology*, 65:337–360.

Perkins, P.J., H.J. Boermans & G.R. Stephenson. 2000. Toxicity of glyphosate and triclopyr using the Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19:940–945.

Piešova, E. 2005. The effect of glyphosate on the frequency of micronuclei in bovine lymphocytes *in vitro*. *Acta Veterinaria-Beograd*, 55:3–13.

Pimentel, D., A. Greiner & T. Bashore. 1998. Economic and environmental costs of pesticide use. In: Rose, J. (Ed.), *Environmental Toxicology: Current Developments*. Gordon and Breach Science Publishers, UK, 121–187.

Poletta, G.L., A. Larriera, E. Kleinsorge & M.D. Mudryc. 2009. Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup® (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. *Mutation Research*, 672:95–102.

Prasad, S., S. Srivastava, M. Singh & Y. Shukla. 2009. Clastogenic effects of glyphosate in bonemarrow cells of swiss albino mice. *Journal of Toxicology*, 2009:308985.

Quaranta, A., V. Bellantuono, G. Cassano & C. Lippe. 2009. Why amphibians are more sensitive than mammals to xenobióticos. *Plos One*, 4(11):e7699.

Raipulis, J., M.M. Toma & M. Balode. 2009. Toxicity and genotoxicity testing of roundup. 63:29–32.

Rajaguru, P., R. Kalpana, A. Hema, S. Suba, B. Baskarasethupathi, P.A. Kumar & K. Kalaiselvi. 2001. Genotoxicity of some sulfur dyes on tadpoles (*Rana hexadactyla*) measured using the Comet assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 38:316–322.

Ralph, S. & M. Petras. 1998a. Comparison of sensitivity to methyl methane sulphonate among tadpole developmental stages using the alkaline single-cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 31:374–382.

Ralph, S. & M. Petras. 1998b. Caged amphibian tadpoles and in situ genotoxicity monitoring of aquatic environments with the alkaline single cell gel electrophoresis (comet) assay. *Mutation Research*, 413:235–250.

Ralph, S., M. Petras, R. Pandrangi & M. Vrzoc. 1996. Alkaline single-cell gel (Comet) assay and genotoxicity monitoring using two species of tadpoles. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 28:112–120.

Ramírez-Duarte, W.F., I.S. Rondón-Barragán & P.R. Eslava-Mocha. 2005. Surfactantes asociados a herbicidas: Efectos sobre organismos acuáticos. *Orinoquia*, 9:45–59.

Rampoldi, A., S. Hang & E. Barriuso. 2008. Glyphosate mineralization: Effect of temperature and soybean and corn crop residue. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 68:13–20.

Relyea, R.A. 2003. Predator cues and pesticides: A double dose of danger for amphibians. *Ecological Applications*, 13:1515–1521.

Relyea, R.A. 2005a. The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological Applications*, 15:1118–1124.

Relyea, R.A. 2005b. The lethal impacts of Roundup and predatory stress on six species of North American tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48:351–357.

Relyea, R.A. & D.K. Jones. 2009. The toxicity of Roundup Original Max<sup>®</sup> to 13 species of larval amphibians. *Environmental toxicology and chemistry*, 28:2004–2008.

Relyea, R.A. & J.T. Hoverman. 2008. Interactive effects of predators and a pesticide on aquatic communities. *Oikos*, 117:1647–1658.

Relyea, R.A. & N. Diecks. 2008. AN unforeseen chain of events: lethal effects of pesticides on frogs at sublethal concentrations. *Ecological Applications*, 18:1728–1742.

Relyea, R.A. & N. Mills. 2001. Predator-induced stress makes the pesticide carbaryl more deadly to gray treefrog tadpoles (*Hyla versicolor*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98:2491–2496.

Relyea, R.A., N.M. Schoepner & J.T. Hoverman. 2005. Pesticides and amphibians: The importance of Community context. *Ecological applications*, 15:1125–1134.

Richard, S., S. Moslemi, H. Sipahutar, Benachour & G.E. Séralini. 2005. Differential effects of glyphosate and Roundup on human placental cells and aromatase. *Environmental Health Perspectives*, 113:716–720.

Rohr, J. R., J. L. Kerby & A. Sih. 2006. Community ecology as a framework for predicting contaminant effects. *Trends in Ecology and Evolution*, 21:606–613.

Rohr, J.R. & P.W. Crumrine. 2005. Effects of an herbicide and an insecticide on pond community structure and processes. *Ecological Applications*, 15:1135–1147.

Rohr, J.R., T.R. Raffel, S.K. Sessions & P.J. Hudson. 2008. Understanding the net effects of pesticides on amphibian trematode infections. *Ecological Applications*, 18:1743–1753.

Rondón-Barragán, I.S., D. Pardo-Hernández & P.R. Eslava-Mocha. 2010. Effects of herbicides on immune system: An approach to fish. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*, 4:1–22.

Ruiz-Carranza, P.M., M.C. Ardila-Robayo & J.D. Lynch. 1996. Lista actualizada de la fauna anfibia de Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 20:365–415.

Samuel, O. 2001. Riesgos inherentes a la utilización del Roundup<sup>md</sup> para el control de plantaciones de cocaína en Colombia. Informe preparado para la Organización Panamericana de la Salud. Institut national de santé publique du Québec (INSPQ), Canada.

Schneider, M.I., N. Sanchez, S. Pineda, H. Chi & A. Ronco. 2009. Impact of glyphosate on the development, fertility and demography of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae): Ecological approach. *Chemosphere*, 76:1451–1455.

Sih, A., A.M. Bell & J.L. Kerby. 2004. Two stressors are far deadlier than one. *Trends in Ecology and Evolution*, 19:274–276.

Singh, N. P. 2000a. A simple method for accurate estimation of apoptotic cells. *Experimental Cell Research*, 256:328–337.

Singh, N.P. 2000b. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. *Mutation Research*, 455:111–127.

Singh, N.P. 2005. Apoptosis assessment by the DNA Diffusion assay. *Chemosensitivity*, 2:55–57.

Singh, N.P., M.T. McCoy, R.R. Tice & E.L. Schneider. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175:184–191.

Sobrero, C., M.L. Martin & A. Ronco. 2007. Phytotoxicity of the Roundup<sup>®</sup> Max herbicide on the non-target species *Lemna gibba* in field and laboratory studies. *Hidrobiológica*, 17:31–39.

Solomon, K. R., A. Anadón, G. Carrasquilla, A. Cerdeira, J. Marshall & L.H. Sanin. 2007. Coca and poppy eradication in Colombia: Environmental and human health assessment of aerially applied glyphosate. *Reviews of Environmental Contamination & Toxicology*, 190:43–125.

Solomon, K.R. & E.J.P. Marshall. 2009. Production of Illicit Drugs, the Environment, and Human Health. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 72:913.

Solomon, K.R., A. Anadón, A.L. Cerdeira, J. Marshall & L.H. Sanín. 2005. Environmental and human health assessment of aerial spray program for coca and poppy control in Colombia. A report prepared for the Inter-American Drug Abuse Control Commission (CICAD) section of the Organization of American States (OAS). Washington, DC. USA.

Solomon, K.R., E.J.P. Marshall & G. Carrasquilla. 2009. Human health and environmental risks from the use of glyphosate formulations to control the production of coca in Colombia: Overview and conclusions. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 72:914–920.

Tice, R.R., E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.-C. Ryu & Y.F. Sasaki. 2000. Single cell gel/Comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35:206–221.

Tsui, M.T.K. & L.M. Chu. 2004. Comparative toxicity of glyphosate-based herbicides: Aqueous and sediment porewater exposures. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 46:316–323.

U.S. Department of State, Bureau for International Narcotics and Law Enforcement Affairs, Report on issues related to the aerial eradication of illicit coca in Colombia 2002. <http://www.state.gov/p/inl/rls/rpt/aeicc/13234.htm>.

U.S. Environmental Protection Agency. 1993a. Dunnett Program, Ecological Monitoring Research Division, Environmental Monitoring Systems Laboratory, U. S. Environmental Protection Agency. <http://www.epa.gov/eerd/stat2.htmS>.

U.S. Environmental Protection Agency. 1993b. Probit Program, Ecological Monitoring Research Division, Environmental Monitoring Systems Laboratory, U. S. Environmental Protection Agency. <http://www.epa.gov/eerd/stat2.htmS>.

UNODC. 2010. Colombia: Monitoreo de cultivos de coca. Censo de cultivos de coca 2009. Oficina de las Naciones Unidas Contra la Droga y el Delito & Gobierno de Colombia. <http://www.unodc.org/colombia/es/censocultivos.html>.

Valencia-Otero, L.C., Fuentes-Lorenzo, J.L. & Ramírez-Pinilla, M.P. 2010. Estimados de daños genéticos en la rana de desarrollo directo *Eleutherodactylus johnstonei* (anura: Eleutherodactylidae) mediante el ensayo cometa. Trabajo de Grado presentado como requisito para optar al título de Biólogo. Universidad Industrial de Santander.

Vera-Candioti, J., G.S. Natale, S. Soloneski, A.E. Ronco & M.L. Larramendy. 2010. Sublethal and lethal effects on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles exerted by the pirimicarb-containing technical formulation insecticide Aficida<sup>®</sup>. *Chemosphere*, 78:249–255.

Wada, S., T.A. Khoa, Y. Kobayashi, T. Funayama, K. Yamamoto, M. Natsuhori & N. Ito. 2003. Detection of radiation-induced apoptosis using the Comet assay. *Journal of Veterinary Medical Science*, 65:1161–1166.

Walsh, J., G. Sánchez-Garzoli & Y. Salinas-Abdala. 2008. La aspersión aérea de cultivos de uso ilícito en Colombia: Una estrategia fallida. Informe preparado para la Oficina en Washington para Asuntos Latinoamericanos (WOLA). Estados Unidos.

Wildlife International. 2006. Glyphosate–Cosmo-Flux<sup>®</sup>–coca mix: A 96-hour static-renewal acute toxicity test with the African clawed-frog tadpole (*Xenopus laevis*). Final report. Technical report 628A-101, Wildlife International. Easton, MD, USA.

Wilkins, R.C., B.C. Kutzner, M. Truong, J. Sanchez-Dardon & J.R.N. McLean. 2002. Analysis of radiation-induced apoptosis in human lymphocytes: Flow cytometry using annexin V and propidium iodide versus the neutral Comet assay. *Cytometry*, 48:14–19.

Wojtaszek, B.F., B. Staznik, D.T. Chartrand, G.R. Stephenson & D.G. Thompson. 2004. Effects of Vision<sup>®</sup> herbicide on mortality, avoidance response, and growth of amphibian larvae in two forest wetlands. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 23:832–842.










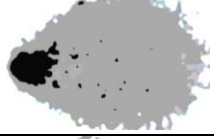


Yin, X.H., G.N. Zhu, X.B. Li & S.Y. Liu. 2009. Genotoxicity evaluation of chlorpyrifos to amphibian Chinese toad (Amphibian: Anura) by Comet assay and Micronucleus test. *Mutation Research*, 680:2–6.

Yin, X.H., S.N. Li, L. Zhang, G.N. Zhu & H.S. Zhuang. 2008. Evaluation of DNA damage in Chinese toad (*Bufo bufo gargarizans*) after in vivo exposure to sublethal concentrations of four herbicides using the comet assay. *Ecotoxicology*, 17:280–286.

Zeljezic, D., V. Garaj-Vrhovac & P. Perkovic. 2006. Evaluation of DNA damage induced by atrazine and atrazine-based herbicide in human lymphocytes in vitro using a Comet and DNA Diffusion assay. *Toxicology In Vitro*, 20:923–935.

## ANEXOS

Anexo 1. Caracterización visual de los grados de daño utilizados en el presente estudio.

CLASES DE DAÑO	FOTOGRAFIA	ESQUEMA
<p style="text-align: center;"><b>Nivel 0</b></p> <p>Cabeza ligeramente ovalada rodeada por una capa fina de gránulos en forma de halo.</p>		
<p style="text-align: center;"><b>Nivel 1</b></p> <p>Cabeza ligeramente ovalada con una pequeña cola formada puntos dispersos en uno de los lados de la cabeza.</p>		
<p style="text-align: center;"><b>Nivel 2</b></p> <p>Cabeza semicircular con una cola originada desde la mitad o parte delantera de la cabeza y se ensancha ligeramente en el centro.</p>		
<p style="text-align: center;"><b>Nivel 3</b></p> <p>Cabeza semicircular con una cola más definida desde el inicio de la cabeza y se ensancha significativamente en el centro.</p>		
<p style="text-align: center;"><b>Nivel 4</b></p> <p>Cabeza pequeña de forma circular con una cola que ocupa la mayoría de la imagen con una intensidad significativa.</p>		
<p style="text-align: center;"><b>Apoptosis</b></p> <p>Células con un núcleo pequeño rodeado por un halo de fragmentos del núcleo con un límite nebuloso.</p>		

Tomado de Valencia-Otero *et al.* (2010).

Anexo 2. Porcentaje de mortalidad aproximado en individuos adultos y neonatos de *Eleutherodactylus johnstonei* expuestos a diferentes concentraciones de la mezcla Roundup® SL - Cosmoflux 411F®.

Porcentajes de Mortalidad en los Ensayos de Toxicidad										
Hembras – Machos						Neonatos				
	3.69	4.94	6.19	7.38	11.1	0.74	1.48	2.21	2.95	3.69
<b>24 h</b>	0% - 4%	6% - 18%	39% - 38%	44% - 79%	61% - 71%	0%	8%	21%	46%	67%
<b>48 h</b>	0% - 7%	22% - 33%	55% - 50%	56% - 88%	83% - 100%	0%	42%	58%	92%	96%
<b>72 h</b>	0% - 13%	22% - 46%	72% - 83%	77% - 91%	100% - 100%	0%	54%	71%	100%	100%
<b>96 h</b>	6% - 13%	22% - 46%	72% - 83%	77% - 91%	100% - 100%	4%	75%	96%	100%	100%

Las concentraciones se expresan en kilogramos de equivalente ácido de glifosato por hectárea (Kg e.a/ha).

Anexo 3. Daño en el ADN de células sanguíneas nucleadas de *Eleutherodactylus johnstonei* expuestas *in vitro*, a un rango de concentraciones de la mezcla Roundup® SL - Cosmoflux 411F®.

Daño en el ADN													
T <sub>E</sub>	%N <sub>A/N</sub>	C (-)		4.625		9.25		18.5		37		74	
		AU <sub>T</sub>	AU <sub>R</sub>	AU <sub>T</sub>	AU <sub>R</sub>	AU <sub>T</sub>	AU <sub>R</sub>	AU <sub>T</sub>	AU <sub>R</sub>	AU <sub>T</sub>	AU <sub>R</sub>	AU <sub>T</sub>	AU <sub>R</sub>
<b>5 m</b>	6.5 ± 3	76.5 ± 19	71.5 ± 17	159 ± 4	148.5 ± 7	177.5 ± 9	166 ± 8	186 ± 12	174 ± 12	188.5 ± 29	176 ± 27	195.5 ± 3	183 ± 3
<b>10 m</b>	7 ± 2	78 ± 2	72.5 ± 1	142 ± 2	132 ± 2	153 ± 8	142.5 ± 7	160.5 ± 15	150 ± 14	174 ± 12	162 ± 11	196.5 ± 15	183 ± 14
<b>20 m</b>	8.5 ± 3	77 ± 18	70.5 ± 17	158.5 ± 7	145 ± 6	207 ± 12	189.5 ± 11	225.5 ± 5	207 ± 4	229.5 ± 37	210 ± 34	241.5 ± 37	221 ± 34
<b>40 m</b>	5.5 ± 3	79 ± 12	73 ± 11	172.5 ± 17	163 ± 16	188.5 ± 7	178 ± 6	209 ± 2	198 ± 1	210.5 ± 7	199 ± 6	215 ± 8	203 ± 8
<b>1 h</b>	7.5 ± 2	76 ± 6	70 ± 5	161.5 ± 9	149.5 ± 9	174.5 ± 19	161.5 ± 17	182 ± 12	169 ± 11	194 ± 8	179.5 ± 7	196 ± 10	181.5 ± 9
<b>3 h</b>	9.5 ± 3	74.5 ± 7	67.5 ± 7	104.5 ± 1	94.5 ± 1	106.5 ± 1	96.5 ± 1	110 ± 2	100 ± 1	124 ± 16	112 ± 14	146.5 ± 11	133 ± 10
<b>6 h</b>	10.5 ± 5	74.5 ± 3	66.5 ± 3	120 ± 2	107.5 ± 1	120 ± 4	107.5 ± 3	125.5 ± 5	112 ± 5	127.5 ± 5	114 ± 4	135.5 ± 5	121.5 ± 5
<b>12 h</b>	9 ± 2	77 ± 4	70 ± 4	145 ± 4	132 ± 4	156.5 ± 1	142.5 ± 1	173.5 ± 19	158 ± 18	176.5 ± 5	160.5 ± 5	196 ± 4	178.5 ± 3
<b>24 h</b>	10.5 ± 2	71.5 ± 1	64 ± 0	148.5 ± 15	133 ± 14	169.5 ± 21	152 ± 19	170 ± 2	152 ± 2	174.5 ± 25	156 ± 23	176 ± 10	157.5 ± 9

Los valores representan la media y su error estándar correspondiente. T<sub>E</sub> indica el tiempo de exposición a la mezcla. AU (de sus siglas en inglés) denota las unidades arbitrarias, donde AU<sub>T</sub> es el daño total medido mediante el ensayo Cometa, AU<sub>R</sub> es el daño remanente no asociado a eventos apoptóticos y/o necróticos. %N<sub>A/N</sub> expresa el porcentaje de núcleos con apoptosis y/o necrosis. Las concentraciones se expresan en microgramos de equivalente ácido sobre mililitro de solución (µg e.a./mL).

Anexo 4. Daño en el ADN de células sanguíneas nucleadas de *Eleutherodactylus johnstonei* expuestas *in vivo*, a un rango de concentraciones de la mezcla Roundup® SL - Cosmoflux 411F®.

Daño en el ADN											
T <sub>E</sub>	%N <sub>A/N</sub>	C (-)		0.055		0.092		0.129		0.166	
		AU <sub>T</sub>	AU <sub>R</sub>	AU <sub>T</sub>	AU <sub>R</sub>	AU <sub>T</sub>	AU <sub>R</sub>	AU <sub>T</sub>	AU <sub>R</sub>	AU <sub>T</sub>	AU <sub>R</sub>
<b>0.5 h</b>	5.8 ± 0.25	69.8 ± 2.39	65.8 ± 2.39	80.3 ± 2.32	75.8 ± 2.06	89.5 ± 2.36	84.3 ± 2.14	122.3 ± 4.5	115.3 ± 4.09	141 ± 1.47	133 ± 1.47
<b>1 h</b>	6.8 ± 1.25	64.3 ± 1.65	60 ± 1.41	109.5 ± 6.12	95.5 ± 10.3	111.3 ± 3.71	103.8 ± 3.47	127.5 ± 8.01	119 ± 7.38	148.5 ± 2.22	138.5 ± 2.22
<b>2 h</b>	5 ± 0.91	69 ± 2.12	65.5 ± 1.85	112.5 ± 2.4	107 ± 2.12	113.8 ± 4.59	108.3 ± 4.31	118.8 ± 9.15	112.8 ± 8.58	137.3 ± 4.03	130.5 ± 3.8
<b>4 h</b>	4.3 ± 0.75	70.3 ± 1.89	67.3 ± 1.89	105.3 ± 0.75	100.8 ± 0.48	148.4 ± 3.33	141.8 ± 3.04	176.5 ± 3.88	169 ± 3.67	177.5 ± 2.10	169.8 ± 1.89
<b>8 h</b>	3.8 ± 0.48	76.5 ± 1.32	73.5 ± 1.32	150 ± 5.82	144.5 ± 5.56	166 ± 1.78	160 ± 1.78	194.5 ± 2.22	187.5 ± 2.22	217.5 ± 30.3	209.3 ± 29.3
<b>16 h</b>	4.5 ± 0.65	76 ± 2.2	72.5 ± 1.94	111.3 ± 3.82	106.3 ± 3.82	112.3 ± 2.06	107.3 ± 2.06	127.3 ± 2.29	121.3 ± 2.29	152.8 ± 6.8	146.3 ± 6.51
<b>24 h</b>	4.8 ± 0.48	73.5 ± 2.5	70 ± 2.27	110.8 ± 2.25	105.5 ± 2.06	114.3 ± 1.7	109 ± 1.47	128.8 ± 3.45	122.5 ± 3.23	179 ± 12.73	170.5 ± 12.1

Los valores representan la media y su error estándar correspondiente. T<sub>E</sub> indica el tiempo de exposición a la mezcla. AU (de sus siglas en ingles) denota las unidades arbitrarias, donde AU<sub>T</sub> es el daño total medido mediante el ensayo Cometa, AU<sub>R</sub> es el daño remanente no asociado a eventos apoptóticos y/o necróticos. %N<sub>A/N</sub> expresa el porcentaje de núcleos con apoptosis y/o necrosis. Las concentraciones se expresan en kilogramos de equivalente ácido de glifosato por hectárea (Kg e.a/ha).