



EFFECTOS GENOTÓXICOS Y CITOTÓXICOS DE SOJA TRANSGÉNICA
(VARIEDAD NUEVA ANDREA 66RR) EN MEDULA OSEA DE RATONES
SWISS ALBINOS

HAJIME GUILLERMO KURITA OYAMADA

Tesis presentada al Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas de la Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica, de la Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de Magíster en *Scientiae* en Biotecnología; Curso de Maestría en Biotecnología.

SAN LORENZO – PARAGUAY

JUNIO - 2017

**EFECTOS GENOTÓXICOS Y CITOTÓXICOS DE SOJA (VARIEDAD
NUEVA ANDREA 66RR) EN MEDULA OSEA DE RATONES SWISS
ALBINOS**

HAJIME GUILLERMO KURITA OYAMADA

Orientador: Dra. Biol. **EDITH ALBA LUZ SEGOVIA CORRALES**

Co-orientador: MSc. **PASTOR ENMANUEL PÉREZ ESTIGARRIBIA**

Tesis presentada al Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas de la Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica, de la Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de Magíster en *Scientiae* en Biotecnología; Curso de Maestría en Biotecnología.

SAN LORENZO - PARAGUAY

JUNIO - 2017

Kurita Oyamada, Hajime Guillermo

Efectos genotóxicos y citotóxicos de soja transgénica (variedad Nueva Andrea 66RR) en ratones Swiss albinos/ Hajime Guillermo Kurita Oyamada. --Asunción: Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas, Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica, UNA, 2017.

56 p, ;30 cm.

Tesis (Magister en Ciencias en Biotecnología). – Universidad Nacional de Asunción, Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica.

1. Soja transgénica.
2. Soja variedad Nueva Andrea 66RR
3. Efectos genotóxicos.
4. Efectos citotóxicos.
5. Micronúcleos.
6. Ratones Swiss albinos.
7. Tesis y Disertaciones Académicas – Paraguay. I. Título.

CDD 660.6

**EFFECTOS GENOTÓXICOS Y CITOTÓXICOS DE SOJA (VARIEDAD
NUEVA ANDREA 66RR) EN MEDULA OSEA DE RATONES SWISS
ALBINOS**

HAJIME GUILLERMO KURITA OYAMADA

Aprobado en fecha 21 de junio de 2017

Tribunal Examinador

Dra. Biol. Edith Alba Luz Segovia Corrales CEMIT/DGICT/UNA

MSc. Pastor Enmanuel Pérez Estigarribia FACEN/UNA

Biol. Dra. Nilsa Elizabeth González Brítez IICS/UNA

Edith Alba Luz Segovia Corrales
Orientador

Prof. Dr. José Manuel Silvero Arévalos
Encargado de Despacho
Dirección General de Postgrado y Relaciones Internacionales

DEDICATORIA

A los estudiantes que me acompañaron, principalmente a los pasantes Jessy, Fabi, Abel, Gi, Carlos, Angie y Adri ellos que fueron pilares y esperanza personal para seguir apostando por la ciencia en nuestro país.

AGRADECIMIENTO

A mis Padres, por la eterna paciencia de tener a un hijo ya “grande” aún en etapa de estudios.

A mis colegas Biólogos, porque siempre me hicieron ver la importancia “Biológica” de las cosas.

A los otros profesionales del área, por permitirme desarrollar profesionalmente.

A la Dra. Margarita Samudio por los tests estadísticos realizados.

Y finalmente al staff de la Maestría en este caso individualizado por la Orientadora, por permitir el desarrollo de la Investigación de la UNA.

EFFECTOS GENOTÓXICOS Y CITOTÓXICOS DE SOJA (VARIEDAD NUEVA ANDREA 66RR) EN MEDULA OSEA DE RATONES SWISS ALBINOS

Autor: Hajime Guillermo Kurita Oyamada
Orientadora: Biol. Dra. Edith Alba Luz Segovia Corrales
Co-Orientador: Pastor Pérez Estigarribia

RESUMEN

El presente trabajo estudia los posibles efectos tóxicos a nivel genético y citológico que podría ocasionar el consumo de soja transgénica producida en el Paraguay. Se planteó como objetivo dilucidar los potenciales efectos genotóxicos y citotóxicos de soja transgénica Nueva Andrea 66RRN obtenidas en un campo experimental particular con diferentes dosis del herbicida Glifosato. Como modelo experimental biológico se utilizó ratones *Mus musculus* de la cepa Swiss albinos adquiridos del bioterio del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud de la UNA. Como controles se utilizó soja convencional de la variedad BRS 282 para el control negativo y el químico Ciclofosfamida como control positivo. Los tratamientos consistieron en la administración mediante ingesta de las sojas, en forma de pellets elaborados en el laboratorio haciendo una mezcla de proporción 1:1:3 siendo estos: soja, almidón de mandioca y balanceado comercial, respectivamente. El periodo de tratamiento fue de 14 días. Los parámetros evaluados fueron presencia de Micronúcleos en Eritrocitos policromáticos y porcentaje de Eritrocitos policromáticos en extendido de médula ósea; para el ensayo de genotoxicidad y citotoxicidad, respectivamente. Para descartar alguna diferencia en la calidad nutricional que pudiese interferir en los ensayos, también se ha realizado ensayos de composición nutricional de las sojas transgénicas. No se ha observado un incremento en la proporción de Eritrocitos policromáticos micronucleados en ningún tratamiento con las sojas transgénicas ni convencional; si en el control positivo y tampoco diferencias en el porcentaje de eritrocitos policromáticos sobre los normocromáticos. Los conteos fueron testeados mediante análisis estadísticos descriptivos y contrastes de hipótesis tanto paramétricos como no paramétricos. Los resultados estadísticos arrojaron valores por debajo del nivel de significancia al 0.05 ($p < 0.05$) cuando se comparó las medias pareadas contra el control negativo, no así para las comparaciones con el control positivo, donde sí se observó una significancia estadística esperada. El examen de composición nutricional tampoco ha evidenciado una diferencia sustancial con respecto a la soja convencional. Por lo que se puede concluir que, en ratones Swiss albinos, en estas condiciones laborales, el consumo del producto biotecnológico, la soja transgénica variedad Nueva Andrea 66RR, no conlleva a riesgos de genotoxicidad y citotoxicidad.

Summary

In this work are evaluated the possible toxicological effects due to consumption of transgenic soybean produced in Paraguay. The objective was to assess potential adverse effects in terms of genotoxicity and cytotoxicity of a transgenic soybean Nueva Andrea 66RR obtained from a private field and cultured with different Glyphosate doses. As experimental model were used *Mus musculus* albino Swiss mice. As controls of the experiment were used conventional non-transgenic soybean and as positive control Cyclophosphamide. Treatments consisted in consumption of manufactured pellets with such soybeans mixed with cassava starch and commercial pellet in the following proportion 1:1:3. Treatment duration was 14 days. Evaluated endpoints were presence of Micronuclei in Polychromatic Erythrocytes and proportion of them in bone marrow smear for genotoxicity and cytotoxicity respectively. To eliminate differences due to nutritional imbalance was performed nutritional quality test of transgenic soybeans. There were not observed any increase in proportion of micronucleated cell in all treatment, nor differences in percentage of polychromatic erythrocytes. Values were contrasted with non-parametric test, which gave no statistical significance ($p < 0.05$) when compared to negative control; however, when compared with positive control was observed statistical differences, as expected. Nutritional quality assay performed gave no substantial differences to conventional soybean. Therefore, in the case of Swiss albino mice, in these laboratory conditions, the consumption of the biotech product, the transgenic soybean Nueva Andrea 66RR, does not lead to risks of genotoxicity and cytotoxicity..

Author: Hajime Guillermo Kurita Oyamada
Advisor: Edith Alba Luz Segovia Corrales, PhD.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. REVISIÓN DE LA LITERATURA	3
2.1. La soja	3
2.1.1. La soja en Paraguay	3
2.2. La Biotecnología	4
2.2.1. La soja transgénica resistente a herbicida Glifosato	5
2.2.1.1. Herbicida Glifosato	6
2.2.1.2. Generación de soja transgénica	6
2.2.2. Descripción de las modificaciones genéticas del cultivar transgénico ..	6
2.3. Estudios de toxicología	7
2.3.1. Genética Toxicológica	8
2.3.2. Análisis de células micronucleadas.....	9
2.3.3. Ensayos de Citotoxicidad.....	9
3. METODOLOGÍA.....	11
3.1. Materiales	11
3.1.1. Obtención de muestra de soja	11
3.2. Composición nutricional	11
3.3. Detección de Glifosato y ácido aminometilfosfónico (AMPA) mediante HPLC/FLD	12
3.4. Montaje de los animales y Bienestar animal	12
3.5. Preparación del alimento	13
3.6. Evaluación del potencial tóxico de la soja	14
3.6.1. Test de Micronúcleos (MN) (Smichd y col. 1975)	14
3.6.2. Estudio de citotoxicidad.....	15
3.7. Estadística.....	15

4.	RESULTADOS	16
4.1.	Muestras de Soja	16
4.2.	Composición Nutricional de la Soja transgénica	16
4.3.	Detección de Glifosato y AMPA.....	18
4.4.	Conteo de Micronúcleos.....	18
4.5.	Evaluación de la Citotoxicidad de la soja transgénica	20
4.6.	Cuadro comparativo de promedio de pesos	21
5.	DISCUSIÓN	23
5.1.	Obtención de la soja a partir de parcelas situadas en el Departamento de Itapúa ¡Error! Marcador no definido.	
5.2.	Confirmación de la presencia del transgén mediante una aplicación del Glifosato superior al establecido por el fabricante. ¡Error! Marcador no definido.	
5.3.	Los resultados del análisis mediante HPLC no han detectado residuos de Glifosato ni AMPA	¡Error! Marcador no definido.
5.4.	El balanceado enriquecido con soja transgénica es igual al convencional en cuanto a calidad nutricional.....	¡Error! Marcador no definido.
6.	CONCLUSIÓN.....	27
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
8.	ANEXOS	49
8.1.	Informe del técnico agricultor, Ing. Agr. Vicente Garcete.....	50
8.2.	Materiales Utilizados.....	55

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Frecuencia de Micronúcleos	20
Figura 2. Muestra de Soja con sus respectivos tratamientos con Glifosato	55
Figura 3. Disposición de los Raks de los animales utilizados en el ensayo	56
Figura 4. Proceso de elaboración de Pellet a partir de soja transgénica, balanceado y almidón de mandioca en proporción 1:1:3	56

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Comparación de producción de granos desde 1993 a 2016 en miles de toneladas y el crecimiento. Fuente CAPECO	5
Tabla 2. Composición Nutricional de soja tanto convencional como transgénica con diferentes tratamientos de Glifosato	17
Tabla 3 Detección de Glifosato y AMPA con la técnica de HPLC.	18
Tabla 4 Conteo de Eritrocitos normo cromáticos, poli cromáticos, PolicromáticosMN (EPCMN) en ratones tratados con soja convencional y transgénica	19
Tabla 5. Ensayo de Citotoxicidad indicado por el porcentaje de Eritrocitos Policromáticos (EPC) en un total de 200 células eritrocitarias de médula ósea. No se observa diferencias significativas en dicho porcentaje. G-test, $p>0.05$	21
Tabla 6 Pesos al inicio y final de tratamiento con régimen alimenticio ad libitum.	22
Tabla 7. Resumen sobre estudios de toxicidad en modelo murino sobre el consumo de productos biotecnológicos con diferentes puntos finales de evaluación y tiempos de tratamientos. Extraído de Snell et al., (2012)	57

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS, SÍMBOLOS

AMPA	Ácido aminometilfosfónico
CAPECO	Cámara Paraguaya de Exportadores y Comercializadores de Cereales y Oleaginosas
CAPPRO	Cámara Paraguaya de Procesadores de Oleaginosas y Cereales
CBD	Convenio sobre la Diversidad Biológica
CEMIT	Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas
CP	Control positivo / Ciclofosfamida
CP4	Cepa de <i>Agrobacterium</i> resistente al herbicida Glifosato
DNA/ADN	Ácido desoxirribonucleico
ECHA	En inglés, Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas
EEUU	Estados Unidos
EFSA	En inglés, Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EPSPS	En inglés, Enzima: 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa
ENC	Eritrocito Normocromático
EPC	Eritrocito Policromático
EPCMN	Eritrocito Policromático Micronucleado
FAO	En inglés, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación
FDA	En inglés, Administración de drogas y alimentos
FLD	En inglés, detector de fluorescencia
GM	Genéticamente Modificado
HPLC	En inglés, cromatografía líquida de alta eficacia
LD/LQ	Límite de Detección/ Límite de Cuantificación
MN	Micrónúcleo
NAS	En inglés, Academia Nacional de Ciencias de los EEUU.
OECD/OCDE	Organización para la Cooperación y Desarrollo Económicos
OGM	Organismo Genéticamente Modificado

SFB/FBS	Suero fetal Bovino
UNA	Universidad Nacional de Asunción
USFDA	En inglés, United States Food and Drug Administration
USDA	En inglés, United States Department of Agriculture
WHO	En inglés, Organización Mundial de la Salud

1. INTRODUCCIÓN

El presente trabajo de investigación pretende cubrir un área de interés tan controversial como lo es el consumo de organismos genéticamente modificados (OGM), en particular, la soja transgénica RR cultivada en Paraguay. Nuestro país es un productor importante de soja a nivel regional y mundial, por lo que es de suma importancia dilucidar y asegurar la inocuidad de los granos transgénicos producidos. Como es un producto del desarrollo biotecnológico, es de suma importancia el estudio de la toxicidad desde las primeras etapas hasta el producto final de consumo ya que se consideran numerosas normativas y convenios que se deben aprobar para la salida al mercado de dicho producto.

En este sentido, los estudios científicos publicados generalmente se enfocan en el estudio toxicológico del herbicida Glifosato utilizado en la soja Roundup Ready(R) abreviada como RR de Monsanto, .Sin embargo, poca atención se le ha dado a la soja transgénica per se. Con este trabajo se utilizará una aproximación al problema valiéndose de la técnica de la genética toxicológica.

Se utilizará dicha metodología debido a que en nuestro medio existe cierto temor en cuanto al consumo de OGM. El temor radica en que exista una relación no confirmada entre el consumo de OGM y la aparición de malformaciones en recién nacidos; por lo que la genética toxicológica ayudaría a esclarecer este supuesto.

La genética toxicológica estudia la interacción de agentes xenobióticos con el material genético mediante análisis de cambios en la estructura del material genético. En el presente trabajo, se utilizó la técnica de conteo de micronúcleos como una medida de daño genético. En el país este es el primer trabajo sobre la soja

transgénica consumida como alimento analizando posibles efectos en el material genético en modelo de ratón.

Como objetivo general se planteó evaluar la actividad genotóxica y citotóxica de la soja transgénica producida en Paraguay. Para alcanzarlo se propuso como objetivos específicos a) determinar la composición nutricional del grano de soja convencional y transgénica sometidos a diferentes tratamientos de glifosato, b) estimar los efectos genotóxicos del tratamiento realizado con soja transgénica y convencional en médula ósea de ratones mediante la determinación de modificaciones de la frecuencia de micronúcleos (MN) y por último c) estimar los efectos citotóxicos del tratamiento realizado con soja transgénica y convencional en médula ósea de ratones mediante el análisis de las desviaciones de las proporciones entre eritrocitos jóvenes y maduros.

No es objetivo de este trabajo el análisis sobre la viabilidad de la soja transgénica como fuente alimenticia, ya que para que dicho efecto se necesita estudios estandarizados como por ejemplo ensayos de alérgenos, análisis composicionales, evaluación de anti nutrientes, etc.

2. REVISIÓN DE LA LITERATURA

2.1. La soja

La soja *-Glycine max-* es una legumbre anual de la familia de las *Fabaceae* y su semilla comestible es probablemente la más importante a nivel mundial, proveyendo de proteínas de origen vegetal a millones de personas al rededor del mundo (FAO, 2009). Su origen es desconocido, aunque su centro de distribución original podría remontarse a algún lugar del territorio de China Continental (Jacob MA, 2016)..

A pesar de que el cultivo de soja se remonta hace más de 5000 años en China, solo hace aproximadamente 200 años que tiene el impacto actual. El cultivo tuvo mayor demanda para la producción de aceite vegetal a comienzos del siglo pasado, en especial en las diferentes guerras mundiales, siendo el principal promotor los EEUU. Esto permitió la introducción de este grano a Sudamérica, principalmente a la Argentina y Brasil (Singh, 2009).

2.1.1. La soja en Paraguay

A pesar de la pequeña área territorial del Paraguay respecto a otros países productores, esta se ha situado entre los de mayor producción de soja a nivel mundial. La estimación dada para el año 2015-2016 fue de 3,6 millones de hectáreas (O'Kray, 2015), y según los informes de la Cámara Paraguaya de Procesadores de Oleaginosas y Cereales (CAPPRO) en el año 2016 alcanzó una cifra récord de 9.171.216 de toneladas, por lo que hace que el país sea el cuarto exportador y sexto productor mundial de la soja. (USDA, CAPPRO).

Con esto es fácil comprender la importancia de este rubro tanto para la economía local y mundial. Para cumplir con ello, a pesar de los conflictos públicos, se manejan

varias estrategias atendiendo la creciente demanda a nivel mundial y la escasez de terreno, (James 2011, citado por Barrows, Sexton, & Zilberman, 2014)

En este sentido se hace obligatorio hacer frente a las más importantes amenazas de carácter biótico como abiótico tales como plagas y condiciones climáticas desfavorables respectivamente. Para ello, se han establecidos varias estrategias como por ejemplo las herramientas biotecnológicas (Belgin, 2006).

2.2. La Biotecnología

Según la Convención sobre Diversidad Biológica, la Biotecnología se define como "cualquier aplicación tecnológica que use sistemas biológicos, organismos vivos o sus derivados, para crear o modificar productos o procesos para un uso específico" (CBD, 2012).

Debido a la alta especificidad y accesibilidad de la tecnología, la Biotecnología se ha consolidado en el ámbito agrícola tanto para hacer frente a condiciones bióticas o abióticas (FAO, 2011). Así con el uso de la biotecnología se logró modificar hasta la información genética de un organismo para conferirle algunas características de interés con la que inicialmente no contaba. (Barrows et al., 2014)

La transferencia de la "información" —que es denominada gen— para adquirir una capacidad se obtiene mediante el corte y empalme del gen de interés obtenido de otro organismo e insertado en el individuo a quien se quiere conferirle esa característica. A este último organismo, ahora con un nuevo gen de otra especie, se lo denomina **Organismo Genéticamente Modificado** u OGM. (Smyth & Phillips, 2014) y al organismo cuyo genoma no ha sido modificado se lo denomina **convencional**.

Si bien la utilización de OGM no es nueva, aún sigue habiendo fuertes debates en cuanto a su inocuidad tanto para la salud humana como ambiental (Defrancesco, 2013; Marshall, 2007). Esta duda subsiste debido a que un OGM se crea mediante la transferencia de gen/es de una especie a otra, pudiendo con esto conferir a la especie aceptora características fenotípicas nuevas que no había desarrollado a lo largo de su evolución (McBroom MPH, 2016). Este tipo de transferencia horizontal de genes difiere de la vertical, en que los caracteres existentes o bien mutados, son solo transferibles de una generación a otra dentro de la misma especie. (Buratovich, 2016)

La transferencia horizontal de genes ocurre en la naturaleza (Keeling & Palmer, 2008). Se define la transferencia horizontal o lateral como la transferencia estable de material genético desde un organismo a otro sin pasar por el proceso reproductivo o intervención humana (Keese, 2008).

En el dominio Procariota la transferencia horizontal es bastante común y también en casos de relación de hospedero-patógeno (FAO, 2011). Se aprovecha esta última capacidad de transferencia genética entre organismos eucariotas y procariotas para la biotecnología, siéndola más conocida el caso de *Agrobacterium tumefaciens* que transfiere naturalmente sus genes a la planta (Smyth & Phillips, 2014). Para que la transferencia se considere exitosa, el transgén o gene transferido, debe permanecer intacto y funcional para luego ingresar a una célula somática o insertarse en su genoma con un promotor apropiado (Byravan, 2010).

En Paraguay se aprovecha el producto de esta tecnología para una producción de soja, siendo el caso más importante el de la soja transgénica resistente a artrópodos y a herbicidas. En la **Tabla 1** se evidencia la importancia del rubro de la soja.

Tabla 1. Comparación de producción de granos desde 1993 a 2016 en miles de toneladas y el crecimiento. Fuente CAPECO

Cultivo	1993 (000ton.)	2016(000ton.)	Crecimiento
Soja	1800	9000	x5
Maíz	462	5070	x11
Trigo	425	1145	x3

2.2.1. La soja transgénica resistente a herbicida Glifosato

Las modificaciones genéticas para conferir una característica a un individuo se puede obtener por estrategias diferentes ya sea modificando la secuencia en el DNA de la característica que se desea cambiar mediante inducción a mutaciones mediado por agentes físicos, químicos o biológicos, o, insertando una capacidad *sui generis* al individuo (FAO, 2011).

En el caso de la soja transgénica en estudio, la capacidad conferida es para la tolerancia al herbicida Glifosato.

2.2.1.1. Herbicida Glifosato

N-(fosfonometil)glicina o Glifosato es un derivado fosfonometilo del aminoácido glicina. El glifosato es una sustancia de color blanco e inoloro con 3 sitios ionizables. Fue inventado en el año 1950 pero no fue hasta en 1970 que la empresa Monsanto sintetizó como una sustancia utilizable como herbicida (Nandula, 2010).

Su acción herbicida consiste en inhibir a la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS) (Amrhein , N. , B. Deus, Gehrke, & Steinrucken, 1980) que se encuentra presente en plantas, hongos y bacteria pero no en animales (Kishore & Shah, 1988). Esta enzima es esencial para la síntesis de aminoácidos aromáticos y otros metabolitos de la planta (CaJacob et al., 2003). Por lo que, al carecer de actividad enzimática la planta no logra completar su desarrollo y muere.

Sin embargo, se logra la tolerancia al Glifosato mediante la incorporación del gen presente en la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. Esta capacidad de la bacteria es debido a la insensibilidad de la enzima EPSPS al Glifosato (CaJacob et al., 2003). El gen de la tolerancia al Glifosato se obtuvo de una población bacteriana encontrada en una fábrica de manufactura de Glifosato. Dicho gen, el *cp4 eps*, se utiliza para la transgénesis de todos los OGM de sojas tolerantes cultivadas. (CaJacob, CA, 2004)

2.2.1.2. Generación de soja transgénica

La primera generación de soja transgénica resistente a herbicidas es la que le confiere tolerancia al Glifosato, y fue desarrollada por la empresa Monsanto en el año 1996. La misma fue obtenida mediante la inserción del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. Mientras que la segunda generación de soja transgénica de Monsanto la RR2Y se generó en el 2009 y tanto la primera como la segunda se obtuvieron mediante la transformación utilizando *Agrobacterium*. (Nandula, 2010)

2.2.2. Descripción de las modificaciones genéticas del cultivar transgénico

El cultivar RoundUp Ready RR (Nueva Andrea 66RR), que contiene el gen *cp4* derivado de la bacteria *Agrobacterium sp* y codifica una forma insensible de la proteína EPSPS (B.M. Khadi, V. Santhy, 1987), lo cual le permite sobrevivir aunque la planta haya sido expuesta al Glifosato.

2.3. Estudios de toxicología

No existe un único test para determinar con 100% de certeza la inocuidad de un determinado compuesto o sustancia, es por eso que se recurren a varios tipos de ensayos y organismos para determinar el potencial tóxico de una sustancia (Codex Alimentarius Commission (2009) y EFSA (2010, 2011a)).

Para los compuestos químicos existen Guías estandarizadas y aceptadas por la comunidad internacional; entre ellos la serie de Guías establecidas por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (**OCDE / OECD**) en el libro *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects*. También el *Test 414*, de la *Administración de Alimentos y Droga de los EEUU (USDA)*, y la *Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas (ECHA)*. Así como existen guías para análisis de químicos con diferentes puntos de evaluación; por ejemplo: su influencia en el ambiente, a la biota o al organismo; se tiene también como punto final de evaluación el daño en el material genético. A este tipo de estudio toxicológico se lo denomina Genética Toxicológica.

Los estudios realizados para analizar la toxicidad de la soja transgénica, tanto a nivel ecológico como fisiológico en modelos animales, se han llevado a cabo en numerosos laboratorios (Ahmed, 2005; Manuela Malatesta, Caporaloni, Gavaudan, et al., 2002; Vecchio, Cisterna, Malatesta, Martin, & Biggiogera, 2004; Venâncio, Silva, Almeida, Brigagão, & Azevedo, 2012). Sin embargo, hasta hoy en día, ninguna agencia regulatoria ha emitido un documento aseverando una inocuidad para la salud humana, teniendo como argumento el Principio de Precaución (Jansen Van Rijssen, Eloff, & Morris, 2015) a pesar de que el uso de OGM ya data de los años 80 (Barrows et al., 2014). Esto es debido a que se recurre al principio de "Equivalencia Sustancial" que según el protocolo de Cartagena, el OGM puede ser comparado con su contraparte convencional que tiene establecido un historial de uso seguro. (Codex alimentarius comission, 2003).

A pesar de que en nuestro país se cultiva OGM, no existen estudios sobre la toxicidad, tanto del producto cosechado como las sustancias que vienen con el kit completo de siembra y cosecha (agroquímicos, fertilizantes, fungicidas etc.)

2.3.1. Genética Toxicológica

La genética Toxicológica o Genotoxicología se define como un área de la toxicología que estudia los efectos de diferentes agentes, ya sea físico, químico o biológico, sobre el material genético (Carballo & Mudry, 2006; Rabello-Gay, Rodrigues, & Monteleone-Neto, 1991)

Los ensayos sobre toxicología genética data de los años 70 con numerosas baterías de test para el estudio sobre los cambios en la secuencia del ADN (Kramer, 1998)

La toxicología genética o genotoxicidad juega un papel importante para la evaluación de riesgos para sustancias químicas y para ello se han desarrollado diferentes métodos tanto *in vitro* como *in vivo* (Makoto Hayashi, 2007). Existen ejemplos de test *in vitro* que utilizan bacterias y cultivos celulares de tejidos de mamíferos, como por ejemplo el Test de Ames, (Ames, B. N., McCann, J., Yamasaki, 1975) y los cultivos de células CHO (Rabello-Gay et al., 1991). Mientras que para los ensayos *in vivo* se utilizan modelos vegetales y animales.

En cuanto a organismos vegetales existen dos ensayos para su aplicación en estudios de genotoxicidad de interés ambiental: el Allium Test (Fiskesjö, 1995) y el test de Tétrada de Tradescantia (Mišík et al., 2011).

Como ejemplo de estudios en animales se utilizan los modelos murinos tales como ratón y rata (Makoto Hayashi et al., 1994) y para los sistemas acuáticos se utilizan mejillón o peces tales como la tilapia, pez cebra u otros (Bacolod, Uno, Villamor, & Koyama, 2016; Bolognesi, Perrone, Roggieri, Pampanin, & Sciutto, 2006; Michael Fenech, 2009).

Para todos estos test se evalúan diferentes puntos finales y de diferentes alcances ya que se podrían clasificar en dos grandes grupos que son los análisis citológicos y los moleculares. De entre los análisis citológicos se pueden citar a las Aberraciones Cromosómicas, el intercambio de cromátidas hermanas, los micronúcleos y las anormalidades nucleares. (Carballo & Mudry, 2006; Rabello-Gay et al., 1991).

Además de utilizar diferentes especies, también se ha desarrollado una amplia variedad de ensayos evaluando órganos y tejidos específicos, tales como el análisis

en tejido sanguíneo, tejido hepático e intestinal. (Bolognesi & Hayashi, 2011; Makoto Hayashi, s. f.; Mert, Benli, & Arslan, 2015).

Las técnicas moleculares utilizadas por su nivel de detalle son el Test del Cometa, los Micro arreglos, entre otros.

2.3.2. Análisis de células micronucleadas

Los Micronúcleos (MN) fueron inicialmente conocidos como corpúsculo de Howell-Jolly y fueron descritos por los hematólogos William Howell y Justin Jolly mientras observaban eritrocitos que luego fueron asociados a la carencia de vitamina B12 y folatos (citado por (Michael Fenech, 2008)). El primer registro que relaciona los MN con agentes ambientales fue descrito en células meristemáticas radiculares expuestas a agentes ionizantes e interacción con químicos tales como la colchicina.

Se sabe que la formación de MN se origina a partir de fragmentos acétricos de cromosomas o bien cromosomas enteros no incluidos en el juego nuclear durante la división celular, debido a que hubo fallas en la unión con los microtúbulos durante la anafase. Estos fragmentos o cromosomas son luego envueltos por la membrana nuclear adquiriendo una apariencia y coloración similar al núcleo (M Fenech et al., 2011).

En este sentido, el test de Micronúcleo (MN) (Schmid, 1975) en células de médula de ratón ha sido utilizado en varios laboratorios por su bajo costo y su estandarización (Michael Fenech, 2009; Makoto Hayashi, s. f.; OECD Environmental Health and Safety Publications, 2014).

2.3.3. Ensayos de Citotoxicidad

La reducción en la proporción de Eritrocitos policromáticos en células de médula ósea tratados con agentes mutagénicos, se utiliza como parámetros de toxicidad (Schmid, 1975). Si bien no está clara la dinámica específica en la fluctuación, se asume que los eventos de rompimiento de cromosomas o alteraciones en la maquinaria de distribución de los mismos en el aparato mitótico son los que influyen la eliminación de eritrocitos policromáticos y abundan por lo tanto los

eritrocitos normocromáticos (Suzuki et al., 1989). Este ensayo es sugerido por diversos organismos y entes tales como la OECD (1983), EPA (1982).

Considerando los antecedentes citados, el objetivo general de este trabajo de investigación fue el de analizar los efectos tóxicos de una variedad de soja transgénica. Para ello, se obtuvo muestras de una variedad de soja convencional y de soja transgénica de la variedad Nueva Andrea 66RR, sembradas en un campo particular en el Dpto. de Itapúa; donde las parcelas de soja transgénica fueron pulverizadas con glifosato en cantidades recomendadas y en cantidades de 2, 4 y 6 veces de la dosis recomendada. Se analizaron los valores nutricionales de las muestras obtenidas y se analizó el potencial genotóxico y citotóxico de las mismas mediante la aplicación de ensayo de cambio en las frecuencias de Micronúcleos y variaciones en las frecuencias de Eritrocitos Policromatófilos (EPC) y Eritrocitos Normocromáticos (ENC), en médula ósea de ratones *Swiss* albinos alimentados con las muestras.

3. METODOLOGÍA

3.1. Materiales

Los granos de soja que se utilizaron para la evaluación fue soja transgénica **Nueva Andrea 66RR** y soja convencional **BRS 282**.

Los reactivos utilizados fueron Ciclofosfamida (Sigma), Suero fetal bovino –FBS– (PAA), balanceado comercial para animales tipo "Cerdo crecimiento (Los Colonos®) y almidón comercial (Indega®).

3.1.1. Obtención de muestra de soja

La variedad **Nueva Andrea 66RR** se obtuvo de un campo particular en la zona de Capitán Miranda (Itapúa) de la zafra 2013-2014, bajo la supervisión del Ing. Agr. Vicente Cáceres (**Informe Anexo 8.1**). Del campo particular se obtuvo también muestras de soja convencional (**BRS 282**). Se sembraron 5 parcelas de soja transgénica, siendo que una parcela de soja transgénica no recibió ningún tratamiento con glifosato (TR0%) y 4 parcelas recibieron tratamientos diferenciados de Glifosato (Roundup Ultramax®) de 100, 200, 400, y 600% de la dosis recomendada por el fabricante (3,2Kg/Ha) y una parcela de soja convencional; todas las parcelas recibieron los tratamientos básicos para el cultivar. En la parcela de soja transgénica (TR0%) que no se trató con glifosato y la parcela de soja convencional el control de malezas se realizó manualmente mediante la carpida de las mismas.

3.2. Composición nutricional

Se analizó la composición nutricional de las muestras de soja obtenidas en el campo particular de Capitán Miranda (Itapúa).

Las muestras fueron analizadas en el equipo NIR AUTOANALIZADOR ADA7250, de la marca PERTEN. Este análisis se llevó a cabo en las instalaciones de la Cooperativa Ferheim, sito en la ciudad de Loma Plata.

Los parámetros considerados fueron humedad, porcentaje de proteína, grasa, fibra, ceniza, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoléico, ácido linolénico e Hidróxido de Potasio.

3.3. Detección de Glifosato y ácido aminometilfosfónico (AMPA) mediante HPLC/FLD

El análisis se realizó por el Lic. Francisco Ferreira en el Laboratorio del Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas de la Universidad Nacional de Asunción. Las muestras fueron sometidas al protocolo del laboratorio en el mes de enero de 2015 y se recibió el informe en el mes de febrero del mismo año. El análisis se realizó 9 meses después de la cosecha. Previamente las muestras fueron mantenidas a temperatura ambiente de 20~25°C.

3.4. Montaje de los animales y Bienestar animal

Para los ensayos de toxicidad se utilizaron ratones *Mus musculus* de la cepa Swiss albinos, adquiridos del Bioterio del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud de la UNA.

Los animales fueron mantenidos en cajas de polipropileno (*ra*) limpiadas con alcohol al 70% asperjado con atomizador de uso corriente y limpiadas con algodón y los bebederos fueron lavados con agua potable cada 48 h.

Para el sustrato se utilizaron virutas obtenidas mediante el raspado de maderas de pino en el taller de la UNA de pino y posteriormente esterilizadas en autoclave. La esterilización de las virutas se realizó mediante autoclave con calor húmedo durante 20 min a 121 atm de presión y fueron mantenidas en la misma bolsa hasta su uso.

Los animales fueron mantenidos en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología del CEMIT durante 14 días con temperatura y luz regulados artificialmente mediante aire acondicionado y luz fluorescente, con agua y comida *ad*

libitum. Con respecto a los procedimientos con animales, los mismos siguieron los estándares necesarios para evitar cualquier sufrimiento innecesario a los animales, además los investigadores utilizarán el menor tamaño de muestra posible necesario para cumplir los objetivos. (CIOMS/ICLAS (2012). Los grupos de tratamiento fueron los siguientes: **C(-)** control negativo; grupo **Conv.**(*pellet* con soja convencional); **TR0%** (*pellet* con soja transgénica sin glifosato); **TR100%** (*pellet* con soja transgénica y 100% glifosato); **TR200%** (*pellet* con soja transgénica y 200% glifosato); **TR400%** (*pellet* con soja transgénica y 400% glifosato); **TR600%** (*pellet* con soja transgénica y 600% glifosato); **CP** (50mg/Kg), control positivo. Cada grupo de tratamiento estuvo compuesto por 6 individuos, 3 hembras y 3 machos, con pesos y tiempo de vida similares.

3.5. Preparación del alimento

Para la preparación de los “pellets” se mezcló balanceado para animales tipo “Cerdo crecimiento” con muestras de soja triturada y almidón con la siguiente proporción de ingredientes: 1:1:3 siendo estos soja, almidón de mandioca y balanceado respectivamente.

Cada muestra de soja, tanto convencional como transgénica fue molida hasta obtener un producto lo suficientemente fino para facilitar el mezclado. Una vez molidas las muestras, fueron almacenadas hasta a preparación del *pellet* o hasta su uso en bolsas de tipo Zip en heladera.

Las diferentes muestras y el almidón fueron humedecidos con agua destilada esterilizada según la cantidad necesaria para obtener una masa manejable. El porcentaje de soja fue de 20% en cada “pellet”, se preparó 6 tipos de pellets diferentes, con las muestras de soja transgénica y convencional. Para los animales del control negativo y positivo se preparó el pellet con balanceado y almidón para evitar cualquier sesgo.

La masa obtenida fue extendida en fuentes de acero inoxidable rectangulares con grosor de aproximadamente 1 centímetro. Luego el preparado fue introducido a una estufa con temperatura regulada de 28 grados por aproximadamente 3 días o hasta que se haya encontrado seco. Cada preparado fue cortado en porciones de manera a

que pueda ser ingerido por el animal pero no tan pequeño como para que pase en la rejilla del rak.

3.6. Evaluación del potencial tóxico de la soja

Los animales fueron alimentados con el pellet y se les proporcionó agua mineral “*ad libitum*” durante 14 días. Este tratamiento fue realizado 9 meses post cosecha.

Como control positivo del ensayo, 24h antes de sacrificio de los animales se les inyectó el agente mutagénico Ciclofosfamida, a 50mg/Kg peso de animal. Todos los animales fueron sacrificados por dislocación cervical.

Se pesó cada animal al inicio del tratamiento y al finalizar el mismo manteniendo la uniformidad de los pesos en cada rak. Para cada tratamiento se utilizó en total seis animales distribuidos en tres hembras y tres machos.

3.6.1. Test de Micronúcleos (MN) (Schmid, 1975)

Protocolo: Se sacrificaron los animales por tracción cervical, se retiró los fémures y se removió la médula ósea con suero fetal bovino (FBS), mantenido a 37°C. Se homogeneizó el material y se transfirió a un tubo cónico de 15ml, se centrifugó a 1000 rpm durante 5 minutos. Se desechó el sobrenadante y se preparó las muestras con las células restantes. Las láminas fueron secadas durante 24h a temperatura ambiente y luego se fijó en metanol absoluto por 5 minutos. Se coloreó las muestras con Giemsa al 4%. Se analizó las muestras en microscopio óptico con aceite de inmersión y se contó 1000 eritrocitos policromáticos incluyendo los que presenten micronúcleos (MNs).

Para el control positivo de la técnica se utilizó Ciclofosfamida (M Hayashi et al., 1994; Krishna & Hayashi, 2000) en una concentración de 50mg/kg de animal inyectado intra-peritonealmente 24hs antes del sacrificio del animal. Como control negativo se les suministró a los animales de este grupo pellet comercial de la marca "Los colonos" mezclado con almidón.

3.6.2. Estudio de citotoxicidad

Para el estudio de citotoxicidad en médula ósea, se analizó las mismas muestras obtenidas para el ensayo de MN, donde se contabilizó 200 eritrocitos por animal, incluyendo los eritrocitos jóvenes (Eritrocitos policromáticos) y maduros (Eritrocitos normocromáticos).

3.7. Estadística

Los datos obtenidos del ensayo de Micronúcleo fueron contrastados mediante método no paramétrico *G test* que compara las frecuencias.

Para la evaluación de citotoxicidad se realizaron comparaciones pareadas de cada tratamiento con el control negativo y positivo independientemente. Los pesos no fueron contrastados con ningún test estadístico.

4. RESULTADOS

4.1. Muestras de Soja

La soja transgénica se obtuvo de la parcela privada (ver Anexo) y fue almacenada hasta su análisis. Cada muestra fue identificada y posteriormente fue trasladada a las instalaciones de los laboratorios. En total, se obtuvo seis tipos de muestra de soja siendo cinco sojas GM (Nueva Andrea 66RR) y uno convencional (BRS 282); es decir, sin modificaciones genéticas.

4.2. Composición Nutricional de la Soja transgénica

El análisis de Composición Nutricional se presenta en la **Tabla 2** siendo las variables analizadas: Humedad ($\bar{x} = 10.79$), Proteína ($\bar{x} = 38.37$), Grasa ($\bar{x} = 21.77$), Fibra ($\bar{x} = 6.22$), Cenizas ($\bar{x} = 5.23$), Ác. Palmítico ($\bar{x} = 7.89$), Ác. Esteárico ($\bar{x} = 3.58$), Ác. Oleico ($\bar{x} = 23.4$), Ác. Linoleico ($\bar{x} = 60.45$), Ác. Linolénico ($\bar{x} = 2.69$), KOH ($\bar{x} = 77.7$). Las muestras de sojas corresponden a los tratamientos según la cantidad de Glifosato (expresada en %) en donde 0% indica ausencia de tratamiento con Glifosato y 600% al tratamiento 6 veces a la recomendada por el fabricante.

Tabla 2. Composición Nutricional de soja tanto convencional como transgénica con diferentes tratamientos de Glifosato

		Parámetros										
		Humedad	Proteína	Grasa	Fibra	Cenizas	Palmitic	Stearic	Oleic	Linoleic	Linolenic	KOH
Muestra de soja	Convencional	10.73	42.18	20.86	6.03	5.46	6.57	2.91	22.6	61.33	2.06	76.7
	*100%	10.45	37.13	22.27	6.26	5.18	8.46	3.75	23.9	60.07	3.14	77.9
	*200%	11.33	37.45	22.31	6.49	5.18	8.55	3.64	21	61.83	2.8	78
	*400%	10.68	36.34	22.29	6.16	5.16	7.03	3.67	23.3	60.88	2.81	78
	*600%	10.39	37.89	21.5	6.17	5.16	7.77	3.8	25.3	59.27	2.18	77.7
	Average	10.79	38.37	21.77	6.22	5.23	7.89	3.58	23.4	60.45	2.69	77.7

*% de glifosato : 100% se refiere a la mayor dosis recomendada por la empresa

4.3. -Detección de Glifosato y AMPA

Las muestras de soja transgénica de 0% de tratamiento con Glifosato hasta el 600%, en las instalaciones del CEMIT, en el Laboratorio de Química y Toxicología, por el Lic. Francisco Ferreira. Los compuestos a detectar fueron Glifosato y su producto de degradación, el AMPA expresados en $\mu\text{g/g}$. Para ambos casos los Límites de Detección del Método y de Cuantificación fueron de 0.15 $\mu\text{g/g}$ (LD) y 0.5 $\mu\text{g/g}$ (LQ), según se detalla en la **Tabla 3**

Tabla 3 Detección de Glifosato y AMPA con la técnica de HPLC.

		Parámetro Analizado	
		Glifosato (mg/Kg ó $\mu\text{g/g}$)	AMPA (mg/Kg ó $\mu\text{g/g}$)
Muestra de soja	0%	Menor a 0.500	Menor a 0.500
	100%	Menor a 0.500	Menor a 0.150
	200%	Menor a 0.500	Menor a 0.500
	400%	Menor a 0.500	Menor a 0.150
	600%	Menor a 0.500	Menor a 0.150

Nota: % indica la cantidad de glifosato utilizado en el momento del tratamiento en la siembra.

4.4. Conteo de Micronúcleos

En la **Tabla 4** se observan los resultados del análisis del conteo de los extendidos de tejido de médula de ratones.

Para cada tratamiento se contabilizó un total de 6000 células de Eritrocitos policromáticos y se registró la cantidad de MN. Todos los tratamientos tuvieron una duración de 14 días. Para el control Positivo con Ciclofosfamida fue de 24 horas. Se analizó un total de siete tratamientos: control negativo, soja convencional, soja tratada con 0%, 100%, 200%, 400% y 600% de Glifosato y el control Positivo.

Para el tratamiento del 0% de Glifosato solo se contabilizaron un total de cinco mil células debido a que con uno de los ratones no se pudo obtener un frotis aceptable.

Tabla 4: Conteo de Eritrocitos normocromáticos, Eritrocitos policromáfilos y Eritrocitos Policromatófilos Micronucleados (EPCMN) en ratones tratados con soja convencional y transgénica.

Tratamiento	Tiempo de tratamiento	Total de Eritrocitos	Total de EPCMN		p-value	p-value
C(-)	14 días	6000	2			< 0.0001
Conv.	14 días	6000	7		0.1746	< 0.0001
TR0%	14 días	5000	0		0.5499	< 0.0001
TR100%	14 días	6000	7	vs	0.1746	vs < 0.0001
TR200%	14 días	6000	4	C(-)	0.6823	CP < 0.0001
TR400%	14 días	6000	6		0.2828	< 0.0001
TR600%	14 días	6000	7		0.1746	< 0.0001
CP (50mg/Kg)	24h	6000	54*		< 0.0001	

EPCMN: eritrocitos policromáticos micronucleados. C(-): control negativo. TR: tratamiento. CP(Ciclofosfamida/Control Positivo) *:p<0.05

En la **figura 1** se observa la frecuencia de MN en forma de barras. En los extremos se encuentran los controles negativos y positivos. En la barra correspondiente al Grupo control positivo se observa un incremento importante de la cantidad de MN observados con respecto a los otros tratamientos, siendo esta diferencia significativa (p<0.05). No se encontró MN en la muestra del tratamiento con 0% de Glifosato.

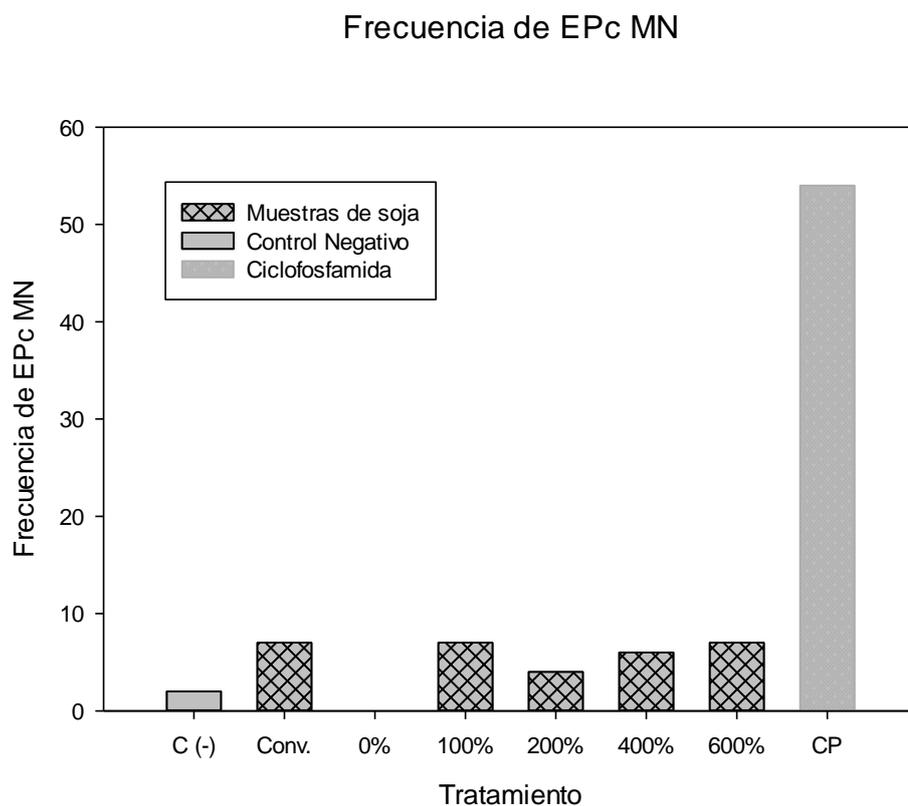


Figura 1. Frecuencia de Micronúcleos

4.5. Evaluación de la Citotoxicidad de la soja transgénica

La determinación de la citotoxicidad mediante la relación de eritrocitos normocromáticos y eritrocitos policromáticos basa en que esta varía según haya mayor o menor cantidad de cada una de las células contadas en un total de 200 células según lo propuesto por (Márlisson de Queiroz et al., 2013).

Tabla 5. Ensayo de Citotoxicidad indicado por el porcentaje de Eritrocitos Policromáticos (EPC) en un total de 200 células eritrocitarias de médula ósea contadas por cada animal tratado..

Tratamiento	Tiempo de tratamiento	Total de Eritrocitos contabilizados	%EPC
C(-)	14 días	200	61.024
Conv.	14 días	200	64.417*
TR0%	14 días	200	64.5*
TR100%	14 días	200	63.286*
TR200%	14 días	200	64.846*
TR400%	14 días	200	63.25*
TR600%	14 días	200	52.75*
CP (50mg/Kg)	24h	200	54.733*

C (-): control negativo. TR: tratamiento. CP (Ciclofosfamida/Control Positivo). No se observa diferencias significativas en los porcentajes. G-test, $p > 0.05^*$

4.6. Cuadro comparativo de promedio de pesos

En la Tabla 4 se observa el incremento de pesos medidos antes y al término del experimento. El menor promedio de peso inicial registrado fue de 20,33 para machos y 17,67 para hembras. Para los grupos de control negativo (testigo), control positivo y de soja convencional se observa un ligero aumento en ambos sexos. En promedio, los machos tuvieron un incremento de 0,23g a 0,87 como máximo y las hembras un incremento de 1, 16 y 2.40 como máximo.

Se observa un descenso de los pesos de los animales machos tratados con soja transgénica siendo el mayor descenso de 1,77 gr y en hembras un descenso mayor de 5,87gr.pero a partir del tratamiento con las soja del 200%.

Tabla 6 Pesos al inicio y final de tratamiento con régimen alimenticio *ad libitum*.

	MACHOS			HEMBRAS		
	Inicio	Final	Diferencia	Inicio	Final	Diferencia
Balanceado	22.00	22.23	0.23	18.33	20.73	2.40
CP	22.00	22.87	0.87	18.67	19.83	1.16
Convencional	21.67	22.33	0.66	18.83	20.50	1.67
TR0%	22.00	21.33	-0.67	18.00	18.17	0.17
TR100%	23.00	21.23	-1.77	17.67	18.27	0.60
TR200%	22.33	22.20	-0.13	18.67	17.87	-0.80
TR400%	20.67	17.70	-2.97	22.67	16.80	-5.87
TR600%	20.33	17.73	-2.60	17.67	13.70	-3.97

5. DISCUSIÓN

El estudio de la inocuidad de los OGM y los alimentos derivados de ellos surge a partir de las convenciones y convenios suscritos a nivel mundial tales como el Codex 2009 (Bartholomaeus, Parrott, Bondy, & Walker, 2013), seguido de otros organismos como OECD, 1994, EFSA, USFDA que la recomiendan ensayos para evaluación de riesgos. Con respecto a efectos al ADN, debido a la ingesta de alimentos modificados genéticamente, no existen protocolos estandarizados, por lo que se propuso el estudio de daños producidos por la ingesta de soja transgénica.

A pesar de no haber un protocolo estandarizado para la evaluación con de alimentos, se llevó a cabo el experimento utilizando la metodología propuesta para estudios de compuestos químicos partiendo de que los compuestos ingeridos pasan al torrente sanguíneo y sus efectos podrían ser observados en poblaciones celulares sanguíneas.

En el presente estudio demostramos que el balanceado enriquecido con soja transgénica no produce efectos genotóxicos por exposición aguda en población de células de médula ósea de ratones *Mus musculus* Swiss albinos medidos como frecuencia de Micronúcleos. Los efectos se han demostrado en otros estudios en donde el periodo de ingesta fue superior y con evaluaciones diferentes. Nuestro estudio tuvo un periodo de exposición aguda, diferente a los propuestos por otros autores ejemplo de ello son Daleprane y colaboradores que han estudiado el efecto en dos generaciones y han concluido que no existen diferencias entre la ingesta de soja convencional y soja transgénica según la composición sanguínea (Daleprane, Pacheco, & Boaventura, 2009). Sakamoto (2007) en estudios similares a Daleprane (2009) concluyó que no existen efectos a largo plazo. Debido a ello, no se consideró necesaria una prolongada exposición a las muestras de alimentos preparados a base de soja transgénica. Otros estudios han utilizado métodos toxicológicos diferentes

tales como desarrollo testicular (Brake & Evenson, 2004) y estudios de morfología ultra estructurales (Manuela Malatesta, Caporaloni, Rossi, et al., 2002) pero no se han realizado estudios con respecto a daños en el material genético en células sanguíneas. Por lo tanto, este trabajo suma a las investigaciones citadas, adicionando un estudio sobre el daño genético en células de eritrocitos de ratones. En la tabla 7 del Anexo se resumen los trabajos donde utilizan modelos de rata y ratón para la evaluación de efectos tóxicos de alimentos genéticamente modificados.

También se midió la proporción de eritrocitos maduros e inmaduros en términos de porcentaje de eritrocitos inmaduros para determinar si existe un efecto citotóxico y se observó que la proporción de eritrocitos inmaduros está ligeramente elevada con respecto a los maduros, lo que indica que no hubo un efecto citotóxico. Estas observaciones se mantuvieron en todos los grupos de estudio de soja transgénica y la variedad convencional, y en el control positivo, ya que no demostraron diferencias significativas cuando comparadas con el grupo control negativo (**Tabla 5**).

Por otro lado, Malatesta en sus estudios ha demostrado que a nivel molecular una dieta alta en soja transgénica produce alteraciones metabólicas en células hepáticas, no así en otros tipos celulares (M. Malatesta et al., 2005). Se debería realizar otros ensayos a nivel molecular con las poblaciones sanguíneas para descartar esta posibilidad de algún efecto citotóxico en médula ósea debido a la ingesta de soja transgénica.

Cuhra, en su revisión, resalta la escasez de estudios sobre toxicidad que determinen los niveles residuales de glifosatos en la muestra además de que el herbicida pueda estar oculto en los ensayos (Cuhra, 2015). En nuestro ensayo realizamos dicho análisis, aun así no fueron detectados residuos de glifosato ni su metabolito AMPA además de que en otras muestras no fueron cuantificables debido a que no superaban los niveles de detección y cuantificación del equipamiento (0.150 y 0.50 respectivamente). Por lo tanto, podemos asegurar que cualquier efecto observado no se puede atribuir al glifosato o su metabolito. Pese a que el análisis se ha realizado con meses de post cosecha, este periodo es similar a lo que sufre cada zafra una vez cosechado. Entonces, cualquier estudio inmediato sobre detección de glifosato carece de fundamentos ya que no será de un consumo inmediato.

Otro punto importante para resaltar es que no hubo un ensayo para la detección del transgén. Estos ensayos son comercializados pero no se ha utilizado en este estudio. El motivo radica en que las sojas transgénicas fueron previamente expuestas y sobre-expuestas a niveles elevados de Glifosato (hasta un seiscientos por ciento superiores al establecido por el fabricante). Con esta práctica se demuestra que la soja resiste al glifosato, además de que no revela características diferentes debido a la sobre exposición.

A pesar de que Codex establece que no es necesario el estudio toxicológico cuando se ha demostrado compatibilidad con la contraparte convencional (Codex) se continuó con el experimento y se ha demostrado que no existe una diferencia de la calidad nutricional entre la soja convencional y la transgénica, concordando con los datos publicados por la empresa Monsanto en la publicación de Padgett. Asimismo, Magaña y colaboradores han encontrado resultados similares (Magaña-Gómez, Cervantes, Yepiz-Plascencia, Calderón, & Barca, 2008). Sería aún más relevante lograr comparar variedades de líneas isogénicas de la variedad Nueva Andrea RR para tal propósito.

Los efectos genotóxicos están relacionados con el cáncer y también se ha con el consumo de OGMs. Así lo ha presentado Séralini y colaboradores en la publicación retractada demostrando la aparición de tumores relacionados a la ingesta de maíz transgénico (Séralini et al., 2012). Sin embargo con nuestro análisis se descarta, al menos en eritrocitos, la relación entre OGM y daño en el ADN.

Pese a que los ratones han disminuido de peso no se han observado efectos en la frecuencia de MN y tampoco diferencias nutritivas entre variedades. Esto podría reflejar conclusiones erróneas en cuanto a los resultados debido a que se podría considerar que no hubo una ingesta del alimento preparado por lo tanto no se observaría dicho efecto. Estos hallazgos se corresponden con los encontrados por Daleprene (2009) en donde observan pérdida de peso debido a la falta de palatabilidad. No tenemos certeza si hubo o no consumo a un nivel en donde se pueda detectar algún daño. Pero como la duración de los tratamientos fue de catorce días, creemos que si hubiera una nula ingesta, los ratones hubieran perdido más peso o, en el peor de los casos, se hubieran muerto. Otro factor importante es la

palatabilidad de los pellets elaborados. Daleprene considera que la razón se debe a la existencia de una enzima que oxida los ácidos grasos reduciendo la palatabilidad. Aun así la ganancia en peso de los ratones en los otros tratamientos tuvo un rango de 0.23 a 2.40 en promedio. Consideramos importante que para futuro experimentos se haga un estudio piloto de comportamiento con respecto a gustos de los animales. También es importante minimizar el estrés que pudiera estar produciendo la condición de experimento, que también es un factor importante en el momento de promover el apetito

6. CONCLUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue analizar la posible implicancia del consumo de la soja transgénica producida en el país a nivel genotoxicológico y citotóxico.

Mediante los ensayos realizados y posteriores análisis se puede concluir que no se ha encontrado evidencia de que exista alguna actividad genotóxica o citotóxica, en la población de células de médula ósea de ratones con régimen alimenticio a base de dicha soja.

Así mismo, la contaminación forzada con Glifosato en esta experimentación demostró no tener efecto adverso en los mismos parámetros ya que se ha observado que esta sustancia no se encuentra en cantidades detectables con las técnicas actuales. Aunada la práctica agrícola que tiene su tiempo correspondiente, asegura su degradación por medios naturales.

No fue objetivo de este trabajo la viabilidad de la soja transgénica como fuente alimenticia; por lo que se recomiendan estudios posteriores para su evaluación.

Por lo tanto, en estas condiciones experimentales se puede concluir que la soja transgénica RoundupReady de la variedad Nueva Andrea 66RR, no tiene efectos genotóxicos ni citotóxicos en ratones albinos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmed, F. (2005). Testing of Genetically Modified Organisms in Food. *International Journal of Food Science and Technology*, 40, 337-342.
- Ames, B. N., McCann, J., Yamasaki, E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella1 mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 31, 347-364.
- Amrhein , N. , B. Deus, P., Gehrke, & Steinrucken, H. C. . (1980). The site of the inhibition of the shikimate pathway by glyphosate. II. Interference of glyphosate with chorismate formation in vivo and in vitro. *Plant Physiology*, 66, 830 – 834.
- B.M. Khadi, V. Santhy, and M. S. Y. (1987). *Biotechnology in agriculture and forestry :cotton. Agricultural Systems* (Vol. 65).
- Bacolod, E. T., Uno, S., Villamor, S. S., & Koyama, J. (2016). Oxidative stress and genotoxicity biomarker responses in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to environmental concentration of 1-nitropyrene. *Marine Pollution Bulletin*, 1-6. Elsevier Ltd. Recuperado a partir de <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.01.077>
- Barrows, G., Sexton, S., & Zilberman, D. (2014). Agricultural Biotechnology: The Promise and Prospects of Genetically Modified Crops. *Journal of Economic Perspectives*, 28(1), 99-120.
- Belgin. (2006). A life with transgenics in 21st century, 1-11.
- Bolognesi, C., & Hayashi, M. (2011). Micronucleus assay in aquatic animals. *Mutagenesis*, 26(1), 205-13. Recuperado marzo 2, 2012, a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21164204>
- Bolognesi, C., Perrone, E., Roggieri, P., Pampanin, D. M., & Sciutto, A. (2006). Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquatic Toxicology*, 78, Supple(0), S93-S98. Recuperado a partir de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X06000683>
- Brake, D. G., & Evenson, D. P. (2004). A generational study of glyphosate-tolerant

soybeans on mouse fetal, postnatal, pubertal and adult testicular development. *Food and Chemical Toxicology*, 42(1), 29-36.

Buratovich, M. A. (2016). Horizontal gene transfer. *Salem Press Encyclopedia*. Salem Press. Recuperado a partir de <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=sso&db=ers&AN=89474233&lang=es&site=eds-live>

Byravan, S. (2010). *Genetically Engineered Crops* : (Vol. xlv).

Carballo, M., & Mudry, M. (2006). *Genética Toxicológica*. De los Cuatro Vientos.

CBD. (2012). Frequently Asked Questions (FAQs) on the Cartagena Protocol. Secretariat of the Convention on Biological Diversity. Recuperado febrero 13, 2017, a partir de http://bch.cbd.int/protocol/cpb_faq.shtml#faq1 International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. Council for International Organizations of Medical Sciences and International Council for Laboratory Animal Sciences. URL disponible en: <http://www.cioms.ch/2012/guidelines.htm>.)

Cuhra, M. (2015). Review of GMO safety assessment studies : glyphosate residues in Roundup Ready crops is an ignored issue. *Environmental Sciences Europe*. Springer Berlin Heidelberg.

Daleprane, J. B., Pacheco, J. T., & Boaventura, G. T. (2009). Evaluation of Protein Quality from Genetically Modified and Organic Soybean in two Consecutive Generations of Wistar Rats, (August), 841-847.

Defrancesco, L. (2013). How safe does transgenic food need to be? *Nature biotechnology*, 31(9), 794-802. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24022153>

FAO. (2009). Evaluación de la inocuidad de los alimentos genéticamente modificados, 192.

FAO. (2011). *Biosafety Resource Book*. Rome: Office of Knowledge Exchange, Research and Extension. Recuperado a partir de <http://www.fao.org/docrep/014/i1905e/i1905e00.htm>

Fenech, M. (2008). The micronucleus assay determination of chromosomal level DNA damage. *Environmental Genomics*, 410. Recuperado mayo 16, 2013, a partir de http://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-59745-548-0_12

Fenech, M. (2009). Mutation Research / Reviews in Mutation Research A lifetime passion for micronucleus cytome assays — Reflections from Down, 681, 111-117.

Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, a T., Surralles, J., Crott, J. W., Parry, J., Norppa, H., et al. (2011). Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human

cells. *Mutagenesis*, 26(1), 125-32. Recuperado julio 14, 2014, a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21164193>

Fiskesjö, G. (1995). Allium test. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 43, 119-27. Recuperado mayo 18, 2013, a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7550639>

Hammond, B., Kough, J., Herouet-Guicheney, C., & Jez, J. M. (2013). Toxicological evaluation of proteins introduced into food crops. *Critical reviews in toxicology*, 43 Suppl 2, 25-42. Recuperado a partir de <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3835160&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>

Hayashi, M. (2007). In Vivo Rodent Micronucleus Assay. En Vijayalaxmi & G. Obe (Eds.), *Chromosomal Alterations: Methods, Results and Importance in Human Health*.

Hayashi, M. (s. f.). The micronucleus test—most widely used in vivo genotoxicity test—. Recuperado mayo 8, 2017, a partir de http://download.springer.com/static/pdf/943/art%253A10.1186%252Fs41021-016-0044-x.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Fgenesenvironment.biomedcentral.com%2Farticle%2F10.1186%2Fs41021-016-0044-x&token2=exp=1494216995~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F943%2Fart%25253A10.1186%25252Fs41021-016-0044-x.pdf*~hmac=61fa0e0021569f482d12c2c31256f536c8374d31a98c79f63c21bd3c510883c9

Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Kirsh-Volders, M., Oleson, F. B., et al. (1994). In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*, 312(3), 293-304.

Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blakey, D. H., Kirsh-Volders, M., Oleson, F. B., et al. (1994). In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutation research*, 312(3), 293-304.

Jacob MA, L. (2016). Soybean. *Salem Press Encyclopedia*. Salem Press. Recuperado a partir de <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=sso&db=ers&AN=87324949&lang=es&site=eds-live>

Jansen Van Rijssen, F. W., Eloff, J. N., & Morris, E. J. (2015). The precautionary principle: Making managerial decisions on GMOs is difficult. *South African Journal of Science*.

Keeling, P. J., & Palmer, J. D. (2008). Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nature reviews. Genetics*, 9(8), 605-18. Nature Publishing Group. Recuperado marzo 26, 2015, a partir de <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2386>

- Keese, P. (2008). Risks from GMOs due to horizontal gene transfer. *Environmental Biosafety Research*, 7, 123–149.
- Kishore, G. M., & Shah, D. M. (1988). Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annual review of biochemistry*, 57(2), 627-663.
- Kramer, P. J. (1998). Genetic toxicology. *The Journal of pharmacy and pharmacology*, 50(4), 395-405.
- Krishna, G., & Hayashi, M. (2000). In vivo rodent micronucleus assay: Protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 455(1-2), 155-166.
- Magaña-gómez, J. A., Cervantes, G. L., Yepiz-plascencia, G., Calderón, A. M., & Barca, D. (2008). Pancreatic response of rats fed genetically modified soybean, (November 2007), 217-226.
- Malatesta, M., Biggiogera, M., Manuali, E., Rocchi, M. B., Baldelli, B., & Gazzanelli, G. (2003). Fine structural analyses of pancreatic acinar cell nuclei from mice fed on genetically modified soybean. *Eur.J.Histochem.*, 47(4), 385-388. Recuperado a partir de pm:14706936
- Malatesta, M., Caporaloni, C., Gavaudan, S., Rocchi, M. B. L., Serafini, S., Tiberi, C., & Gazzanelli, G. (2002). Ultrastructural morphometrical and immunocytochemical analyses of hepatocyte nuclei from mice fed on genetically modified soybean. *Cell structure and function*, 27(4), 173-180.
- Malatesta, M., Caporaloni, C., Rossi, L., Battistelli, S., Rocchi, M. B. L., Tonucci, F., & Gazzanelli, G. (2002). Ultrastructural analysis of pancreatic acinar cells from mice fed on genetically modified soybean. *Journal of Anatomy*, 201(5), 409-415.
- Malatesta, M., Tiberi, C., Baldelli, B., Battistelli, S., Manuali, E., & Biggiogera, M. (2005). Reversibility of hepatocyte nuclear modifications in mice fed on genetically modified soybean. *European journal of histochemistry : EJH.*, 49(3), 237-242.
- Márlisson de Queiroz, F., Wanderson de Oliveira Matias, K., Mylana Freire da Cunha, M., Schwarz, A., Queiroz, F. M., O Matias, K. W., F Cunha, M. M., et al. (2013). Evaluation of (anti)genotoxic activities of *Phyllanthus niruri* L. in rat bone marrow using the micronucleus test. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49(1).
- Marshall, A. (2007). GM soybeans and health safety--a controversy reexamined. *Nature biotechnology*, 25(9), 981-987.
- McBroom MPH, M. M. (2016). Transformation (biology). *Salem Press Encyclopedia of Science*. Salem Press. Recuperado a partir de <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&AuthType=sso&db=ers&AN=89409190&lang=es&site=eds-live>

- Mert, R., Benli, A. Ç. K., & Arslan, G. (2015). Determination of histological and genotoxic effects of formalin on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). *Aquaculture Research*, 46(11), 2798-2807.
- Mišík, M., Ma, T. H., Nersesyan, A., Monarca, S., Kim, J. K., & Knasmueller, S. (2011). Micronucleus assays with *Tradescantia* pollen tetrads: An update. *Mutagenesis*.
- Nandula, V. K. (2010). *Glyphosate Resistance in Crops and Weeds: History, Development, and Management*. *Glyphosate Resistance in Crops and Weeds: History, Development, and Management*. John Wiley & Sons, Inc.
- O'Kray, C. (United S. D. of A. (2015). *Paraguay: Oilseeds and Products Annual*.
- OECD Environmental Health and Safety Publications. (2014). Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test Tg 474, (September).
- Rabello-Gay, M. N., Rodrigues, M. A. L. R., & Monteleone-Neto, R. (Eds.). (1991). *Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e Critérios de Avaliação*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética.
- Schmid, W. (1975). The Micronucleus Test. *Mutation research*, 31, 9-15.
- Séralini, G.-E., Clair, E., Mesnage, R., Gress, S., Defarge, N., Malatesta, M., Hennequin, D., et al. (2012). RETRACTED: Long term toxicity of a Roundup herbicide and a Roundup-tolerant genetically modified maize. *Food and Chemical Toxicology*, 50(11), 4221-4231. Recuperado junio 15, 2017, a partir de <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691512005637>
- Singh, G. (2009). *The soybean : botany, production and uses*. *The Soybean Botany, Production and Uses*.
- Smyth, S., & Phillips, P. W. (2014). Risk, regulation, and biotechnology: The case of GM crops. *GM crops & food*, 5(3), 291-303. Recuperado a partir de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24922052>
- Suzuki, Y., Nagae, Y., Li, J., Sakaba, H., Mozawa, K., Takahashi, A., & Shimizu, H. (1989). The micronucleus test and erythropoiesis. Effects of erythropoietin and a mutagen on the ratio of polychromatic to normochromatic erythrocytes (P/N ratio). *Mutagenesis*, 4(6), 420-424.
- Vecchio, L., Cisterna, B., Malatesta, M., Martin, T. E., & Biggiogera, M. (2004). Ultrastructural analysis of testes from mice fed on genetically modified soybean. *European journal of histochemistry : EJH*.
- Venâncio, V. P., Silva, J. P. L., Almeida, A. a., Brigagão, M. R. P. L., & Azevedo, L. (2012). Conventional (MG-BR46 Conquista) and Transgenic (BRS Valiosa RR) Soybeans Have No Mutagenic Effects and May Protect Against Induced-DNA Damage In Vivo. *Nutrition and Cancer*, 64(5), 725-731.

8. ANEXOS

8.1. Informe del técnico agricultor, Ing. Agr. Vicente Garcete

Informe técnico sobre el ensayo a campo de diferente dosis de Glyphosato en el cultivo de soja

Se instaló la parcela en la localidad de obligado en la finca del señor Cristian Alexander Dickel, donde se sembró en fecha 18 de diciembre de 2013 las variedades de soja BRS 215 RR y una convencional la BRS 282, los cuales no se tuvo buena germinación lo que se optó en eliminar dicho ensayo, luego se había encontrado otra parcela en Caplán Miranda en la finca del señor Alexis Sauchuk, donde se sembró la variedad Nueva Andrea 66 RR y la convencional BRS 282, en fecha 15 de enero de 2014 donde se tuvo excelente germinación, se marcó las parcelas con una dimensión de 7 metros por 15 metros dejando 3 metros de distancias por cada tratamiento.

Los tratamientos son los siguientes:

- Tratamiento 1:** Variedad convencional BRS 282
- Tratamiento 2:** Nueva Andrea 66 RR sin aplicación de Glyphosato
- Tratamiento 3:** Nueva Andrea 66 RR 6.4 kg/ha del Glyphosato
- Tratamiento 4:** Nueva Andrea 66 RR 12.8 kg/ha del Glyphosato
- Tratamiento 5:** Nueva Andrea 66 RR 25.6 kg/ha del Glyphosato
- Tratamiento 6:** Nueva Andrea 66 RR 38.4 kg/ha del Glyphosato
- Tratamiento 7:** Nueva Andrea 66 RR 51.2 kg/ha del Glyphosato

Cabe mencionar que las aplicaciones de glyphosato se realizaron en dos épocas diferentes en los tratamientos 3 al tratamiento 7.

La primera aplicación se realizó en el estadio V4 con las siguientes dosis:

- Tratamiento 3:** Nueva Andrea 66 RR 3.2 kg/ha del Glyphosato
- Tratamiento 4:** Nueva Andrea 66 RR 6.4 kg/ha del Glyphosato
- Tratamiento 5:** Nueva Andrea 66 RR 12.8 kg/ha del Glyphosato
- Tratamiento 6:** Nueva Andrea 66 RR 19.2 kg/ha del Glyphosato
- Tratamiento 7:** Nueva Andrea 66 RR 25.6 kg/ha del Glyphosato

La segunda en la fase reproductiva R1

Tratamiento 3: Nueva Andrea 66 RR 3.2 kg/ha del Glyphosato



Tratamiento 4: Nueva Andrea 66 RR 6.4 kg/ha del Glyphosato



Tratamiento 5: Nueva Andrea 66 RR 12.8 kg/ha del Glyphosato





Tratamiento 6: Nueva Andrea 66 RR 19.2 kg/ha del Glyphosato



Tratamiento 7: Nueva Andrea 66 RR 25.6 kg/ha del Glyphosato



Control Cultural

En cuanto al control de las malezas se realizó carpidas en las parcelas donde no se aplicó glyphosato totalizando 3 en total.

Cuidado General

Se aplicó insecticidas y fungicidas todos en forma preventivas para evitar el ataque de las plagas y enfermedades

Cosecha

La cosecha se realizó en fecha 30 de abril, se arrancó en forma manual las plantas juntando cada parcela debidamente identificados y se llevó para trillar en IPTA



Responsable del ensayo
Ing. Agr. Vicente Garcete
Matricula Profesional Nº 3.967

8.2. Materiales Utilizados



Figura 2. Muestra de Soja con sus respectivos tratamientos con Glifosato



Figura 3. Disposición de los *Raks* de los animales utilizados en el ensayo



Figura 4. Proceso de elaboración de Pellet a partir de soja transgénica, balanceado y almidón de mandioca en proporción 1:1:3

8.3.

Tabla 7. Resumen sobre estudios de toxicidad en modelo murino sobre el consumo de productos biotecnológicos con diferentes puntos finales de evaluación y tiempos de tratamientos. Extraído de Snell et al. (2012)

Autor	Modelo animal	Periodo de tratamiento	Parámetros evaluados	Conclusiones
Daleprane, Pacheco, & Boaventura, (2009)	rata	Dos generaciones (455 días)	Crecimiento. Composición de sangre	sin diferencias entre soja convencional y transgénica. Puede ser utilizado para consumo animal como fuente de proteína.
Daleprane et al., (2009)	rata	455 días	Tejido cavidad de aorta. Colesterol, triacilglicerol, insulina	sin diferencias observadas entre soja convencional y transgénica en todos los parámetros. Sustancialmente equivalentes.
Sakamoto et al. (2007)	rata	26 y 52 semanas	Crecimiento. Aprovechamiento. Peso de órgano. Hematología, suero	Sin riesgos, sin efectos a largo plazo
Manuela Malatesta, Caporaloni, Gavaudan, et al., (2002).	ratón	240 días	Morfometría ultraestructural y análisis inmunocitoquímico de núcleo de hepatocitos	Tasa metabólica alta y tráfico molecular. Influencia de soja GM en funciones nucleares en hepatocitos en ratones juveniles y adultos
Manuela Malatesta, Caporaloni, Rossi, et al. (2002).	ratón	240 días	Histoquímica de células pancreáticas acinares	Una dieta alta en soja transgénica parece influenciar en la síntesis de zimógeno y procesamiento de células acinares

M. Malatesta et al. (2003)	ratón	240 días	Morfometría ultraestructural y análisis inmunocitoquímico de núcleo de células acinares pancreáticas	Una dieta alta en soja transgénica parece influenciar en metabolismo del páncreas
Vecchio et al. (2004).	ratón	240 días	Química enzimática de suero, hígado y páncreas	Leve deseso durante los primeros 2-8 meses, muchos reversibles. Causas no establecidas
M. Malatesta et al. (2005)	ratón	2 años	Histoquímica de hepatocitos	La soja transgénica influencia en funciones del hígado durante el envejecimiento
Daleprane et al. (2009)	rata	periodo de vida del animal	Ganancia de peso, asimilación proteica, consumo de ración. Tasa de conversión de alimento.	Diferencias entre animales experimentales y control
Brake & Evenson (2004)	ratón	8, 16, 26, 32, 63 y 87 días post natalidad	Desarrollo testicular. Peso	Sin riesgos, sin efectos multigeneracionales
(Magaña-gómez, Cervantes, Yepiz-plascencia, Calderón, & Barca (2008)	rata		Evaluación nutricional, nivel de amilasa en plasma, histología y expresión de respuesta de genes pancreáticos	Sin influencia en desempeño nutricional. Se observó cambios microscópicos en el páncreas
Hammond, Kough, Herouet-Guicheney, & Jez, (2013)	rata	4 semanas	Desarrollo, conversión de alimento, cambios histopatológicos	Diferencias relativas en pesos de órganos y hallazgos de patología en machos observados

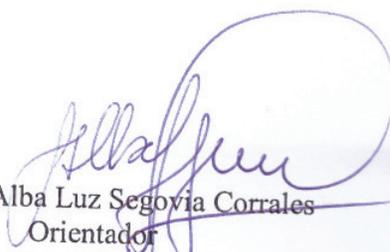
**EFFECTOS GENOTÓXICOS Y CITOTÓXICOS DE SOJA (VARIEDAD
NUEVA ANDREA 66RR) EN MEDULA OSEA DE RATONES *SWISS*
ALBINOS**

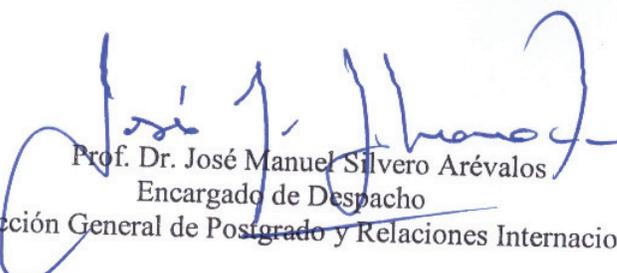
HAJIME GUILLERMO KURITA OYAMADA

Aprobado en fecha 21 de junio de 2017

Tribunal Examinador

Dra. Biol. Edith Alba Luz Segovia Corrales	CEMIT/DGICT/UNA
MSc. Pastor Enmanuel Pérez Estigarríbia	FACEN/UNA
Biol. Dra. Nilsa Elizabeth González Brítez	IICS/UNA


Edith Alba Luz Segovia Corrales
Orientador


Prof. Dr. José Manuel Silvero Arévalos
Encargado de Despacho

Dirección General de Postgrado y Relaciones Internacionales



drea
ada.
ción

ción
de

ivos.
L

595.78