

## Evaluación de la mutagenicidad del herbicida glifosato en *Prochilodus lineatus* a través del test de micronúcleos

Caramello, C.S.; Jorge, L.C.

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Nordeste,  
Sargento Cabral 2139, Corrientes (3400), Argentina.  
E-mail: ccaramello@vet.unne.edu.ar

### Resumen

**Caramello, C.S.; Jorge, L.C.: Evaluación de la mutagenicidad del herbicida glifosato en *Prochilodus lineatus* a través del test de micronúcleos. Rev. Vet. 33: 2, 258-265, 2022.** El uso de plaguicidas puede afectar el ecosistema acuático. A través del suelo, estos contaminantes se drenan a los ríos, lagunas, etc. En la Argentina, agroquímicos a base de glifosato como el Roundup, se utilizan ampliamente en actividades agrícolas. Considerando esto, el objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos genotóxicos de Roundup Full II® en células sanguíneas de ejemplares juveniles de *Prochilodus lineatus*. Los peces se expusieron a las concentraciones de 0,025 µg/L, 0,05 µg/L y 0,1 µg/L de glifosato (Roundup Full II) durante 7 días. Después de este período, para la preparación de los frotis se extrajo de los peces sangre por punción de la vena caudal. El análisis de los frotis reveló la ocurrencia de células con micronúcleos, células binucleadas, lobulaciones nucleares (Lobed nuclei; blebbed nuclei), muescas nucleares (notched nuclei), vacuolas nucleares, microcitos, brotes y núcleos con puente. El estudio estadístico mostró diferencias significativas entre los grupos de control y los tratados. De esta manera, los resultados sugieren la existencia de un daño en el material genético causado por la exposición de los peces al pesticida.

**Palabras claves:** Glifosato, Micronúcleos, Alteraciones Morfológicas Nucleares, *Prochilodus lineatus*.

### Abstract

**Caramello, C.S.; Jorge, L.C.: Evaluation of mutagenicity of herbicide glyphosate in the *Prochilodus lineatus* using the micronucleus test. Rev. Vet. 33: 2, 258-265, 2022.** The use of pesticides can affect the aquatic ecosystem. Through the soil, these pollutants are drained into rivers, lagoons, etc. In Argentina, glyphosate-based agrochemicals such as Roundup are widely used in agricultural activities. Considering this, the objective of this work was to evaluate the genotoxic damage of Roundup Full II® in blood cells of juvenile specimens of *Prochilodus lineatus* were evaluated. The fish are exposed to concentrations of 0.025 µg/L, 0.05 µg/L and 0.1 µg/L of glyphosate (Roundup Full II) for 7 days. After this period, for the preparation of the smears, blood was extracted from the fish by puncture of the caudal vein. Smear analysis will reveal micronucleus, binucleate cells, lobed nuclei, blebbed nuclei, notched nuclei, nuclear vacuoles, microcytes, buds and cells with nuclear bridge. The statistical analysis showed significant differences between the control and treated groups. In this way, the results suggest the existence of a genetic damage caused by the exposure of the fish to the pesticide.

**Key words:** glyphosate, micronucleus, nuclear morphology alterations, *Prochilodus lineatus*.

## INTRODUCCIÓN

Argentina es un país que presenta una enorme heterogeneidad geográfica, su extenso territorio y la variedad climática existente permiten producir diversidad de productos agrícolas. En este contexto, existe un conflicto constante entre dos aspectos, aumentar el volumen de la producción y preservar la salud de los consumidores del posible impacto colateral que esto conlleva. El empleo desregulado de plaguicidas en Argentina afectó, de diversas maneras, a diferentes aspectos de la sociedad.

El incremento en la utilización de los agroquímicos durante los últimos diez años produjo una crisis incuestionable en el país. Específicamente, hay una correlación entre el uso de plaguicidas tóxicos y un aumento de enfermedades peligrosas en comunidades rurales y su efecto en las acciones del gobierno<sup>8</sup>.

Los peces se utilizan ampliamente para evaluar la salud de los ecosistemas acuáticos porque los contaminantes se acumulan en la cadena alimentaria y son responsables de los efectos adversos y la muerte en los sistemas acuáticos<sup>16</sup>.

Por otro lado, los peces desempeñan diferentes roles en la red trófica, como la bioacumulación de contaminantes ambientales y la biotransformación de xenobióticos a través del metabolismo oxidativo dependiente del citocromo p450; también responden a mutágenos en bajas concentraciones<sup>20</sup>.

Se ha comprobado que la reparación del ADN es más lenta en los peces que en los mamíferos<sup>15,42</sup>. Por lo tanto, pueden usarse como organismos centinelas para estudios de biomonitorio, y las posibles lesiones podrían ser detectadas mediante la utilización de biomarcadores<sup>24</sup>.

Las prácticas agrícolas que utilizan el glifosato afectan a los organismos “no blanco”, modificando la estructura y la funcionalidad de los ecosistemas de agua dulce<sup>12,40</sup>. Por otro lado, el glifosato Atanor® **acelera el deterioro de la calidad del agua, especialmente cuando se consideran los sistemas de agua de pequeño volumen**<sup>41</sup>.

Por lo expuesto anteriormente, el objetivo del presente trabajo fue analizar la genotoxicidad del herbicida glifosato (Roundup Full II®), en células sanguíneas de ejemplares juveniles de *Prochilodus lineatus* a través de la determinación de la frecuencia de micronúcleos (MN) y alteraciones morfológicas nucleares.

## MATERIALES y MÉTODOS

Los procedimientos adoptados en la realización del presente trabajo fueron examinados y avalados por el Comité de Ética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional

del Nordeste (UNNE). Protocolo 0033.

### Animales

Los ensayos se realizaron con ejemplares juveniles de *P. lineatus* (Orden Characiformes, Familia Prochilodontidae), provenientes del Centro de Piscicultura del Instituto de Ictiología del Nordeste (INICNE) de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNNE. Antes de las pruebas de toxicidad, los especímenes fueron aclimatados a las condiciones de laboratorio por un lapso de 15 días, permaneciendo en tanques de 300 litros de agua de perforación a 20°C, pH 7,0 y un fotoperíodo ajustado de 12 horas de oscuridad y 12 horas de luz. Durante esta etapa los especímenes fueron alimentados cada 48 horas. Además, se efectuaron controles periódicos de su estado sanitario.

Producto químico

Se empleó para el estudio de genotoxicidad glifosato en formulación comercial (*Roundup® Full II*).

### Diseño Experimental

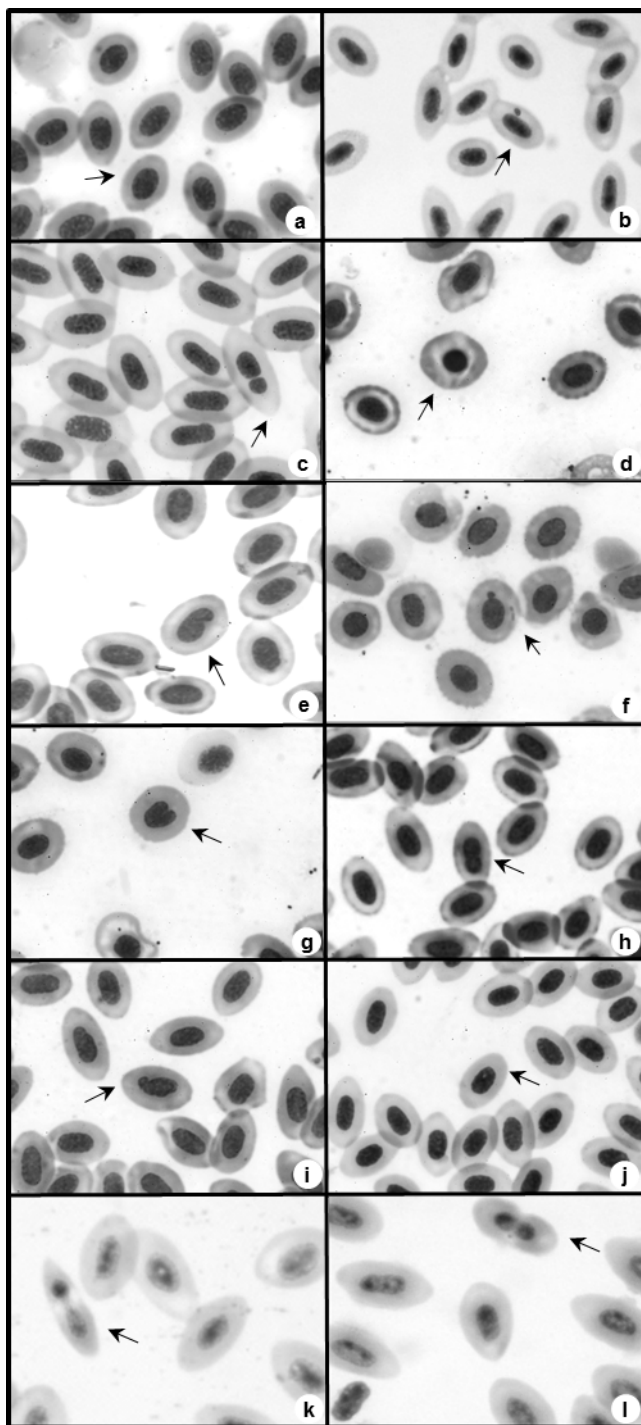
Los peces se dividieron en dos grupos: control (C = mantenidos en agua de pozo artesiano) y tratados con glifosato (T1 = 0,1 µg/L; T2 = 0,05 µg/L y T3 = 0,025 µg/L). Se efectuaron tres réplicas por grupo (3 individuos por pecera). Las peceras poseían 10 litros de capacidad para el bienestar de los peces y el mejor equilibrio de los acuarios (se empleó el cálculo de un litro de agua por cada centímetro de pez). Los animales permanecieron en los acuarios durante un lapso de 7 días, sin recambio de agua.

### Eutanasia

Culminada la etapa de exposición al agroquímico, los ejemplares fueron sacrificados con sobredosis de clorhidrato de lidocaína. Para el ensayo de micronúcleos (MN) y alteraciones morfológicas nucleares (AMN) las muestras de sangre se obtuvieron en los peces por punción de la vena caudal, utilizando una jeringa heparinizada.

### Estudio de micronúcleos

Posterior a la extracción de sangre, se colocó una gota sobre un portaobjeto para la realización de los frotis, éstos se fijaron en etanol durante 10 min y se dejaron secar al aire a temperatura ambiente; luego se tiñeron con Giemsa al 5% en tampón Sörenson (pH 6,9) durante 20 minutos. En cada individuo, se examinó un total de 2000 eritrocitos con membrana citoplasmática intacta. Las microfotografías fueron tomadas con microscopio Olympus BX41 provista de cámara digital Motic 9.0. En las muestras analizadas se determinó la cantidad de micronúcleos (MN) y de alteraciones morfológicas nucleares (AMN).



**Figura 1.** Fotomicrografía de frotis sanguíneos de *P. lineatus*, a: eritrocitos normales; b y c: micronúcleos de diferentes tamaños; d: microcito; e: notched (muescas nucleares); f: brote nuclear; g: lobed (núcleos lobulados); h: núcleo en forma de ocho; i: blebbed (evaginaciones); j: vacuola nuclear; k: núcleo con puente plasmático; l: binucleado.

Para el análisis de micronúcleos (MN) se empleó el ensayo de micronúcleos<sup>23,35</sup>. En el análisis, además de la frecuencia de micronúcleos, también fueron consideradas las alteraciones morfológicas nucleares: notched (núcleos con muescas), blebbed (evaginaciones nucleares), lobed (núcleos lobulados), dumb-

bell-shaped (núcleos bilobulados), segmental nuclei (núcleos segmentados), y vacuolated nuclei (núcleos con vacuolas)<sup>5</sup>.

**Tabla 1:** Comparación de Tukey de micronúcleos y alteraciones morfológicas nucleares.  $\alpha=0,05$ ,  $DMS=0,96131$ ,  $Error: 0,3145$ ,  $gl: 28$ .

Dosis	Medias	n	E.E.	
Sin	0,58	9	0,19	A
0,025 $\mu\text{g/L}$	1,94	7	0,21	B
0,05 $\mu\text{g/L}$	2,16	8	0,20	B
0,1 $\mu\text{g/L}$	2,48	8	0,20	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

#### Análisis Estadístico

Los resultados del Test de MN y AMN fueron evaluados por el Análisis de la Varianza (Paramétrica), seguido de la Prueba Estadística de Tukey para comparaciones múltiples entre los grupos, con 5% de significancia.

#### RESULTADOS

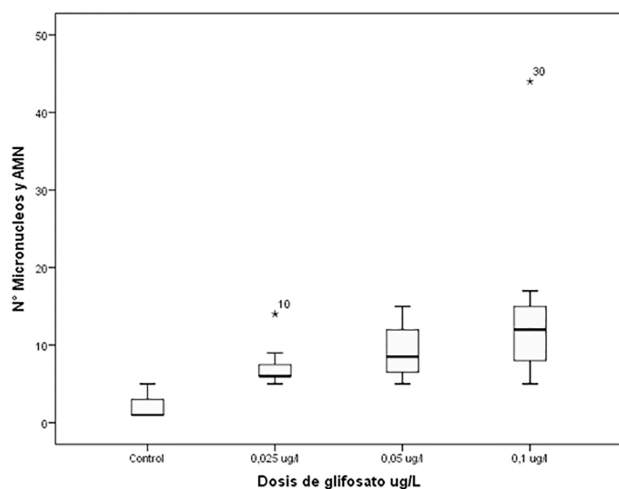
Se analizaron muestras provenientes de 32 animales, elaborándose dos frotis por cada uno. Se examinaron un total de 64.000 células, contándose 2.000 eritrocitos por individuo. De las 64.000 células observadas, 18.000 pertenecieron al tratamiento control y 46.000 a los grupos tratados. Se consideró la forma y estructura de los hematíes, a fin de determinar la frecuencia de micronúcleos y alteraciones morfológicas nucleares. Las anomalías nucleares eritrocíticas detectadas en sangre periférica de *P. lineatus* fueron: micronúcleos, células binucleadas, lobulaciones nucleares (Lobed nuclei; blebbed nuclei), muescas nucleares (notched nuclei), vacuolas nucleares, microcitos, brotes y núcleos con puente plasmático (Figura 1).

Los datos sometidos al análisis de la varianza y comparados por el test de Tukey, mostraron que existe diferencia significativa entre el grupo control y tratado (Tabla 1). La comparación de los resultados nos permite visualizar el aumento de MN y AMN en los hematíes de los individuos que estuvieron en contacto con el herbicida en contraste con los del grupo control (Figura 2).

El análisis evidencia que la respuesta al agroquímico, expresada en el número de anomalías nucleares en los individuos tratados es dosis dependiente. De esta manera, se aprecia como el incremento de la concentración del glifosato se relaciona con un aumento en la frecuencia de MN y AMN en los peces expuestos.

## DISCUSIÓN

El test de micronúcleos es una de las pruebas a corto plazo de mayor aplicación en toxicología genética, y se ha convertido en una de las más importantes implementadas por las entidades reguladoras de diferentes países para evaluar la mutagenicidad y la sensibilidad a xenobióticos<sup>14,30</sup>. Esta técnica está validada internacionalmente como bioensayo para evaluar genotoxicidad de sustancias, exposiciones agudas y crónicas, y es una de las más usadas para identificar agentes cancerígenos<sup>6</sup>. Se considera que la prueba de MN es una forma efectiva de monitorear la presencia de xenobióticos en ambientes acuáticos<sup>31</sup>.



**Figura 2.** Box plot mostrando el número de MN y AMN en los grupos controles y tratados luego del periodo de exposición al agroquímico (Roundup® Full II) durante siete días, exhibiendo diferencias significativas entre ambos grupos ( $p < 0,05$ ). Se puede observar que los grupos tratados presentan un mayor número de alteraciones, existiendo en estos una mayor variabilidad de la distribución de los datos, siendo el grupo conformado por 0,1 µg/L el de mayor dispersión.

Dada la sensibilidad de los peces a los agentes xenobióticos, en el presente trabajo los ejemplares de *P. lineatus* expuestos a las dosis de 0,1 µg/L, 0,05 µg/L y 0,025 µg/L de glifosato (Roundup® Full II) durante siete días, mostraron en sus eritrocitos un aumento significativo en la frecuencia de micronúcleos y de alteraciones morfológicas nucleares. Similares resultados fueron observados en diferentes especies de peces expuestos al herbicida Roundup® en ensayos agudos como en crónicos, en los cuales se emplearon distintas concentraciones del agroquímico.

Asimismo, se evidenció, en ejemplares de *Tilapia rendalli* sometidos a diferentes dosis (50 mg/L, 100 mg/L y 200 mg/L) del herbicida Roundup® durante un periodo agudo, un aumento en la frecuencia de micronúcleos y anomalías nucleares<sup>21</sup>.

Del mismo modo, se observó en individuos de *Carassius auratus* expuestos a varias concentraciones (5 ppm, 10 ppm y 15 ppm) de Roundup® en un ensayo agudo, un aumento en la frecuencia de MN y AMN en los tratados. Según los autores estos resultados son dependientes de la dosis empleada y de la duración del tratamiento<sup>10</sup>.

Con las dosis de 58 mg/L y 116 mg/L de Roundup® durante un periodo de uno a tres días, *Anguilla anguilla* exhibió diversas anomalías nucleares, determinando el potencial efecto genotóxico del compuesto en estudio<sup>22</sup>.

Experiencias realizadas en *Colossoma macropomum* con Roundup® empleándose dosis de 10 mg/L y 15 mg/L durante 96 hs, determinaron que este compuesto podría inducir daño en el ADN en los especímenes expuestos, posiblemente por generar estrés oxidativo, que de persistir ese estímulo de manera crónica derivaría en alteraciones genotóxicas<sup>3</sup>.

Así también, en individuos de *Poecilia reticulata* expuestos a Roundup® durante 24 horas y a las dosis de 1,41 µl/L; 2,83 µl/L; 4,24 µl/L y 5,65 µl/L, se observó un aumento en la frecuencia de MN y AMN, indicando que la cantidad de alteraciones estaba relacionada con las dosis utilizada<sup>36</sup>.

Por otro lado, se identificó en especímenes de *Astyanax* sp, que estuvieron en contacto durante 72 horas a 65 µg/L de Roundup®, una diferencia estadísticamente significativa en la frecuencia de MN entre los individuos tratados con respecto a los controles<sup>11</sup>.

Ejemplares de *Piaractus mesopotamicus* mostraron similares resultados a nivel sanguíneo luego de ser expuestos durante 96 horas a concentraciones subletales de Roundup® (2,75 mg/L). El análisis de los frotis reveló un incremento significativo de micronúcleos y alteraciones nucleares en los individuos tratados comparados con los controles<sup>26</sup>.

Ensayos realizados con Roundup® en ejemplares de *Astyanax altiparanae* a concentraciones de 1,58 mg/L y 5mg/L durante un periodo de cinco días, mostraron un aumento en la incidencia de MN y AMN en los individuos tratados con la dosis de 5 mg/L, los autores atribuyen esta respuesta a la posibilidad de que el Roundup® provoque el desencadenamiento de estrés oxidativo celular, lo cual de persistir en el tiempo, derivaría en notables lesiones citotóxicas y genotóxicas<sup>38</sup>.

Experiencias realizadas con varios plaguicidas incluido el Roundup®, determinaron en la especie *Astyanax* sp. el mayor potencial genotóxico de este herbicida frente a los demás agroquímicos en estudio. Los agroquímicos utilizados fueron Roundup® (glifosato) y Hexaron® (Diuron y Hexazinona). Se realizaron varios tratamientos (Roundup® 0,006 ml/L y

0,003 ml/L; Hexaron® 30 mg/L y 15 mg/L, y mezcla: Roundup® 0,003 ml/L y Hexaron® 30 mg/L) aplicando diferentes concentraciones de ambos compuestos. A través del Test de MN y AMN se observó una acción genotóxica significativa en aquellos individuos sometidos al herbicida Roundup® y en los tratados con la mezcla de ambos compuestos. Los autores postulan que esto podría ocurrir como consecuencia de un aumento de peróxidos lipídicos, los cuales alteran la integridad de las membranas celulares induciendo daño en el ADN por otros tipos de radicales de oxígeno<sup>34</sup>.

Del mismo modo, en tratamientos crónicos efectuados en varias especies de peces (*Rhamdia quelen*, *Astyanax bimaculatus*, *Ciprinus carpio*) con Roundup® (1,58 mg/L y 3,16 mg/L), Folicur® (0,4 mg/L y 0,8 mg/L) y una mezcla de ambos plaguicidas (3,6 mg/L y 0,8 mg/L), se evidenció un aumento de MN y AMN en eritrocitos de los individuos expuestos al herbicida Roundup® y a la mezcla Roundup® - Folicur®; este trabajo refleja un notable sinergismo entre los compuestos cuando estos se adicionan al mismo tiempo en el agua. Los resultados obtenidos a las dosis de exposición testeadas podrían deberse al potencial genotóxico del Roundup®, y la posible acción del mismo sobre los órganos hematopoyéticos de los teleosteos (riñón anterior y posterior). Se presume que el herbicida podría afectar la formación de eritrocitos, lo cual tendría relación directa con la manifestación de anormalidades nucleares<sup>18</sup>.

Asimismo, la prueba de micronúcleo en especímenes de *P. lineatus* y *Astyanax altiparanae* expuestos a Roundup® durante 96 horas, no reveló daño mutagénico. La falta de diferencia significativa en los valores relativos de anormalidades nucleares en individuos tratados y controles se podría deber a las concentraciones y los tiempos testeados del agroquímico incapaces de producir alteraciones en el ADN. No obstante, los autores no descartan el potencial tóxico del producto<sup>7,13</sup>.

De igual manera, investigaciones realizadas con Roundup® en *Corydoras paleatus* durante tres, seis y nueve días a una concentración baja de Roundup® (0,00667 ml/L), en los análisis hematológicos no presentaron diferencia entre el grupo control y tratado, se atribuyen estos resultados a las condiciones experimentales y a la duración del ensayo<sup>19</sup>.

Por otro lado, pruebas de laboratorio realizadas con peces, en donde se utilizó el glifosato en su forma pura, mostraron iguales resultados a los hallados en el presente trabajo (Roundup® Full II). Además, tenemos que el análisis de los extendidos de sangre de especímenes de *Ancistrus brevifilis* expuestos por 96 horas a las dosis de 0,1 ppm, 3 ppm y 5 ppm de glifosato; revelaron que los animales sometidos a la dosis

de 5 ppm presentaban una mayor frecuencia de MN y AMN, lo cual sería un indicativo de genotoxicidad en células sanguíneas<sup>25</sup>. También, se estudió durante 96 horas la acción de distintas concentraciones de glifosato (8,1 mg/L; 16,3 mg/L; 24,4 mg/L) en especímenes de *Chana punctatus*; transcurrido el periodo de exposición se determinó daño genotóxico en los individuos tratados<sup>29</sup>, igualmente se evidenció en *Danio rerio* expuesto por 360 horas a 65 µg/L de glifosato un aumento significativo en la frecuencia de MN, se sugirió que los peces tras absorber el compuesto desencadenarían como respuesta biológica la formación de MN<sup>28</sup>.

Incluso, en líneas celulares diploides y triploides de peces se efectuaron estudios con glifosato en su forma pura. Las concentraciones usadas en los cultivos fueron de 80 mg/L, 240 mg/L, 400 mg/L, 560 mg/L, 720 mg/L, 880 mg/L, 1040 mg/L, los cuales se incubaron a 25°C por 24 horas. La línea diploide mostró un mayor índice de MN y AMN, sin embargo, en ambas líneas, diploides y triploides se observaron también daños a nivel de la cromatina como condensación, retículo endoplasmático dañado y cuerpos apoptóticos. Los resultados indicarían que el pesticida en el rango de las concentraciones empleadas presentaría un potencial riesgo, ya que inhibe la proliferación celular y provoca lesiones citotóxicas y genotóxicas en líneas celulares de peces<sup>32</sup>.

Otra formulación comercial a base de glifosato como ser el herbicida Panzer (glifosato 48%), fue empleado para determinar su posible potencial genotóxico en especímenes de *Cnesterodon decemmaculatus*. Estos peces estuvieron en contacto con el agroquímico por un breve lapso de tiempo (96 horas) y a diferentes concentraciones 3,9 mg/L; 7,8 mg/L y 11,8 mg/L. El análisis de los eritrocitos en los individuos tratados reveló un incremento en la tasa de MN y AMN, lo cual es un indicativo de que este herbicida presenta efectos genotóxicos<sup>39</sup>.

Cabe mencionar, que los micronúcleos aparecen en las células hijas, como resultado de daños inducidos en las células parentales. Los fragmentos cromosómicos que resultan de quiebras, pueden no ser incorporados en el núcleo principal de las células hijas después de la mitosis. Una membrana nuclear se formará alrededor del fragmento, el cual será visible como un pequeño (micro) núcleo separado del núcleo principal de la célula. Los MN pueden, también, formarse a partir de un cromosoma entero cuando ocurre daño en el aparato mitótico de la célula, o en el propio cromosoma. En esta situación, el MN va a contener el centrómero del cromosoma, el cual puede ser detectado utilizándose sondas específicas<sup>33</sup>.

En cuanto a las anormalidades morfológicas nucleares, se proponen que estas anomalías son rezagos

anafásicos o fragmentaciones de puentes anafásicos que durante la telofase adquieren una envoltura nuclear independiente al núcleo principal <sup>27</sup>. Sin embargo, otros estudios plantean un modelo donde la formación de las AMN ocurriría durante la interfase de la mitosis. Estos autores realizaron estudios, empleando células COLO 320 DM de carcinoma colorectal en humanos, en el cual se amplificaron los dobles diminutos que no se integran al núcleo o a ningún cromosoma durante la mitosis, los cuales posteriormente son captados por la proteína nuclear en la fase S, todo esto acontecería durante la reconstitución de la envoltura del núcleo <sup>37</sup>. De esta forma, se observó que cuando la lámina B (capa interna nuclear) se reconstruye da lugar a la aparición de brotes o prolongaciones nucleares, las cuales poseen un material genético que se replica y puede ser expulsado hacia el citoplasma con la forma de MN. Las AMN estarían compuestas por fragmentos cromosómicos acéntricos, muchos de ellos intersticiales, los cuales son difíciles de hallar en MN <sup>17</sup>.

Por lo expuesto anteriormente, se podría inferir que las modificaciones en la morfología del núcleo se deberían a problemas que afectan la membrana nuclear interna, y los defectos en la misma podrían traer aparejado complicaciones o problemas en la mitosis o meiosis <sup>1</sup>.

Estudios realizados mostraron que las alteraciones morfológicas nucleares son originadas por contacto con compuestos genotóxicos, dichas anomalías se detectaron inclusive en situaciones donde los micronúcleos no fueron inducidos <sup>2</sup>. Diversos autores asocian la presencia de núcleos blebbed con efectos clastogénicos <sup>4</sup> y la aparición de células binucleadas sería un indicador de citotoxicidad <sup>9</sup>. Por lo tanto, las anomalías morfológicas nucleares son hallazgos cuya importancia sería análoga a la de los micronúcleos, y tiene gran relevancia como herramienta en el monitoreo ambiental.

## CONCLUSIÓN

Los datos obtenidos en este trabajo nos permiten determinar la capacidad del glifosato de inducir a lesiones del material genético observables en eritrocitos periféricos, demostrando su potencial genotóxico y citotóxico. La frecuencia de aparición de las lesiones evaluadas está intrínsecamente ligada a la concentración de glifosato empleada. De tal manera, que al aumentar la concentración del herbicida, el número de anomalías también se eleva, determinando de esta manera la capacidad contaminante del glifosato y su potencial efecto deletéreo sobre el medio ambiente.

## REFERENCIAS

1. **Alberts B et al.** 1997. Essential Cell Biology: An Introduction to the Molecular Biology of the Cell Garland Science, New York.
2. **Ayllon F, Garcia-Vazquez E.** 2001. Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Ecotoxicol. Environ. Saf., 49: 221-225.
3. **Braz Mota S, Sadauskas Henrique H, Duarte RM, Val AL, Almeida Val VM.** 2015. Roundup® exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Collossoma macropomum*. Chemosphere. 135: 53-60.
4. **Brzuzan P, Jurczyk L, Wozny M.** 2006. Molecular geometry, CYP1A gene induction and clastogenic activity of cyclopenta [c] phenanthrene in rainbow trout. Polycyclic Aromatic Compounds.26: 345-365.
5. **Carrasco, KR, Tilbury, KL, Meyers, MS.** 1990. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 47: 2123-2136.
6. **Castillo E, Guevara Fujita ML, Fujita R.** 2011. Optimización del test de micronúcleos en linfocitos cultivados usando una metodología de gradiente y frotis.
7. **Cavalcante DGSM, Martínez CBR, Sofia SH.** 2008. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 655 (1): 41-46.
8. **Cavanaugh MM.** 2017. Las pesticidas en Argentina: la tensión entre proteger o producir. Honors Research Projects. 568. [http://ideaexchange.uakron.edu/honors\\_research\\_projects/568](http://ideaexchange.uakron.edu/honors_research_projects/568)
9. **Çavao T, Ergene-Gözükara S.** 2005. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. Aquatic Toxicology. 74: 264-271
10. **Çavaş T, Könen, S.** 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 (4): 263-268.
11. **Da Silva MRLR.** 2015. Avaliação da toxicidade celular do herbicida glifosato em *Astyanax* spp. Saúde e meio ambiente: Revista Interdisciplinar, 3(2), 62-69.
12. **Di Fiori E, Pizarro H, Dos Santos AM, Cataldo D.** 2012. Impact of the invasive mussel *Limnoperna fortunei* on glyphosate concentration in water. Ecotoxicol. Environ. Saf. 81, 106-13.

13. **Disner GR, Rocha MV, Miranda GB.** 2011. Avaliação da atividade mutagênica do Roundup em *Astyanax altiparanae* (Chordata, Actinopterygii). Evidência. 11 (1): 33-42.
14. **EPA.** 1998. Toxicological Review of Hexavalent Chromium. Washington, DC: National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development. 64 pp
15. **Espina NG, Wesis P.** 1995 DNA repair in fish from polluted estuaries. Marine Environmental Research. 39 (1/4): 309-312.
16. **Farkas A, Salanki J, Specziar A.** 2002. Relation between growth and the heavy metal concentration in organs of bream *Abramis brama* L. populating lake Balaton. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 43(2), 236-243.
17. **Fenech M, Crott JW.** 2002. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay. Mutat Res., 504: 131-136.
18. **Ferraro MVM.** 2009. Avaliação de três espécies de peixes - *Rhamdia quelen*, *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus*, como potenciais bioindicadores em sistemas hídricos através dos ensaios: Cometa e dos Micronúcleos. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. Brasil. 176 p.
19. **Ghisi NDC.** 2007. Avaliação do efeito mutagênico do herbicida Roundup em bioensaio agudo com o bioindicador *Corydoras paleatus* (Pisces). Monografia de Grado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. Brasil. 43p.
20. **Goksoyr A et al.** 1991. Immunochemical cross reactivity of  $\beta$ -naphthoflavon inducible cytochrome P450 (P450 IAI) in liver microsomes from different fish species and rat. Fish Physiology and Biochemistry. 9: 1-13.
21. **Grisolia CK.** 2002. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 518: 145-150.
22. **Guilherme S, Gaivão I, Santos MA, Pacheco M.** 2010. *European eel* (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup®—a glyphosate-based herbicide. Mutagenesis. 25: 523-530.
23. **Heddle, JA.** 1973. A rapid in vivo test for chromosomal damage. Mutation Research. 18: 187-190.
24. **Landolt ML, Kocan RM.** 1983. Fish cell cytogenetics: A measure of the genotoxic effects of environmental pollutants. En: NRIAGU, J.O. (Ed.) Aquatic Toxicology. John Wiley and Sons Ins. pp. 335-352.
25. **Lárez López CY.** 2011. Genotoxicidad en células sanguíneas de la guaraguara *Ancistrus brevifilis* (Eigenmann, 1920), bajo condiciones controladas y naturales en dos localidades del río Manzanares, Estado de Sucre, Venezuela. Tesis de Magister. Universidad de Oriente. Cumaná. Venezuela. 56 p.
26. **Leveroni FA, Caffetti JD, Pastori MC.** 2017. Genotoxic response of blood, gill and liver cells of *Piaractus mesopotamicus* after an acute exposure to a glyphosate-based herbicide. Caryologia. 70 (1): 21-28.
27. **Lindberg HK, Wang X, Järventaus H, Falck GC, Norppa H, Fenech M.** Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. Mutat Res. 2007; 617:33-45.
28. **Nezzi L.** 2015. Efeito do herbicida glifosato sobre as células somáticas e germinativas de testículo de peixe *Danio rerio* (Hamilton, 1822). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. Brasil. 81p
29. **Nwani CD et al.** 2013. Induction of micronuclei and nuclear lesions in *Channa punctatus* following exposure to carbosulfan, glyphosate and atrazine. Drug and chemical toxicology. 37 (4): 370-377.
30. **OECD.** 1997. OECD guideline 474. Guideline for the testing of chemicals. Mammalian erythrocyte micronucleus test.
31. **Palacio Betancur I, Palacio Baena JA, Camargo Guerrero M.** 2009. Micronuclei test application to wild tropical ichthyic species common in two lentic environments of the low zones in Colombia. Actual Biol. 31:67-77.
32. **Qin Y, Li X, Xiang Y, Wu D, Bai L, Li Z, Liang Y.** 2017. Toxic effects of glyphosate on diploid and triploid fin cell lines from *Misgurnus anguillicaudatus*. Chemosphere. 180: 356-364.
33. **Ribeiro LR.** 2003. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. Mutagênese Ambiental. ULBRA, Canoas, 173-178.
34. **Rossi S.** 2008. Uso de biomarcadores para a detecção de efeitos subletais dos pesticidas Roundup® e Hexaron® em *Astyanax* sp. (Pisces, Teleostei). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. Brasil. 64 p.
35. **Schmid, W.** 1975. The micronucleus test. Mutation. Research. 31: 9-15.
36. **Souza Filho J, Sousa CCN, Silva CC, Sabóia Morais SMT, Grisolia CK.** 2013. Mutagenicity and genotoxicity in gill erythrocyte cells of *Poecilia reticulata* exposed to a glyphosate formulation. Bulletin of environmental contamination and toxicology. 91 (5): 583-587.
37. **Tanaka T, Shimizu N.** 2000. Induced detachment of acentric chromatin from mitotic chromosomes leads to their cytoplasmic localization at G1 and the micronucleation by lamin reorganization at S phase. J Cell Sci. 113: 697-707.

38. **Turek J, Castilhos Ghisi N, Matozo F, Noletto RB.** 2018. Efeitos citotóxicos de um herbicida a base de glifosato no peixe *Astyanax altiparanae*. Luminária. 19 (02): 6-12.
39. **Vera Candiotti J, Soloneski S, Larramendy ML.** 2013. Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of glyphosate-based herbicides in the ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842). Ecotoxicology and environmental safety. 89: 166-173.
40. **Vera MS et al.** 2010. New evidences of Roundup (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. Ecotoxicology 19, 710-21.
41. **Vera MS et al.** 2012 b. Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanor® on freshwater microbial communities. Ecotoxicology 21, 1805-16
42. **Walton DG, Acton AB, Stich HF.** 1984. DNA repair synthesis following exposure to chemical mutagens in primary liver, stomach and intestinal cells isolated from rainbow trout. Cancer Research. 44 (3): 1120-1121.