

## Trabajo completo

# Evaluación de genotoxicidad en linfocitos humanos expuestos a mezclas de biocidas mediante electroforesis en gel de células individuales (Ensayo cometa)

RECIBIDO: 16/06/2011

ACEPTADO: 15/09/2011

Muchut, S.<sup>1</sup> • Simoniello, M. F.<sup>1</sup> • Scagnetti, J.<sup>1</sup> •  
Poletta G. L.<sup>1,2</sup> • Kleinsorge, E. C.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cátedra Toxicología, Farmacología y Bioquímica Legal, Fac. Bioquímica y Ciencias Biológicas - UNL, Santa Fe. <sup>2</sup>CONICET.

\*e-mail: gisepoletta@hotmail.com

**RESUMEN:** El avance de las actividades agrícolas en nuestro país tiene como efecto directo el aumento en la utilización de pesticidas en grandes extensiones de tierra. El objetivo de este estudio fue evaluar la genotoxicidad de pesticidas de amplio uso en nuestra región, glifosato, cipermetrina y la mezcla de ambos, en linfocitos humanos utilizando el Ensayo cometa. Se realizaron 4 ensayos de exposición: 1) a la formulación de Cipermetrina (Atanor®, 30%), 2) a la formulación de Glifosato (Roundup® 66,2%), 3) a Glifosato puro (99,9%) y 4) a una mezcla de la formulación de Cipermetrina y Glifosato. Los resultados demostraron que ambas formulaciones de plaguicidas, así como la mezcla, presentaron un índice de daño superior al control negativo, poniendo de manifiesto la importancia de evaluar las mezclas de plaguicidas utilizadas en agricultura para detectar en forma temprana el potencial

riesgo que implican para la salud de los trabajadores que realizan aplicaciones múltiples.

**PALABRAS CLAVES:** genotoxicidad – mezclas de plaguicidas – cipermetrina – glifosato

**SUMMARY:** *Evaluation of genotoxicity in human lymphocytes exposed to biocide mixtures by single cell gel electrophoresis (Comet assay).*

The expansion of agricultural activities in our country has led to an increasing pesticides use in wide extensions of lands. The aim of this study was to evaluate the genotoxicity of pesticides widely used in our region, glyphosate, cypermethrin, and the mixture of both, in human lymphocytes through the Comet assay. We carried out 4 exposure assays: 1) to Cypermethrin formulation (Atanor®, 30%),

2) to Glyphosate formulation (Roundup® 66.2%), 3) to pure Glyphosate (99%) and 4) to the mixture of Cypermethrin and Glyphosate formulations. Results showed that both pesticide formulations as well as the mixture, induced increases in damage index compared to the negative control. These data highlight the importance of

assessing pesticide mixtures commonly used in agriculture, in order to early detect the potential hazards they imply for health of the workers that make serial multiple applications.

**KEYWORDS:** genotoxicity - pesticide mixtures - cypermethrin - glyphosate

---

### Introducción

En los últimos 15 años, la frontera agrícola argentina se expandió de 15 a 30 millones de hectáreas cultivadas, generando cambios en el uso de la tierra en varias regiones del país (1). Junto con el aumento de la superficie cultivada, también llegaron nuevas formas de trabajar la tierra. La adopción de los cultivos transgénicos y el control eficaz de plagas a través de compuestos químicos, contribuyeron a un mayor rendimiento económico de los cultivos. Sin embargo, muchos de estos compuestos son capaces de actuar sobre organismos no-blanco, incluidos los seres humanos. De hecho, se considera que sólo entre el 10-15 % de los plaguicidas aplicados en agricultura ejercen su acción directamente sobre los organismos plaga, mientras que el resto se dispersa en el ambiente (2).

El uso creciente y la inadecuada manipulación de sustancias destinadas a eliminar o atenuar el efecto de plagas animales o vegetales, han despertado cada vez mayor inquietud sobre los riesgos y daños que podrían provocar en el ambiente y la salud pública. Los plaguicidas pueden causar problemas de intoxicación aguda o crónica para las personas que manipulan, aplican o trabajan con estos productos. La exposición a plaguicidas se ha asociado con el cáncer, las enfermedades neurológicas degenera-

tivas y la respuesta inmune alterada, entre otras, pero el mecanismo de acción no está claro (3).

El Glifosato [N-(fosfonometil) glicina,  $C_3H_8NO_5P$ ] es uno de los herbicidas que alcanzó mayor difusión frente a los cambios de la agricultura. En Argentina, durante el año 2010 solamente, se comercializaron 180 millones de litros de glifosato (4). Es un herbicida no selectivo, de amplio espectro, que inhibe el crecimiento de plantas a través de la interferencia con la producción de aminoácidos aromáticos esenciales, al inhibir la enzima encargada de su producción. Su mecanismo de acción es a través del contacto directo con las hojas y la subsecuente traslocación a través de la planta.

Otro plaguicida ampliamente utilizado en el país en agricultura y también en productos del hogar para combatir insectos comunes es la Cipermetrina ( $C_{22}H_{19}C_{12}NO_3$ ), insecticida del grupo de los piretroides, de amplio espectro, no sistémico, que actúa por contacto e ingestión. Ofrece un control efectivo de insectos (lepidópteros, coleópteros y hemípteros) y baja toxicidad para los mamíferos. Es estable a la luz solar y resistente al lavado por lluvias, características que le otorgan persistencia de acción.

Los pesticidas pueden producir alteraciones en el nivel genético, incluyendo desde micro a macromutaciones. Estas alteracio-

nes tienen la capacidad de producir modificaciones de las proteínas resultantes, alterando su funcionalidad y pudiendo causar, a largo plazo, trastornos en la salud humana. El daño generado por mutaciones puede incluir un amplio rango de enfermedades hereditarias, cáncer, anomalías congénitas y se lo vincula además con envejecimiento precoz o procesos de senescencia en general.

Dentro de los ensayos utilizados para la detección de daño al ADN se encuentra el Ensayo Cometa (EC), también llamado Electroforesis en gel de células individuales, que permite evaluar los niveles de lesión y reparación del ADN en cualquier población celular, sin necesidad de que la misma se encuentre en proliferación. El EC es un método versátil y sensible para medir roturas de simple y doble cadena del ADN y sitios álcali-lábiles. El mismo se basa en montar las células de interés sobre un portaobjeto, embebidas en un gel de agarosa, lisarlas para liberar el material genético y permitir la relajación y expansión de la cromatina, exponiendo de esta manera las lesiones previamente generadas por el agente genotóxico. Al someter a los "nucleoides" a un campo electroforético, los fragmentos migran hacia el ánodo (5), dando como resultado la aparición de pequeños "cometas" que pueden observarse al microscopio, preferentemente de fluorescencia. A mayor daño inducido a la doble hélice de ADN, mayor longitud del cometa. La versión alcalina del ensayo es capaz de detectar rupturas de simple cadena, sitios álcali-lábiles, entrecruzamientos ADN-ADN/ADN-proteína y rupturas de cadena simple asociadas con sitios de reparación por escisión incompletos (6).

Debido a que la obtención de una muestra de sangre es relativamente fácil, los linfo-

citos humanos (LH) constituyen una población útil y accesible para evaluar la actividad genotóxica de sustancias químicas y físicas, por lo que es una de las más utilizadas en estudios in vivo concernientes al monitoreo de poblaciones expuestas y en estudios in vitro de potenciales agentes mutágenos (5).

El objetivo de este estudio fue evaluar la genotoxicidad en leucocitos expuestos en directo a la formulación herbicida Roundup® (y su principio activo Glifosato), a una formulación del insecticida Cipermetrina, y a la mezcla de ambos, tal como se aplica en las prácticas agrícolas actuales en Argentina, mediante la electroforesis en gel de células individuales.

## **Materiales y Métodos**

### *Obtención de muestras*

Se obtuvo sangre de 10 dadores sanos de entre 18 y 25 años de edad, de ambos sexos. Las extracciones fueron realizadas por personal de la Dirección de Salud de la Universidad Nacional del Litoral y las muestras se mantuvieron en medio RPMI 1640 en una dilución de 1:20 hasta su utilización en el laboratorio, para asegurar la viabilidad de las células.

### *Ensayos de exposición en directo*

Previo a la realización de los ensayos de exposición finales se realizaron ensayos preliminares basados en las concentraciones utilizadas por Bolognesi y col (7) y por Kocaman y col (8) para Glifosato, su formulado y para Cipermetrina respectivamente. En la dilución celular en RPMI 1640 (1:20) se suspendieron las distintas concentraciones de los biocidas en solución acuosa, las concentraciones finalmente seleccionadas fueron aquellas en las que la viabilidad fue superior al 90 %.

Se realizaron 4 ensayos de exposición: 1) a la formulación de Cipermetrina (Atanor®, 30%), 2) a la formulación de Glifosato (Roundup® 66,2%), 3) a Glifosato puro (SIGMA 99,9%) y, 4) a una mezcla de la formulación de Cipermetrina y Glifosato. Para cada ensayo se utilizó 1 ml de la dilución de sangre en RPMI por concentración y por duplicado.

Las concentraciones utilizadas en el ensayo de exposición a Roundup® (RU) fueron: 24, 48, 96, 192, 240 y 480  $\mu\text{M}$ , en el de exposición a Glifosato (Gly) puro fueron: 24, 48, 96, 192, 384 y 768  $\mu\text{M}$ , y en el de exposición a Cipermetrina (Cip) se utilizaron: 10, 20, 30 y 40  $\mu\text{M}$ . Para el ensayo de exposición a la mezcla (Mz) se tomaron arbitrariamente 4 combinaciones de concentraciones correspondientes a las más bajas de las formulaciones de Cip y RU: 10  $\mu\text{M}$  Cip / 24  $\mu\text{M}$  RU; 20  $\mu\text{M}$  Cip / 48  $\mu\text{M}$  RU; 30  $\mu\text{M}$  Cip / 96  $\mu\text{M}$  RU; 40  $\mu\text{M}$  Cip / 192  $\mu\text{M}$  RU. Como control positivo se utilizó  $\text{H}_2\text{O}_2$  (25  $\mu\text{M}$ ) y como control negativo agua bidestilada.

En todos los casos la exposición se realizó durante períodos de 1 y de 2 horas, en estufa a 37 °C, por duplicado. Una vez finalizada la misma, se centrifugaron las muestras a 1000 rpm durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. Al pellet resultante se agregó 200  $\mu\text{l}$  de agarosa de bajo punto de fusión (ABPF) y se realizaron dos preparados por muestra según protocolo convencional de aplicación del EC en linfocitos humanos (9). Brevemente, se mezclaron las células con ABPF para darles soporte y luego extenderlas sobre portaobjetos. En un paso siguiente, se sumergieron los portaobjetos en una solución de lisis compuesta de detergentes y sales concentradas (2,5 M NaCl, 100 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 10

mM trizma base, 1% Triton X-100 y DMSO 10%; pH 10) durante toda la noche a 4 °C. Con esta solución, se lisaron las paredes celulares y nucleares y el ADN que se encontraba superenrollado se liberó dando lugar a los nucleoides. Los siguientes pasos se realizaron en oscuridad para prevenir el daño adicional al ADN que puede producir la luz. Se prosiguió a colocar los portaobjetos en un buffer de electroforesis alcalino (300 mM NaOH y 1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ; pH > 13), durante 20 minutos, provocando el desenrollamiento de la doble hebra. Luego de la electroforesis (0,7-1 V/cm, 300 mAmp, 20 min, 4 °C), los portaobjetos fueron lavados con una solución neutralizadora. Para la visualización en microscopio de fluorescencia los preparados se tiñeron con Bromuro de Etidio (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), se contaron 100 células por muestra (50 de c/réplica) con un aumento de 400X y se clasificaron en 5 categorías: 0: sin daño, 1-4: daño mínimo a máximo según las recomendaciones realizadas por Collins y col (5) para el conteo visual. A partir de la cantidad de células en cada categoría de daño se calculó un índice de daño (ID) para cada muestra.

Para el cálculo se utilizó la siguiente fórmula  $\text{ID} = n_1 + 2 n_2 + 3 n_3 + 4 n_4$ , siendo  $n_1$  las células incluidas en la categoría 1,  $n_2$  en la categoría 2,  $n_3$  en la categoría 3 y  $n_4$  en la de mayor daño. La categoría 0 no fue incluida en la fórmula ya que corresponde a células sin daño. (3).

### **Análisis estadístico**

Los datos fueron procesados con el programa estadístico SPSS para Windows 14.0 (10), analizando las relaciones dosis-respuesta en cada ensayo mediante regresiones lineales entre el ID y la concentración de los diferentes compuestos estudiados. Para

analizar los ID de las distintas concentraciones entre si y respecto al control positivo y negativo se utilizó el test de Mann-Whitney. Se consideró significativo fue considerado para  $p < 0,05$ .

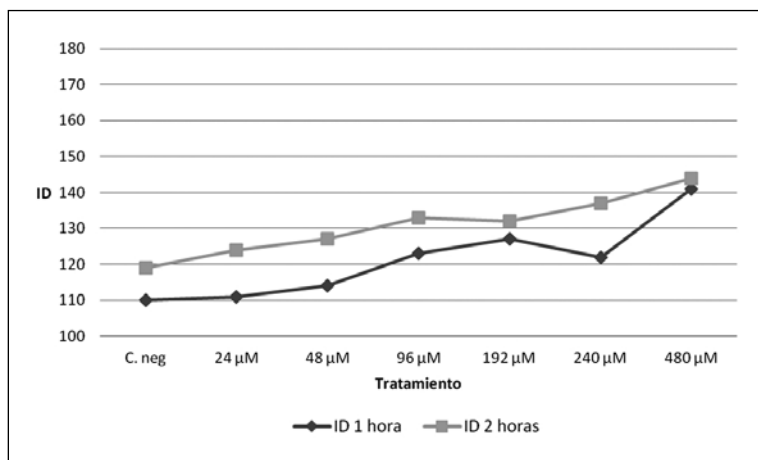
### Resultados

Cuando se compararon los resultados hallados en los controles negativos ( $ID = 113,25 \pm 8,59$ ) con los determinados para los controles positivos ( $ID = 130,00 \pm 5,69$ ) las diferencias fueron estadísticamente significativas (Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ). Los resultados mostraron un claro efecto dosis-respuesta para RU pero no así para el principio activo Gly. Se realizaron las regresiones lineales y se observó un efecto dosis-respuesta para RU tanto a 1 hora ( $R^2 = 0,82$ ;  $p < 0,01$ ) como a 2 horas

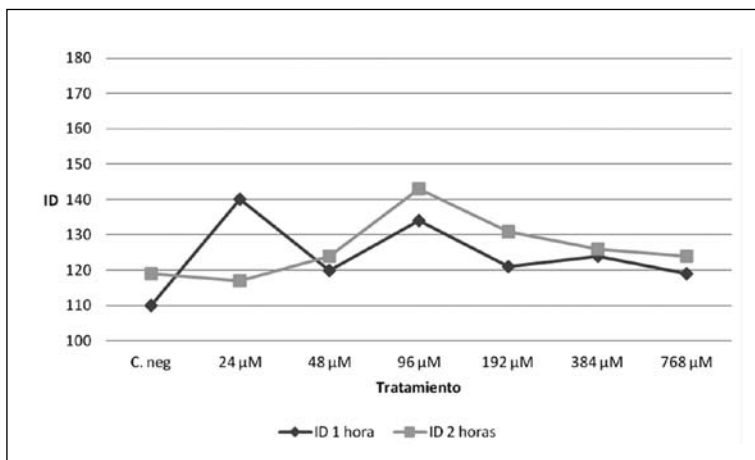
( $R^2 = 0,96$ ;  $p < 0,001$ ), siendo en ambos casos el ID de los grupos expuestos mayor que el control negativo (Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ). En el ensayo realizado durante 1 hora de exposición con el producto formulado, el ID observado en los grupos expuestos a  $192 \mu\text{M}$  y  $480 \mu\text{M}$  de RU fue incluso mayor que el control positivo (Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ), mientras que en el realizado durante 2 horas fue mayor en todas las concentraciones analizadas utilizando el mismo test (Figura 1). Para el caso de Gly no se evidenció efecto dosis-respuesta ( $p > 0,05$ ), sin embargo el ID de los grupos expuestos durante 1 y 2 horas fue mayor que el ID del control negativo (Mann-Whitney,  $p < 0,05$ ), a excepción de  $\text{Gly}^{2\text{h}} = 24 \mu\text{M}$  (Figura 2).

Los resultados del ensayo realizado con Cip mostraron la existencia de una relación

**Figura 1.** Índice de Daño al ADN (ID) en leucocitos humanos expuestos a una formulación de glifosato (Roundup®, 66,2%) durante 1 y 2 horas.



**Figura 2.** Índice de Daño al ADN (ID) en leucocitos humanos expuestos a Glifosato puro (99,9%) durante 1 y 2 horas.

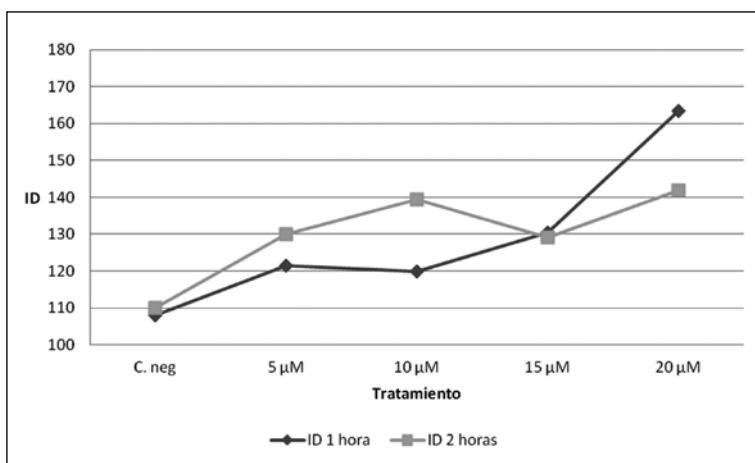


dosis-respuesta para la exposición durante 1 hora ( $R^2=0,813$ ,  $p<0,05$ ), pero no luego de 2 horas ( $p>0,05$ ). En ambos casos, todos los tratamientos mostraron un ID mayor que el del control negativo (Mann-Whitney,

$p<0,05$ ), y el tratamiento Cip<sup>1h</sup>= 20 μM mostró un ID incluso mayor que el control positivo (Mann-Whitney,  $p<0,05$ ; Figura 3).

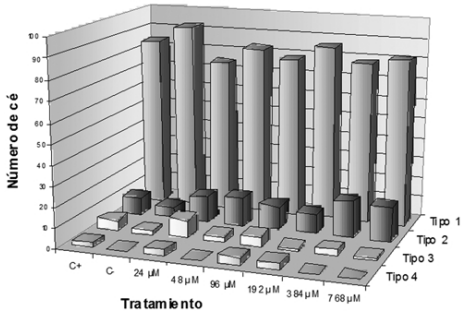
Por su parte, los resultados de los ensayos realizados con la mezcla de ambas for-

**Figura 3.** Índice de Daño al ADN (ID) en leucocitos humanos expuestos a una formulación de Cipermetrina (Atanor®, 30%) durante 1 y 2 horas.

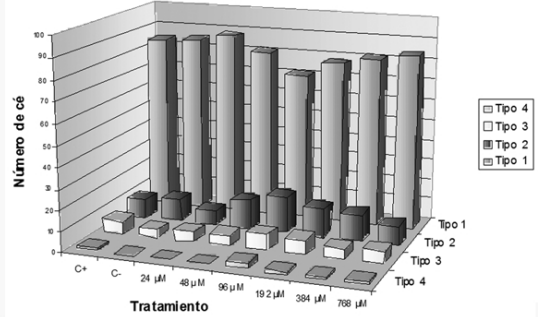




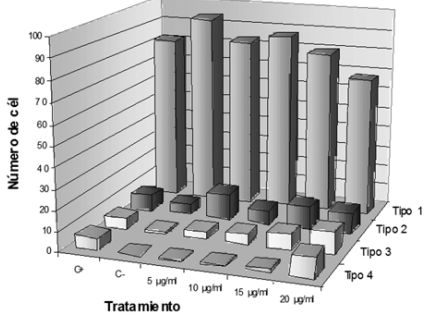
**Conteo Celular - GLIFOSATO - 1 hora**



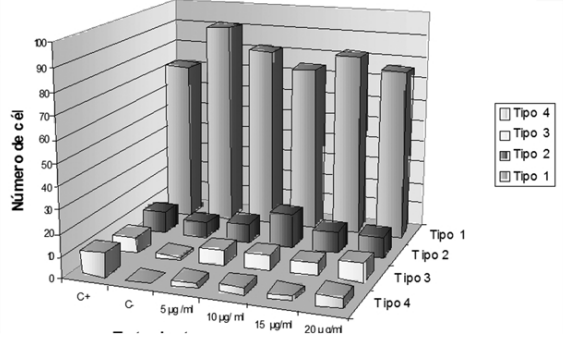
**Conteo Celular - GLIFOSATO - 2 horas**



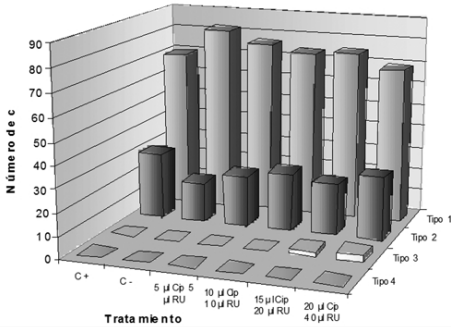
**Conteo Celular - CIPERMETRINA - 1 hora**



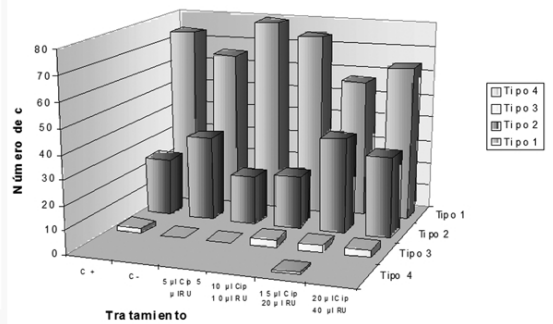
**Conteo Celular - CIPERMETRINA - 2 horas**



**Conteo Celular - Mezclas - 1 hora**



**Conteo Celular - Mezclas - 2 horas**





## Discusión

Los resultados del presente trabajo demostraron un efecto genotóxico observado mediante el EC en leucocitos humanos expuestos a las dos formulaciones plaguicidas testeadas, Cip y Gly, y a su mezcla, pero no se encontraron efectos significativos en la exposición a Gly puro. Diferentes estudios fueron realizados para evaluar la genotoxicidad en directo e *in vitro* de estos plaguicidas, utilizando distintos biomarcadores y con resultados controvertidos. Williams y col. (11), afirmaron no encontrar evidencia suficiente de daño al ADN *in vitro*, y concluyeron que tanto RU como sus componentes aditivos no presentaron riesgos para la producción de mutaciones somáticas en humanos. Sin embargo, un trabajo realizado por Monroy y col. (12) demostró daño genético mediante el EC al tratar con Gly células GM38 y HT1080, células humanas normales y de fibrosarcoma respectivamente. Por otra parte, Bolognesi y col. (7) determinaron la inducción de daño genotóxico por RU y Gly en LH mediante EC, observando efecto dosis-respuesta y una mayor genotoxicidad en la formulación, como fue observado en el presente trabajo. La mayor inducción de daño genotóxico encontrada en este trabajo y por otros autores para la formulación técnica (RU) sugiere que dicho efecto se debe a los agentes surfactantes y coadyuvantes que se sumarían a los provocados por el Gly. Sin embargo, otros trabajos han reportado también genotoxicidad del principio activo glifosato en LH mediante el EC (13; 14), pero no al utilizar el Test de Aberraciones Cromosómicas (AC) (7). Por otra parte, al evaluar el metabolito principal del glifosato (AMPA) se observó un incremento en las AC en LH expuestos 48 horas a concentraciones 0,9 y 1,8 mM (15).

Kocaman y col. (8) reportaron un incremento en la frecuencia de Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH) y AC para todas las concentraciones bajo estudio (5, 10, 15 y 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) de Cip, revelando un efecto dosis-respuesta. Por su parte, Ünderger y col. (16), trabajando también con LH, obtuvieron datos que evidencian daño genotóxico a una concentración de 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , superior a las usadas en este trabajo. Existen otros estudios realizados con diferentes biomarcadores donde también se demostró la genotoxicidad de la Cip. Patel y col. (17) realizaron estudios con EC en diferentes órganos de ratones detectando un efecto dosis-respuesta significativo.

En nuestro país, es frecuente la aplicación de fitosanitarios en mezclas y su aplicación en forma secuenciada en cortos periodos. Este hecho nos obliga a considerar algunos aspectos relevantes de la problemática de las mezclas. La mayoría de las investigaciones sobre los efectos de las sustancias químicas en los sistemas biológicos se lleva a cabo con un solo producto químico, a un tiempo. Sin embargo en la realidad, las personas están expuestas a mezclas, no a productos químicos aislados. Aunque varias sustancias pueden tener acciones totalmente independientes, en muchos casos, dos sustancias pueden actuar en un mismo sitio o blanco, de manera que pueden causar efectos aditivos, potenciadores o antagonistas (18). Con respecto a la mezcla de formulaciones evaluada, nuestros resultados mostraron un claro efecto dosis-respuesta sólo para la exposición durante 1 hora. La falta de una relación dosis respuesta luego de 2 horas de exposición podría ser resultado de una alta citotoxicidad, con muerte celular, lo cual impide la observación de los efectos geno-

toxicos. A este respecto cabe aclarar, que en las pruebas previas realizadas con concentraciones de los compuestos a evaluar equivalentes a las existentes en la literatura, se producía hemólisis de glóbulos rojos, de manera que las concentraciones de los compuestos evaluados se disminuyeron hasta que tal fenómeno no se observó más. En la literatura, no se han encontrado trabajos similares que incluyan estos dos plaguicidas, pero sí otros reportes de genotoxicidad de mezclas que incluyen Cip. Kocaman y col. (19) estudiaron el efecto de una mezcla de  $\alpha$ -cipermetrina y acetamiprid en LH mediante AC, ICH y test de micronúcleos. Mediante los tres biomarcadores, los resultados mostraron daño significativo sobre el ADN.

### Conclusiones

Utilizando el Ensayo Cometa como biomarcador de daño al ADN, se estudiaron los efectos de dos plaguicidas de amplio uso en Argentina, y de su mezcla. Los resultados demostraron un efecto genotóxico de estas sustancias sobre el ADN de leucocitos expuestos en forma directa por un periodo de tiempo corto. Se observó mayor genotoxicidad para la formulación Roundup que para el principio activo glifosato, lo cual se atribuye a la presencia de los surfactantes en la formulación. El ensayo realizado con la mezcla de ambas formulaciones plaguicidas demostró también la incidencia de daño significativo al ADN, poniendo de manifiesto los posibles efectos inducidos en los trabajadores que realizan aplicaciones múltiples en la práctica agraria.

Diferentes sectores de la población se encuentran expuestos a estos plaguicidas en forma directa o indirecta. El presente trabajo demuestra la continua necesidad

de evaluación de las mezclas utilizadas en agricultura debido a las posibles interacciones de sus componentes y los consiguientes efectos genotóxicos de estas sustancias, que pueden significar un potencial riesgo para la salud humana.

### Agradecimientos:

A los Bioq. Sandra Sánchez, Patricia Spedaletti y Jorge Roldán, de la Dirección de Salud de la UNL por su colaboración en el muestreo.

Este trabajo fue realizado en el marco del Proyecto PI 09-50: Evaluación de la exposición a Plaguicidas en población expuesta directa e indirectamente a través de marcadores de Exposición.

### Referencias bibliográficas:

1. Negri, R.; Feiguin, F.; Campos, M.; Walter, M.; Ferreira F. y Satorre, E., 2009. La agricultura argentina en marcha: Sus cambios e impactos, con atención al uso de herbicidas. La Agricultura Argentina en Marcha. AACREA. 1-10.
2. Donald, P.F. 2004. Biodiversity impacts of some agricultural commodity production systems. *Conserv. Biol.* **18**: 17-37.
3. Simoniello, M.F.; Kleinsorge, E.C.; Scagnetti, J.A.; Grigolato, R.A.; Poletta, G.L. y Carballo, M.A., 2008. DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures. *J. Appl. Toxicol.* **28**, 8: 957-965.
4. CASAFE (2010). Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes Argentina. <http://www.casafe.org/>.
5. Collins, A. R.; Osoz, A. A.; Brunborg, G.; Gaivao, I.; Giovannelli, L.; Kruszewski, M.; Smith, C. C. y Stetina, R., 2008. Review. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis.* **23**, 3: 143-151.
6. Tice, R. R.; Agurell, E.; Anderson, D.; Burlinson, B.; Hartmann, A.; Kobayashi, H.;

- Miyamae, Y.; Rojas, E.; Ryu J. C. y Sasaki, Y. F., 2000. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. *Environ. Mol. Mutagen.* **35**: 206-221.
7. Bolognesi, C.; Bonatti, S.; Degan, P.; Gallerani, E.; Peluso, M.; Rabboni, R.; Roggieri, P. y Abbondandolo, A., 1997. Genotoxic Activity of Glyphosate and Its Technical Formulation Roundup. *J. Agric. Food Chem.* **45**: 1957-1962.
8. Kocaman, A. Y. y Topaktas, M., 2009. The In Vitro Genotoxic Effects of a Commercial Formulation of  $\alpha$ -Cypermethrin in Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* **50**: 27 – 36.
9. Singh, N. P.; McCoy, M. T.; Tice, R. R. y Schneider, E. L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individuals cells. *Exp. Cell. Res.* **175**: 184–191.
10. SPSS for Windows. 2005. Version 14.0., SPSS Inc. Chicago, USA. Available in <http://www.spss.com/>.
11. Williams, G. M.; Kroes, R. y Munro, I. C., 2000. Safety Evaluation and Risk Assessment of the Herbicide Roundup and Its Active Ingredient, Glyphosate, for Humans. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **31**: 117–165.
12. Monroy, C. M.; Cortés, A. C.; Sicard, D. M. y Groot de Restrepo, H., 2005. Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a glifosato. *Biomédica.* **25**: 335-45.
13. Mañas, F.; Peralta, L.; Raviolo, J.; García Ovando, H.; Weyers, A.; Ugnia, L.; Gonzalez Cid, M.; Larripa, I. y Gorla N., 2009. Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **28**: 37 – 41.
14. Mladinic, M.; Berend, S.; Vrdoljak, A. L., Kopjar N., Radic B., Zeljezic D., 2009. Evaluation of genome damage and its relation to oxidative stress induced by glyphosate in human lymphocytes in vitro. *Environ. Mol. Mutagen.* **50**: 800 – 807.
15. Mañas, F.; Peralta, L.; Raviolo, J.; García Ovando, H.; Weyers, A.; Ugnia, L.; Gonzalez Cid, M.; Larripa, I. y Gorla N., 2009. Genotoxicity of AMPA, the environmental metabolito of glyphosate, assessed by the Comet assay and cytogenetic tests. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* **72**: 834 – 837.
16. Ündeger, Ü. y Basaran N., 2005. Effects of Pesticides on human peripheral lymphocytes in vitro: induction of DNA damage. *Arch. Toxicol.* **79**: 169 – 176.
17. Patel, S.; Pandey, A.; Bajpayee, M.; Parmar, D. y Dhawan, A., 2006. Cypermethrin-induced DNA damage in organs and tissues of the mouse: Evidence from the comet assay. *Mutat. Res. Gen. Tox. En.* **607**, 2: 176-183.
18. Carballo, M. A.; Simoniello, M. F. y Kleinsorge, E. C., 2011. Agrochemicals: Horticulture Use Conditions Determine Genotoxic Effects and Oxidative Damage in Rural Populations in Santa Fe, Argentina. En: "Pesticides - The Impacts of Pesticides Exposure" Editorial InTech, Cap. **17**: 357-384.
19. Kocaman, A. Y. y Topaktas M., 2009. Genotoxic effects of a particular mixture of acetamiprid and  $\alpha$ -cypermethrin on chromosome aberration, sister chromatid exchange, and micronucleus formation in human peripheral blood lymphocytes. *Environ Toxicol.* **25**, 2: 157–168.