

LA GENOTOXICIDAD DEL HERBICIDA GLIFOSATO EVALUADA POR EL ENSAYO COMETA Y POR LA FORMACIÓN DE MICRONÚCLEOS EN RATONES TRATADOS

EVALUATION OF GENOTOXICITY OF THE HERBICIDE GLYPHOSATE
QUANTITATIVELY MEASURED BY THE COMET ASSAY AND
MICRONUCLEIUS FORMATION IN TREATED MICE

FERNANDO MAÑAS TORRES*^{1, 2}, MARCELA BEATRIZ GONZÁLEZ CID URROZ^{1, 3}, HUGO GARCÍA OVANDO⁴, IRMA WEYERS ANCHORDOQUI², LAURA UGNIA VERA², IRENE BEATRIZ LARRIPA HAND^{1, 3} Y NORA GORLA ABRATE^{1, 2}

¹CONICET, ²Departamento de Salud Pública, Facultad de Agronomía y Veterinaria (FAV),
Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC),

³Departamento de Genética, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, ⁴Departamento de Clínica Animal, FAV, UNRC.
Ruta 36, km. 601m, Río Cuarto, Argentina.

*Autor para correspondencia: fmanas@ayv.unrc.edu.ar

RESUMEN

Glifosato es uno de los herbicidas de amplio espectro más empleado en todo el mundo para el control de malezas. En Argentina se utiliza principalmente en cultivos de soja transgénica resistente a Glifosato. El objetivo de este trabajo es evaluar *in vivo* la actividad clastogénica de Glifosato mediante el ensayo de micronúcleos y el daño al ADN mediante el ensayo de cometa en ratones tratados con 100, 200 o 400 mg/kg. Se analizaron 1000 eritrocitos inmaduros para cuantificar células micronucleadas/1000 eritrocitos (EMN). En el ensayo de cometa se analizaron 200 células por animal empleando una clasificación visual de cinco categorías: sin daño, bajo, moderado, elevado y daño extremo; y se calculó un índice de daño ponderado (IDP). Los resultados indican un nivel basal de $3,0 \pm 0,8$ EMN en los animales del grupo control negativo, con diferencias estadísticas sólo frente a la dosis mayor de Glifosato: $13,0 \pm 3,5$ EMN. Un comportamiento análogo se observa en el ensayo de cometa, el IDP basal fue $151,7 \pm 10,7$ con una diferencia ($p < 0,01$) para el grupo de animales tratados con 400 mg/kg (IDP: $227,5 \pm 18,4$). La medición de genotoxicidad a través del ensayo de cometa y de micronúcleos, nos permite estimar que Glifosato 400 mg/kg es capaz de producir mutaciones y daño citogenético *in vivo* en ratones. Se sugiere firmemente el uso controlado y mínimo de este herbicida, necesario para la producción de alimentos, pero no exento de riesgo genético.

Palabras claves: Genotoxicidad, Glifosato, ensayo cometa, test de micronúcleos.

ABSTRACT

Glyphosate is a non selective herbicide of wide application in the world used in weed control. In Argentina it is used on farms of transgenic soybean resistant to Glyphosate. The aim of this work is to evaluate *in vivo* the clastogenic activity of Glyphosate through the micronucleus test, and the DNA damage by means of the comet assay in mice treated with 100, 200 or 400 mg/kg. One thousand immature erythrocytes were analyzed to quantify micronucleated cells/1000 erythrocytes (EMN). For comet assay 200 cells for each animal were analyzed and the comets were classified into five categories: without damage, low, moderate, high and extreme damage. A weighted damage index (WDI) was calculated. The results indicate a base level of $3,0 \pm 0,8$ EMN in the animals of the negative control group, having statistical differences just in the highest dose of glyphosate: $13,0 \pm 3,5$ EMN. An analogous behavior was observed in the comet assay. The basal WDI was

151,7 ± 10,7 with statistical difference ($p < 0,01$) for the group of animals treated with 400 mg/kg of glyphosate (IDP: 227,5 ± 18,4). The genotoxicity quantification through comet assay and micronucleus test shows that Glyphosate 400 mg/kg can produce DNA and cytogenetic damage *in vivo* in mice. It is firmly suggested that the use of this herbicide be controlled and minimal, necessary for agricultural plant production, but not exempt of genotoxic risks.

Keywords: Genotoxicity, Glyphosate, comet assay, micronucleus test.

Recepción: 15/09/06. Revisión: 12/10/06. Aprobación: 10/11/06.

INTRODUCCIÓN

Glifosato es un herbicida sistémico, no selectivo y de amplio espectro usado para el control post-emergente de malezas anuales y perennes en ambientes agrícolas, forestales y paisajísticos. La introducción del maíz genéticamente modificado resistente a Glifosato produjo un aumento significativo en el empleo de este herbicida, y actualmente es uno de los más utilizados en todo el mundo. En Argentina la siembra de soja transgénica resistente a Glifosato se ha incrementado desde 1997, convirtiendo al país en el primer exportador de harina y aceite de soja y el tercer exportador de granos de soja del mundo, con una superficie sembrada de 15,2 millones de hectáreas (SAGPyA, 2006).

El mecanismo de acción de Glifosato es una inhibición competitiva de la Enolpiruvilshikimato-fosfato-sintetasa (EPSPS), una enzima ausente en animales, esencial para la síntesis de aminoácidos aromáticos en las plantas. Debido a que esta ruta metabólica existe sólo en plantas y microorganismos, el mecanismo de acción no es considerado como un riesgo para la salud pública (Williams *et al.*, 2000; De Roos *et al.*, 2005). Sin embargo, la existencia de posibles efectos indeseables tras la exposición humana a Glifosato no ha sido bien documentada y es aún tema de controversia (Monroy *et al.*, 2005).

Los estudios de genotoxicidad de Glifosato llevados a cabo hasta el momento han arrojado resultados variables. La Agencia de Protección Ambiental de los EE.UU. (EPA)

y la Organización Mundial de la Salud (OMS) concluyeron que Glifosato no es mutagénico ni carcinogénico (EPA, 1993; WHO, 1994). Sin embargo, varias investigaciones independientes empleando diversos ensayos sugirieron que podría ser genotóxico para células mamíferas y no tan seguro como se pensó inicialmente (Isenring, 1996). Efectos genotóxicos, hormonales y enzimáticos han sido reportados en animales (Bolognesi *et al.*, 1997; Lioi *et al.*, 1998; Darwich *et al.*, 2001). Estudios llevados a cabo en personas expuestas mostraron que esta exposición está relacionada con un incremento en el riesgo de padecer linfomas no Hodgkin (De Roos *et al.*, 2005). Es escasa la información disponible sobre las posibles consecuencias de la exposición *in vivo* a este herbicida para la integridad del genoma.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad genotóxica de Glifosato mediante la prueba de micronúcleos en médula ósea y el ensayo cometa en sangre de ratones tratados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Químicos

Glifosato (N-(fosfonometil) glicina) de grado analítico (96%) fue comprado a Sigma-Aldrich (CAS 1071-83-6). Una solución de Ciclofosfamida (Laboratorios Filaxis, Argentina) fue empleada como agente genotóxico conocido.

Animales

Veinte ratones Balb C, de dos meses de vida y con un peso promedio de 20 g fueron obtenidos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, Argentina. Los animales fueron aclimatados a las condiciones del laboratorio durante tres días previos al comienzo del ensayo, recibiendo una dieta balanceada comercial en forma de pellet y agua *ad libitum*. Se conformaron 5 grupos de 4 individuos, cada uno con igual cantidad de machos y hembras.

Tratamientos

Los animales recibieron, mediante inyección intraperitoneal, 0,6 ml de Glifosato en tres dosis diferentes, solución fisiológica, o ciclofosfamida (20 mg/kg). Dos inyecciones de Glifosato con 24 hs de intervalo fueron administradas a cada ratón, a fin de completar una dosis total de 100, 200 y 400 mg/kg. Todas las soluciones empleadas fueron preparadas inmediatamente antes de su uso. Las soluciones de Glifosato fueron cuidadosamente ajustadas a pH 7,2-7,4 con NaOH 1M. Las muestras biológicas (médula ósea y sangre) fueron colectadas 24 hs después de la segunda administración.

Para el ensayo cometa, inmediatamente después de la dislocación cervical, las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción cardíaca empleando una jeringa de 1 ml. Para el análisis de micronúcleos se procedió a extraer la médula ósea de ambos fémures con 400 µl de Suero Fetal Bovino.

Determinación de daño citogenético en eritrocitos inmaduros de médula ósea de ratón (Ensayo de Micronúcleos)

La suspensión medular obtenida se centrifugó durante cinco minutos a 1000 RPM. Luego

se retiró el sobrenadante, y el contenido celular, levemente hidratado, se extendió en portaobjetos (Schmid, 1975). Las preparaciones de médula ósea se dejaron secar al aire, se tiñeron con May Grunwald-Giemsa y se codificaron previo al análisis. Se analizaron 1000 eritrocitos policromáticos para cuantificar la presencia de células micronucleadas. Los resultados se expresaron como células micronucleadas/1000 eritrocitos policromáticos (EMN).

Determinación de daño al ADN en células sanguíneas de ratón (ensayo cometa)

El ensayo cometa alcalino fue llevado a cabo de acuerdo a Singh *et al.* (1988). La sangre (10µl) de los ratones fue colocada en tubos de 1 ml con 75 µl de agarosa de bajo punto de fusión (ABPF) 0,75% en buffer fosfato, para ser extendida luego sobre la superficie de portaobjetos previamente tratados con agarosa de punto de fusión normal (APFN) 0,75% en buffer fosfato. Se aplicó una tercera capa de ABPF y se cubrió con un cubreobjetos hasta la solidificación. Una vez removido el cubreobjetos, los portaobjetos fueron colocados en solución de lisis (Na Cl 2,5 M, Na₂EDTA 100 mM, Tris 10 mM pH 10, 1% Triton X-100 y 10% DMSO) donde permanecieron al menos una hora a 4°C. Luego se los colocó en una cuba de electroforesis con una solución alcalina (NaOH 300 mM, Na₂EDTA 1 mM, pH 13) durante 20 min a 4°C antes de comenzar la corrida electroforética (30 V, 250 mA) durante 25 min. Finalmente se neutralizaron los portaobjetos con una solución de Tris pH 7,5 y se realizó la tinción con bromuro de etidio (20 µg/ml). Los núcleos fueron evaluados mediante microscopía de fluorescencia. Se analizaron 200 células por cada animal. Los cometas fueron clasificados visualmente empleando una escala arbitraria de cinco categorías según la cantidad de

ADN en la cola (porcentaje), asignando a cada cometa un valor de 0, sin daño (<5%); 1, bajo nivel de daño (5-20%); 2, daño moderado (20-40%); 3, daño elevado (40-80%) o 4, daño extremo (> 80%) (Moller *et al.*, 2000; Collins *et al.*, 2001; Collins, 2004; Horoz *et al.*, 2006). Los cometas sin cabeza, también llamados “nubes”, no fueron incluidos en el análisis.

El daño al ADN se expresa como porcentaje de células dañadas, que incluye todas las células con cometa de bajo, moderado, elevado y extremo nivel de daño al ADN (clasificación 1 a 4). Además, para evaluar el daño global de cada uno de los tratamientos y asignar a cada nivel de daño su importancia relativa se utilizó el índice de daño ponderado (IDP) (Ferreiro *et al.*, 2002): $IDP = n1 + 2n2 + 3n3 + 4n4$

Donde, $n1$: número (n°) de células con un nivel de daño 1, $n2$: n° de células con un nivel de daño 2, $n3$: n° de células con un nivel de daño 3, $n4$: n° de células con un nivel de daño 4.

Análisis estadístico

Para la realización del estudio estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism (Prism, 1997). Se estudió la normalidad de las muestras para los dos ensayos realizados, mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Se utilizaron tests paramétricos (ANOVA y test de Dunnet) para los resultados obtenidos mediante el ensayo cometa, que siguieron una distribución normal, y test no paramétricos (Kruskall Wallis y test de Dunn) para los resultados obtenidos mediante el ensayo de micronúcleos, que no se ajustaron a una distribución normal. A fin de determinar una posible asociación entre los resultados obtenidos para los dos ensayos realizados se empleó el coeficiente de correlación de Pearson.

La existencia de una posible relación dosis-respuesta se verificó a través del análisis de regresión lineal. En todos los casos, se trabajó con un nivel de significancia menor al 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Los resultados de la cuantificación de daño a nivel de ADN y de cromosomas en ratones Balb C, tratados con diferentes dosis de Glifosato están agrupados en la Tabla I. En todos los casos los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. En el ensayo de micronúcleos se observa un nivel basal de EMN: $3,0 \pm 0,8$ en los animales del grupo control negativo, no observándose diferencias estadísticamente significativas con los animales tratados con 100 mg/kg ($3,7 \pm 0,5$ EMN) y con 200 mg/kg ($4,2 \pm 0,5$ EMN). El grupo tratado con la dosis más elevada de Glifosato, 400 mg/kg, ($13,0 \pm 3,5$ EMN) y el grupo control positivo tratado con Ciclofosfamida, 20 mg/kg, ($20,7 \pm 3,2$ EMN) mostraron diferencias significativas ($p < 0,01$, test de Dunn) respecto al grupo control.

Un comportamiento análogo se observa para los resultados obtenidos en los mismos animales evaluados mediante el ensayo cometa. El índice de daño ponderado (IDP) basal para el grupo de animales controles negativos fue $151,7 \pm 10,7$, sin diferencias estadísticas con las dosis de 100 mg/kg (IDP: $164,2 \pm 2,1$) y de 200 mg/kg (IDP: $177,5 \pm 30,0$). Se observaron diferencias significativas ($p < 0,01$, test de Dunnet) para el grupo de animales tratado con la dosis de 400 mg/kg de Glifosato (IDP: $227,5 \pm 18,4$) y el tratado con 20 mg/kg de Ciclofosfamida (IDP: $230,5 \pm 26,6$) respecto del grupo control.

El nivel de daño al ADN, en la gran mayoría de los cometas observados en todos los

TABLA I. Cuantificación de daño a nivel del ADN y de los cromosomas en ratones Balb C tratados con diferentes dosis de Glifosato.

Solución fisiológica	Ciclofosfamida 20 mg/kg	Glifosato 100: 2x50 mg/kg	Glifosato 200: 2x100 mg/kg	Glifosato 400: 2x200 mg/kg
EMN: eritrocitos micronucleados/1000 células analizadas.				
4	23	4	4	13
3	17	4	5	15
3	22	3	4	8
2	-	4	4	16
3,0 ± 0,8	20,7 ^a ± 3,2	3,7 ± 0,5	4,2 ± 0,5	13,0 ^a ± 3,5
IDP: Índice de Daño Ponderado.				
149	258	164	162	220
167	223	162	186	219
142	244	167	159	216
149	197	164	149	204
151,7 ± 10,7	230,5 ^b ± 26,6	164,2 ± 2,1	164,0 ± 15,7	214,7 ^b ± 7,4
Porcentaje de células dañadas				
67,0	90,0	72,5	77,0	99,5
78,5	92,5	79,0	81,0	98,0
67,5	95,0	78,5	75,5	97,0
68,5	82,5	72,5	72,0	97,5
70,4 ± 5,4	90,0 ^b ± 5,4	75,7 ± 3,7	76,5 ± 3,8	98,0 ^b ± 1,1

n: 20 ratones Balb C (4 animales por tratamiento). ^aP < 0,01 (Test de Dunn); ^bP < 0,01 (Test de Dunnet). Los resultados al final de cada tratamiento están expresados como media ± desviación estándar.

animales fue de tipo 1 (bajo nivel de daño). Sólo en el grupo tratado con Ciclofosfamida se observó una migración del ADN de tal distancia y dispersión que fue clasificado como de nivel 4 (daño extremo). Este grupo también presentó una gran cantidad de cometas de tipo 3 (daño elevado) y un 90,0 ± 5,4% de células dañadas (Tabla I).

El grupo de animales tratados con la dosis más alta de Glifosato (400 mg/kg) es el que presentó el porcentaje más elevado de células dañadas (98,0 ± 1,1% p < 0,0001),

aunque representadas principalmente por cometas de tipo 1 y 2 (niveles de daño bajo y moderado). El coeficiente de correlación de Pearson entre los resultados obtenidos para cometa y micronúcleos demostró una excelente asociación, r: 0,94 (P < 0,0001; r² = 0,87) (Figura 1). El análisis de regresión lineal demostró una relación dosis-respuesta tanto para el % de células dañadas (r² = 0,83) e IDP (r² = 0,74) como para EMN (r² = 0,73), (P < 0,0001).

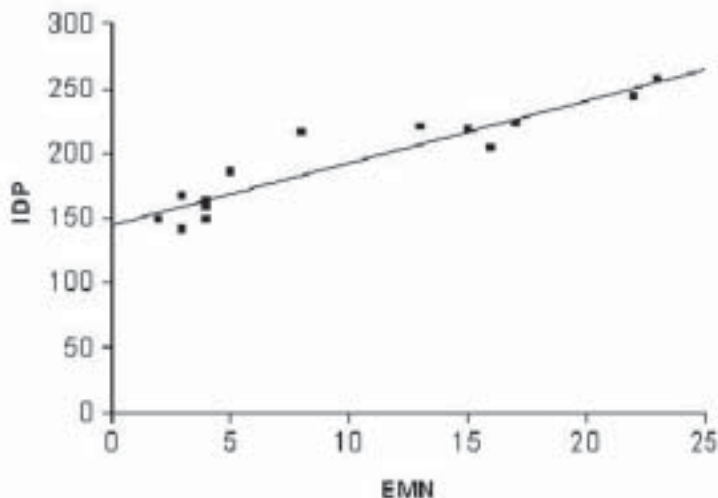


FIGURA 1. Correlación entre IDP: Índice de Daño Ponderado (ensayo cometa), y EMN: número de células micronucleadas/1000 eritrocitos analizados (ensayo de micronúcleos) en 20 ratones Balb C tratados con distintas dosis de Glifosato (100, 200 y 400 mg/kg). $r^2 = 0,8763$.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El ensayo cometa empleado es una técnica de electroforesis en microgeles de agarosa considerada de alta sensibilidad para detectar daño al ADN, a nivel de células individuales. El nivel de daño puede determinarse midiendo la migración de ADN en el largo de la cola del cometa o a través de parámetros que integran el largo con la intensidad de fluorescencia en la cola, o clasificando los cometas visualmente por medio de unidades arbitrarias, como en el presente trabajo, teniendo todas estas modalidades de análisis una buena correlación entre sus resultados (Moller *et al.*, 2000).

Por otro lado, el ensayo de micronúcleos es la detección de pequeños fragmentos de ADN en el citoplasma de eritrocitos inmaduros, y tiene el potencial de detectar el efecto de compuestos químicos clastogénicos y aneugénicos (OECD, 1997).

Si bien ambas técnicas monitorean niveles de organización biológica distintos, a nivel de rotura de simple cadena y sitios alcali-

lábiles en el ADN (ensayo cometa) y a nivel de estructuras cromosómicas y aparato mitótico (micronúcleos), los resultados obtenidos en ambos ensayos fueron semejantes, en las tres dosis de Glifosato empleadas, con diferencias estadísticamente significativas para la dosis más alta (400 mg/kg) y con una excelente asociación entre los resultados obtenidos en los dos ensayos ($r: 0,94$).

La DL50 en ratones CD-1 varía entre 4239 mg/kg para Rodeo, 643 mg/kg para Roundup y 436 mg/kg para Direct (Williams *et al.*, 2000). La formulación del herbicida para uso acuático (Rodeo) tiene una DL50 10 veces mayor, debido a la ausencia de surfactantes en su composición. Sin embargo, esta menor toxicidad aguda no debe habilitar el uso indiscriminado, ya que según los presentes resultados la genotoxicidad en sistemas biológicos puede ser evidente a partir de los 400 mg/kg. Esta dosis no ha sido previamente evaluada en ensayos de genotoxicidad *in vivo* de acuerdo a la bibliografía disponible. Rank *et al.* (1993) publicaron resultados negativos en el ensayo de micronú-

cleos de ratones a la dosis de 200 mg/kg, coincidente con nuestros datos. Bolognesi *et al.* (1997) reportaron genotoxicidad en el mismo ensayo empleando una dosis de 300 mg/kg.

Por otro lado, son escasos los estudios de genotoxicidad que han evaluado Glifosato puro empleando el ensayo cometa. Bolognesi *et al.* (1997) reportaron resultados positivos en células de hígado y riñón de ratones expuestos por la vía intraperitoneal a Glifosato con una dosis de 300 mg/kg. Los estudios efectuados con el ensayo cometa en líneas celulares *in vitro*, mostraron un aumento del daño al ADN con concentraciones de Glifosato de 4 a 6,5 mM (Monroy *et al.*, 2005).

La medición de la genotoxicidad a través del ensayo de cometa y de la prueba de micronúcleos a una dosis de 400 mg/kg en ratones, nos permite estimar que Glifosato es capaz de producir daño citogenético y al ADN *in vivo*, con una relación dosis-respuesta tanto para el porcentaje de células dañadas como para el IDP y el EMN.

Se estima que, en nuestro país, se utilizan 100 millones de litros de Glifosato por año y en el mundo es uno de los herbicidas más ampliamente empleado. Se sugiere el uso controlado y mínimo de este herbicida, necesario para la producción de alimentos, pero no exento de riesgo genético.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con financiamiento de la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Río Cuarto y CONICET.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOLOGNESI C, BONATTI S, DEGAN V, GALLERANI E, PELUSO M, RABÓN M (1997), Genotoxic activity of glyphosate and

technical formulation Roundup. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 1957-62.

COLLINS A, DUSINSKA M, HORSKA A (2001), Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay. *Acta Biochimica Polonica* 48: 611-614.

COLLINS A (2004), The comet assay for DNA damage and repair, principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology*. 26: 249-261.

DARUICH J, ZIRULNIK F, SOFÍA GIMENEZ M, (2001), Effect of the herbicide Glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses. *vo "Environmental Research" Environmental Research* 85: 226-231.

DE ROOS A, BLAIR A, RUSIECKI J, HOPPINJ, SVECM, DOSEMECI M, SANDLER D, ALAVANJA M (2005), Cancer incidence among Glyphosate-exposed pesticide applicators in the agricultural health study. *Environmental and Health Perspectives* 113: 49-54.

EPA (1993), Re-registration eligibility decision (RED): Glyphosate. U.S. Environmental Protection Agency, office of prevention, pesticides and toxic substances, Washington, DC.

FERREIRO G, CANCINO BADIÁS L, LOPEZ-NIGRO M, PALERMO A, MUDRY M, PRIETO GONZALEZ E, CARBALLO A (2002), DNA single strand breaks in peripheral blood lymphocytes induced by three nitroimidazole derivatives. *Toxicology Letters* 132: 109-115.

HOROZ M, BOLUKBAS C, BOLUKBAS F, KOCYGIT A, ASLAN M, KOYLU A, GUMUS M, CELIK H, KOKSAL M (2006), Assessment of peripheral DNA damage by alkaline comet assay in maintenance hemodialysis subjects with hepatitis C infection. *Mutation Research* 596: 137-142.

ISENRING R (1996), Glyphosate. *Pesticides News* 64: 20-21.

LIOI M, SCARFI M, SANTORO A, BARBIERI R, ZENI O, SALVEMINI F, DI BERARDINO D, URSINI M (1998), Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant state in human lymphocytes exposed in vitro to Glyphosate, Vinclozolin, Atrazine, and DPX-E9636. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 32: 39-46.

MOLLER P, KNUDSEN L, LOFT S, WALLIN H (2000), The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors.

- Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention 9: 1005-1015.
- MONROY C, CORTES A, SICARD D, GROOT DE RESTREPO H (2005), Citotoxicidad y genotoxicidad en células humanas expuestas in vitro a Glifosato. Biomedica 25: 335-345.
- OECD (1997), OECD Guidelines for the testing of chemicals No. 474: Genetic toxicology: mammalian erythrocyte micronucleus test. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris.
- PRISM (1997), GraphPad Software. Inc., San Diego, CA 92121 USA.
- RANK J, JENSEN, A, SKOV B, PEDERSEN L, JENSEN K (1993), Genotoxicity testing of the herbicide Roundup and its active ingredient Glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, *Salmonella* mutagenicity test, and *Allium* anaphase-telophase test. Mutation Research 300: 29-36.
- SAGPyA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos), Estimaciones agrícolas. Campaña agrícola 2005/2006. Sitio Web: <http://www.sagpya.meccon.gov.ar>
- SCHMID W, (1975) The micronucleus test. Mutation Research 31: 9-15.
- SINGH NP, MCCOY MT, TICE RR, SCHNEIDER E (1988), A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research 175:184-91.
- WHO (1994), Glyphosate. Environmental health criteria 159. The internal programme on chemical safety (IPCS), World Health Organization, Geneva. 159: 84-86.
- WILLIAMS G, KROES R, MUNRO I (2000), Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, Glyphosate, for humans. Regulatory Toxicology and Pharmacology 31: 117-165.