

EFECTO DE CONCENTRACIONES SUBLETALES DE Roundup® ACTIVO EN EL RIÑÓN DE ALEVINOS DE CACHAMA BLANCA (*Piaractus brachypomus*)

Fecha de recepción: 25 de mayo de 2012 • Fecha de aceptación: 13 de julio de 2012

EFFECT OF SUBLETHAL CONCENTRATIONS OF Roundup® ACTIVE ON KIDNEY OF WHITE CACHAMA (*Piaractus brachypomus*) FRY

Edwin Gómez Ramírez^{1,2} • Leslie Guzmán Beltrán² • Esp, Pedro Rene Eslava Mocha² • Hernán Hurtado Giraldo¹

RESUMEN

El glifosato es un herbicida de amplio espectro para el control de arvenses, maduración de granos y caña de azúcar. En Colombia, el glifosato es usado en la aspersión aérea de cultivos de coca y amapola. En varios países Andinos este herbicida se comercializa como Roundup® Activo. Debido al uso poco regulado y el posible efecto sobre otros organismos se estableció el efecto de concentraciones subletales de Roundup® Activo en el riñón de alevinos de Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). Se evaluaron tres tratamientos con tres replicas: T1: 0 mg/L, T2: 0,1 mg/L y T3: 1,0 mg/L, preparados a partir de la concentración de glifosato presente en el producto Roundup® Activo. En acuarios de 40 L, se colocaron 20 alevinos los cuales fueron expuestos durante 30 días. Después 4 peces por tratamiento fueron sacrificados para microscopía óptica de alta resolución. Se realizaron cortes de 1 µm y se tiñeron con azul de toluidina. El análisis histopatológico no reveló lesiones epiteliales tubulares ni cambios en el número y tamaño de los centros melanomacrofagos. No obstante se evidencio congestión vascular acompañada de una leve expansión glomerular (telangiectasia) y disminución del espacio de Bowman en el T3. Se puede inferir que las concentraciones subletales de Roundup® Activo evaluadas en este trabajo no afectan considerablemente el riñón de alevinos de *P. brachypomus*.

Palabras clave: peces, histopatología, glifosato, microscopía óptica de alta resolución

1 Grupo de Ictiología, Laboratorio de Embriología, Facultad de Ciencias Básicas y Aplicadas, Universidad Militar Nueva Granada.

2 Grupo de Sanidad de Organismos Acuáticos. Instituto de Acuicultura de los Llanos, Universidad de los Llanos

3 Autor para correspondencia: hernan.hurtado@unimilitar.edu.co

ABSTRACT

Glyphosate is a wide spectrum herbicide, commonly used for weed control, grain and sugar cane maturation. In Colombia glyphosate is also used for aerial aspersion of illegal cocaine and amapola cultures. In the Andina area countries this herbicide is mainly commercialized as Roundup® Activo. For that reason the effect of sublethal doses of Roundup® Activo on Cachama blanca (*Piaractus brachypomus*) fry kidneys was tested. Three treatments with three replicate were evaluated T1: 0 mg/L, T2: 0.1 mg/L T3: 1.0 mg/L, prepared of glyphosate concentration in the product. In 40 L glass with 20 fry/glass were exposed for 30 days to the herbicide. Then four fish per treatment were sacrificed for high resolution optical microscopy. 1µm sections were made and stained with toluidine blue. In all cases kidneys did present simple cubic epithelia in tubules. Histopathological analysis revealed no tubular epithelial lesions or changes in the number and size of melanomacrophage centers. However evidenced vascular congestion accompanied by a slight expansion glomerular and decreased Bowman's space in the T3. *P. brachypomus* fry exposed to sublethal concentrations of Roundup® Activo not affected significantly the kidney.

Key words: fish, histopathology, glyphosate, high resolution optic microscopy

INTRODUCCIÓN

En Colombia el Roundup®, es el principal producto usado en la agricultura para el control de malezas en los cultivos tradicionales, así mismo se usa como desecante de granos y por vía aérea como madurante en los cultivos de caña de azúcar (Nivia, 2001). Recientemente Monsanto desarrolló la presentación comercial de Roundup Activo® para el uso en los países del área andina (Venezuela, Perú, Ecuador y Colombia) con la particularidad que no revela el tipo y concentración del surfactante (MONSANTO, 2011).

Aparte de los usos antes mencionados para Colombia, en otros países donde usan productos a base de glifosato como principio activo lo manejan además para el control de malezas acuáticas (Olaleye y Akinyemiju *et al.*, 1996), control de algas en estanques de peces, lagos, canales y drenajes (Peluso *et al.*, 1998). El glifosato (GP) el cual es el principal componente activo del herbicida Roundup® Ultra está constituido de 48% de sal ácida isopropilamina de

GP (IPA), 15% de surfactante polioxietilamina (POEA) y 37% de agua (Oldham *et al.*, 2002; Tsui y Chu, 2003).

La Agencia de Protección Ambiental (EPA) de Estados Unidos ha encontrado que, exposiciones a residuos de GP en aguas de consumo humano por encima del límite máximo autorizado de 0.7 mg/L, pueden causar respiración acelerada y congestión pulmonar, daño renal y efectos reproductivos en seres humanos (Dinham, 1999). Walsh *et al.*, (2000) reportan que exposiciones a Roundup® afectan la expresión de una proteína reguladora del ciclo esteroideogénico (StAR) la cual media el paso inicial de la síntesis de hormonas esteroideas como los andrógenos. También hay evidencia que el herbicida reduce los niveles de ARNm y la actividad de la enzima aromataasa (Richard *et al.*, 2005).

Aunque los estudios del efecto del GP en peces son pocos, estos han venido en aumento en los últimos 10 años (Jiraungkoorskul *et al.*, 2002; Gluszcak

et al., 2007; Eslava et al., 2007; Modesto y Martínez, 2010; Kreutz et al., 2011; Shiogiri et al., 2012). Hay dos vertientes de investigación, por un lado se han realizado pruebas de toxicidad aguda estableciendo la CL_{50} de diferentes especies de peces (Jiraungkoorskul et al., 2002; Ramírez-Duarte, 2004; Eslava et al., 2007). Jiraungkoorskul et al., (2002) mencionan que CL_{50-96h} reportada por el fabricante para peces es mucho mayor (97-150 mg/L) a la encontrada en *O. niloticus* (2-50 mg/L), conclusiones similares obtuvo Eslava et al., (2007) reportando una CL_{50} de 97.47 mg/L para juveniles de Cachama blanca (*P. brachypomus*) expuestos a Roundup® Ultra.

Por otro lado, la otra línea de investigación plantea estudios de toxicidad crónica y sus posibles efectos en concentraciones sub-letales (Gluszczak et al., 2007; Kreutz et al., 2011; Shiogiri et al., 2012), pues consideran que son valores más cercanos a los ambientalmente esperados, lo cual impacta los cuerpos de agua por procesos de escorrentía o por la acción de deriva del viento en la aspersión. En estudios con *Rhamdia quelen* se evaluó el efecto de una concentración sub-letal de Roundup® del 10% de la CL_{50-96h} (0.73 mg/L) determinando efectos negativos en células sanguíneas y algunos parámetros inmunológicos (Gluszczak et al., 2007). De igual manera, ocurre con el herbicida Roundup® Ready producto diseñado para controlar malezas en plantas transgénicas de soya en Brasil, el cual, como el Roundup® Activo no especifica el tipo y concentración de surfactante.

Este producto produjo daños moderados en branquias y daños severos en hígado, a concentraciones relativamente bajas (3.0, 3.5, 4.0, 4.5 mg/L) en el pez Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), el cual pertenece al mismo género de la cachama blanca (Shiogiri et al., 2012). Por estas razones se plantea determinar el efecto histopatológico en riñón de alevinos de *P. brachypomus* expuestos a concentraciones subletales de glifosato preparadas a partir del Roundup® Activo, en condiciones de laboratorio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación

Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de patología de la Universidad de los Llanos y de Embriología de la Universidad Militar Nueva Granada.

Diseño experimental

Para determinar el efecto de las concentraciones subletales de glifosato, este se preparó a partir de la concentración inicial de GP presente en el producto Roundup® Activo, el cual está constituido por 363 g/L de ácido GP de formulación, equivalente a 446 g/L de sal potásica de N-(fosfonometil)-glicina, de la casa comercial Monsanto. Se evaluaron los siguientes tratamientos: tratamiento 1 (T1: 0 mg/L de GP), tratamiento 2 (T2: 0.1 mg/L de GP) y el tratamiento 3 (T3: 1 mg/L de GP), cada uno con tres replicas. Las concentraciones subletales para los tratamientos se

Concentraciones subletales como las usadas en el presente estudio (0.1 y 1 mg/L de GP) no inducen lesiones renales de severidad, a excepción del hallazgo de la disminución del espacio de Bowman

tomaron a partir de pruebas piloto realizadas en el Laboratorio de Bioensayos del Instituto de Acuicultura de los Llanos (IALL) en las cuales se habían evidenciado lesiones (Ramírez-Duarte y Eslava-Mocha, 2009). El experimento de toxicidad subletal fue diseñado como un sistema semiestático con recambio diario del 50% del volumen de agua con mantenimiento de la concentración mediante la adición de la mitad de la concentración de GP presente en el Roundup® Activo (Rondón-Barragán *et al.*, 2007).

Animales experimentales

En este proyecto se siguieron los lineamientos para el manejo ético de peces en investigación (AVMA Guidelines on Euthanasia, 2007). Se trabajó con 180 alevinos de Cachama blanca (*P. brachyomus*) de 30 días después de la eclosión (dde) de un mismo desove, obtenidos en la estación piscícola del Instituto de Acuicultura de los Llanos (IALL), teniendo en cuenta que los peces no presentarán aletas en mal estado, nado errático, manchas algodonosas, tendencia a frotarse con piedras u otros objetos, ojos opacos y lesiones externas. Así mismo, se realizó un estudio histopatológico preliminar a la llegada de los peces, esto con el fin de asegurarnos de trabajar con peces clínicamente sanos y que las alteraciones observadas sean efecto de los tratamientos (Gómez-Ramírez *et al.*, 2011).

Los peces tenían un peso inicial de $2,30 \pm 0,51$ para el T1, de $2,28 \pm 0,57$ para el T2 y $2,28 \pm 0,56$ el T3. Se manejó una densidad de 20 peces/acuario alrededor de 2.5 g/L. Los acuarios (40 L) presentaban aireación y calefacción constante, pero no poseían biofiltro.

Los peces fueron expuestos al Roundup® Activo durante 30 días. Este periodo se estableció a partir de los reportes de Giesy *et al.*, (2000) los cuales hallaron una vida media para el GP en el agua de 1-2 semanas, y de 3-4 semanas para el surfactante. Transcurrido el tiempo de exposición los peces fueron anestesiados y sacrificados conforme a los criterios

éticos para el sacrificio de animales propuesto por Beaver *et al.*, (2001), para lo cual se usó una sobredosis de benzocaína (0.1 g/L) (Gómez *et al.*, 2010; Gómez-Ramírez *et al.*, 2011).

Seguimiento de parámetros fisicoquímicos

Los parámetros fisicoquímicos se mantuvieron dentro de los rangos adecuados para la especie (González, 2001), por lo que diariamente se midieron parámetros de calidad de agua como: oxígeno disuelto (OD), pH, temperatura (Sonda Ex-tech® DO 700) y nitrógeno amoniacal total (NAT) (Espectrofotómetro de alta sensibilidad Multy Espectroquant Merck®). Semanalmente se registraron las dos durezas: general (GH) y de carbonatos (KH) con kits Tetra® test.

Para evitar efectos deletéreos del GP en el ambiente por contaminación de los cuerpos de agua, el agua usada en el experimento fue mantenida en tanques plásticos por un periodo de 30 días para permitir la transformación del herbicida; después de este tiempo el agua fue percolada en el suelo (Soso *et al.*, 2007).

Procesamiento histológico para microscopia óptica de alta resolución (MOAR)

Transcurridos los 30 días de exposición, se realizó la necropsia y se tomaron aleatoriamente 22 peces por tratamiento para los cortes y su posterior descripción histopatológica. Cuatro para hígado, riñón, branquias y hemisferios telencefálicos (16 peces) y seis para estudiar las neuronas sensoriales de los ganglios de la raíz dorsal (GRDs). Esto se realizó con el fin de disminuir el tiempo entre la muerte y la fijación y así lograr una mejor conservación de las estructuras estudiadas. Las muestras se fijaron en Karnovsky durante dos horas, seguida de tres lavados con buffer fosfato. Para la postfijación se utilizó tetraóxido de osmio al 2% con buffer fosfato durante dos horas y posteriormente se realizaron tres lavados

con buffer fosfato. Los tejidos se deshidrataron en concentraciones ascendentes de alcohol preparado a partir de etanol absoluto y diluido en agua destilada. Alcohol al 70% tres lavados de 5 minutos, alcohol al 90% un lavado de 5 minutos, alcohol al 95% dos lavados de 10 minutos y finalmente dos lavados de 10 minutos en alcohol al 100% (Gómez-Ramírez *et al.*, 2011; Gómez-Ramírez *et al.*, 2012). Es importante aclarar que en este trabajo solo se presentan los resultados concernientes al riñón tanto cefálico como caudal.

Luego del proceso de deshidratación, las muestras fueron impregnadas en resina Poli/Bed®812 con óxido de propileno en diferentes proporciones. En la polimerización se utilizó resina Poli/Bed®812 pura en una incubadora Fisher-Scientific a 60°C durante 16 horas. Se realizaron cortes semiseriados de 1µm de espesor en un micrótopo rotatorio CUT SLEE 4060 y se tiñeron con azul de toluidina (Gómez-Ramírez *et al.*, 2011; Gómez-Ramírez *et al.*, 2012).

Para la evaluación de las alteraciones del riñón se tomaron los siguientes criterios histopatológicos: aparición de células epiteliales con procesos digitiformes en el glomérulo, células con núcleos elípticos y con células tubulares proximales, aparición de células tubulares necróticas con núcleos picnóticos, dilatación de la capsula de Bowman, formación de centros melanomacrófagos y degeneración de epitelio tubular (Eslava *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Rondón-Barragán *et al.*, 2007).

RESULTADOS

Parámetros de calidad de agua

Durante el experimento los parámetros físico-químicos se mantuvieron estables entre los siguientes rangos: pH entre 7,4 - 7,5, temperatura entre 26,6 - 26,2 °C; NAT entre 0 - 0,37 mg/L, oxígeno disuelto entre 7- 8 mg/L, KH entre 17,8 - 35,6 y GH entre 53,4 - 71,2 mg/L.

Riñón

El riñón en todos los tratamientos se observaron normales, identificando túbulos renales compuestos de epitelio cúbico simple con núcleos generalmente esféricos y prominentes ubicados centralmente, presentaban un nucléolo intensamente teñido, aunque en ocasiones se observaban dos de ellos. Hacia el extremo apical de las células epiteliales de los túbulos se encontraron vesículas de pigmento, en la región luminal del epitelio se hallaron vesículas hialinas frecuentes rodeando la pared tubular. Los glomérulos estaban distribuidos en la región intersticial del riñón, cercanos a centros hematopoyéticos, presentando un epitelio parietal plano simple (Figuras 1 y 2). También se encontraron algunos centros melanomacrófagos (CM) aunque sin diferencias cualitativas en tamaño y número en los tratamientos evaluados (Figura 1). A nivel glomerular se halló expansión glomerular en los individuos del tratamiento T3, representado como una reducción del espacio de Bowman (Figura 2).

La región cefálica del riñón de los alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) es exclusivamente hematopoyético con abundantes células de línea sanguínea, presentando pocos islotes de tejido interrenal, el cual se compone de túbulos y glomérulos (Figura 3). Este órgano va cambiando gradualmente de hematopoyético a renal. En la región caudal aumenta considerablemente el número de túbulos y glomérulos presentando poco tejido hematopoyético, el cual estaba restringido a los espacios intersticiales (Figura 1 y 2).

DISCUSIÓN

En los vertebrados superiores así como en los peces el riñón desempeña varias importantes funciones de excreción así como endocrinas que permiten mantener la homeostasis del organismo, dichas funciones incluyen la absorción selectiva de solutos,

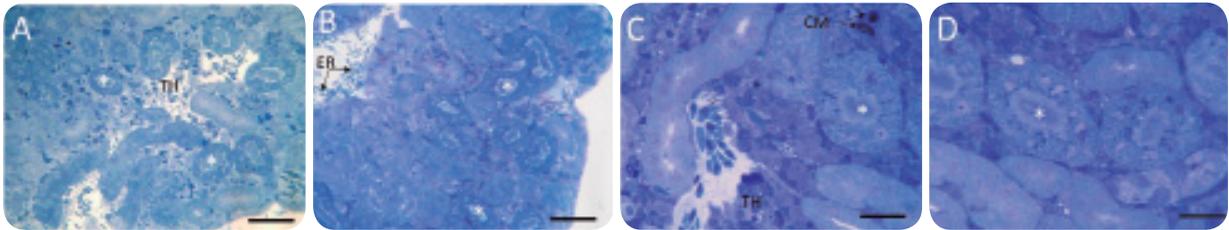


Figura 1. Riñón de alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) del T1. A y B. Panorámica del riñón del T1. C y D. Detalle del riñón del T1. Tejido hematopoyético (TH), eritrocitos (ER), centros melanomacrofagos (CM), túbulos renales proximales (* blanco). Tinción azul de toluidina. A y B barra= 50 µm, C y D barra= 20 µm.

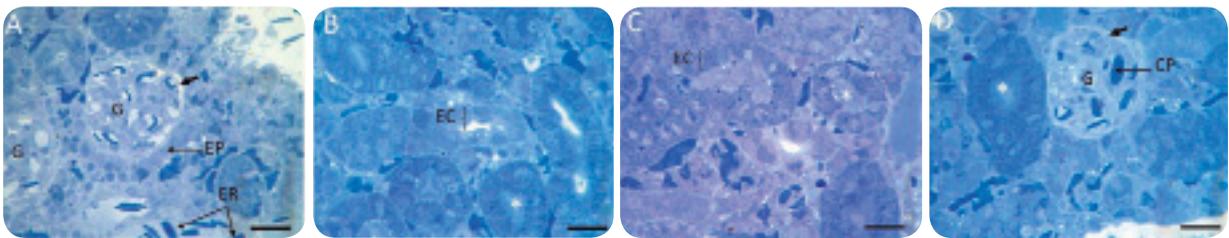


Figura 2. Riñón de alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*) del T2 y T3. A y C. detalle riñón del T1. B. detalle riñón del T2. D. Detalle del riñón del T3. Glomérulo (G), eritrocitos (ER), epitelio parietal de la capsula renal (EP), epitelio cilíndrico cúbico (EC), capilares (CP), túbulos renales proximales (* blanco) peces (flechas negras gruesas). Tinción azul de toluidina. A, B, C, y D barra= 20 µm.

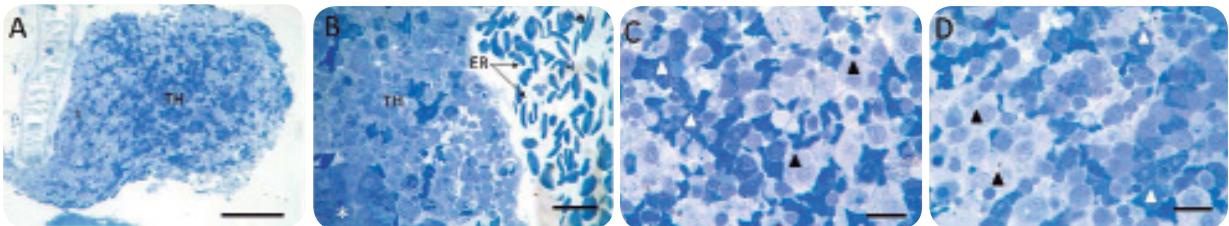


Figura 3. Riñón cefálico de alevinos de Cachama blanca (*P. brachypomus*). A. Panorámica detalle riñón del T1. B, C y D. detalle riñón del T1. Tejido hematopoyético (TH), eritrocitos (ER), túbulos renales proximales (* blanco), basófilos (negro), heterófilos (blanco). Tinción azul de toluidina. A barra= 50 µm, B barra= 20 µm, C y D barra= 10 µm.

filtración de metabolitos para ser excretados, síntesis de hormonas (e.g, eritropoyetina) así como la regulación de la presión, volumen y pH sanguíneo (Iqbal et al., 2004). En teleósteos, representa uno de los primeros órganos en recibir la sangre postbranquial (Charmi et al., 2010), por lo cual también es un receptor de sustancias tóxicas que se distribuyen por vía hemática, por lo tanto se considera un buen órgano para determinar afectos por algún contaminante en el agua (Mela et al., 2007).

En los teleósteos, el riñón está subdividido en dos partes: el riñón cefálico o craneal y el riñón caudal. El riñón cefálico es un órgano hematopoyético donde se desarrollan los eritrocitos y leucocitos (macrófagos, granulocitos y linfocitos B) el cual es homólogo a la médula ósea de los tetrápodos (Betoulle et al., 2000; Romano et al., 2002). Por lo anterior, es considerado el principal órgano del sistema inmune en peces (Betoulle et al., 2000; Romano et al., 2002; Fishelson, 2005). Eslava et al., (2002) reportaron

previamente esta estructura al estudiar la anatomía microscópica en juveniles de *P. brachypomus*, lo cual coincide con lo observado en este trabajo, indicando que la división morfológica y funcional del riñón ocurre temprano en el desarrollo de esta especie.

En el riñón cefálico se observó un gran número de morfologías celulares de línea sanguínea tanto blanca como roja. En peces la identificación de subtipos celulares sanguíneos no es fácil, por lo que es común que los neutrófilos y eosinófilos se agrupen como heterófilos (Romano *et al.*, 2002). Por ello, se habla que en las áreas hematopoyéticas del riñón cefálico se encuentran dos tipos de granulocitos: los similares a heterófilos y los similares a basófilos (Romano *et al.*, 2002). En este trabajo se observaron diferentes morfologías de células sanguíneas, aunque se optó por agruparlas en dos grandes grupos heterófilos y basófilos.

Los estudios histopatológicos del riñón han mostrado ser importantes para determinar la calidad del agua de cuerpos de agua afectados por las actividades antropogénicas. Un ejemplo de esto es el trabajo de Silva y Martínez (2007) quienes expusieron peces de la especie *Astyanax altiparanae* a aguas residuales, encontrando que las células interrenales aumentaban su área nuclear y celular indicando hiperactividad celular, lo anterior, según los autores es un signo de estimulación del eje hipotálamo-hipófisis-células inter-renales, quien modula los mecanismos de estrés en los peces. Por el contrario en este trabajo no hubo un cambio aparente en el tamaño de las células epiteliales de los túbulos renales, quizás al hecho que los parámetros fisicoquímicos se mantuvieron estables y dentro de los rangos reportados como óptimos para su crecimiento (Gonzales 2001).

Los túbulos proximales en mamíferos y peces están involucrados en la reabsorción y degradación lisosomal de macromoléculas, por lo que los túbulos renales serían los primeros en afectarse ante un pesticida (Prashanth *et al.*, 2011). Los túbulos renales de los

alevinos de *P. brachypomus* presentaron un epitelio cúbico simple sin alteración perceptible, morfología similar a la reportada para otras especies de teleosteos, lo cual es una característica de peces sanos (Eslava *et al.*, 2002; Eslava *et al.*, 2007; Silva y Martínez, 2007; Charmi *et al.*, 2010; Prashanth, 2011). Al evaluar el insecticida cipermetrina en la especie *Cirrhinus mrigala* se encontró un mayor daño en las concentración letal (5.130 µg/L) en comparación con la concentración subletal (1.026 µg/L). Los principales daños se caracterizaron por vacuolación de las células epiteliales de los túbulos y alargamiento de los mismos, deformación de las microvellosidades renales, núcleos picnóticos, necrosis focal de los túbulos acompañada de macrófagos y leucocitos (Prashanth, 2011). Jalaludeen *et al.*, (2012) encontraron disminución del tamaño celular de las células epiteliales y leves edemas en los tubulos renales, mientras que el tejido glomerular permaneció más o menos intacto, este hallazgo fue al evaluar una concentración subletal de sulfato de cadmio (0.084 mg/l) en una especie de tilapia (*Tilapia mossambica*) durante 20 días de exposición.

La leve disminución del espacio de Bowman ya había sido reportado en varias especies de peces: en *Prochilodus lineatus* al ser expuesto a aguas con desechos urbanos (Camargo y Martínez, 2007), en *Lates calcarifer* al ser expuesto a cadmio (Thophon *et al.*, 2003), lo cual es una clara señal de intoxicación leve (Prashanth, 2011). Daños más severos en riñón han sido reportados cuando los peces fueron expuestos a pesticidas del grupo de los carbamatos como el Cabaryl (Boran *et al.*, 2010). La disminución del espacio de Bowman puede ser atribuido a cambios osmoregulatorios del riñón, esto es apoyado por estudios en los que se evaluaba el aumento de la actividad de la enzima sodio potasio ATPasa en células branquiales e interrenales de percas (*Anabas testudineus*) expuestas a Cabaryl (Valsa *et al.*, 2013)

Los centros melanomacrófagos (CM) se relacionan con procesos inflamatorios, de detoxificación y

reciclaje para el procesamiento de sustancias endógenas y exógenas (Hur *et al.*, 2006; Eslava *et al.*, 2007). Los CM se presentaron en todos los tratamientos evaluados pero en pocas agrupaciones focalizadas. Esto concuerda con lo reportado por Ramírez-Duarte *et al.*, (2008) y Eslava *et al.*, (2007) al evaluar el riñón de Juveniles de *P. brachypomus* pero en concentraciones más altas de exposición a Roundup® Ultra (7.5, 15, 30, 60, 120 mg/L), encontrando una elevada expresión de CM en una manera dependiente de la concentración. No obstante, en esta investigación no se encontraron diferencias cualitativas en la cantidad de CM. Esto se puede explicar a que una de las funciones principales de estas estructuras es la captura, almacenamiento y reciclaje de hierro, al igual que la captura de radicales libres, lo cual es un proceso natural en células del riñón, hígado y bazo de peces (Agius y Roberts, 2003; Leknes, 2007). Además Agius y Roberts (2003) reportan que es uno de los principales sitios en donde ocurre la melanogénesis.

En animales expuestos a una concentración de 120 mg/L de glifosato en el producto Roundup® Ultra se encontró daños renales caracterizados por hemorragias multifocales a la periferia del órgano, acompañado de necrosis del epitelio tubular Ramírez-Duarte *et al.*, (2008). De lo anterior, se puede inferir que concentraciones subletales como las usadas en el presente estudio (0.1 y 1 mg/L de GP) no inducen lesiones renales de severidad, a excepción del hallazgo de la disminución del espacio de Bowman

AGRADECIMIENTOS

Al Centro general de investigaciones Proyecto IIOC B/2011 de la Universidad de los Llanos, y a la vicerrectoría de investigaciones de la Universidad Militar Nueva Granada CIAS 1061. A Oswaldo Tovar, Diana Castañeda, Ana Torres, Liliana Cifuentes, Sheryll Corchuelo, Laura Rincón y Giovany Muñoz.

BIBLIOGRAFÍA

1. Agius C, Roberts RJ. 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Disease*. 26: 499-509.
2. AVMA Guidelines on Euthanasia. 2007. American Veterinary Medical Association. 1-36.
3. Beaver B, Reed W, Leary S, McKiernan B, Bain F. 2001. Report of the AVMA panel on euthanasia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 218: 669-696.
4. Betoulle S, Duchiron C, Deschaux P. 2000. Lindane differently modulates intracellular calcium levels in two populations of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune cells: head kidney phagocytes and peripheral blood leucocytes. *Toxicology* 145: 203-215
5. Boran H, Altinok I, Capkin E. 2010. Histopathological changes induced by maneb and carbaryl on some tissues of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Tissue and Cell*. 42: 158-164
6. Camargo MM, Martinez CB. 2007. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. *Neotropical Ichthyology*, 5 :327-336,
7. Charmi A, Parto P, Bahmani M, Kazemi R. 2010. Morphological and Histological Study of Kidney in Juvenile Great Sturgeon (*Huso huso*) and Persian Sturgeon (*Acipenser persicus*). *American-Eurasian Journal of Agriculture & Environmental Science*. 7: 505-511.
8. Dinham B. 1999. Resistance to glyphosate. The Pesticides Trust. PAN-Europe. London, UK.
9. Eslava P.R, Ramírez W.F, Rondón I.S. 2007. Sobre los efectos del Glifosato y sus mezclas: impacto en peces nativos. Grupo de sanidad de peces Instituto de acuicultura de los Llanos, Universidad de los Llanos. p 15-72. Meta, Colombia.
10. Eslava PE, Suarez H, Pardo SC, Guevara S. 2002. Estudios sobre morfología del corazón y riñón cefálico (pronefros) de la cachama blanca *Piaractus brachypomus*. *Orinoquia*. 6: 75 - 92.
11. Fishelson L. 2005. Cytomorphological alterations of the thymus, spleen, head kidney, and liver in cardinal fish (*Apogonidae, Teleostei*) as bioindicators of stress. *Journal Morphology*. 267: 57-69.
12. Giesy JP, Dobson S, Solomon KR. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 167: 35-120.
13. Glusczak L, Dos Santos DM, Silveira BM, Rodrigues RS, Chitolina RS, Morsch VM, Loro VL. 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 146: 519-524.
14. Gómez E, Tovar MO, Obando MJ, Hurtado H. 2010. Estudio histológico del tracto digestivo del pez tiburoncito *Ariopsis seemanni*. *Revista Facultad De Ciencias Básicas*, 6: 216-225

15. Gómez-Ramírez E, Eslava-Mocha PR, Hurtado-Giraldo H. 2011. Avances en estudios de microscopía óptica de alta resolución (MOAR) en peces expuestos a concentraciones subletales de una presentación comercial de glifosato. Jornada XVII de Acuicultura. Villavicencio. Colombia. 25-32.
16. Gómez-Ramírez E, Guzmán-Beltrán L, Eslava-Mocha PR, Hurtado-Giraldo H. 2012. Efecto de dosis subletales de un herbicida comercial en el sistema nervioso de alevinos de cachama blanca (*Piaractus brachyomus*). Resumen Revista Orinoquía. 16:264.
17. Gonzales RA. 2001. El cultivo de la Cachama. En: Rodríguez HG, Daza PV, Carrillo MA (Editores). Fundamentos de Acuicultura. Instituto Nacional de Pesca y Acuicultura (INPA). Bogotá D.C, Colombia, p. 329-346.
18. Hur JW, Woo SR, Jo JH, Park SI. 2006. Effects of starvation on kidney melano-macrophage centre in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel). Aquaculture Research. 37: 821–825
19. Iqbal F, Qureshi IZ, Ali M. 2004. Histopathological changes in the kidney of common carp, *Cyprinus carpio* following nitrate exposure. J. Res. Sci.15: 411-418.
20. Jiraungkoorskul W, Upatham ES, Kruatrachue M, Sahaphong S, Vichasri-Grams S, Pokethitiyook P. 2002 . Histopathological effects of Roundup, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Science Asia, 28: 121-127
21. Jalaludeen MD, Arunachalam M, Raja M, Nandagopal S, Showket ABt, Sundar S, Palanimuthu D. 2012. Histopathology of the gill, liver and kidney tissues of the freshwater fish *Tilapia mossambica* exposed to cadmium sulphate. International Journal of Advanced Biological Research. 2: 572-578.
22. Kreutz LC, Gil Barcellos LJ, Valle LF, Oliveira TS, Anziliero D, Dos Santos DV, Pivato M, Zanatta R. 2011. Altered hematological and immunological parameters in silver catfish (*Rhamdia quelen*) following short term exposure to sublethal concentration of glyphosate. Fish & Shellfish Immunology 30: 51-57.
23. Leknes IL. 2007. Melano-macrophage centres and endocytic cells in kidney and spleen of pearl gouramy and platyfish (Anabantidae, Poeciliidae: Teleostei). Acta Histochem. 109:164-8.
24. Li L, Xiea P, Chena J. 2007. Biochemical and ultrastructural changes of the liver and kidney of the phytoplanktivorous silver carp feeding naturally on toxic *Microcystis* blooms in Taihu Lake, China, Toxicon, 49:1042–1053.
25. Mela M, Randi MA, Ventura DF, Carvalho CE, Pelletier E, Oliveira Ribeiro CA. 2007. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney

- histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 68: 426-435.
26. Modesto KA, Martinez CB. 2010. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere*, 81: 781-787
 27. MONSANTO.2011.http://www.monsantoandino.com/productos/agroquimicos/no_selectivos/roundup_activo.asp.
 28. Nivia E. 2001. Las fumigaciones aéreas sobre cultivos ilícitos sí son peligrosas Algunas aproximaciones. Instituto Hemisférico de las Américas. Universidad de California, Davis.
 29. Olaleye VF, Akinyemiju OA. 1996. Effect of a Glyphosate (N-(Phosphonomethyl) glycine) Application to Control Eichhornia crassipes Mart. on Fish Composition and Abundance in Abiala Creek, Niger Delta, Nigeria. *Journal of Environmental Management*, 47: 115-122.
 30. Oldham J, Massey R, Cryan P. 2002. Aerial spraying in Colombia: and environmental effects. The Institute for Science & Interdisciplinary Studies. Fact Sheet, 4.
 31. Oliveira AL. 2001. Apoptosis of sensory neurons and satellite cells after sciatic nerve transection in C57BL/6J mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 34: 375-380.
 32. Peluso M, Munnia A, Bolognesi C, Parodl S. 1998. 32P-postlabeling detection of DNA adducts in mice treated with the herbicide Roundup. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 31: 55-9.
 33. Prashanth MS. 2011. Histopathological changes observed in the kidney of freshwater fish, *Cirrhinus mrigala* (Hamilton) exposed to cypermethrin. *Recent Research in Science and Technology*. 3: 59-65
 34. Ramírez-Duarte WF, Eslava-Mocha PR. 2009. Efectos de la exposición crónica a Glifosato y surfactante Cosmoflux® 411F en Cachama blanca. En: *Memorias XV Jornada de Acuicultura*. Villavicencio. Colombia. 46-50 p.
 35. Ramírez-Duarte WF, Rondón-Barragán IS, Eslava-Mocha PR. 2008. Acute toxicity and histopathological alterations of Roundup herbicide on "Cachama blanca" (*Piaractus brachypomus*). *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 28: 547-554
 36. Richard S, Moslemi S, Sipahutar H, Benachour N, Seralini GE. 2005. Differential effects of glyphosate and Roundup on human placental cells and aromatase. *Environmental Health Perspectives*, 113: 716-720.
 37. Romano N, Ceccariglia S, Mastrolia L, Mazzini M. 2002. Cytology of lymphomyeloid head kidney of Antarctic fishes *Trematomus bernacchii* (Nototheniidae) and *Chionodraco hamatus* (Channichthyidae). *Tissue & Cell*, 34: 63-72.
 38. Rondón-Barragán IS, Ramírez-Duarte WF, Eslava-Mocha PE. 2007. Evaluación de los efectos tóxicos y concentración letal 50 del surfactante Cosmoflux® 411F sobre juveniles de cachama blanca (*Piaractus brachypomus*). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 20: 431-446

39. Salazar-Lugo R, Mata C, Oliveros A, Rojas LM, Lemus M, Rojas-Villarroel. 2011. Histopathological changes in gill, liver and kidney of neotropical fish *Colossoma macropomun* exposed to paraquat at different temperatures. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 31: 490-495.
40. Shiogiri NS, Paulino MG, Carraschi SP, Baraldi FG, Da Cruz C, Fernandes MN. 2012. Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34: 388–396.
41. Silva AG, Martinez CB. 2007. Morphological changes in the kidney of a fish living in an urban stream. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 23: 185-192
42. Soso AB, Gil-Barcellos LJ, Ranzani-Paiva MJ, Kreutz LC, Quevedo RM, Anziliero D, Lim M, Bolognesi da Silva L, Ritter F, Calliari BA, Finco JA. 2007. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundia (*Rhamdia quelen*). *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 23: 308-313.
43. Thophon S, Kruatrachue M, Upathan ES, Pokethitiyook P, Sahaphong S, Jarikhuan S. 2003. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer* in acute and subchronic cadmium exposure. *Environmental Pollution*, 121: 307-320.
44. Tsui TK, Chu LM. 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, 52: 1189-1197.
45. Valsa SP, Babithaa GS, Wendelaar Bongab SE, Subhash MC. 2013. Carbaryl exposure and recovery modify the interrenal and thyroidal activities and the mitochondria-rich cell function in the climbing perch *Anabas testudineus*. *Aquatic Toxicology*. 126 306–313
46. Walsh LP, McCormick C, Martin C, Stocco DM. 2000. Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. *Environ Health Perspectives*, 108:769-76.