



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Naturales y Museo

Trabajo para optar por el título de
Doctor en Ciencias Naturales

“Evaluación genotóxica y del daño oxidativo
inducido en *Cnesterodon decemmaculatus*
(Pisces:Poeciliidae) por herbicidas”

Lic. Celeste Ruiz de Arcaute

Directores de Tesis: Dres. Sonia Soloneski y
Marcelo L. Larramendy

2018

Agradecimientos

A mis directores, el Dr. Marcelo Larramendy y la Dra. Sonia Soloneski, por haberme guiado estos años, compartir sus conocimientos, por estar pendientes en cada paso y asegurarse que llegase a destino.

A mis compañeros, Juan Manuel, Milagros, Noelia, Josefina y Wanessa por su amistad, ayuda desinteresada y momentos compartidos.

A la Dra. Natalia Ossana y a todos los integrantes del Programa de Ecofisiología Aplicada (PRODEA, UNLu) por su predisposición y colaboración en la realización de las mediciones enzimáticas.

Al Dr. Guillermo Natale y la Dra. Alicia Ronco por haber abierto las puertas de su laboratorio desinteresadamente, iniciándome en el camino de la Ecotoxicología.

A todos los integrantes de la cátedra de Genética, por su apoyo y compañerismo.

A mis padres, Daniela y Joaquín por haberme dado todo y más, incondicionalmente. Por su sacrificio, amor y confianza en mí.

A mis hermanos, Iñaki, Miranda, Trinidad y Timoteo por su apoyo, aliento y aguante todos estos años.

A mis suegros y cuñados, Alejandra, Carlos, Eugenia, Tato, Julieta, Javier, Maru, Juan, Juani y Jesi por haberme acompañado e incentivado a no bajar los brazos todo este tiempo, y a mis sobrinos, Toto, Lucas, Alma, Vicente, Irene y Amina por ser la alegría a la familia.

A mis abuelos, por todo el amor y los recuerdos atesorados. Aunque ya no estén físicamente, siempre están presentes.

Al resto de mi familia por su cariño, especialmente a mi madrina por estar siempre pendiente.

A mis amigas, Agustina, Ariadna, Lucía, Carla y Emilia, por ser parte de mi vida y acompañarme a través de éste como otros tantos momentos.

A Fernando, por su amor, paciencia y aliento.

A Clara y Olivia, porque aún sin saberlo, le dan sentido a todo.

Índice

Resumen	8
Abstract	12
Lista de publicaciones	15
Abreviaturas	16
Índice de Tablas	20
Índice de Figuras	22

1. Introducción

1.1 Modelo agrícola moderno.....	23
1.2 Plaguicidas. Definición y clasificaciones.....	29
1.2.1 De acuerdo al organismo blanco sobre el cual actúa	30
1.2.2 De acuerdo a su estructura química	30
1.2.3 De acuerdo al grado de riesgo que presentan	33
1.3 Herbicidas	34
1.3.1 Clasificación de los herbicidas	36
1.3.2 Herbicidas auxínicos	40
1.3.2.1 Dicamba	41
1.3.2.2 Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)	50
1.4 Peces como modelo experimental	62
1.4.1 <i>Cnesterodon decemmaculatus</i> (Jenyns, 1842),	

	(Pisces, Poeciliidae).....	64
1.5	Ensayos biológicos	67
1.5.1	Uso de biomarcadores en monitoreos ambientales	68
1.5.1.1	Alteraciones del comportamiento.....	70
1.5.1.2	Ensayo de micronúcleos	71
1.5.1.3	Electroforesis en gel de células únicas. Variedad alcalina del Ensayo Cometa	75
1.5.1.4	EC modificado empleando enzimas de restricción.....	78
1.5.1.5	Biomarcadores enzimáticos y no enzimáticos	79
2.	Hipótesis y Objetivos	
2.1	Hipótesis.....	82
2.2	Objetivos	
2.2.1	Objetivo general	82
2.2.2	Objetivos específicos	82
3.	Materiales y Métodos	
3.1	Muestreo y aclimatación.....	84
3.2	Compuestos químicos empleados.....	85
3.3	Mediciones analíticas de las concentraciones utilizadas.....	87
3.4	Bioensayos	
3.4.1	Bioensayos agudos	87
3.4.2	Bioensayos crónicos	89
3.5	Biomarcadores.....	90
3.5.1	Determinación de la concentración letal media (CL50)	90
3.5.2	Análisis de comportamiento	91
3.5.3	Cuantificación de la frecuencia de micronúcleos y anormalidades nucleares	91
3.5.4	Cuantificación de la inducción de daño primario en el ADN mediante electroforesis en gel de	

células únicas: Ensayo Cometa (EC) variante alcalina	93
3.5.5 Cuantificación de la inducción de lesiones primarias en el ADN mediante electroforesis en gel de células únicas o Ensayo Cometa alcalino modificado con enzimas de restricción	95
3.5.6 Biomarcadores enzimáticos y no enzimáticos de estrés oxidativo	97
3.5.7 Biomarcador de neurotoxicidad	99
3.5.8 Determinación de la toxicidad aguda de mezclas de los herbicidas dicamba y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).....	99
3.6 Estadística.....	101

4. Resultados

4.1 Mediciones analíticas de las concentraciones utilizadas.....	103
4.2 Bioensayos agudos	
4.2.1 Efectos letales. Determinación de la concentración letal media (CL50)	103
4.2.2 Efectos subletales. Análisis en los patrones de comportamiento.....	105
4.2.3 Estudios a nivel citogenético. Cuantificación de la frecuencia de micronúcleos y anomalías nucleares	109
4.2.4 Cuantificación de la inducción de lesiones primarias en la molécula de ADN mediante electroforesis en gel de células únicas o Ensayo Cometa (variante alcalina).....	114
4.2.5 Cuantificación de la inducción de lesiones primarias en el ADN mediante electroforesis en gel de células únicas o Ensayo Cometa alcalino modificado con enzimas de restricción	117
4.2.6 Biomarcadores de estrés oxidativo	123
4.2.7 Biomarcadores de neurotoxicidad	123

4.2.8 Toxicidad aguda de mezclas binarias de los herbicidas dicamba y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)	126
4.3 Ensayos crónicos. Cuantificación de la inducción de lesiones primarias en el ADN mediante el ensayo cometa.....	129
5. Discusión	
5.1 Evaluación de la letalidad inducida por dicamba y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en sus formulaciones comerciales Banvel® y DMA®	139
5.2 Evaluación de los efectos en el comportamiento inducidos por dicamba y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en sus formulaciones comerciales Banvel® y DMA®	146
5.3 Evaluación de la genotoxicidad inducida por dicamba y 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en sus formulaciones comerciales Banvel® y DMA®	150
5.3.1 Inducción de micronúcleos	150
5.3.2 Inducción de daño primario en la cadena de ADN medidas mediante el EC.....	155
5.4 Evaluación de la inducción de lesiones primarias en la molécula de ADN mediante el Ensayo Cometa modificado con enzimas de con enzimas de restricción.....	159
5.5 Evaluación de las alteraciones en biomarcadores enzimáticos y de neurotoxicidad.....	161
5.6 Evaluación de la letalidad inducida por mezclas de dicamba y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en sus formulaciones comerciales Banvel® y DMA®	167
5.7 Cuantificación de la inducción de lesiones primarias en el ADN luego de exposición crónica	172
5.8 Consideraciones generales.....	175
5.9 Conclusiones finales.....	177

6. Bibliografía	180
7. Anexo I	213

Resumen

El objetivo del presente trabajo de Tesis Doctoral fue evaluar los efectos letales y subletales inducidos por dos herbicidas auxínicos ampliamente utilizados tanto en Argentina como en el agro mundial, el dicamba (DIC) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético contenidos en las formulaciones nacionales Banvel® (57,7% DIC) y DMA® (58,4% 2,4-D), respectivamente. Es ampliamente conocido que en las últimas décadas, la cantidad de plaguicidas utilizados en los agroecosistemas aumentó significativamente. La aplicación masiva e intensiva, sumado a falta de regulación del uso de estos agroquímicos representa una preocupación para la salud humana y ambiental, ya que pueden producir múltiples consecuencias negativas a nivel de los organismos, poblaciones, comunidades y ecosistemas perturbando funciones vitales como el comportamiento, reproducción, evasión de predadores y recolección de alimento, entre otros, afectando su supervivencia y la biodiversidad finalmente de las especies. Los efectos inducidos por los mismos fueron evaluados sobre el poecílido Neotropical *Cnesterodon decemmaculatus* mediante el empleo de una batería de biomarcadores de efecto tales como letalidad, comportamiento, genotoxicidad y de estrés oxidativo en ensayos agudos de laboratorio. Adicionalmente, se evaluó el efecto letal de las posibles interacciones (aditividad, sinergismo o antagonismo) resultantes de la aplicación conjunta de ambos herbicidas usando mezclas equitóxicas y no equitóxicas de los mismos. Asimismo, se evaluó el efecto genotóxico inducido por DIC y 2,4-D luego de una exposición a largo plazo de los peces a estos herbicidas. Como biomarcador de letalidad se utilizó la determinación de la concentración letal 50 (CL50), la cual en adición a ser un parámetro útil y ampliamente utilizado para establecer la toxicidad de un compuesto, fue empleada para determinar las concentraciones a utilizar en los ensayos subletales a realizar en la presente Tesis

Doctoral. Las alteraciones en el comportamiento evaluadas fueron aglomeración en el fondo del acuario (AFA), movimiento lento (ML), reacción lenta (RL) y natación anormal (NA) y se procedió al cálculo de parámetros como NOEC y LOEC para las mismas. En adición, para la evaluación de los posibles efectos genotóxicos se utilizaron diferentes biomarcadores de efecto, como el ensayo de MNs, la inducción de otras anormalidades nucleares y la variante alcalina del ensayo cometa (EC) utilizando células sanguíneas de este poecílido. Posteriormente, se empleó la modificación del EC con enzimas de restricción con el objetivo de determinar el posible mecanismo de acción ejercido por DIC y 2,4-D por tratamiento con endonucleasas Endo III y Fpg, enzimas que detectan oxidación de bases pirimidínicas y púricas, respectivamente. Por otro lado, se analizó la posible respuesta antioxidante inducida por ambos herbicidas auxiliando biomarcadores enzimáticos y no enzimáticos como la detección de variaciones en los niveles de catalasa (CAT), glutatión-S-transferasa (GST) y glutatión (GSH). Adicionalmente, se evaluó la variación en los niveles de acetilcolinesterasa (AChE) como biomarcador de neurotoxicidad. Con el objetivo de analizar las posibles interacciones resultado de la aplicación conjunta de ambos herbicidas y el efecto que podrían ejercer sobre *C. decemmaculatus*, se realizaron ensayos de toxicidad de mezclas a concentraciones equitóxicas y no equitóxicas de ambos herbicidas. Finalmente, con el objetivo de evaluar el efecto deletéreo a largo plazo ejercido por los herbicidas DIC y 2,4-D, se evaluó la inducción de lesiones primarias en el ADN en células sanguíneas de *C. decemmaculatus* mediante el EC en ejemplares expuestos de manera crónica a estos herbicidas. Los resultados de los estudios de letalidad revelaron que el formulado Banvel[®], produjo efectos letales con un valor de CL50_{96h} de 1639 mg/L mientras que el formulado DMA[®], presentó un valor de CL50_{96h} de 1008 mg/L. Luego de la exposición a ambos herbicidas, se observaron alteraciones en los patrones de comportamiento que difirieron significativamente con respecto a los valores controles para los cuatro tiempos de exposición, en el lapso de 0-96 h. Los resultados del ensayo de MNs revelaron un aumento significativo de la frecuencia de MNs a las 48 h de exposición para la concentración más alta ensayada del formulado de DIC (1229 mg/L), pero dicha diferencia no fue observada luego de las 96 h de exposición al mismo. En los peces expuestos a 2,4-D, un aumento significativo fue observado con todas las concentraciones ensayadas, en el rango de 252-756 mg/L,

para ambos tiempos de exposición (48 y 96 h). En relación a los resultados del EC, se observó un aumento significativo con respecto a los valores control en el porcentaje de nucleoides dañados y en el índice de daño genético (IDG) tanto para el formulado de DIC como para la formulación de 2,4-D en el rango de concentraciones de 410-1229 y 252-756 mg/L, respectivamente, luego de 48 y de 96 h de exposición. El EC modificado con enzimas de restricción puso en evidencia que las células de los peces que recibieron un post-tratamiento con la enzima Fpg mostraron un aumento significativo del daño oxidativo neto, revelando que ambos herbicidas auxínicos indujeron daño en el ADN mediante la oxidación de purinas. Por otro lado, las muestras que recibieron el post tratamiento con Endo III no mostraron diferencias significativas respecto al grupo control. En cuanto a los resultados de los biomarcadores enzimáticos y no enzimáticos, luego de la exposición tanto a DIC como a 2,4-D, la actividad de CAT y GST aumentó significativamente con respecto a valores controles luego de 48 y 96 h de exposición. El análisis de la actividad de AChE mostró una disminución significativa sólo luego de las 96 h de exposición para ambos herbicidas auxínicos evaluados, pero dicha diferencia no fue observada luego de 48 h de tratamiento. En adición a los biomarcadores enzimáticos evaluados, la actividad de GSH mostró una disminución significativa de su actividad a las 48 para el formulado conteniendo DIC y a las 96 h para el formulado 2,4-D. Los resultados de los ensayos destinados a evaluar la toxicidad y las posibles interacciones resultantes de la mezcla entre los formulados de DIC y 2,4-D, demostraron para mezclas equitóxicas un patrón aditivo entre las mismas, mientras que para mezclas no equitóxicas se observó un patrón sinérgico en las cuatro combinaciones no equitóxicas ensayadas. Finalmente, la evaluación de los efectos genotóxicos inducidos por ambos herbicidas mediante la variante alcalina del EC luego de una exposición crónica empleando concentraciones equivalentes al 2,5% y 5% de la $CL_{50_{96h}}$, demostró que el DIC fue capaz de inducir lesiones primarias en la molécula de ADN evaluada mediante el EC alcalino luego de 7 y 14 d cuando fue expuesto a una concentración equivalente al 2,5% de la $CL_{50_{96h}}$, y luego de 7 d a una concentración equivalente al 5% de la $CL_{50_{96h}}$. Adicionalmente, mediante la misma metodología, el herbicida 2,4-D fue capaz de inducir lesiones primarias en la molécula de ADN luego de los 7, 14, 21 y 28 días de exposición a DIC y 2,4-D. Los resultados de los estudios realizados en el presente trabajo de Tesis Doctoral representan una evidencia concreta

que los herbicidas DIC y 2,4-D en sus formulaciones comerciales Banvel® y DMA® deben ser considerados agentes inductores tanto de mortalidad como de efectos subletales tales como alteraciones en el comportamiento, efectos cito y genotóxicos y como agentes capaces de generar alteraciones en el balance oxidativo, tanto enzimáticos y no enzimáticos en *C. decemmaculatus*. Adicionalmente, estos herbicidas deberían ser clasificados según los valores de CL50_{96h} obtenidos como compuestos nocivos (categoría III) para *C. decemmaculatus* de acuerdo a los patrones internacionales de clasificación de riesgo toxicológico para especies acuáticas. Es relevante destacar que las concentraciones empleadas en el presente trabajo de Tesis Doctoral se encuentran en el orden de mg/L, mientras que hasta el presente, las detectadas en el ambiente acuático se encuentran en el orden de µg/L. Aun así, ante las condiciones predominantes en el modelo de producción actual y al escaso control gubernamental existente en nuestro país, no podría descartarse la posibilidad de que ambos herbicidas auxínicos, DIC y 2,4-D, puedan ingresar y contaminar los diferentes compartimentos ambientales ejerciendo efectos deletéreos y comprometiendo la salud no sólo para la especie evaluada, *C. decemmaculatus*, sino también de otros organismos, incluyendo los seres humanos.

Abstract

The aim of the current Doctoral Thesis was to evaluate the lethal and sublethal effects induced by two auxinic herbicides employed worldwide, dicamba (DIC) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) contained in the Banvel® (57.7% DIC) and DMA® (58.4% 2,4-D) formulations marketed in our country. In the last decades, the amount of pesticides used in agroecosystems has significantly increased. The widespread, intensive and non regulated application of these agrochemicals represent a serious concern for human and environmental health, as they can produce multiple consequences at organism, population, community and ecosystem levels, disturbing vital functions of organisms such as behavior, reproduction, predators evasion and food gathering, among others, and thus the survival and biodiversity. The effects induced by these herbicides were evaluated on the Neotropical poecilid *Cnesterodon decemmaculatus* by biomarkers of lethality, behavior, genotoxicity and oxidative damage under acute laboratory assays. Additionally, the possible interactions (additivity, synergism or antagonism) resulting from the joined application of both herbicides were evaluated by lethality assays using equitoxic and non-equitoxic mixtures. Furthermore, the genotoxic effect induced by DIC and 2,4-D after a long-term exposure through the alkaline single cell gel electrophoresis assay (SCGE, comet assay) was assayed. The determination of the LC50 was employed as a biomarker for lethality and for determining the concentrations of the sublethal assays in the present Doctoral Thesis. Behavioral changes as gathering at the bottom of the aquarium (GBA), slowness in motion (SM), slow reaction (SR) and abnormal swimming (AS) were evaluated and employed for calculating NOEC and LOEC parameters. In addition, for evaluating the possible genotoxic effects, different biomarkers of effect were employed such as the micronuclei (MNs) test, the induction of other nuclear

abnormalities and the alkaline comet assay using blood cells of this poeciliid. The modified SCGE methodology with the addition of restriction enzymes was employed in order to determine the possible mechanism of action exerted by DIC and 2,4-D, through the detection of oxidated pyrimidine and purine bases by enzymes Endo III and Fpg, respectively. Moreover, the possible antioxidant response induced by both auxinic herbicides was analyzed using enzymatic and non-enzymatic biomarkers such as the detection of variations in the levels of catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), acetylcholinesterase (AChE) and glutathione (GSH). In addition, in order to analyze the possible interactions resulting from the joined application of both herbicides and the effect that they could exert on *C. decemmaculatus*, acute toxicity tests of mixtures were carried out employing equitoxic and non-equitoxic concentrations of both herbicides. Finally, to evaluate the chronic effects induced by the herbicides DIC and 2,4-D, the induction of primary lesions in the DNA in blood cells of *C. decemmaculatus* was assayed by the SCGE assay. Lethality results revealed that the DIC-based formulation Banvel® exerted lethal effects with a LC50_{96h} value of 1639 mg/L while the 2,4-D-based formulation DMA® had a LC50_{96h} a value of 1008 mg/L. Results of behavioral changes on individuals exposed to DIC and 2,4-D showed significant variations respect to the control values within the 0-96 h exposure range. The results reveal an increased frequency of MNs in those fish exposed to the highest concentration (1229 mg/L) of DIC during 48 h but not in fish exposed to the herbicide for 96 h, regardless of the concentration of herbicide assayed. In 2,4-D- exposed fish, the enhancement in MNs frequency was observed at all concentrations assayed within the range 252-756 mg/L for both exposure times (48 and 96 h). In addition, both herbicides were able to induce single-strand breaks and/or alkali sensitive sites into DNA, revealed by the SCGE assay regardless of the concentration and exposure time. Furthermore, the modified comet assay showed that cells post-treated with the restriction enzyme Fpg showed a significant increase of the oxidative damage, revealing that both auxinic herbicides induced DNA damage through the oxidation of purines. On the other hand, post treatment with restriction enzyme Endo III did not showed significant differences with their respective control group. Regarding the results of the enzymatic and non-enzymatic biomarkers, significant increased activities of the enzymes CAT and GST were observed in fish exposed to DIC- and 2,4-D-based

formulations for 48 and 96 h, respectively. The analysis of AChE activity showed a significant decrease only after 96 h of exposure for both herbicides but such difference was not observed after 48 h of exposure. Additionally to the aforementioned altered enzymatic markers, a decrease of GSH was registered in specimens treated for 48 and 96 h with either DIC- and 2,4-D-herbicide formulations. The results of the tests aimed to evaluate the toxic effects exerted when *C. decemmaculatus* was exposed simultaneously to the DIC- and 2,4-D-based formulations Banvel® and DMA®, respectively, showed for equitoxic mixtures an additive pattern, while for non-equitoxic mixtures a synergistic pattern was observed in the four non-equitoxic combinations tested.

Finally, the chronic sublethal effects showed an increased frequency of DNA breaks estimated by the alkaline SCGE in fish exposed to 2.5% of DIC LC50_{96h} for 7 and 14 days whereas this enhancement was observed only after 7 days of exposure to a concentration equivalent to 5% of the LC50_{96h}. In individuals chronically exposed to concentrations equivalent to 2.5 and 5% of 2,4-D LC50_{96h} increased the frequencies of breaks in DNA estimated by the alkaline SCGE in fish exposed for 7, 14, 21 and 28 days. Overall, the results obtained in the present Doctoral Thesis represent a concrete evidence that the auxinic herbicides DIC and 2,4-D present in their commercial formulations Banvel® and DMA®, respectively, should be considered as oxidizing agents able to induce both mortality and sub-lethal effects such as alterations in behavior, genotoxic effects and alterations of enzymatic and non-enzymatic biomarkers in *C. decemmaculatus*. Furthermore, these herbicides should be classified according to the values of LC50_{96h} obtained as harmful compounds (category III), for *C. decemmaculatus* according to the international standards of toxicological risk classification for aquatic species. Given the prevailing conditions in the current agronomic-production model, it cannot be rule out the possibility that both auxinic herbicides can enter and contaminate different environmental compartments, exerting deleterious effects and compromising the health not only of our test species, *C. decemmaculatus*, but also of other organisms, among which human beings are included.

Listado de publicaciones científicas

El presente trabajo de Tesis Doctoral dio lugar a los siguientes trabajos científicos. Los mismos se encuentran contenidos en el Anexo I y son referidos a lo largo del texto.

- I. **Ruiz de Arcaute C**; Soloneski S y Larramendy ML. 2014. Evaluation of the genotoxicity of a herbicide formulation containing 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (dicamba) in circulating blood cells of the tropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. *Mutation Research*. 773, 1-8.
- II. **Ruiz de Arcaute C**; Soloneski S y Larramendy ML. 2016. Toxic and genotoxic effects of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-d)-based herbicide on the neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 128, 222-229.
- III. **Ruiz de Arcaute C**; Soloneski S y Larramendy ML. 2018. Synergism of mixtures of dicamba and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide formulations on the neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). *Environmental Pollution*, 236, 33-39.
- IV. **Ruiz de Arcaute, C**; Larramendy, ML y Soloneski, S. 2018. Genotoxicity by long-term exposure to the auxinic herbicides 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and dicamba on *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces: Poeciliidae). *Environmental Pollution*, 243, 670-678.
- V. **Ruiz de Arcaute, C**; Pérez-Iglesias, JM; Ossana, NA; Soloneski, S y Larramendy, ML. 2018. Auxinic herbicides induce oxidative stress in *Cnesterodon decemmaculatus*. *Ecological Indicators*, Enviado.

Abreviaturas

°C	Grados Celsius
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
μl	Microlitro/s
ABA	Ácido abscísico
ACC	1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico
AChE	Acetilcolinesterasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFA	Aglomeración en el fondo del acuario
AP	Antes del presente
APFB	Agarosa de punto de fusión bajo
APFN	Agarosa de punto de fusión normal
ASTM	American Society for Testing and Materials (Sociedad Americana para Pruebas y Materiales)
ATA	Ácido tricloroacético
ATP	adenosín trifosfato
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades)
BEnz	Buffer enzimas
BSA	Albúmina suero bovino (Bovine Serum Albumin)
BSI	British Standards Institution (Instituto Británico de Normalización)
BHPM	Buffer de homogenización post mitocondrial
CASAFE	Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes
CAS	Chemical Abstract Service Registry Number
CAT	Catalasa
CB	Célula binucleada
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzenuo
CE50	Concentración efectiva 50
CF	Ciclofosfamida
CN	Control negativo

CL50_{96h}	Concentración letal cincuenta en 96 horas
cm	Centímetro/s
cm²	Centímetro/s cuadrado/s
cm³	Centímetro/s cúbico/s
CONICET	Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas
ChE	Colinesterasa/s
CP	Control positivo
d	Día/s
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
DIC	Dicamba
DDT	Dicloro-difenilo-tricloroetano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Daño oxidativo neto
DTNB	ácido 5,5'-ditiobis-2-dinitrobenzoico
DTT	Ditiotreitol
EC	Ensayo cometa
ECHA	European Chemical Agency (Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE	Error estándar
EN	Escotadura nuclear
Endo III	Endonucleasa III
ERO	Especies reactivas de oxígeno
EU	European Union (Unión Europea)
FAO	Food and Agriculture Organization (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación)
Fpg	Formamidopirimidina-DNA glicosilasa
g	Gramo/s
GPx	Glutación peroxidasa
GSH	Glutación reducido
GR	Glutación reductasa
GST	Glutación-S-transferasa
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
H₂O_d	Agua destilada
h	Hora/s
ha	Hectárea

HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IARC	International Agency for Research on Cancer (Agencia Internacional de Investigación en Cáncer)
IDG	Índice de daño genético
INCHEM	Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations (Información sobre Seguridad Química para Organizaciones Intergubernamentales)
IPC	Índice de proliferación celular
IPCS	International Programme on Chemical Safety (Programa Internacional para la Seguridad Química)
kg	kilogramo/s
Km	Kilómetro/s por hora
Kow	Coeficiente de partición octanol/agua
L	Litro/s
LC	Límite/s de confianza
LOEC	Lowest Observed Effect Concentration (Concentración más baja a la cual se observa efecto)
mA	Miliamperio
MCPA	Ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético (2-methyl-4-chlorophenoxyacetic acid)
MCPP	Ácido propiónico, 2-(4-cloro-2-metilfenoxi)l (methylchlorophenoxypropionic acid)
MG	Modificaciones genéticas
mg/L	Miligramo/s por litro
min	Minuto/s
ML	Movimiento lento
mM	Milimolar
MN	Micronúcleo
msnm	Metros sobre el nivel del mar
NA	Natación anormal
NAcr	Naranja de acridina
ng/L	Nanogramo por litro
NL	Núcleo lobulado
nm	Nanometro
NOEC	NoObservedEffectConcentration(concentración más baja a la cual no se observa efecto)
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development (Organización para la Cooperación)

	y el Desarrollo Económicos)
p.a.	Principio activo
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón
PT	Proteínas totales
p/v	Peso en volumen
RL	Reacción lenta
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundo/s
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
SHE	Sirio hamster embrio (Embriones de hámster Sirios)
SOD	Superóxido dismutasa
t	Toneladas
µg/mL	Microgramo/s por mililitro
UN	United Nations (Naciones Unidas)
UNESCO	United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (Organización de la Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura)
U.S. EPA	Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos)
UT	Unidad Tóxica/s
V	Voltio
Vit. E	Vitamina E
WHO	World Health Organization (Organización Mundial de la Salud)
WSSA	Weed Science Society of America (Sociedad de Ciencias de la Maleza de Estados Unidos de América)

Índice de Tablas

Tabla 1.1	Plaguicidas más utilizados en el sector agrícola de EE.UU. del año 2012	25
Tabla 1.2	Clasificaciones toxicológicas.....	34
Tabla 1.3	Clasificaciones de herbicidas según su modo de acción	37
Tabla 1.4	Familia de herbicidas auxínicos	41
Tabla 1.5	Formulados comerciales en Argentina conteniendo dicamba como principio activo	43
Tabla 1.6	Información toxicológica del formulado comercial Banvel® (57,7% dicamba)	50
Tabla 1.7	Formulados comerciales en Argentina conteniendo 2,4-D como principio activo	54
Tabla 1.8	Información toxicológica del formulado comercial DMA® (58,4% 2,4-D).....	62
Tabla 3.1	Compuestos químicos utilizados	86
Tabla 4.1	Efectos letales luego de la exposición aguda a dicamba.....	104
Tabla 4.2	Efectos letales luego de la exposición aguda a 2,4-D.....	105
Tabla 4.A	Individuos afectados con alteraciones comportamentales	106
Tabla 4.3	Efectos en el comportamiento luego de exposición aguda a dicamba.....	107

Tabla 4.4	Efectos en el comportamiento luego de exposición aguda a 2,4-D.....	108
Tabla 4.5	Frecuencia de MNs y AN luego de exposición aguda a dicamba	111
Tabla 4.6	Frecuencia de MN y AN luego de exposición aguda a 2,4-D	113
Tabla 4.7	Análisis del daño en el ADN mediante EC en individuos expuestos a dicamba.....	115
Tabla 4.8	Análisis del daño en el ADN mediante EC en individuos expuestos a 2,4-D	117
Tabla 4.9	Análisis del daño en el ADN mediante EC modificado en individuos expuestos a dicamba.....	120
Tabla 4.10	Análisis del daño en el ADN mediante EC modificado en individuos expuestos a 2,4-D.....	122
Tabla 4.11	Análisis de estrés oxidativo en <i>Cnesterodon decemmaculatus</i> expuestos a dicamba y 2,4-D	125
Tabla 4.12	Efectos letales luego de exposición aguda a mezclas equitóxicas de dicamba y 2,4-D.....	126
Tabla 4.13	Efectos letales luego de exposición aguda a mezclas no equitóxicas de dicamba y 2,4-D.....	127
Tabla 4.14	Análisis del daño en el ADN mediante EC en individuos expuestos de manera crónica a dicamba.....	131
Tabla 4.15	Análisis del daño en el ADN mediante EC en individuos expuestos de manera crónica a 2,4-D.....	134
Tabla 5.1	CL50 _{96h} reportadas en organismos expuestos a dicamba y 2,4-D	141
Tabla 5.2	CL50 _{96h} reportadas en <i>Cnesterodon decemmaculatus</i> expuestos a distintos compuestos	145

Índice de Figuras

Figura 1.1	Evolución Mercado Fitosanitario Argentino	26
Figura 1.2	Estructura química del herbicida dicamba.....	42
Figura 1.3	Estructura química del herbicida 2,4-D	50
Figura 1.4	Ejemplares de <i>Cnesterodon decemmaculatus</i>	65
Figura 1.5	Micronúcleo en eritrocito circulante de <i>Cnesterodon decemmaculatus</i>	71
Figura 1.6	Anormalidades nucleares.....	73
Figura 1.7	Nucleoide sin daño y cometa	76
Figura 1.8	Categorías de daño utilizadas en el EC	77
Figura 3.1	Sitio de muestreo, Parque Pereyra Iraola	85
Figura 3.2	Diseño experimental de los ensayos agudos	88
Figura 3.3	Diseño experimental de los ensayos crónicos	89
Figura 3.4	Protocolo del ensayo cometa alcalino	94
Figura 3.5	Categorías de daño utilizadas en el EC	95
Figura 3.6	Esquema isoblograma.....	101
Figura 4.1	Frecuencias de nucleoides en individuos expuestos de manera aguda a dicamba	114
Figura 4.2	Frecuencias de nucleoides en individuos expuestos de manera aguda a 2,4-D	116
Figura 4.3	Daño oxidativo neto inducido por dicamba y 2,4-D.....	118
Figura 4.4	Isoblograma ilustrando UT de mezclas no	

	equitóxicas de dicamba y 2,4-D.....	128
Figura 4.5	Frecuencias de nucleoides en individuos expuestos de manera crónica a dicamba	130
Figura 4.6	Frecuencias de nucleoides en individuos expuestos de manera crónica a 2,4-D	133

1. Introducción

1.1 Modelo agrícola moderno

El control de plagas en cultivos es una práctica tan antigua como la agricultura misma. Partiendo 12.000 años A.P. con la remoción manual de plantas no deseadas, su evolución fue lenta en el comienzo. En el 8.000 A.P. se reportó el uso de las primeras herramientas para la labranza manual y posteriormente en el 4500 A.P. se registró el primer uso intencional de plaguicidas, cuando los sumerios utilizaron compuestos azufrados para repeler insectos y ácaros. A través de los años, el conocimiento acerca del uso de plaguicidas fue incrementando y 2000 años A.P. los romanos emplearon diferentes tipos de sales para combatir las malezas. Posteriormente, en el siglo XVIII, durante la revolución agrícola europea, entre 1750 y 1780, se comenzaron a aplicar en los cultivos diferentes sustancias con capacidad insecticida tal como el piretro, obtenido del crisantemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) (Taylor y col., 2006). A partir del 1800 se comienzan a emplear elementos extraídos de la naturaleza tales como el azufre, cobre, arsénico y fósforo y se da inicio a la utilización de las primeras fumigaciones con plaguicidas orgánicos, tales como derivados del petróleo, clorofenoles, naftaleno, el famoso caldo bordelés (sulfato de cobre y cal), el verde de París (acetoarsenito de cobre), entre otros. Ya en la década de 1940, durante el comienzo de la Segunda Guerra Mundial se introdujo el control químico de plagas con el desarrollo de los primeros plaguicidas sintéticos como el organoclorado DDT, muy

utilizado debido a su gran estabilidad y acción prolongada contra una amplia variedad de plagas entre las que se incluyen la mosca doméstica, piojos y mosquitos, entre otros (Ware y Whitacre, 2004). Posteriormente, en 1947, se introdujo el control químico, con la entrada al mercado de los plaguicidas orgánicos sintéticos, tales como el clordano, eldrín, dieldrín, paration, lindano, ácido 2-metil-4-cloro fenoxiacético (MCPA) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), cuya mezcla con el 2,4,5-T se denominó agente naranja, masivamente empleado como herbicida y defoliante durante la Guerra de Vietnam (Hay, 1974; Unsworth, 2010). Estos nuevos productos tenían la ventaja de ser efectivos y económicos. Luego de la Segunda Guerra Mundial y junto a las tecnologías desarrolladas bajo el concepto de Revolución Verde, se produjo un importante incremento en la productividad agrícola mediante la utilización de tecnologías innovadoras aplicadas en la producción de plaguicidas, fertilizantes, mecanismos de riego y variedades de cultivos de alto rendimiento resistentes a climas extremos y plagas (Conway, 1997). Este nuevo modelo productivo, asociado a la práctica del monocultivo a gran escala, trajo como consecuencia una producción basada en el consumo de elevadas cantidades de insumos, principalmente herbicidas, al igual que el uso extendido de maquinaria agrícola. Desde la década del '80 conjuntamente con la introducción de los cultivos genéticamente modificados (GM) tales como soja, maíz y algodón, dichas prácticas agrícolas tuvieron un gran desarrollo tanto en Argentina como en Sudamérica y en el resto del mundo (FAO, 2013; Martin-Guay y col., 2018).

Particularmente en nuestro país, en los últimos 40 años se produjo una expansión de la superficie destinada a la agricultura, encontrándose actualmente dentro de los países mega productores de cultivos genéticamente modificados. Argentina se ubica en el tercer puesto de países de mayor producción con 23,8 millones de ha cultivadas, de las cuales al año 2016, 18,7 fueron de soja, 4,7 de maíz y 0,4 de algodón (ISAAA, 2016; Sasal y col., 2016). El 96% de la producción de soja se exporta a China (tanto poroto como aceite de soja), Europa (harina y pellet de soja), India (aceite de soja) y Estados Unidos (biodiésel) (Pontón, 2008; Silvetti y Cáceres, 2015). Esta gran demanda en el mercado de las oleaginosas condujo concomitantemente a un aumento en la importación y utilización de numerosos productos agroquímicos (Figura 1.1), tendencia observada también a nivel global. En el

año 2012, el consumo mundial de plaguicidas fue aproximadamente de dos millones de t por año, de los cuales el 45% fue utilizado en Europa, 25% en Estados Unidos y el 30% restante en el resto del mundo (De y col., 2014). Del total de ventas de productos fitosanitarios, los herbicidas lideran el ranking con aproximadamente el 50% de las ventas, seguidos por los fumigantes, insecticidas y fungicidas, respectivamente (USEPA, 2017)(Tabla 1.1).

Tabla 1.1

Plaguicidas más utilizados en el sector agrícola de EE.UU. del año 2012

Ingrediente activo	Tipo ^a	Puesto
Glifosato	H	1
Atrazina	H	2
S-Metolaclor	H	3
Dicloropropeno	Fum	4
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)	H	5
Metam sodio	Fum	6
Acetoclor	H	7
Metam potasio	Fum	8
Cloropicrina	Fum	9
Clorotaloni	F	10
Pendimetalin	H	11
Etefon	RCP	12
Mancozeb	F	13
Clorpirifós	I	14
Metolaclor	H	15
Hidróxido de calcio	F	16
Propanil	H	17
Dicamba	H	18
Trifluralin	H	19
Decan-l-ol	RCP	20
Hidróxido de cobre	F	21
Acefato	I	22
Paraquat	H	23
Metil bromidio	Fum	24
Glufosinato	H	25

^a, Tipos de plaguicidas. H: herbicidas; Fum: fumigantes; F: fungicidas; I: insecticidas; RCP: reguladores del crecimiento de las plantas

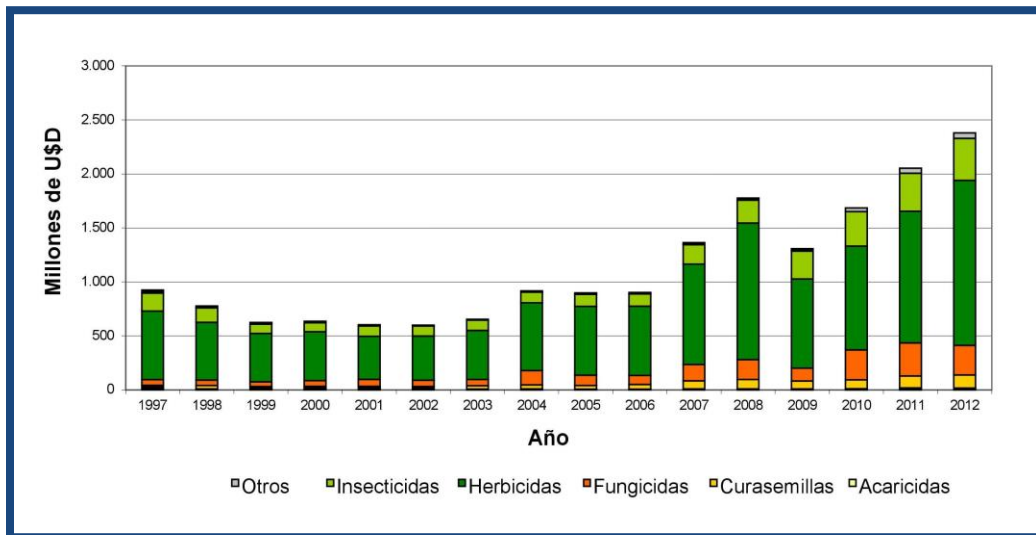


Figura 1.1: Evolución del Mercado Fitosanitario Argentino. Fuente: (CASAFE, 2017b)

En el caso de Argentina y dentro del contexto de un sostenido aumento de la productividad, según información de la Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE) en cuanto al consumo de productos fitosanitarios, el 64% de las ventas correspondieron a herbicidas, seguido por los insecticidas (17%) y los fungicidas (15%) (CASAFE, 2017b). Cabe destacar que la mayor proporción de plaguicidas fue empleada para el tratamiento de malezas en barbecho químico, seguido de una marcada demanda de estos compuestos para el tratamiento en cultivos de oleaginosas y cereales y en menor proporción para el tratamiento de malezas en cultivos de vid, caña de azúcar, frutas de pepita y carozo, entre otros.

Es ampliamente conocido que el uso indiscriminado de plaguicidas inflige numerosas consecuencias negativas para el medio ambiente y para los seres vivos tales como el aumento de resistencia de patógenos y pestes, la reducción de la biodiversidad del suelo, la disminución de las poblaciones de especies favorables a los cultivos por destrucción de sus hábitats, entre otros efectos adversos (Tilman y col., 2002; Duhan y col., 2017). De esta manera, se ven afectadas no sólo las especies blanco para las cuales fueron diseñadas en primera instancia, sino también organismos no blanco tales como la biota acuática, incluyendo desde microorganismos hasta plantas y mamíferos al igual que numerosos organismos terrestres (Liang y col., 2013; Meffe y de Bustamante, 2014). Este problema, en países subdesarrollados como Argentina, se ve agravado por la falta de controles por parte del estado que regulen la

aplicación, manejo y el tratamiento de los agroquímicos al igual que de los residuos generados de dichas actividades (Ministerio de Salud, 2007).

Desafortunadamente, en este modelo de producción es muy difícil disminuir el uso de agroquímicos sin disminuir el rendimiento de los cultivos (McLaughlin y Kinzelbach, 2015). La necesidad de alimentar a las estimadas 8 mil millones de personas que vivirán en la tierra para el año 2024, hace que la producción de alimentos tenga que aumentar al menos un 50%, sino aún más del 100% en los próximos 30 años, un desafío intimidante teniendo en cuenta que el aumento en el rendimiento de los cultivos se ha estancado o incluso ha disminuido en la última década (FAO-WHO, 2006; Camargo y col., 2017). Los incrementos en el rendimiento a través de las mejoras utilizando métodos convencionales han estado por debajo del requerimiento del 2,4% por año proyectado hasta el 2050. Las modificaciones genéticas introducidas en distintas variedades vegetales, principalmente tolerancia a herbicidas y resistencia a los insectos ha sido transformadora, pero aún queda un largo camino por recorrer en términos de obtener el máximo rendimiento intrínseco (Griffiths y Paul, 2017).

En la actualidad, se está avanzando firmemente en la aplicación de agricultura de precisión, que propone una revolución tecnológica conocida como la Nueva Revolución Verde (FAO, 2018). Esta nueva revolución agrícola plantea combinar la tecnología moderna y el conocimiento tradicional, poniendo énfasis en los sistemas agrícolas, sociales y agroecológicos, así como en el máximo rendimiento de los cultivos. Al mismo tiempo, pone énfasis en los enfoques alternativos y en la mejora de los sistemas de manejo por aplicación de nuevas tecnologías con el fin de minimizar el daño ambiental de los insumos externos y beneficiando a los agricultores más humildes y a las áreas marginales no tenidas en cuenta por la Revolución Verde original (FAO, 2013; Martin-Guay y col., 2018). Asimismo, tiene como finalidad poseer una mayor precisión en el manejo integrado de los cultivos mediante la utilización de diferentes tipos de herramientas asociadas con diferentes sistemas de información a fin de minimizar el daño ambiental debido al consumo excesivo de insumos. Estas características traen un mayor beneficio a los agricultores dado que incrementan su productividad empleando una menor cantidad de agroquímicos y generando un bajo nivel de impacto negativo sobre las márgenes aledañas a los cultivos. Todos los

procesos que involucran desde la siembra hasta la cosecha final de los cultivos se realizan utilizando maquinaria agrícola de precisión que incluyen nuevas modificaciones y equipamiento, tales como programas de computación específicos, drones, pequeños helicópteros e imágenes satelitales que permiten, por medio de Internet, hacer un seguimiento en tiempo real de las necesidades del cultivo. Esto tiene como objetivo, durante la siembra, obtener una mayor precisión en la dosificación y en la profundidad; realizar un mejor trazado de surcos, evitar superposiciones y fertilizar según los requerimientos específicos. En la etapa de control del cultivo, permite realizar una dosificación variable de los agroquímicos, un control selectivo de malezas y riego según la necesidad detectada. En la etapa de cosecha se pretende disminuir las pérdidas, monitorear el rendimiento, determinar la humedad exacta evitando que se empaquen productos no preparados, y registrar la calidad por zona en tiempo real (Menéndez y col., 2015).

La Revolución Verde introdujo y propagó la idea de la modificación del ambiente para explotar el máximo potencial de unas pocas variedades vegetales, conocido como monocultivo, que se tradujo en altos costos sociales y ambientales, en adición a los económicos y tecnológicos (Sarandón y Marasas, 2017). Actualmente el mundo enfrenta una crisis alimentaria silenciosa. Según la FAO, 815 millones de personas se encuentran en estado de desnutrición y 52 millones de niños menores de 5 años se ven afectados por desnutrición aguda en el mundo en desarrollo (FAO, 2017b). A pesar de lo augurado para las nuevas tecnologías, este problema sigue sin resolverse, y aquello que en principio suponía la utilización de plaguicidas para aumentar la producción mediante un control total de plagas, estos no sólo no las han erradicado, sino que se han vuelto cada vez más necesarios y su dosificación cada vez más alta.

Se ha estimado que, del total de herbicidas aplicados en el ambiente, menos del 0,1% llega al organismo blanco, dejando una gran cantidad de residuos tóxicos libres en los distintos compartimentos ambientales (Pimentel y col., 1993; Zhou, 2008; WHO-FAO, 2009; Song y col., 2017). La contaminación por plaguicidas puede afectar a todos los compartimentos ambientales como consecuencia de su fabricación, aplicación, escorrentía y drenaje de aguas contaminadas y/o el transporte de agroquímicos a través de los suelos y hacia las aguas subterráneas, entre otros (Pimentel y col., 1993; Solomon y Thompson, 2003; Soloneski y col., 2016). Adicionalmente, en los últimos

años se le ha dado especial interés a la preparación y limpieza de los residuos de plaguicidas como otra fuente de contaminación ambiental (Higginbotham y col., 1999; Suciú y col., 2011; Osborne y col., 2015), un aspecto poco regulado que eleva las concentraciones de los mismos en aguas subterráneas y de escorrentía (Gan y col., 1996).

En el contexto mundial actual, resulta prácticamente imposible que las especies animales y vegetales no se encuentren expuestas directa o indirectamente en algún momento de su ciclo de vida a diferentes tipos de agroquímicos, los cuales representan un problema a nivel ecológico y de salud pública, por su persistencia, bioacumulación y toxicidad.

1.2 Plaguicidas. Definición y clasificaciones

Según la FAO, un plaguicida puede definirse como *“cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra la deterioración durante el almacenamiento y transporte”* (OECD, 1997) (FAO, 2002). Dentro de los plaguicidas se incluyen los insecticidas, fungicidas y herbicidas, y otros compuestos como desinfectantes, repelentes, preservantes y curasemillas (USEPA, 2018).

Los plaguicidas pueden clasificarse de acuerdo a diferentes criterios, presentados a continuación.

1.2.1 De acuerdo al organismo blanco sobre el cual actúa

El ingrediente activo de un plaguicida determinado se describe principalmente según el tipo de plaga sobre la que actúa. Entre los más conocidos se incluyen los insecticidas, herbicidas, rodenticidas y fungicidas. La siguiente lista abarca el amplio rango existente de tipos de plaguicidas (USEPA, 2018).

Acaricidas:	Eliminan ácaros que se alimentan de plantas y animales.
Alguicidas:	Eliminan algas en lagos, canales, tanques y otros cuerpos de agua.
Antiincrustantes:	Actúan repeliendo o eliminando organismos que se adhieren a superficies sumergidas.
Antimicrobianos:	Eliminan microorganismos tales como bacterias y virus.
Biocidas:	Eliminan organismos considerados nocivos.
Defoliantes:	Causan la pérdida de hojas o follaje de una planta, usado en generalmente para facilitar la cosecha.
Desecantes:	Promueven la deshidratación de tejidos vivos.
Desinfectantes:	Matan o inactivan microorganismos productores de enfermedades.
Fungicidas:	Eliminan hongos.
Herbicidas:	Eliminan hierbas y otras plantas que crecen en áreas no deseadas.
Reguladores del crecimiento de insectos:	Interrumpen la muda, maduración de la pupa, u otros procesos del ciclo de vida de los insectos.
Insecticidas:	Eliminan insectos y otros artrópodos.
Molusquicidas:	Eliminan caracoles y babosas.
Nematicidas:	Eliminan nematodos.
Ovicidas:	Eliminan huevos de insectos y ácaros.
Reguladores del crecimiento de plantas:	Alteran la tasa de crecimiento, de reproducción o la floración de las plantas.
Repelentes:	Repelen pestes entre las que se encuentran insectos y aves.
Rodenticidas:	Controlan ratones y otros roedores.

1.2.2 De acuerdo a su estructura química

Los plaguicidas, según su estructura química, pueden categorizarse en los siguientes grupos principales:

Organoclorados: Son compuestos sintéticos de estructura cíclica. Se encuentran conformados por moléculas de cloro y en algunos casos, oxígeno y azufre. Son altamente tóxicos, lipofílicos, estables y persistentes en el ambiente, y tales como el

DDT, aldrín, endrín, dieldrín y endosulfán en la actualidad se encuentran en su mayoría prohibidos (SENASA, 2011). Han sido utilizados como insecticidas en una amplia variedad de cultivos, tales como uva, lechuga, tomate, alfalfa, maíz, arroz, sorgo y algodón y para el control de vectores en la erradicación de enfermedades como la malaria y el dengue. Su modo de acción es por inhibición de la enzima citocromo oxidasa afectando la apertura de los canales de Na^+ dependientes de voltaje lo cual genera síntomas de inestabilidad a nivel del sistema nervioso (Jayaraj y col., 2016).

Organofosforados: Son ésteres derivados del ácido fosfórico, en su mayoría fosforotiatos, combinados con oxígeno, azufre, carbono y nitrógeno. Son utilizados principalmente como insecticidas en una amplia variedad de cultivos de importancia económica. Actúan sobre el sistema nervioso central inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa (AChE), interrumpiendo el impulso nervioso. Su principal efecto es, por consiguiente, neurotóxico, causando en humanos síntomas como la pérdida de reflejos, cefalea, mareos, náuseas, convulsiones, coma e incluso la muerte. Son altamente tóxicos y de baja persistencia en el ambiente. Dentro de los más utilizados se encuentran el clorpirifós, diclorvos, malatión y paratión (Elersek y Filipic, 2011; Jayaraj y col., 2016).

Carbamatos: Son ésteres derivados del ácido N-metil-carbámico, con una serie de radicales que le dan acción anticolinesterásica. En el caso de añadir un radical bencénico al oxígeno del éster o bien un hidrógeno, se da lugar a la formación de los metil y dimetilcarbamatos. Estos compuestos han sido utilizados principalmente como insecticidas desde 1950. Son compuestos de menor persistencia en el ambiente que los organoclorados y los organofosforados y al igual que estos últimos, actúan inhibiendo la AChE de manera transitoria. Dentro de este grupo se encuentran el carbofurán, zineb y pirimicarb (USEPA, 2007; Soloneski y col., 2015; Jayaraj y col., 2016).

Piretroides: Estos compuestos fueron desarrollados a partir de las piretrinas, sustancias naturales que actúan como insecticidas obtenidas del crisantemo o piretro (*C. cinerariaefolium*). Su modo de acción es neurotóxico, provocando cambios en la dinámica de los canales de Na^+ en la membrana de las neuronas. Esto genera alteraciones del sistema nervioso, parálisis de la musculatura e incluso la muerte en insectos y vertebrados. En adición, algunos piretroides presentan actividad hormonal y

han sido clasificados como disruptores endocrinos. Dentro de este grupo se encuentran la cipermetrina, permetrina y fenvalerato (Jayaraj y col., 2016).

Ácidos fenoxiacéticos: son derivados del ácido fenoxiacético y de acción herbicida. Actúan emulando a las fitohormonas auxínicas, como reguladoras del crecimiento vegetal, estimulando el crecimiento a bajas concentraciones e inhibiéndolo a altas. En vertebrados, son altamente tóxicos ya que afectan al sistema nervioso periférico. Dentro de este grupo se encuentran el 2,4-D, el ácido 2,4,5 triclorofenoxiacético (2,4,5-T, agente naranja) y el mecoprop [ácido 2-(4-cloro-2-metilfenoxi) propanoico, MCP], entre otros (Grossmann, 2000; 2010).

Ácidos benzoicos: Son derivados del ácido benzoico y se incluyen junto al grupo de los ácidos fenoxiacéticos dentro de los llamados herbicidas hormonales, por su acción fitohormonal auxínica. La mayoría de los compuestos son utilizados como herbicidas, pero también hay representantes que se utilizan como fungicidas e insecticidas. Este grupo de herbicidas es levemente tóxico y pueden causar irritación por contacto en piel y mucosas. Dentro de este grupo se encuentran el clorfenac, cloramben, dicamba y tricamba (Grossmann, 2000; 2010; Jayaraj y col., 2016).

Fosfonoaminoácidos: Son compuestos con efecto herbicida por interferir con la síntesis normal de aminoácidos en la planta. Son compuestos de acción foliar, no selectivos. Son considerados de baja toxicidad para mamíferos, aunque se han reportado efectos perjudiciales en humanos y otros organismos tales como mamíferos, peces e insectos (Van Bruggen y col., 2018). Dentro de este grupo se encuentran, entre otros el glifosato, glufosinato y fosamina (Casarett y Doull's, 2008).

Triazinas: Son compuestos heterocíclicos cuya estructura contiene tres átomos de nitrógeno. Actúan inhibiendo el transporte de electrones en los fotosistemas de las plantas. A pesar de poseer baja toxicidad para mamíferos presentan gran capacidad de bioacumulación y actúan como disruptores endocrinos. Dentro de este grupo se encuentran atrazina y prometrina, entre otros (Jayaraj y col., 2016).

Bipiridilos: Son compuestos conformados por dos anillos bipiridilos. Son utilizados como desecantes foliares, causando el marchitamiento de las hojas. Son altamente tóxicos para mamíferos. Producen efectos severos tanto si son ingeridos como si absorbidos por la piel. Dentro de este grupo se encuentran diquat y paraquat, entre otros (Jayaraj y col., 2016).

1.2.3 De acuerdo al grado de riesgo que presentan

Los plaguicidas se clasifican según el grado de riesgo que presentan, entendiendo por riesgo a la probabilidad de que ocurra un efecto adverso en un organismo, sistema o población bajo circunstancias específicas por exposición a un agente (WHO, 2004). Previo al registro de los formulados de plaguicidas para su comercialización, las autoridades requieren información experimental sobre su toxicología, biología y degradación química y bioquímica, teniendo en cuenta los posibles efectos adversos sobre la calidad del agua y del aire, microorganismos del suelo y vida silvestre. Aunque los formulados comerciales están conformados por varios compuestos, los ensayos toxicológicos se realizan teniendo en cuenta el p.a., el cual es el componente que se cree afecta el organismo blanco. Los criterios para evaluar los posibles efectos deletéreos de los plaguicidas teniendo en cuenta su grado de seguridad tanto en humanos como en otros integrantes de la biota y el ambiente son su toxicidad (incluyendo carcinogenicidad, mutagenicidad, disrupción endocrina y anomalías en la reproducción y desarrollo), biomagnificación y persistencia en el ambiente (Radosevich y col., 2007).

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se tendrán en consideración las clasificaciones toxicológicas provistas por la Organización Mundial de la Salud (WHO) la cual realiza la clasificación de acuerdo a la peligrosidad del plaguicida, entendiendo a esta como su capacidad de producir daño agudo a la salud humana cuando se producen una o múltiples exposiciones en un tiempo relativamente corto (WHO, 2009); por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (U.S. EPA), la cual realiza la clasificación siguiendo los mismos criterios que la WHO; por la Unión Europea (EU), la cual se realiza de acuerdo a los valores de CL50 basada en estudios de toxicidad aguda en organismos acuáticos (Mazzatorta y col., 2002) y la provista por las Naciones Unidas (UN) la cual realiza la clasificación toxicológica teniendo en consideración los mismos criterios que la EU (Tabla 1.2).

Tabla 1.2. Clasificaciones toxicológicas
Clasificaciones toxicológicas propuestas por Organismos Internacionales para clasificar la peligrosidad de los plaguicidas de acuerdo a la Concentración Letal 50 (CL50)

Organismo	Categoría	Valor CL50 mg/L	Fuente
WHO	Ia Extremadamente peligroso	<5	WHO, 2009
	Ib Altamente peligroso	5 - 50	
	II Moderadamente peligroso	50 - 2000	
	III Ligeramente peligroso	> 2000	
	U Improbable de presentar riesgo agudo	> 5000	
U.S. EPA	Clase I Altamente tóxico	< 0,2	USEPA, 2001
	Clase II Moderadamente tóxico	0,2 - 2	
	Clase III Ligeramente tóxico	2 - 20	
	Clase IV Prácticamente no tóxico	> 20	
EU	I Muy tóxico	< 1	Mazzatorta et al., 2002
	II Tóxico	1 - 10	
	III Perjudicial	10 - 100	
	IV Efectos adversos a largo plazo	> 100	
UN	Categoría 1 Muy tóxico	≤ 1	UN, 2011
	Categoría 2 Tóxico	1 - 10	
	Categoría 3 Nocivo	11- 100	

1.3 Herbicidas

Los herbicidas son compuestos químicos que tienen como finalidad controlar plantas indeseables o malezas (OECD, 1997). Se utilizan principalmente en cultivos de importancia económica, pero también en manejo forestal al igual que en áreas urbanas, periurbanas y rurales. Los herbicidas se designan con nombres comunes aprobados por la Sociedad de Ciencias de la Maleza de Estados Unidos de América (WSSA) o por el Instituto Británico de Normalización (BSI). Las plantas no deseadas ejercen numerosos efectos perjudiciales en los cultivos, como la disminución de recursos nutricionales, hídricos y lumínicos, alojar organismos dañinos para los cultivos y provocar la contaminación de las cosechas, motivos por los cuales se estima que la producción mundial agrícola potencial se ve disminuida en un 20-40% (FAO, 2017a).

Dentro del mercado de plaguicidas, el segmento de los herbicidas lidera las ventas a nivel mundial, donde el glifosato es el herbicida más comercializado en todo el mundo, seguido por atrazina, S-metolacoloro, 2,4-D, acetoclor, pendimetalin,

metolaclor, propanil, dicamba y trifluralin (USEPA, 2017) (Tabla 1.1). Dentro de los plaguicidas, los herbicidas representan la mayor proporción de plaguicidas utilizados. Se emplean en agricultura, silvicultura y para otras funciones tales como el control de la vegetación en los sitios urbanos e industriales. Con el número y variedad de cultivos GM para ser tolerantes a herbicidas, el uso de estos productos en Argentina aumentó más del 100% en los últimos años diez años (INTA, 2012). Hasta ahora, el herbicida más utilizado en cultivos GM ha sido el glifosato (Duke y Powles, 2008), pero otros cultivos han sido modificados por resistencia a otras clases de plaguicidas tales como el 2,4-D y productos relacionados (Mortensen y col., 2012). El aumento del uso de cultivos GM y sus plaguicidas asociados, lleva a aumentos concomitantes en el potencial de exposición en el ambiente, particularmente en organismos acuáticos (Solomon y col., 2014).

La mayoría de los plaguicidas no pueden utilizarse tal cual son sintetizados durante el proceso industrial, sino que deben ser preparados en formulaciones o presentaciones aptas para su comercialización. Formando parte de las formulaciones comerciales se encuentran ingredientes activos e inertes. El ingrediente o principio activo (p.a.) previene, destruye, repele o mitiga las plagas; particularmente en las plantas actúa como regulador, defoliador, disecante o estabilizador de nitrógeno. El resto de los componentes presentes en una formulación comercial son los ingredientes inertes, también conocidos como excipientes, que no poseen una acción biocida *per se* y que actúan como solventes, coadyuvantes, emulsionantes, tensoactivos y/o conservantes del p.a., mejorando su penetración en la planta, extendiendo su vida útil o minimizando su degradación en la planta (Beggel y col., 2009). Numerosos estudios han demostrado que la toxicidad de estos compuestos inertes, que forman parte de las formulaciones comerciales, pueden presentar una mayor toxicidad que la del p.a. por sí solo (Brühl y col., 2011; USEPA, 2012; Nikoloff y col., 2014b; Pérez-Iglesias y col., 2014; Ruiz de Arcaute y col., 2014a). Por consiguiente, hay que tener en cuenta que las propiedades tóxicas de un determinado formulado no dependen sólo del p.a. presente sino también de las posibles interacciones resultantes entre éste y los compuestos inertes presentes en dicha formulación comercial. Este hecho fue informado por la U.S. EPA en 1982, recomendando el estudio no solo de los p.a. sino de los formulados comerciales que los contienen (USEPA, 1982). A pesar de los numerosos estudios que

demuestran la toxicidad que presentan los excipientes dentro de las formulaciones comerciales, tanto en Argentina como en otros países, la identidad de estos compuestos inertes continúa formando parte del secreto comercial dado que es información que el fabricante se reserva por normativa legal.

1.3.1 Clasificación de los herbicidas

Los herbicidas pueden agruparse según su selectividad, su momento de aplicación al igual que por su mecanismo de acción. Estas clasificaciones serán desarrolladas a continuación.

Según su selectividad:

- No selectivos: Eliminan o actúan sobre la totalidad de las especies presentes. Ejemplo: glifosato y paraquat.
- Selectivos: Actúan sobre determinadas especies, preservando el cultivo donde se aplica. Esta selectividad depende de varios factores, tales como la tasa, tiempo o técnica de aplicación, retención diferencial, absorción, entre otros. Ejemplo: atrazina, 2,4-D y dicamba.

Según el momento de aplicación:

- Preemergentes: Son aplicados antes de la emergencia de los cultivos. Controlan las malezas en los primeros estadios del ciclo de vida, durante la germinación de las semillas y la emergencia de las plántulas. En cultivos anuales estos herbicidas son aplicados luego de la siembra, pero antes de la emergencia de cultivos y de las plantas no deseadas. Su objetivo es impedir la competencia desde los primeros estados de desarrollo, minimizando pérdidas en el rendimiento del cultivo. Ejemplo: prometrina, diuron.
- Postemergentes: Son aplicados luego que las malezas y el cultivo emergen del suelo. Atacan las raíces de las especies no deseadas. Son eficaces contra la mayoría de las especies más comunes de malezas, siendo más compleja la eliminación de especies con raíces profundas. Ejemplo: glifosato, dicamba y 2,4-D.

Según su modo de acción (Tabla 1.3)

Tabla 1.3

Modo de acción	Familia química	Principio activo
Inhibición de la acetil coenzima (ACCasa)	Aryloxfenoxipropionatos	clodinafop-propargil, butil-cihalofop, metil-diclofop, etil-P-fenoxaprop, butil-P-fluazifop, metil-R-Haloxip, propaquizafop, etil-P-quizalofop
	Cyclohexanodionas	cletodim, tralkoxidim, aloxidim, butroxidim, clefoxidim, cicloxidim, profoxidim, setoxidim, tepraloxidim
Inhibición de la acetolactato sintetasa (ALS)	Sulfanilureas	amidosulfuron, azimsulfuron, bensulfuron-metil, cinosulfuron, clorimuron-metil, clorsulfuron, ciclosulfamuron, etametsulfuron-metil, etoxisulfuron, flazasulfuron, mesosulfuron, metsulfuron-metil, nicosulfuron, oxasulfuron, primisulfuron-metil, prosulfuron, pirazosulfuron-etil, rimsulfuron, sulfometuron-metil, sulfosulfuron, tinfesulfuron-metil, flupirsulfuron-metil-Na, foramsulfuron, halosulfuron-metil, imazosulfuron, iodosulfuron
	Imidazolinonas	imazametabenz-metil, imazamox, imazapic, imazapir, imazaquin, imazetapir
	Triazolpirimidinas	cloransulam-metil, diclosulam, florasulam, flumetsulam, metosulam, penoxsulam
	Pirimidinil tiobenzosatos	bispiribac-Na, piribenzoxim, piriftalid, piriminobac-metil, piritiobac-Na
	Sulfonilamino-carboniltriazolinonas	flucarbazone-Na, propoxicarbazone-Na
Inhibición de la fotosíntesis en el fotosistema II	Triazinas	ametrina, atrazina, cianazina, desmetrina, dimetametrina, prometon, prometrina, propazina, simazina, simetrina, terbumeton, terbutilazina, terbutrina, trietazina
	Triazonas	hexazinona, metamitron, metribuzina
	Urazilos	bromacil, lenacil, terbacil
	Piridazinona	pirazon=cloridazon
	Fenil-carbamatos	desmedifam, fenmedifam
	Triazolinonas	amicarbazone
	Ureas	clorobromuron, clorotoluron, cloroxuron, dimefuron, diuron, etidimuron, fenuron, fluometuron, (grupo F3) isoproturon, isouron, linuron, metabentiazuron, metabromuron, metoxuron, monolinuron, neburon, siduron, tebutiuron, tidiazuron
	Amida	propanil, pentanoclor
	Nitrilos	bromofenoxim (grupo M), bromoxinil (grupo M), ioxinil (grupo M)
	Benzotiadiazinonas	bentazon
	Fenil-piridazinas	piridato, piridafo

Desviación del flujo electrónico en el fotosistema	Bipiridilos	diquat, paraquat
Inhibición de la protoporfirinógeno oxidasa (PPO)	Difenil-éteres	acifluorfen-Na, bifenox, clometoxifen, fluoroflicofen-etil, fomesafen, halosafen, lactofen, oxifluorfen
	Fenilpirazoles	fluazolato, piraflufen-etil
	N-fenilftalimidas	cinidon-etil, flumioxazin, flumiclorac-pentil
	Tiadiazoles	flutiacet-metil, tidiazimin
	Oxadiazoles	oxadiazon, oxadiargil
	Triazinolinonas	azafenidin, carfentrazone-etil, sulfentrazona
	Oxazolidinedionas	pentoxazona
	Pirimidindionas	benzfendizona, butafenacil
Otros	flufenpir, profluzol, piraclonil	
Inhibición de la síntesis de los carotenoides a nivel de la fitoeno desaturasa (PDS)	Piridazinonas	norflurazon
	Piridinecarboxamidas	diflufenican, picolinafen
	Otros	beflubutamida, fluridona, flurocloridona, flurtamona
Decoloración: inhibición de la 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa(4-HPPD)	Triquetonas	mesotrione, sulcotrione
	Isoxasoles	isoxaclortole, isoxaflutole
	Pirazoles	benzofenap, pirazolinato, pirazoxifen
	Otros	benzobiclon
Inhibición de la síntesis de los carotenoides (lugar desconocido)	Isoxazolidionas	clomazone
	Ureas	fluometuron (Grupo C2)
	Triazoles	amitrol
	Difenil-éteres	aclonifen
Inhibición de la EPSP sintetasa	Glicinas	glifosato = sulfosato, trimesio
Inhibición de la glutamino sintetasa	Ácidos fosfínicos	glufosinato de amonio = bilanafos
Inhibición de la síntesis de folato	Carbamatos	asulam
Inhibición del ensamblaje de microtúbulos o de la polimerización	Dinitroanilinas	benefin=benfluralin, butralina, dinitramina, etalfluralina, orizalina, pendimetalin, trifluralina, fosforoamidas, aminoprofos-metil, butamifos

de la tubulina	Fosforoamidas	aminoprofos-metil, butamifos
	Piridinas	ditiopir, tiazopir
	Acido bencempdocarboxílicos	DCPA = clortal-dimetil
	Benzamidas	pronamida, tebutam
Inhibición de la organización de los microtúbulos	Carbamatos	carbetamida, clorprofam, profam
Inhibición de la división celular	Cloroacetamidas	acetocloro, alacloro, butacloro, dimetacloro, dimetanamida, metazacloro, metolacloro, S-metolacloro, patoxamida, pretilacloro, propacloro, propisocloro, tenilcloro
	Oxiadetamidas	flufenacet, mefenacet
	Acetamidas	difenamida, napropamida, naproanilida
	Tetrazolinoras	fentrazamida
	Otros	anilofos, cafenstrole, piperofos
Inhibición de la síntesis de celulosa	Nitrilos	diclobenil, clortiamida
	Benzamidas	isoxaben
	Triazolocarboxamidas	flupoxam
Inhibición de la síntesis de ácidos grasos de cadena larga	Tiocarbamatos	butilato, cicloato, dimepiperato, EPTC, esprocarb, molinato, orbencarb, pebulato, prosulfocarb, tiobencarb=bentiocarb, tiocarbazil, triallato, vernolato
	Benzofuranos	benfurasato, etofumesato
	Fosforoditioatos	bensulide
	Acidos cloro- carbónicos	dalapon, flupropanato, TCA
Auxinas sintéticas (Tipo Auxina)	Ácidos fenoxicarboxílicos	clomeprop, 2,4-D, 2,4-DB, diclorprop=2,4-DP, MCPA, MCPB, mecoprop=MCPP=CMPP
	Ácido benzoico	cloramben, dicamba, TBA
	Ácidos piridincarboxílicos	clopiraldid, fluroxipir, picloram, triclopir
	Ácidos quinolinicarboxílicos	quinclorac (Grupo L), quinmerac
	Otros	benanzolin-metil
Inhibición del transporte de auxinas	Ftalamatos	naptalam, diflufenzopir-Na
Desconocido	Semicarbazones	
	Acidos arilamino-propionicos	flamprop-M-metil/ isopropil
	Pirazolium	difenzoquat
	Organoarsenicales	DSMA, MSMA
	Otros	ácido oleico, ácido pelargónico, bromobutida,

cloro-flurenol, cumiluron, dazomet,
dimron=daimuron, etobenzanida, fosamina,
indanofan, metam, metil-dimuron,
oxaziclomefone, piributicarbo

Fuente: Anzalone, 2007 ; CASAFE, 2017

1.3.2 Herbicidas auxínicos

Los herbicidas auxínicos u hormonales fueron sintetizados por primera vez de manera artificial en el año 1940, encontrándose entre ellos el ácido 1-naftalenacético (1-NAA), MCPA y el 2,4-D (Grossmann, 2010). Actúan imitando la acción de las hormonas naturales auxinas, siendo el ácido índoleacético (AIA) la forma predominante de las mismas. Estos herbicidas, en la planta, tienen una estabilidad mayor que las hormonas naturales, ya que estas últimas están sujetas a una rápida inactivación a través de conjugación y degradación en las mismas.

A bajas concentraciones, los herbicidas auxínicos estimulan la división y el crecimiento celular, promoviendo de este modo el rápido crecimiento de tallos, pecíolos y hojas (Bunch y col., 2012). Opuestamente, a concentraciones elevadas funcionan como herbicidas, en otras palabras, inhibiendo el crecimiento de las hojas. Eliminan selectivamente a las dicotiledóneas sin afectar a las monocotiledóneas (Grossmann, 2003) mediante un mecanismo que todavía no está totalmente dilucidado (Song, 2014). Las plantas expuestas a herbicidas auxínicos presentan crecimiento anormal, destrucción del parénquima, cambium y floema y su efecto culmina con la muerte del organismo (Grossmann, 2003; CASAFE, 2009; 2017a). Dentro de los síntomas que presentan los organismos vegetales expuestos a altas concentraciones de estos herbicidas se incluyen la necrosis en hojas terminales, epinastia y malformaciones morfológicas (Strachan y col., 2010; Egan y Mortensen, 2012). La desregulación del crecimiento de la planta se produce luego que el herbicida ingresa en la misma, al aumentar la concentración de AIA en los tejidos. Este proceso puede dividirse en tres fases: fase de estimulación, fase de inhibición y fase de decaimiento (Grossmann, 2010).

Fase de estimulación: ocurre en las primeras horas luego de la aplicación. Incluye la activación de procesos metabólicos, como la estimulación de biosíntesis de

etileno a través de la inducción de 1-aminociclopropano-1-ácido carboxílico sintetizado en el tejido del tallo (1-2 h), seguido por síntomas de crecimiento anormal como epinastia de las hojas, hinchazón de los tejidos y enrollamiento del tallo (3-4 h). Luego, se comienza a acumular ácido abscísico, detectado inicialmente en los tejidos del tallo luego de 5-8 h de exposición.

Fase de inhibición: ocurre dentro de las 24 h de exposición e incluye la inhibición del normal crecimiento de la raíz y del tallo, disminuyendo la elongación internodo y el área foliar. Se intensifica la pigmentación de las hojas, se produce el cierre de los estomas, que trae aparejado la reducción en la transpiración, en la absorción de carbono y en la formación de almidón al igual que se incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) generando una toxicidad elevada.

Fase de decaimiento: se caracteriza por la acelerada senescencia foliar, daño en los cloroplastos, clorosis, destrucción de membranas y del sistema vascular, llevando a la muerte del organismo (Grossmann, 2010).

Dentro del grupo de herbicidas hormonales pueden identificarse 5 familias (Tabla 1.4):

Tabla 1.4

Familia	Herbicidas
Ácidos Benzoicos	DIC, clorambem
Ácidos Fenoxi-Carboxílicos	2,4-D, MCPA
Ácidos Piridino-Carboxílicos	picloram, clopiralid
Ácidos Pirimidino-Carboxílicos	aminociclopiraclor
Ácidos Quinolino-Carboxílicos	quinclorac

1.3.2.1 Dicamba

El herbicida auxínico dicamba (DIC, ácido 2-metoxi-3,6-diclorobenzoico, CAS 1918-00-9; Figura 1.2), derivado la familia de los ácidos benzoicos fue registrado como herbicida postemergente por primera vez en 1967 en los Estados Unidos (USEPA, 2006). Actualmente se lo utiliza en agricultura y jardinería para controlar el crecimiento de especies no deseadas en cultivos de cereales, alpiste, lino, caña de azúcar, soja, trigo, como también en zonas de pastoreo y campos naturales, entre

otros (USEPA, 2006; CASAFE, 2009). Es comercializado mundialmente en varias formulaciones, ya sea siendo el único componente activo o en combinación con otros herbicidas, como el 2,4-D, MCPP, MCPA (ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético), sulfonilureas y triazinas (FAO, 2001) y de esta forma controlar un espectro mayor de malezas. En Argentina, según el último reporte realizado por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), existen 83 formulaciones conteniendo DIC como p.a. (SENASA, 2018) (Tabla 1.5), ubicándose en el noveno puesto entre los herbicidas más utilizados a nivel mundial (USEPA, 2017) (Tabla 1.1).

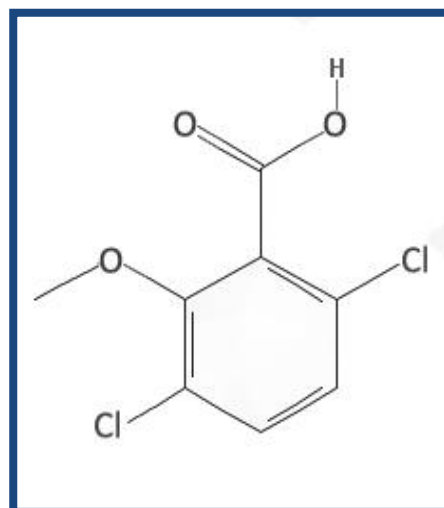


Figura 1.2: Estructura química del herbicida dicamba (NCBI, 2017)

Una vez aplicado, DIC es absorbido por la planta a través de las raíces y las hojas. Ciertas características compartidas con otros herbicidas ácidos, como la alta solubilidad en agua y la baja volatilidad, junto a su uso actualmente muy extendido, facilitan su incorporación en el ambiente. Posee un bajo coeficiente de partición del carbono orgánico (K_{oc} 1,42) y, por lo tanto, una baja afinidad por las partículas al suelo y sedimento en suspensión, características que hacen al mismo un compuesto de alta movilidad (Comfort y col., 1992). La vida media de DIC en suelo es de 6 y 144 d para condiciones aeróbicas y anaeróbicas, respectivamente (USEPA, 2006). Adicionalmente, también posee un bajo coeficiente de partición octanol/agua (K_{ow} 2.21; Hansch y col., 1995), una presión de vapor de 4,5 mPa a 25°C y se caracteriza por ser un compuesto moderadamente volátil en aire (Waite y col., 2005; Bunch y col., 2012), dependiendo de varios factores, entre los que se encuentran la cantidad de herbicida aplicado, la temperatura y humedad ambiental, la formulación química del producto y la superficie sobre la cual fue aplicado (Waite y col., 2005).

Tabla 1.5

Formulados comerciales en Argentina conteniendo al herbicida dicamba como principio activo

Empresa	Marca Comercial	Componente activo	C.T. ^a	Conc. (% p.a.)
AGM ARGENTINA S.A.	DICAMBA 58 AGM	DICAMBA	II	58
AGM ARGENTINA S.A.	SUPERB 70	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	III	77/70
AGRICULTORES FEDERADOS ARG. S.C.L.	DICAMBA 57,7 AFA	DICAMBA	IV	57,7
AGRICULTORES FEDERADOS ARG. S.C.L.	DICAMBA AFA 57,7	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	III	57,7/48
AGRO IYASI S.A.	DICAMBA 57,7% IYASI	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	III	57,7/47,9
AGRO MAX S.R.L.	DICAMBA SUMAGRO	DICAMBA	III	57,7
AGROEMPRESA COLON S.A.	DICAMBA KEMSURE	DICAMBA	IV	57,7
AGROFACIL S.R.L.	DICAMBA CONTROLER	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	III	57,8/48
AGROFINA S.A.	TOLAN	DICAMBA	IV	57,8
AGROSERVICIOS PAMPEANOS S.A.	KUARTEL ASP	DICAMBA	IV	57.51
AGROSERVICIOS PAMPEANOS S.A.	KUARTEL II	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	IV	57,8/48
ALFREDO FERRERO S.R.L.	FERRERO DICAMBA	DICAMBA	IV	57,8
ARANAMI S.A.	ARAKAMBA 58	DICAMBA	II	58
ASOCIACION DE COOP. ARG. COOP.LTD.	DICAMAX ACA 58	DICAMBA	III	58
ATANOR S.C.A.	DICAMBA ATANOR	DICAMBA	III	57,8
ATANOR S.C.A.	DICAMBA ATANOR A	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	III	57,8/3,6
BASF ARGENTINA S.A.	AECTRA BV	DICAMBA	III	70,8
BONQUIM S.A.	DICAMBA MELTHIS	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	III	57,8/48
BORCHES Y CIA S.A.	COMPASS	DICAMBA	IV	57,8
BORCHES Y CIA S.A.	DICAMBA MAX	DICAMBA	II	57,8
BORCHES Y CIA S.A.	NAVIGATOR	DICAMBA	II	57,8
CIAGRO S.A.	COWBOY	DICAMBA	III	57,8
CIBELES ARGENTINA S.A.	DOMBELL 48 SL	DICAMBA	IV	57,8
CIBELES ARGENTINA S.A.	DICAMBA SUMAGRO	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	IV	57,8/48
CIBELES ARGENTINA S.A.	DICAMBA PHILAGRO	DICAMBA	IV	57,8
CIBELES ARGENTINA S.A.	STARGAN	DICAMBA	IV	57,8
COMPAÑÍA ARGENTINA DE GRANOS S.A.	DICAMBA LYCSA	DICAMBA	IV	57,71
COMPAÑÍA ARGENTINA DE GRANOS S.A.	GREEN DICAMBA 57,8	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	IV	57,8/48
CROPMAX S.A.	CROPMAX DICAMBA	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	IV	57,8/48
CHEMOTECNICA S.A.	GALO'PE	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	III	57,8/48

ENRIQUE M. BAYA CASAL S.A.	DICAMBA ARN EBC	DICAMBA	II	58
FALCROP S.A.	DICAMBA FALCROP	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	III	57,8/48
FARMCHEM S.A.	DICANFA 58	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	II	58/48,2
FORMULAGRO S.R.L.	DICAMBA 58 FORMULAGRO	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	IV	58/48,2
GENBRA ARGENTINA S.A.	DICAMBA 48,5 SL	DICAMBA	IV	57,8
GENBRA ARGENTINA S.A.	WINTER	DICAMBA	IV	57,71
GLEBA S.A.	ZURCO	DICAMBA	III	57,71
GREEN CROPS S.A.	SUPERCAMBA	DICAMBA	III	57,71
GREEN CROPS S.A.	GREEN DICAMBA	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	III	57,71/48
GRUPO AGROS S.A.	HUNTER AGROS	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	IV	57,71/48
HANDELSGESELLSCHAFT DETLEF VON APPEN mbH	DICAMBA 58 DVA	DICAMBA	II	58
HELM ARGENTINA S.R.L.	DICAMBA 48 HELM	DICAMBA	III	57,8
HELM ARGENTINA S.R.L.	BEMUS	DICAMBA	IV	57,7
INSUMOS AGROQUIMICOS S.A.	DICAMBA BLOCK	DICAMBA	II	57,8
JNG & ASOCIADOS S.A.	DICAMBA JNG	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	III	57,8/48
LANTHER QUIMICA S.A.	DICAMBA LQ	DICAMBA	III	57,87
MH LATAM S.R.L.	AGROVERDE DICAMBA	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	III	57,7/47,9
MONSANTO ARGENTINA S.R.L.	XTENDICAM	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	IV	51,5/34,9
NIDERA S.A.	DICAMBA ZAMBA	DICAMBA	III	57,8
NIDERA S.A.	DICAMBA II ZAMBA	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	III	57,8/48
NUFARM S.A.	KAMBA	DICAMBA	IV	57,71
NUFARM S.A.	KAMBA DRY	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	III	77/70
NUFARM S.A.	KAMBA FULL	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	III	88,8/75
PHILAGRO S.A.	PHILCAMBA	DICAMBA	IV	57,7
PROTEGRAN S.A.	PROCAMBA 57,8 DICAMBA 57,8	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	III	57,8/48
RAINBOW AGROSCIENSES S.A.	RAINBOW	DICAMBA	IV	57,8
RAINBOW AGROSCIENSES S.A.	KUARTEL 70 SG	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	III	77/70
RAINBOW AGROSCIENSES S.A.	TRANVEL	DICAMBA	III	77/70
RAINBOW AGROSCIENSES S.A.	DICAGOOD 48	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	IV	57,8/48
RAINBOW AGROSCIENSES S.A.	DICAGOOD SL	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	IV	57,8/48
RED SURCOS S.A.	COWBOY FG	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	IV	66,3
RED SURCOS S.A.	COWBOY RED SURCOS	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	III	57,8/48
RED SURCOS S.A.	COWBOY 57,8 SL	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	IV	57,8/48
RED SURCOS S.A.	COWBOY ELITE	DICAMBA	III	20

REOPEN S.A.	DICAMBA DAARGUS 57,7	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	IV	57,7/47,9
SIGMA AGRO S.A.	SIGMA DICAMBA	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	III	57,6/47,8
SIGMA AGRO S.A.	DICAMBA SIGMA	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	III	57,8/48
SINER S.A.	KAMBA	DICAMBA	IV	57,8
SINOCHEM AGRO ARGENTINA S.A.	PYRU	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	III	57,8/48
SINTESIS QUIMICA S.A.I.C.	VENDAVAL DICAMBA DICAMBA 57,8	DICAMBA	IV	57,71
STOCKTON S.A.	STOCKTON	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	IV	57,8/48
SURCROPS S.R.L.	DICAMBA SURCROPS	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	III	57,8/48
SYNGENTA AGRO S.A.	BANVEL	DICAMBA	III	57,71
SYNGENTA AGRO S.A.	CAIMAN	DICAMBA	III	87,5
SYNGENTA AGRO S.A.	CAIMAN PLUS	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	III	57,8/48
SYNGENTA AGRO S.A.	GLADER	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	III	57,8/48
TECNOMYL S.A.	CONTROLE	DICAMBA	IV	57,8/48
TECNOMYL S.A.	YPF DICAMBA HD	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	IV	57,8/48
TECNOMYL S.A.	DICAM - BAC	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	IV	57,8/48
TECNOMYL S.A.	CONTROLE 77 SG	DICAMBA EQUIVALENTE ACIDO	IV	77/70
TERRIUM ARGENTINA S.A.	DICAMBA 58 TERRIUM	DICAMBA	II	58
UPL ARGENTINA S.A.	RECAMBA	DICAMBA	IV	57,8
UPL ARGENTINA S.A.	DICAMBA ICONA	DICAMBA	IV	57,8
YPF S.A.	H DICAMBA 58	DICAMBA	II	58

^a, CT: Clasificaciones toxicológicas según la WHO. Fuente: CASAFE, (CASAFE, 2017a)

En Canadá, DIC fue detectado como contaminante en aguas superficiales de ecosistemas rurales, urbanos y mixtos en concentraciones entre 0,89 ng/L a 50 µg/L (Cessna y Elliot, 2004; Woudneh y col., 2007; Glozier y col., 2012), y en plantas de tratamiento de aguas residuales en concentraciones de 185 ng/L (Westlund y Yargeau, 2017). En EE. UU. fue detectado en reservorios superficiales de agua para consumo humano en concentraciones de 1,04-16 ng/L (Donald y col., 2007), en agua de locaciones urbanas o residenciales en niveles máximos de 3,1 µg/L (Ensminger y col., 2013) y en aguas superficiales en concentraciones máximas de 2,1 µg/L (Phillips y Bode, 2004). Es de destacar que, hasta el presente, la única información sobre concentraciones ambientales de DIC en Argentina es de 157 ng/L, reportada para agua superficial en la laguna La Brava (Prov. Bs. As.) (Corcoran y col., 2017). No obstante, las concentraciones recomendadas de aplicación de este herbicida para nuestro país están comprendidas entre 100-1500 cm³/ha (CASAFE, 2017a).

La información sobre los efectos toxicológicos que ejerce DIC en plantas acuáticas y en organismos terrestres se consideran suficientes para evaluar su efecto y riesgos posibles ejercidos en humanos y en otras especies (USEPA, 2006).

Los ensayos de toxicidad aguda informaron valores de DL50 oral para abejas entre 3,6-10 µg/abeja (Bunch y col., 2012). Para especies acuáticas, DIC fue ligeramente tóxico para peces e invertebrados, presentando estos últimos valores medios de CE50 de 34,6 mg/L (USEPA, 2013). Adicionalmente, los valores de CL50_{96h} reportados para peces fueron de 465 mg/L para el pez mosquito (*Gambusia affinis*) (Johnson, 1978), 180 mg/L para la petota (*Cyprinodon variegatus*) (USEPA, 2013), 153 mg/L para la trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) (USEPA, 2013) y 50 mg/L para la trucha degollada (*O. clarkii*) (Woodward, 1982). En cuanto a su efecto agudo en aves, las sales de DIC son consideradas prácticamente no tóxicas, aunque el DIC en su variante ácida puede ser considerado moderadamente tóxico para estos organismos (USEPA, 2006). En adición, para pequeños mamíferos DIC ha sido clasificado por la U.S. EPA (2006) como prácticamente no tóxico luego de la exposición oral aguda. La DL50 oral reportada en ratas fue mayor a 2,74 mg/kg. Para plantas acuáticas vasculares, DIC resultó prácticamente no tóxico, pero sí potencialmente peligroso para plantas no vasculares afectando su crecimiento y desarrollo (USEPA, 2006). Según lo expuesto, la U.S. EPA estableció, luego de una revisión realizada en el año 2006, que el herbicida

DIC no ejerce toxicidad aguda en especies acuáticas amenazadas y/o en peligro de extinción tales como peces e invertebrados de agua dulce (U.S. Dept. of Agriculture/Forest Service, 2004; USEPA, 2006). Los efectos de DIC luego de una exposición crónica fueron evaluados en un estudio realizado en ratas donde se analizaron efectos reproductivos multigeneracionales. En ellos se establecieron valores de NOEC y LOEC de 45 y 136 mg/kg/d, respectivamente. En el caso de la concentración LOEC, como efecto adicional se registró una reducción significativa en el peso de las crías.

Cuando se analizó la actividad mutagénica inducida por este herbicida auxínico en sistemas bacterianos, DIC ha mostrado efectos mutagénicos en cepas de *Salmonella typhimurium* (Simmon, 1979; Plewa y col., 1984; Kier y col., 1986). De manera similar, se han registrado la inducción de daño en el ADN de *Bacillus subtilis* (Leifer y col., 1981) y de *Escherichia coli* (Simmon, 1979; Leifer y col., 1981; Waters y col., 1981). En levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* se reportaron resultados negativos para los ensayos de recombinación mitótica y conversión génica (Zimmermann y col., 1984) luego de la exposición a DIC. Adicionalmente, los resultados indicaron en *S. cerevisiae* que DIC podría actuar como disruptor endócrino, teniendo efectos antiestrogénicos y antiandrogénico, mostrando un comportamiento pleiotrópico, como ha sido reportado para otros plaguicidas, incluido 2,4-D (Kojima y col., 2003; Orton y col., 2009; Li y Gramatica, 2010). Adicionalmente, resultados positivos y negativos fueron informados para la de síntesis de ADN no programada en células humanas, en presencia o ausencia de un sistema de activación metabólica proveniente de hígado de ratas (Simmon, 1979; Perocco y col., 1990).

En ensayos *in vitro* empleando la línea celular CHO se reportó la inducción de rupturas de cadena simple y/o sitios sensibles al álcali en el ADN estimados mediante la metodología del ensayo cometa (González y col., 2007), así como la inducción de micronúcleos (MN) (González y col., 2011). Observaciones similares fueron reportadas por Sorensen y col. (2004; 2005) en esta línea celular. Tanto González y col. (2006; 2007; 2009) como Perocco y col. (1990) demostraron la capacidad de DIC de inducir intercambios de cromátidas hermanas en células CHO y en linfocitos humanos. La inducción de alteraciones en la progresión del ciclo celular en diferentes tipos celulares, tales como las células CHO y los linfocitos humanos, fueron reportados luego

de la exposición *in vitro* de DIC (Sorensen y col., 2004; González y col., 2006; 2007; 2009). Con respecto a estudios *in vivo*, DIC fue capaz de inducir recombinación homóloga y mutaciones puntuales en la crucífera *Arabidopsis thaliana* (Filkowski y col., 2003). En cuanto a la inducción de lesiones en el ADN, se reportó que la exposición a DIC no produjo mutaciones letales recesivas ligadas al sexo en *Drosophila melanogaster* (Waters y col., 1981; Lee y col., 1983). Adicionalmente, se reportó un aumento en la frecuencia de la tasa de desenrollamiento del ADN mediante espectrofotometría en hepatocitos de ratas tratadas intraperitonealmente (Perocco y col., 1990) y un aumento de la frecuencia de aberraciones cromosómicas en células meristemáticas radicales de la cebada *Hordeum vulgare* así como en células de la médula ósea de ratas expuestas a DIC (Hrelia y col., 1994). Por otro lado, DIC no indujo un aumento de la frecuencia de reordenamientos cromosómicos en el trigo *Triticum turgidum* (Satyavathi y col., 2004). Finalmente, en sistemas vegetales, DIC indujo un aumento dosis-dependiente en la frecuencia de MNs de *Tradescantia* sp. clon 03 (Mohammed y Ma, 1999). Adicionalmente, en la papa, *Solanum tuberosum*, DIC indujo disrupción de membranas celulares, aumento de actividad enzimática de la glutatión-S-transferasa (GST) y una disminución del contenido intracelular de adenosín trifosfato (ATP) (Peixoto y col., 2003; 2008b). En modelos animales como las ratas, Espandari y col. (1995) informaron que DIC indujo la proliferación de peroxisomas, mientras que Peixoto y col. (2003) reportaron la pérdida de la actividad fosforilativa en las mitocondrias. Adicionalmente se informó la inducción de actividad promotora de un modelo de hepatocarcinogénesis en ratas tratadas con DIC (Espandari y col., 1999).

En cuanto a su potencial carcinogénico, la U.S. EPA propone a DIC como un compuesto perteneciente a la clase D (no carcinogénico para el ser humano). Sin embargo, en personas laboralmente expuestas a DIC se observó una asociación positiva con el desarrollo de mielomas múltiples (Burmeister, 1990), linfoma no-Hodgkin (McDuffie y col., 2001) y cáncer de pulmón y de colon (Alavanja y col., 2004; Samanic y col., 2006).

La mayoría de los estudios que informaron resultados genotóxicos positivos en personas ocupacionalmente expuestas a DIC involucraron en su mayoría mezclas de formulaciones de diferentes agroquímicos, que imposibilita la evaluación de la

genotoxicidad inducida exclusivamente por el herbicida DIC (Barry y col., 2012; Schinasi y Leon, 2014).

Teniendo en cuenta los efectos tóxicos agudos inducidos, la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2009) clasificó a DIC como un compuesto perteneciente a la Clase II, compuesto ligeramente peligroso para la salud humana, mientras que la U.S. EPA (2006) lo clasificó como un compuesto tipo III, elemento moderadamente tóxico. En adición, siguiendo la clasificación ecotoxicológica propuesta por la U.S. EPA (2008), DIC es considerado prácticamente como un compuesto no tóxico para organismos acuáticos.

Formulado comercial Banvel®: Este compuesto es comercializado en Argentina por la empresa Syngenta Agro S.A. como concentrado soluble del herbicida DIC (57,7% p/v sal dimetilamina del ácido 2-metoxi-3,6-diclorobenzoico), empleada para controlar malezas de hoja ancha sobre una amplia variedad de cultivos entre los que se pueden nombrar la soja, trigo, maíz, cebada, caña de azúcar, sorgo y mijo, entre otros. Se aplica sólo una vez por ciclo de cultivo, en concentraciones que van de 100 a 120 L H₂O/ha para aplicaciones terrestres, o de 20 a 40 L en aplicaciones aéreas. En estas últimas, se recomienda suspender las aplicaciones con vientos superiores a 10 Km/h. Adicionalmente, aconsejan aplicar de 20-30 gotas/cm² sobre las hojas de las plantas no deseadas hasta 30 d antes de la cosecha. Puede utilizarse sólo o en combinación con otros herbicidas, como por ejemplo el 2,4-D, MCPA y bromoxinil, ya que es compatible con la mayoría de los plaguicidas orgánicos y soluciones acuosas de fertilizantes nitrogenados (CASAFE, 2017b). Luego de la aplicación, es absorbido por hojas y raíces trasladándose a toda la planta. La hoja de seguridad del producto recomienda no utilizar el caldo remanente luego de la aplicación y seguir las instrucciones de triple lavado según la Norma IRAM 12.069 que indica lavar el envase con agua tres veces antes de ser descartado o, en caso contrario, inutilizarlo. En la Tabla 1.6 se detallan los datos toxicológicos del herbicida informados por la empresa Syngenta Agro S.A.

Tabla 1.6

Información toxicológica del formulado comercial Banvel® (57,7% dicamba)

Parámetro	Organismo	Valor
Toxicidad oral aguda	Rata	DL50: 2467 mg/Kg
Toxicidad dermal aguda	Conejo	DL50: >4000 mg/Kg
Toxicidad inhalatoria aguda	Rata (4h)	DL50: >5,4 mg/L
Irritación dermal aguda	Conejo	No irritante
Irritación ocular aguda	Conejo	Irritante
Sensibilización dermal	Cobayo	No sensibilizante
Toxicidad aguda para peces	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (96h)	DL50: >1000 mg/L
Inhibición de crecimiento en algas	<i>Selensatrum caprocornutum</i> (96 h)	CL50: >250 mg/L
Toxicidad en invertebrados acuáticos	<i>Daphnia magna</i> (48h)	>1600 mg/L
Toxicidad a bacterias	Sedimentos cloacales (3 h)	CL50: >500 mg/L

Fuente: Hoja de Seguridad de Producto (Syngenta Agro S.A.)

Por lo expuesto, son necesarias investigaciones complementarias para poder determinar un perfil toxicológico claro del herbicida DIC, más aun teniendo en cuenta su creciente utilización en el agro y con esto, su continua incorporación en los ambientes tanto acuáticos como terrestres circundantes.

1.3.2.2 Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)

Dentro de la familia de los ácidos fenoxiacéticos se encuentra el 2,4-D (CAS 2008-39-1), un herbicida sistémico pre- y post-emergente ampliamente utilizado mundialmente (Liu y col., 2013). Fue el primer herbicida sintético desarrollado y comercializado y ha sido utilizado por más de 70 años para el control de especies no deseadas en diversos cultivos, silvicultura, limpieza de caminos y líneas de ferrocarriles, entre otros (CASAFE, 2017a).

Es comercializado en formulaciones sólo o en combinación con otros p.a., tales como DIC, MCPP, MCPA, mecoprop-P (enantiómero de mecoprop),

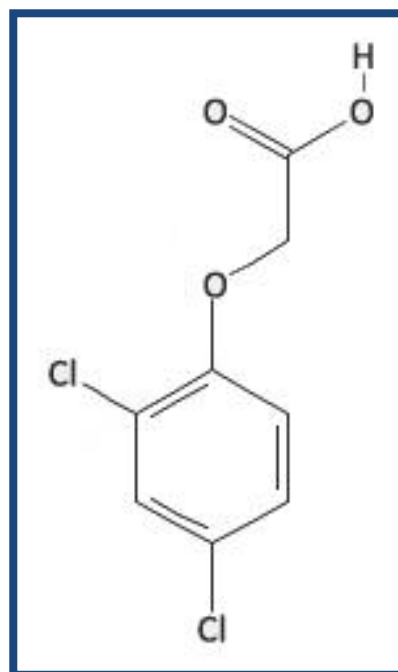


Figura 1.3: Estructura química del herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)(NCBI, 2017)

picloram (ácido-4-amino-3,5,6-tricloropiridina-2-carboxílico) y clopiralid (ácido 3,6-dicloro piridina-2-carboxílico) (NCBI, 2017). Adicionalmente, el 2,4-D es extensamente usado en combinación con glifosato en cultivos modificados genéticamente y resistentes, por consiguiente, a ambos herbicidas (Wright y col., 2010).

A nivel mundial, existen más de 600 formulaciones conteniendo 2,4-D como p.a. que actualmente están siendo comercializadas (Wafa y col., 2011; Song, 2014). En adición de la forma ácida del compuesto, el 2,4-D forma parte de las formulaciones mayormente en la forma de sal amina en solución acuosa o en su forma éster como concentrado emulsionable. En Argentina y de acuerdo con el SENASA, en abril de 2018 se reportó la comercialización de más de 178 formulaciones conteniendo 2,4-D como p.a. (SENASA, 2018) (Tabla 1.7), ubicándose en el cuarto puesto entre los herbicidas más utilizados a nivel mundial (USEPA, 2017) (Tabla 1.1).

El 2,4-D es altamente soluble en agua, con un Kow 2,1 (Howard, 1991). En el ambiente acuático, la vida media del 2,4-D varía entre 7-21 d bajo condiciones aeróbicas. No obstante, bajo condiciones anaeróbicas puede exceder los 120 d (USEPA, 2005; Wafa y col., 2012). En suelo es poco persistente, presentando una vida media entre 7-13 d y tiene una residualidad de 1-4 semanas (Wauchope y col., 1992; USEPA, 2005). Debido a procesos de deriva y volatilización del compuesto puede ser detectado en el aire y en el ambiente acuático. Los niveles guía para el agua de consumo establecidos por la WHO (2011) proponen un valor máximo de 0,03 mg 2,4-D/L. Sin embargo, la presencia de 2,4-D en el ambiente fue reportado en México en concentraciones máximas de 0,04 mg/L en aguas superficiales (Félix-Cañedo y col., 2013). En Canadá, fueron reportadas concentraciones medias de 700 ng/L en zonas urbanas (Tierney y col., 2011; Glozier y col., 2012) mientras que concentraciones entre 1,77-30,9 ng/L en sitios con actividad agrícola (Woudneh y col., 2007) y hasta una concentración máxima de 751 ng/L en plantas de tratamiento de aguas residuales (Westlund y Yargeau, 2017). En aguas subterráneas de Europa fueron reportadas concentraciones de 12 ng/L (Loos y col., 2010). En reservorios superficiales de agua para consumo humano de EE.UU. fueron informadas concentraciones promedio de 0,17 y 75 ng/L por Tagert y col. (2014) y Donald y col. (2007), respectivamente. Particularmente en Argentina, en un estudio realizado en 2017, se registró una concentración máxima de 2,4-D equivalente a 0,99 µg/L en aguas superficiales en el

arroyo El Crespo ubicado en el Partido de Balcarce (Provincia de Buenos Aires) (Pérez y col., 2017). Adicionalmente, en la laguna La Brava (Prov. Bs. As.) se reportaron concentraciones de 157 ng/L para agua superficial (Corcoran y col., 2017). De acuerdo con CASAFE, las concentraciones recomendadas de aplicación a campo de 2,4-D varían entre 1,25-2,25 L/ha (CASAFE, 2017a).

La información toxicológica sobre 2,4-D en base a ensayos de toxicidad aguda reportó una DL50 oral de 639-1646 mg/Kg para ratas y de > 2000 mg/Kg para conejos, dependiendo del tratamiento con la variante amina, éster o ácida del 2,4-D (USEPA, 2005). Para ratones, la toxicidad reportada en DL50 fue 138 mg/Kg (Tomlin, 2006). Para abejas, el 2,4-D fue considerado prácticamente no tóxico presentando una CL50_{24h} de 115 µg/abeja (USEPA, 2005). La toxicidad para peces e invertebrados acuáticos es variable dependiendo básicamente de la variante química de 2,4-D utilizada. Una mayor toxicidad se observó luego del tratamiento con la variante éster del 2,4-D debido a la mayor tasa de absorción del mismo a través de las branquias donde es hidrolizada a su forma ácida (WHO, 1989).

En estudios *in vitro*, cuando se emplearon sistemas bacterianos, tales como el test de Ames en distintas cepas de *S. typhimurium* y el test de mutación reversa en *B. subtilis* mostraron resultados negativos luego del tratamiento con 2,4-D (Gabińska-Sota y col., 2002). En levaduras de la especie *S. cerevisiae*, el 2,4-D indujo la formación de aductos en el ADN (Teixeira y col., 2004) y mostró tener actividad antiestrogénica y antiandrogénica mediante los ensayos de detección de estrógenos y andrógenos en levaduras (Westlund y Yargeau, 2017). Cuando se evaluó el potencial carcinogénico de 2,4-D se obtuvieron resultados positivos mediante el ensayo de transformación en la línea celular SHE (embriones de hámster Sirio) (Maire y col., 2007). Adicionalmente, se evaluó la inducción lesiones primarias del ADN estimadas por el ensayo cometa en su variante alcalina (González y col., 2005; Maire y col., 2007; Sandal y Yilmaz, 2011; Bokán y col., 2013). En este ensayo se observó un aumento de lesiones primarias en el ADN en células CHO y SHE como así también en linfocitos humanos y en líneas celulares de peces. Por otro lado, resultados negativos fueron observados con estos mismos ensayos por otros investigadores (Sorensen y col., 2005; Sandal y Yilmaz, 2011). Maire y col. (2007) informaron que el 2,4-D no fue capaz de inducir fragmentación del ADN en células SHE. Tanto González y col. (2005), Soloneski y col.

(2007) y Korte y col. (1982) demostraron la capacidad del 2,4-D de inducir intercambios de cromátidas hermanas en células CHO al igual que en linfocitos humanos tratados *in vitro*.

Tabla 1.7

Formulados comerciales en Argentina conteniendo al herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) como principio activo.

Empresa	Marca Comercial	Componente activo	C.T. ^a	Conc. (% p.a.)
ATANOR S.C.A.	2,4D AMINA	2,4-D SAL AMINA	II	57,8
ATANOR S.C.A.	HERBIFEN AMINA 70	2,4-D SAL AMINA	II	84,3
ATANOR S.C.A.	HERBIFEN AMINA TD	2,4-D SAL AMINA	II	58,4
ATANOR S.C.A.	HERBIFEN SUPER	2,4-D	II	97
SINTESIS QUIMICA S.A.I.C.	VENDAVAL 2,4D AMINA	2,4-D	III	58,4
DOW AGROSCIENCES ARGENTINA S.R.L.	ESTERON ULTRA	2,4-D	II	100
DISTRI CAMPO S.R.L.	SELECTIVO DC	2,4-D	III	60,2
DOW AGROSCIENCES ARGENTINA S.R.L.	DMA	2,4-D	III	58,4
NIDERA S.A.	2,4 D ZAMBA	2,4-D	II	100
TERRIUM ARGENTINA S.A.	2,4D TERRIUM	2,4-D	II	100
NIDERA S.A.	2,4D AMINA ZAMBA	2,4-D	III	58,4
NUFARM S.A.	NAVAJO	2,4-D	III	96,3
AGM ARGENTINA S.A.	2,4D AGM	2,4-D	II	100
ATANOR S.C.A.	NV NO VOLATIL ATANOR	2,4-D MEZCLA SALES AMINAS DEL ACIDO	II	60
HANDELSGESELLSCHAFT DETLEF VON APPEN mbH SUC. ARG.	2,4D AMINA DVA	2,4-D	II	60
CHEMOTECNICA S.A.	ACADEMIX	2,4-D	II	100
AGM ARGENTINA S.A.	2,4D AMINA AGM	2,4-D	II	60
CHEMOTECNICA S.A.	ASI MAX 50	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	60
CHEMOTECNICA S.A.	ASI MAX 72	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	72
BIESTERFELD ARGENTINA S.A.	24D AMINA BIESTERFELD	2,4-D	II	60
BIESTERFELD ARGENTINA S.A.	24D ESTER BIESTERFELD	2,4-D	II	100
NUFARM S.A.	WEEDONE	2,4-D ESTER BUTILICO	II	97
NIDERA S.A.	2,4D PLUS ZAMBA	2,4-D	II	80,4
TERRIUM ARGENTINA S.A.	2,4D AMINA TERRIUM	2,4-D	II	60
DOW AGROSCIENCES ARGENTINA S.R.L.	ESTERON ULTRA S	2,4-D	II	97
ATANOR S.C.A.	GRANERO 2,4-D ESTER	2,4-D ESTER BUTILICO	II	97
UPL ARGENTINA S.A.	2,4D AMINA ICONA 70 SL	2,4-D	II	84,3
UPL ARGENTINA S.A.	2,4D AMINA ICONA SL	2,4-D	II	58,4
UPL ARGENTINA S.A.	2,4D ICONA CE	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	97/77,4

ARANAMI S.A.	ARAMINA 2,4D 60	2,4-D	II	60
GRUPO AGROS S.A.	BASIC AGROS	2,4-D	II	60
AGM ARGENTINA S.A.	SALIX 80	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	III	95/80
RED SURCOS S.A.	DEDALO	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	III	60/50
STOCKTON S.A.	CAMPEON 100 STK	2,4-D	II	100
3 LOMAS S.A.	2,4D AMINA MAXX	2,4-D	III	60
TERRIUM ARGENTINA S.A.	SALIX TERRIUM	2,4-D	III	95
TECNOMYL S.A.	FENOMYL	2,4-D	II	60
STOCKTON S.A.	FENIX GOLD	2,4-D	II	72
STOCKTON S.A.	FENIX	2,4-D	II	60,2
DOW AGROSCIENCES ARGENTINA S.R.L.	DMA 48	2,4-D	II	48
PHILAGRO S.A.	PHILAMINA	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	III	58,4/48,5
BORCHES Y CIA S.A.	2,4D AMNA MAX	2,4-D	III	60
CHEMINOVA AGRO DE ARGENTINA S.A.	KING LIX	2,4-D	III	95
GRUPO AGROS S.A.	BASIC AGROS LOSS CONTROLLED	2,4-D	II	84,3
CHEMOTECNICA S.A.	ASIMAX 80	2,4-D	III	95
CAMPO CROP S.A.	2,4 D CAMPO	2,4-D	II	60
AGRO MAX S.R.L.	2,4D AMINA SUMAGRO	2,4-D	III	60,2
CHEMINOVA AGRO DE ARGENTINA S.A.	KING 50	2,4-D	II	60,2
YPF S.A.	YPF 2,4-D AMINA HA	2,4-D	II	80,4
ADAMA ARGENTINA S.A.	ADAMA ESSENTIALS 2,4 D AMINA	2,4-D	II	60,2
ADAMA ARGENTINA S.A.	ADAMA ESSENTIALS 2,4 D ESTER	2,4-D ESTER BUTILICO DEL ACIDO	II	100
SHARDA WORLDWIDE EXPORTS PVT LTD.	WEEDISHIDE	2,4-D	II	86,77
RAINBOW AGROSCIENSES S.A.	CLEANSPRAY SL	2,4-D SAL DIMETILAMINA	II	60
RAINBOW AGROSCIENSES S.A.	2,4-D 100 RAINBOW	2,4-D BUTIL ESTER	III	100
GLEBA S.A.	DEGLEX	2,4-D	II	60
RAINBOW AGROSCIENSES S.A.	CLEANSPRAY SS	2,4-D	III	95
HELM ARGENTINA S.R.L.	2,4D AMINA 60 HELM	2,4-D	II	60
RED SURCOS S.A.	DEDALO 60% SL	2,4-D	II	60
RED SURCOS S.A.	DEDALO SUPER	2,4-D	III	100
ARANAMI S.A.	ARAMINA 2,4D PLUS	2,4-D	III	58,4
GREEN CROPS S.A.	2,4-D 100 GREEN CROPS	2,4-D BUTIL ESTER	III	100
AGROSERVICIOS PAMPEANOS S.A.	ASP AMINA 60	2,4-D	II	60
INSUMOS AGROQUIMICOS S.A.	MATRIX	2,4-D	III	95
AGROEMPRESA COLON S.A.	2,4-D AMINA KEMSURE	2,4-D	II	58,4

AGROSERVICIOS PAMPEANOS S.A.	ASP ESTER 100	2,4-D	III	100
GREEN CROPS S.A.	SOLUTION	2,4-D	III	95
CROPMAX S.A.	CROPMAX 2,4D AMINA 50	2,4-D	II	60,2
ASOCIACION DE COOPERATIVAS ARGENTINAS COOP.LTD.	2,4 D AMINA ACA	2,4-D	III	58,4
REOPEN S.A.	DAARGUS 2,4D AMINA	2,4-D	III	60,27
RED SURCOS S.A.	DEDALO RED SURCOS	2,4-D	III	60
WECAN AGRO S.A.	CONTROL 2,4-D	2,4-D	II	60
JNG & ASOCIADOS S.A.	AMINA JNG	2,4-D	III	58,4
CHEMOTECNICA S.A.	ASIMAX 60 TOP	2,4-D	II	72,2
GENBRA ARGENTINA S.A.	MACHETE D 72	2,4-D	II	72
BONQUIM S.A.	2,4D 60 MELTHIS	2,4-D	III	60
SINER S.A.	D-70	2,4-D	II	84,3
SINER S.A.	D-AMINA	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	58,4
RAINBOW AGROSCIENSES S.A.	CLEANSPRAY EHE	2,4-D	III	102,5
TERRIUM ARGENTINA S.A.	NOVOLESTER 68	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	68/45,17
RAINBOW AGROSCIENSES S.A.	CLEANSPRAY	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	96,3/80
FARMICHEM S.A.	ALLGRAM 2,4DA	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	86,7/72
FALCROP S.A.	ARADOR ESTER 100	2,4-D	III	100
NIDERA S.A.	2,4D AMINA ZAMBA	2,4-D	II	60
SEMBRADO S.A.	D-SEM AMINA 60	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	III	60/50
AGM ARGENTINA S.A.	NOVOLESTER AGM	2,4-D	III	102,5
COMPAÑÍA ARGENTINA DE GRANOS S.A.	COMPAÑÍA 2,4-D AMINA	2,4-D SAL DIMETILAMINA	II	60
AGROSERVICIOS PAMPEANOS S.A.	ASP ESTER LV	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	III	102,5/68
TRAPALCO S.A.	MORTAL	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	III	100/79,8
FORMULAGRO S.R.L.	2,4D AMINA FORMULAGRO	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	60/49,8
AGM ARGENTINA S.A.	SMART	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	96/80
NUFARM S.A.	WEEDAR DRY	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	96,3/80
COMPAÑÍA ARGENTINA DE GRANOS S.A.	GREEN 2,4D SG	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	III	96,3/80
RAINBOW AGROSCIENSES S.A.	ESTERCIDE	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	III	100/79,8
TERRIUM ARGENTINA S.A.	NOVOLESTER 97	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	97/64,3
AGROEMPRESA COLON S.A.	2,4D ESTER KEMSURE	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	III	100/79,8
NUFARM S.A.	2,4D 96,3 NUFARM	2,4-D	III	96,3
PHILAGRO S.A.	PHILAMINA 50	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	III	60,2/50
CAMPO CROP S.A.	2,4 D AMINA 85	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	85/70,6

ADAMA ARGENTINA S.A.	ADAMA ESSENTIALS 2,4 D AMINA	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	60,2/50
NUFARM S.A.	WEEDAR	2,4-D	III	60,2
RAINBOW AGROSCIENSES S.A.	ESTERCIDE LV	2,4-D	III	102,5
BORCHES Y CIA S.A.	2,4D AMINA MAX 60	2,4-D	II	60
HUAGRO S.A.	GREEN CHOICE 2,4D AMINA	2,4-D	II	60
CAMPO CROP S.A.	2,4D CAMPO ESTER	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	97/77,4
RAINBOW AGROSCIENSES S.A.	DRACO	2,4-D	III	95
AGRO IYASI S.A.	2,4D AMINA 60% IYASI	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	III	60/50
BONQUIM S.A.	2,4D ESTER MELTHIS	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	97/77,4
RED SURCOS S.A.	DEDALO ELITE	2,4-D	II	30
ARYSTA LIFESCIENCE ARGENTINA S.A.	2,4D AMINA LINE	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	60,2/50
ENRIQUE M. BAYA CASAL S.A.	ACTION 2,4D	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	III	60/50
BORCHES Y CIA S.A.	2,4D AMINA MAX 50	2,4-D	II	60
NIDERA S.A.	2,4D ZAMBA	2,4-D	II	97
AGRICULTORES FEDERADOS ARGENTINOS S.C.L.	2,4D AMINA 60 AFA	2,4-D	II	60
AGRO MAX S.R.L.	2,4D AMINA SUMAGRO SL	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	58,4/48,5
RURALCO SOLUCIONES S.A.	AMINA 50 RURALCO	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	60,2/50
RAINBOW AGROSCIENSES S.A.	CLEANSPRAY SP	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	96,3/80
STOCKTON S.A.	FENIX STK	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	III	60,2/50
ADAMA ARGENTINA S.A.	ADAMA ESSENTIALS PARADIGM	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	III	100/79,8
GREEN CROPS S.A.	2,4-D 60 GREEN CROPS	2,4-D	III	60
TERRIUM ARGENTINA S.A.	XILAS	2,4-D	II	96,3
NUFARM S.A.	WEEDAR FULL	2,4-D	II	83,5
CHEMPRO S.A.	2,4D CHEMPRO	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	95/80
MONSANTO ARGENTINA S.R.L.	2,4D AMINA NV EQUIPAGRO	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	80,4/60
FALCROP S.A.	ARADOR 60	2,4-D	II	60
RAINBOW AGROSCIENSES S.A.	TOPSPRAY	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	III	95/80
SINTESIS QUIMICA S.A.I.C.	VENDAVAL 2,4D ESTER ISOBUTILICO	2,4-D	II	97
RAINBOW AGROSCIENSES S.A.	CAESTER	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	III	100/79,8
GRUPO AGROS S.A.	BASIC AGROS LOSS	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	84,3/70
RAINBOW AGROSCIENSES S.A.	SWIFT SPRAY	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	96,3/80
LABORATORIO SAN PABLO PRODUCTOS BIOLOGICOS S.R.L.	AMINA SP	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	60,2/50
FARMICHEM S.A.	ALLGRAM 2,4 D SDA 60	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	60
CHEMOTECNICA S.A.	ASI MAX 80 WP	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	95/80,4

CHEMPRO S.A.	ENTRIX	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	95/80,4
AGROSERVICIOS PAMPEANOS S.A.	ASP ESTER XTRA	2,4-D	II	97
LANTHER QUIMICA S.A.	2,4-D AMINA 60 LQ	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	60/50
AGROSERVICIOS PAMPEANOS S.A.	ASP AMINA XTRA	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	80,4/60
MONSANTO ARGENTINA S.R.L.	LA TIJERETA 2,4 D	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	80,4/60
TECNOMYL S.A.	MORTAL	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	72/60
PROTEGRAN S.A.	PRO D 97 ESTER	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	97/77,4
GREEN CROPS S.A.	SOLUTION FULL	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	86,7/72
RAINBOW AGROSCIENSES S.A.	MODELO LV	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	III	102,5/68
REOPEN S.A.	DAARGUS 2,4 D AMINA FULL	2,4-D	II	84,3
AGROFINA S.A.	2,4 D ESTER AGROFINA	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	97/77,4
SIGMA AGRO S.A.	2,4 D 60 SIGMA	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	60/50
ARANAMI S.A.	ARA 2,4 D	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	III	60,2/50
CHEMINOVA AGRO DE ARGENTINA S.A.	KING SL	2,4-D	II	60,2
FACYT I+D S.A.	FACYT 2,4 D	2,4-D	II	30
DOW AGROSCIENCES ARGENTINA S.R.L.	ENLIST	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	66,9/45,6
ATANOR S.C.A.	GRANERO 2,4-D AMINA NV	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	80,4/60
ATANOR S.C.A.	NV ATANOR B	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	80,4/60
ATANOR S.C.A.	NV ATANOR C	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	80,4/60
RAINBOW AGROSCIENSES S.A.	TOWERSPRAY LV	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	III	102,5/68
RAINBOW AGROSCIENSES S.A.	QUECLENA LV	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	III	102,5/68
SINTESIS QUIMICA S.A.I.C.	VENDAVAL 2,4D ESTER	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	100/79,8
ATANOR S.C.A.	HERBIFEN AD	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	97/64,3
RAINBOW AGROSCIENSES S.A.	ASISTENTE LV	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	III	102,5/68
NUFARM S.A.	2,4-D 70 NUFARM	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	83,5/70
ATANOR S.C.A.	VENCEWEED EXTRA B	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	93,1/76
ATANOR S.C.A.	VENCEWEED EXTRA C	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	93,1/76
LOS GROBO AGROPECUARIA S.A.	2,4-D ESTER LGA	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	97/77,4
AAGROCO S.A.	WEEDAMINA 72 SL	2,4-D	II	72
RAINBOW AGROSCIENSES S.A.	EXCEMINE	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	60/50
RAINBOW AGROSCIENSES S.A.	COMPRE LV	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	III	102,5/68
RAINBOW AGROSCIENSES S.A.	AUXILIAR LV	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	III	102,5/68
PROTEGRAN S.A.	ALLISTER 2,4D	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	97/77,4
PHILAGRO S.A.	D-ESTER	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	97/77,4
ATANOR S.C.A.	HERBIFEN EH A	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	97/64,3

GREEN CROPS S.A.	AMINA 86,7 FULL GC	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	86,7/72
AGROFINA S.A.	2,4 D ESTER 97	2,4-D	II	97
TRAPALCO S.A.	MORTAL BV	2,4-D	II	89
HANDELSGESELLSCHAFT DETLEF VON APPEN mbH SUC. ARG.	POTRERO ULTRA	2,4-D	II	96
ATANOR S.C.A.	HERBIFEN AMINA A	2,4-D EQUIVALENTE ACIDO	II	84,3/70

^a, CT: Categoría toxicológica según la WHO. Fuente: CASAFE, 2017

Por otro lado, también se reportó un aumento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas en células V79 y en linfocitos humanos tratados *in vitro* en presencia/ausencia de sistema de activación metabólica microsomal S9 (Pilinskaia, 1974; Korte y Jalal, 1982; Pavlica y col., 1991; Zeljezic y Garaj-Vrhovac, 2004). Zeljezic y Garaj-Vrhovac (2004) reportaron la inducción de MN en linfocitos humanos *in vitro*. También fueron reportadas alteraciones en la progresión del ciclo celular de diferentes sistemas celulares incluyendo plantas, células V79, linfocitos humanos y células bovinas (Pavlica y col., 1991; Soloneski y col., 2007; Soloneski y Larramendy, 2017).

Puntos finales similares fueron estudiados en sistemas *in vivo*. Se reportó la inducción de mutaciones puntuales en plantas (Kumari y Vaidyanath, 1989) y en insectos (Graf y Würzler, 1996), pero no en ratones (Knapp y col., 2003). Ateeq y col. (2005) informaron el potencial genotóxico de 2,4-D mediante aumento de daño primario en la cadena de ADN en eritrocitos de peces. En linfocitos periféricos de trabajadores ocupacionalmente expuestos fueron reportados aumento de rupturas de cadena simple y aberraciones cromosómicas (Yoder y col., 1973; Garaj-Vrhovac y Zeljezic, 2001; IARC, 2015). Adicionalmente, 2,4-D aumentó la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas en embriones de pollo y en células de mamíferos *in vitro*, incluyendo linfocitos humanos de trabajadores ocupacionalmente expuestos (Amer y Ali, 1974; Adhikari y Grover, 1988; Schop y col., 1990; Pavlica y col., 1991; Venkov y col., 2000; Garaj-Vrhovac y Zeljezic, 2001). Cuando se analizó la inducción de MNs, se encontraron resultados positivos en peces (Ateeq y col., 2002; Farah y col., 2003; 2006) al igual que en linfocitos humanos tratados con 2,4-D (Garaj-Vrhovac y Zeljezic, 2001), pero los resultados fueron negativos en células de la médula ósea de ratones expuestos (Schop y col., 1990). Finalmente, resultados incongruentes fueron informados para el análisis de la progresión del ciclo celular cuando fue usado como punto final la citotoxicidad inducida. Resultados positivos fueron reportados luego de la exposición a 2,4-D en plantas, embriones de pollo y en células de la médula ósea de ratones (Pavlica y col., 1991; Venkov y col., 2000; Arias, 2007). Por otro lado, resultados negativos fueron reportados luego de la exposición *in vivo* a 2,4-D en células de la médula ósea y espermatogonias de ratones y en linfocitos de personas no fumadoras (Madrigal-Bujaidar y col., 2001; Zeljezic y Garaj-Vrhovac, 2004). En cuanto a la inducción de alteraciones enzimáticas, se han reportado resultados diversos

empleando distintas especies de organismos acuáticos. A modo de ejemplo, en peces da Fonseca y col. (2008) informaron disminución de actividad de AChE en la boga (*Leporinus obtusidens*) luego de la exposición a 2,4-D, mientras que Cattaneo y col. (2008) informaron en el bagre sapo, también llamado bagre negro (*Rhamdia quelen*) un aumento significativo en cerebro y una concomitante disminución en músculo. Por último, Karasu Benli y col. reportaron la inducción de alteraciones histopatológicas en hígado y branquias así como un aumento de la peroxidación lipídica en el cangrejo de río (*Astacus leptodactylus*) (Karasu Benli y col., 2016). Cabe destacar que, de manera similar a lo ocurrido en DIC, los estudios que informaron resultados genotóxicos positivos en personas ocupacionalmente expuestas involucraron en su mayoría mezclas de distintos compuestos, lo que imposibilita la evaluación de la genotoxicidad inducida de forma exclusiva por 2,4-D (Bhatti y col., 2010; Harris y col., 2010; Zhang y col., 2011).

El 2,4-D ha sido clasificado por la Organización Mundial de la Salud como un compuesto Clase II (moderadamente peligroso) según su toxicidad aguda (WHO, 2009) y como perteneciente a la Categoría II-III (ligeramente/moderadamente tóxico) por la U.S. EPA (1974). Adicionalmente, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha clasificado recientemente al 2,4-D como un agente posiblemente carcinógeno para humanos (Grupo 2B) (IARC, 2015).

Formulado comercial DMA[®]: Este compuesto es comercializado en Argentina por la empresa Dow Agrosiences S.A. como concentrado soluble del herbicida 2,4-D (58,4% p/v sal dimetilamina del ácido 2,4-diclorofenoxiacético) para controlar malezas en cultivos de interés económico tales como arroz, caña de azúcar, cebada, centeno, trigo, sorgo, maíz y gramíneas, entre otros. Adicionalmente se utiliza para el tratamiento pre-cosecha y limpieza de caminos. Se recomienda la aplicación de la variante amina del 2,4-D por sobre la variante éster dado que la primera es considerada menos volátil. Se utiliza en concentraciones que van desde los 60 a 80 L/ha para aplicaciones terrestres o de 15 a 25 L/ha en aplicaciones aéreas. En estas últimas, se recomienda suspender las aplicaciones con vientos superiores a 10-20 Km/h. Adicionalmente, y al igual que para el herbicida auxínico Banvel[®], se aconseja aplicar de 20-30 gotas/cm² sobre las hojas de las malezas. Por otra parte, la etiqueta del producto advierte sobre la suspensión de las aplicaciones cuando existan riesgos

que la aspersión del herbicida sea arrastrada por el viento. El periodo de carencia antes de la cosecha depende del cultivo sembrado, variando entre 7-20 d. En nuestro país, se aplica sólo o en mezclas principalmente con glifosato y/o DIC para tratar malezas resistentes o para abarcar un mayor espectro de control a las mismas (CASAFE, 2017b). En la Tabla 1.8 se detallan los datos toxicológicos del herbicida informados por la empresa Dow Agrosciences S.A.

Tabla 1.8

Información toxicológica del formulado comercial DMA® (58,4% 2,4-D)

Parámetro	Organismo	Valor
Toxicidad oral aguda	Rata	DL50: 2698 mg/Kg
Toxicidad dermal aguda	Ratón	DL50: >4000 mg/Kg
Toxicidad inhalatoria aguda	Ratón (14 d)	DL50: >8,03 mg/L
Irritación dermal aguda		Ligeramente irritante
Irritación ocular aguda		Irritante
Toxicidad aguda para peces	<i>Poecilia reticulata</i> (96 h)	DL50: >2000 mg/L
Toxicidad aguda para aves	<i>Codorniz</i> (96 h)	DL50: 1069,4 mg/Kg
Toxicidad aguda para abejas		CL50 oral: 18 µg p.a./abeja

Fuente: Hoja de Seguridad de Producto (Dow Agrosciences S.A.)

Por lo expuesto, para el herbicida 2,4-D, al igual que para el herbicida DIC en su formulación comercial Banvel®, son necesarias investigaciones complementarias para poder determinar un perfil toxicológico claro, más aun teniendo en cuenta su creciente utilización en el agro y con esto, su incorporación en los ambientes acuáticos y terrestres circundantes.

1.4 Peces como modelo experimental

En las últimas décadas, las poblaciones de peces se han visto notablemente disminuidas a nivel mundial como resultado de la actividad antropogénica y al ingreso de los contaminantes asociados al ambiente acuático como último destino de los mismos (Tierney y col., 2010; Ogada, 2014). Este fenómeno, en la mayoría de los casos relacionado con la contaminación con plaguicidas de las áreas naturales y agrícolas, tornó a la fauna ictícola como modelo idóneo para detectar efectos tóxicos y genotóxicos ejercidos por los mismos (Çavaş, 2017). Numerosos estudios demostraron

que estos vertebrados, distribuidos prácticamente en todas las zonas del ambiente acuático, son excelentes indicadores de efectos tóxicos, fisiológicos, genotóxicos, mutagénicos y carcinogénicos, entre otros, por su sensibilidad a los cambios en el ambiente y su capacidad de metabolizar y acumular contaminantes ambientales (Schlenk y col., 2012; Benitez y col., 2014; Annabi y col., 2015; Greene y col., 2015; Soloneski y Larramendy, 2017). Por este motivo, han sido utilizados durante muchos años como modelos experimentales para detectar toxicidad ambiental mediante bioensayos tanto agudos como crónicos. Esta capacidad radica tanto en el rol de los peces en la cadena trófica como por su sensibilidad a las bajas concentraciones de contaminantes tanto emergentes como clásicos (McKenzie y col., 2007; Cavalcante y col., 2008; Lazartigues y col., 2013; Zhao y col., 2014). Adicionalmente, los peces responden muy frecuentemente a los tóxicos de manera similar a vertebrados superiores (Tierney y col., 2010; Schlenk y col., 2012; King y col., 2013; Benitez y col., 2014; Ogada, 2014; Çavaş, 2017) e incluso igual que algunos mamíferos (Al-Sabti y Metcalfe, 1995; Udroi, 2006). Por este motivo resultan modelos experimentales aptos para ser empleados en la evaluación toxicológica de compuestos potencialmente mutagénicos, carcinogénicos y/o teratogénicos tanto para humanos como para la biota en general (USEPA, 2002a).

Los teleósteos representan más del 50% de todas las especies conocidas de peces y especialmente los de pequeño tamaño, debido a su fácil manutención y exposición a contaminantes en forma experimental, han sido ampliamente adoptados tanto en ensayos de laboratorio como en ensayos *in situ*. Dentro de las cualidades de este tipo de organismos podemos mencionar que son de fácil obtención ya sea en ambientes naturales como en acuarios o criaderos y de fácil exposición a los contaminantes acuáticos ya que la misma se puede realizar en la mayoría de los casos de forma directa y eficiente por difusión simple a través de las agallas, tracto digestivo y tegumento (Çavaş, 2017). Por todo lo anteriormente expuesto, el empleo de peces en el monitoreo del ambiente acuático ha aumentado en las últimas décadas, siendo más de cuarenta las especies marinas y dulceacuícolas reportadas y utilizadas en diferentes tipos de bioensayos (Çavaş, 2017). A nivel mundial, entre las especies que han sido empleadas como modelo de estudio en diferentes ensayos de toxicidad pueden mencionarse: pez cebra (*Danio rerio*), medaka común (*Oryzias latipes*), *O.*

mykiss, lebistes (*Poecilia reticulata*), pez dorado (*Carassius auratus*), carpa común (*Cyprinus carpio*) y el pez cabeza de serpiente (*Channa punctatus*), entre otros.

La contaminación de los ambientes acuáticos puede interferir con el crecimiento y desarrollo normal de los peces y predisponerlos a enfermedades, pero la inducción de daño genético en el ADN es el efecto más relevante luego de la exposición aguda y/o crónica a diferentes xenobióticos, incluyendo plaguicidas. En estudios de genotoxicología acuática, los tipos celulares más utilizados son los eritrocitos de sangre periférica, las células epiteliales de agallas, los hepatocitos, las células de riñón y las epiteliales de aletas. Particularmente, los eritrocitos de sangre periférica presentan ciertas ventajas metodológicas, por su estructura nucleada y la practicidad y facilidad de obtención (Çavaş, 2017).

1.4.1 *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Pisces, Poeciliidae)

La familia Poeciliidae, perteneciente al orden Cyprinodontiformes, se encuentra conformada mayormente por peces pequeños de agua dulce o salobre. La misma incluye especies conocidas de acuario como *P. reticulata*, pez molly (*P. sphenops*), pez platy (*Xiphophorus maculatus*) y pez espada (*X. helleri*). Originalmente su distribución comprendía desde el sur de los Estados Unidos hasta el norte del Río de La Plata, así como también África (incluyendo Madagascar). Sin embargo, como resultado del amplio uso y liberación al ambiente de especies como *Poecilia* y *Gambusia* para el control de mosquitos, su distribución ha aumentado abarcando actualmente aéreas tropicales y subtropicales alrededor del mundo. El tamaño máximo que alcanzan los individuos pertenecientes a esta familia es de 10 cm y en la mayoría de las especies existe en dimorfismo sexual franco siendo las hembras de mayor tamaño que los machos (Soloneski y Larramendy, 2017).

Entre los Poeciliidae, la especie *Cnesterodon decemmaculatus* cuenta con una extensa distribución neotropical, presentándose en altas densidades en una gran variedad de cuerpos de agua en la zona del Río de La Plata y otras cuencas sudamericanas, entre ellas la Laguna dos Patos en Brasil, las cuencas del Río Salado y Río Negro en Argentina, y arroyos costeros de ambos países (Ferrari, 2017; Soloneski y Larramendy, 2017). Es un pez pequeño que se presenta tanto en ambientes lóticos

como lénticos, ya sean permanentes o estacionales. En cuanto a su biología, es un pez ovovivíparo, micromnívoro, no migratorio y de hábito bentónico-pelágico. Su cuerpo es color gris, oliva o plateado, presentando su vientre más claro, color blanco o crema. Es comprimido lateralmente, y en sus flancos se disponen una serie de siete a diez manchas oscuras en forma de máculas alargadas verticalmente. Posee una cabeza pequeña con ojos prominentes, con la boca en posición terminal y oblicua (Fig. 1.4). La especie es marcadamente dimórfica, siendo los machos de menor tamaño y presentando su aleta caudal modificada en una estructura con fines reproductivos

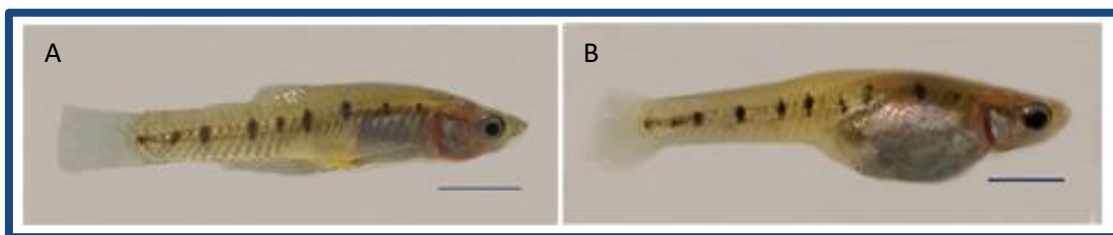


Figura 1.4: Ejemplares de *C. decemmaculatus*. (A) Macho; (B) Hembra. La barra representa 1 cm.

denominado gonopodio. Los machos alcanzan tamaños promedio de 2,6 cm y las hembras de 4,3 cm (Menni, 2004).

Son numerosos los trabajos que resaltan la utilidad de *C. decemmaculatus* como modelo para medir los efectos letales y subletales causados por exposición a agroquímicos, tanto *in situ* como en condiciones experimentales de laboratorio. Entre los estudios *in situ*, esta especie fue utilizada en la determinación de calidad sanitaria del agua proveniente de diferentes ríos y efluentes industriales. Así, la calidad del Río Lujan de la Provincia de Buenos Aires fue evaluada por Di Marzio y col. (2005) en diversas especies autóctonas, entre las que se encontraba *C. decemmaculatus* como matriz biótica. Sus resultados permitieron postular la existencia de un posible proceso de bioacumulación de compuestos orgánicos en las especies evaluadas (Di Marzio y col., 2005). Asimismo, la toxicidad inducida en *C. decemmaculatus* por efluentes industriales fue evaluada por el grupo de investigación de Castro Scarone y col. (2002) mediante ensayos de letalidad. Estudios de los efectos adversos sobre la actividad enzimática, condición física, índice somático en hígado y recuperación de los niveles basales de los parámetros antes mencionados fueron llevados a cabo por de la Torre y col. (2002), pudiendo mediante estos biomarcadores diferenciar sitios puntuales

caracterizados por presentar altos niveles de contaminación. Adicionalmente, demostraron que los niveles basales enzimáticos y del hígado pueden ser recuperados luego de trasladar los ejemplares a un medio no contaminado (de la Torre y col., 2007). El estado sanitario del Río Luján junto con un pulso de cadmio fue estudiado por Ossana y col. (2016) mediante un ensayo agudo bajo condiciones experimentales de laboratorio durante una exposición por un lapso de 96 h en el que evaluaron alteraciones en biomarcadores de genotoxicidad y enzimáticos tales como MNs y AN, GSH, GST, CAT y SOD (Ossana y col., 2016).

También se evaluó la toxicidad ejercida por metales pesados, determinándose la CL50 para *C. decemmaculatus* luego de ser expuestos a metales como cadmio (de la Torre, 1997; Eissa y col., 2010), zinc (Gómez y col., 1998), cobre (Villar y col., 2000; Casares y col., 2012), cromo (Vera-Candioti y col., 2011), plata (Casares y col., 2013) y sales como cloruro de zinc (Di Marzio, 1999) y el dicromato de potasio (Di Marzio, 1999). Particularmente, estudios empleando agroquímicos fueron llevados a cabo por Di Marzio y Tortorelli (1994) y Di Marzio y col. (1994; 1998) quienes evaluaron la inducción de efectos letales y alteraciones enzimáticas del paraquat en ejemplares de la especie. También fue determinada la toxicidad de los plaguicidas pirimicarb (Vera-Candioti y col., 2015), metamidofós (Di Marzio, 1999), ciflutrina (Di Marzio, 1999), endosulfán (Mugni y col., 2012b), clorpirifós (Mugni y col., 2012a; 2012b; Vera-Candioti y col., 2014; Paracampo y col., 2015), cipermetrina (Di Marzio, 1999; Carriquiriborde y col., 2007; Mugni y col., 2012b; Brodeur y col., 2016) y glifosato (Di Marzio, 1999; Vera-Candioti y col., 2013a; Brodeur y col., 2016). Efectos involucrando alteraciones en el comportamiento, en marcadores de genotoxicidad al igual que de estrés oxidativo fueron evaluados en ensayos de laboratorio en esta especie. Estudios empleando el insecticida clorpirifós fueron reportados por Vera-Candioti y col. (2013b; 2014), quienes reportaron la inducción de daño genotóxico evaluado mediante el ensayo de MNs y EC luego de una exposición aguda (Vera-Candioti y col., 2013b; 2014). Empleando el mismo compuesto, Bonifacio y col. (2016; 2017) informaron alteraciones en el comportamiento y enzimáticas luego de 48 h de exposición a concentraciones ambientales mientras que Bernal-Rey y col. (2017) reportaron inhibición de la actividad de AChE en individuos expuestos por 96 h a este compuesto (Bernal-Rey y col., 2017). Vera-Candioti y col. reportaron inducción de MNs y daño en

el ADN medido mediante el EC empleando los insecticidas pirimicarb (Vera-Candiotti y col., 2013b; 2015) y clorpirifós (Vera-Candiotti y col., 2013b; 2014) al igual que el herbicida glifosato (Menéndez-Helman y col., 2012; Vera-Candiotti y col., 2013a; 2013b). Estudios evaluando los efectos inducidos por glifosato fueron llevados a cabo por Menéndez-Helman y col. (2012), quienes reportaron inhibición de la enzima AChE luego de la exposición aguda a este herbicida (Menéndez-Helman y col., 2012). Adicionalmente, luego de la exposición crónica a concentraciones ambientales de glifosato, Bonifacio y col. (2016) informaron alteraciones enzimáticas como GST y fosfatasa alcalina en ejemplares de *C. decemmaculatus*. Finalmente, estudios evaluando los efectos inducidos por 17 α -etinilestradiol en *C. decemmaculatus* fueron llevados a cabo y demostrando la inducción del desarrollo de ovocitos testiculares luego de una exposición prolongada al xenoestrógeno (Young y col., 2017).

El uso de *C. decemmaculatus* como modelo experimental se ve explicado por su fácil cría y mantenimiento en laboratorio, alta tasa de fecundidad, rápido desarrollo y por contar con un amplio rango de tolerancia a parámetros tales como temperatura, salinidad y pH, que hace a la especie adecuada para bioensayos en laboratorio (Menni y col., 1996; Menni, 2004; Ferrari, 2017). Adicionalmente, su manutención es económica y son de fácil cuidado en un número de individuos elevado. Su alta tasa de fecundidad y su corto tiempo generacional hacen de esta especie un modelo valioso en el empleo de ensayos de laboratorio.

1.5 Ensayos biológicos

Los ensayos biológicos son métodos analíticos empleados para determinar la concentración o la potencia de una sustancia por su efecto sobre organismos de prueba o sistemas vivientes, tanto *in vivo* como *in vitro* o *in situ*. Son empleados para detectar peligros biológicos o para evaluar la calidad de una mezcla, para monitorear calidad del agua al igual que la descarga de aguas residuales y su potencial impacto. También se utilizan para evaluar el impacto ambiental y la seguridad de las nuevas tecnologías.

En 1940 se introdujo el uso de bioensayos con peces y durante 1950 se comenzaron a utilizar como modelos experimentales a los invertebrados y algas. El

concepto de bioensayo deriva de la toxicología clásica, el cual ha sido adaptado para el diagnóstico ambiental. Son llevados a cabo en condiciones experimentales de laboratorio, específicas y controladas (USEPA, 2002b). Los efectos estudiados pueden ser letales o subletales, ubicándose dentro de este último grupo efectos en el comportamiento, crecimiento, reproducción, cambios morfológicos, fisiológicos o histológicos (Díaz Báez y col., 2004). Se utilizan metodologías estandarizadas para maximizar la reproducibilidad y confiabilidad de los resultados, que permiten su comparación con los obtenidos por otros grupos de investigación. Dentro de los ensayos de toxicidad, las pruebas de letalidad son una herramienta útil para la determinación de niveles de concentración de compuestos que resultan tóxicos o dañinos para la biota y el ambiente (USEPA, 1975; Díaz Báez y col., 2004). Los resultados son utilizados por organismos gubernamentales tales como la Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas (ECHA), U.S. EPA, IARC y WHO para establecer parámetros y niveles guía que garanticen la seguridad y sanidad del ambiente y del agua para consumo humano.

Los agentes que producen alteraciones en el material genético son estudiados por la Genética Toxicológica, la cual se define como *“la ciencia que trata acerca de la transmisión, expresión y evolución de los genes, las moléculas que controlan el funcionamiento, el desarrollo y la apariencia final de los individuos”* (Mudry y Carballo, 2006). Esta ciencia se ocupa del estudio del efecto mutagénico, tanto de alteraciones mutacionales puntuales como macromutaciones, de agentes químicos, físicos y/o biológicos, así como las consecuencias que los mismos provocan sobre los ecosistemas, ambiente, seres vivos y la salud humana (Mudry y Carballo, 2006). La Genética Toxicológica tiene dos objetivos principales: detectar y analizar el potencial efecto deletéreo de aquellos agentes capaces de dañar el ADN e investigar los mecanismos de acción a través de los cuales causan toxicidad (Çavaş, 2017).

1.5.1 Uso de biomarcadores en monitoreos ambientales

En el ambiente, los organismos se encuentran expuestos a un amplio abanico de compuestos y condiciones que pueden ser perjudiciales para su desarrollo, aunque un gran número de especies toleren estas situaciones (Mudry y Carballo, 2006). Para que un contaminante ambiental cause un efecto deletéreo, primero tiene que ingresar al

organismo, vencer las defensas de protección del mismo y una cantidad de ese xenobiótico interactuar con un blanco celular o tisular donde se inicia el efecto biológico (Mudry y Carballo, 2006). Cabe destacar que el término xenobiótico se refiere al término derivado del griego ξένος (xenos) = extraño, extranjero y βίος (bios, vivos) = vida, en adición al sufijo griego para adjetivos -τικός, -ή, -ό (tic). Muchos de los xenobióticos en general, son manufacturados por el hombre y en la mayoría de los casos, resultan necesarios para preservar y mejorar la calidad de la salud humana y ambiental.

Un biomarcador es un cambio a nivel celular, tisular, fisiológico, bioquímico o de comportamiento en un organismo vivo, el cual es usado de manera cuantitativa con la finalidad de identificar y caracterizar de manera significativa la exposición a un determinado contaminante (Newman y Clements, 2008; Gupta, 2014). Son indicadores de la ocurrencia de un cambio que podría más tarde llevar al desarrollo de una enfermedad con expresión clínica, por lo cual se utilizan como herramientas de alerta temprana. Los biomarcadores son utilizados para detectar la exposición a un contaminante, determinar las consecuencias biológicas de la misma, detectar los estados iniciales e intermedios de un proceso patológico, identificar los individuos sensibles de una población y fundamentar la decisión de intervenir, tanto a nivel individual como ambiental (Mudry y Carballo, 2006). Estos estimadores, pueden ser clasificados como biomarcadores de exposición, de efecto y de susceptibilidad.

Un **biomarcador de exposición** señala la presencia de un xenobiótico que puede ser medido dentro de un compartimento del organismo. Estos marcadores se obtienen midiendo su concentración en muestras de fluidos o tejidos. Entre estos se encuentran el análisis de distintos parámetros como la estimación de niveles de creatina quinasa - MB, detección de niveles de diferentes sustancias como tolueno, tricloroetano, pentaclorofenol o metales ya sea en sangre u orina, entre otros (Gupta, 2014; Kaviraj y col., 2014).

Un **biomarcador de susceptibilidad** es indicador de la sensibilidad particular de un individuo, heredada o adquirida, al efecto de un xenobiótico particular o al de varios grupos cuando el mismo es una mezcla compleja. Entre estos biomarcadores se encuentran por ejemplo, la detección de polimorfismos enzimáticos y genéticos, entre otros (Gupta, 2014; Kaviraj y col., 2014).

Por último, los **biomarcadores de efecto** son indicadores de alteraciones bioquímicas, fisiológicas o genéticas resultado de la exposición a un agente xenobiótico. Estas alteraciones pueden ser definidas como un daño o como una patología, dependiendo de su magnitud. Entre estos biomarcadores se encuentran, por ejemplo, los que evalúan efectos letales como la mortalidad, y subletales como marcadores bioquímicos entre los cuales podemos mencionar la medición de isoenzimas, marcadores moleculares como la medición de fragmentos de restricción polimórficos (RFLP), fragmentos polimórficos de ADN amplificados al azar (RAPD), minisatélites y microsátélites, marcadores fisiológicos como la expresión y actividad de enzimas, citotóxicos como la detección de procesos apoptóticos, genotóxicos como la estimación de la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas, de MNs y la estimación de lesiones primarias en el ADN mediante la aplicación del EC, entre otros (Grisolia y Starling, 2001; Gupta, 2014; Kaviraj y col., 2014; Ossana y col., 2016; Bonifacio y col., 2017).

Los biomarcadores permiten, al ser indicadores de un efecto biológico temprano, poder intervenir oportunamente antes de que se produzca un daño irreversible. Para evaluar el alcance del efecto adverso inducido, se realizan estudios empleando los mencionados biomarcadores de efecto que entre los evaluados en la presente Tesis Doctoral se encuentran:

1.5.1.1 Alteraciones del comportamiento. Los ensayos agudos de letalidad, tales como los propuestos por la U.S. EPA (1975; 2002a) proporcionan un índice simple de toxicidad de un contaminante determinado. Sin embargo, estas pruebas por sí solas brindan poca información sobre los efectos que producen los tóxicos en la biota ya que ignoran otros efectos o alteraciones subletales que puede tener impactos ecológicos serios, como por ejemplo el comportamiento. Adicionalmente, estas alteraciones ocurren, a menudo, en concentraciones muy inferiores a las que causan una mortalidad significativa (Cabrera y col., 1998; Gaworecki y Klaine, 2008). Las alteraciones del comportamiento son utilizados como puntos finales de toxicidad subletal y sirven como una herramienta en la evaluación de riesgo ambiental y el análisis del impacto toxicológico de un determinado contaminante (Kane y col., 2004; Faimili y col., 2006).

La capacidad de natación es crucial para los peces y determinante en su supervivencia dentro del medio acuático (Wolter y Arlinghaus, 2003). Por lo anteriormente expuesto, gran parte de las investigaciones sobre los efectos de los contaminantes ambientales en los peces se han centrado en estas alteraciones como punto final (Bretaud y col., 2001; Dogan y Can, 2011; Pereira y col., 2012). Sin embargo, como resultado de la exposición a ciertos xenobióticos los peces también pueden exhibir otras alteraciones como aquellas observadas durante el comportamiento social las que afectan su habilidad en la búsqueda de alimento y en evitar predadores, poniendo en riesgo su supervivencia (Sarıkaya y Yılmaz, 2003; Yılmaz y col., 2004).

Para ser relevantes como biomarcadores, las respuestas comportamentales deben ser bien definidas, mensurables, ecológicamente relevantes y sensibles a una variedad de sustancias tóxicas. Estos puntos finales comportamentales han sido utilizados como indicadores tempranos de contaminación ambiental (Quarcoo y col., 2014), pudiendo ser adaptados para la evaluación de la toxicidad de plaguicidas. La importancia de la utilización de biomarcadores comportamentales radica en su confiabilidad, facilidad de aplicación y que, en ocasiones, se manifiestan como la primera respuesta de un organismo a la exposición a un xenobiótico. En adición, brindan información sobre las consecuencias poblacionales y ecológicas de la exposición a xenobióticos.

1.5.1.2 Ensayo de Micronúcleos. Es un bioensayo que permite la evaluación del daño a nivel cromosómico inducido por un xenobiótico y que puede ser determinado en distintos tipos de células proliferantes mediante la inducción de daño clastogénico o aneugénico. Fue descrito por primera vez por Evans y col. (1959) quienes utilizaron como modelo raíces de *Vicia faba* expuestas a radiación ionizante. Esta técnica se basa en analizar la presencia de macrolesiones a nivel de la molécula de ADN donde el material genético desprendido da origen a los denominados micronúcleos (MN), que son pequeñas porciones de material extranuclear rodeados por membrana nuclear

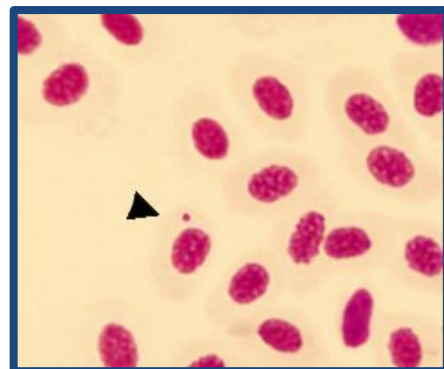


Figura 1.5: Micronúcleo (cabeza de flecha) en eritrocito circulante de *C. decemmaculatus*

detectados en células en interfase celular. El MN es un indicador indirecto de daño cromosómico que puede originarse por una o varias rupturas de la molécula de ADN la cual alcanza su máximo grado de compactación durante la metafase mitótica dando lugar a la formación de un cromosoma que puede generar uno o a varios fragmento(s) acéntrico(s) cromosómicos (efecto clastogénico) o pueden estar formados por cromátidas enteras o por un cromosoma completo el cual no migró normalmente durante la anafase celular por alteraciones acontecidas en el aparato mitótico (efecto aneugénico) (Fenech y col., 2011; Çavaş, 2017). Por esto, requieren al menos una división celular para expresarse y pueden ser visualizados con una tinción convencional en células en el estado de interfase celular. Adicionalmente, pueden ser observados y por consiguiente, cuantificados en diferentes modelos experimentales, incluyendo células vegetales, animales e inclusive humanas y empleando distintos tipos celulares, dependiendo del modo de acción del agente a caracterizar y del objeto de estudio (Mudry y Carballo, 2006).

Los criterios establecidos para identificar un MN en una célula interfásica son: tener una morfología redondeada, un diámetro menor a $1/3$ respecto al núcleo principal, no ser refringente, mostrar menor o la misma intensidad en la coloración que el núcleo principal, no estar conectado al núcleo principal, no estar solapado al núcleo principal, tener los bordes definidos y bien diferenciables del núcleo principal al igual que no existir más de 6 MNs en una misma célula según los criterios establecidos por Fenech (2000; 2007) (Fig.1.5).

Particularmente, el análisis de frecuencia de MNs en eritrocitos circulantes de peces expuestos a diferentes tóxicos, al igual que en otros organismos acuáticos se ha tornado una metodología aceptada y utilizada ampliamente a nivel mundial dentro del campo de la genotoxicología (Çavaş y Ergene-Gözükara, 2003; Gökalp Muranli y Güner, 2011; Pérez-Iglesias y col., 2014). Aún más, se ha convertido en una herramienta de estudio obligatoria durante el proceso de aprobación de productos farmacéuticos y químicos (Mudry y Carballo, 2006). Entre las tinciones más utilizadas para este método se encuentran la coloración con Giemsa, coloración con naranja de acridina (NAcr), DAPI, ioduro de propidio, entre otras (Çavaş, 2017). El uso de Giemsa, formado por una mezcla de colorantes neutros y básicos, es la metodología de tinción más extendida, aunque con este método, algunos artefactos no conformados por material nuclear

pueden ser teñidos y confundidos con MNs por un observador no experimentado. Por otro lado, la NAcR es un fluorocromo catiónico específico para ácidos nucleicos, vale decir pone en evidencia tanto ADN como ARN, siendo considerada por consiguiente una técnica más confiable que la de Giemsa, aunque con la desventaja de precisar equipamiento más sofisticado, como microscopia con epifluorescencia y el empleo de filtros de excitación adecuados en el equipo empleado.

Asimismo, cabe destacar que, aun no existiendo en la literatura un consenso universal para su significancia y clasificación, se describieron y se propusieron diversas anomalías nucleares (AN), diferentes a los MNs, como signo de daño inducido en el material genético por diferentes agentes xenobióticos (Carrasco y col., 1990). Las mismas pueden resumirse en las siguientes variedades o tipos designadas vernáculamente como “otras alteraciones nucleares” siguiendo los criterios establecidos por diversos autores (Çavaş y Ergene-Gözükara, 2003; Strunjak-Perovic y col., 2009; Nikoloff y col., 2014b).

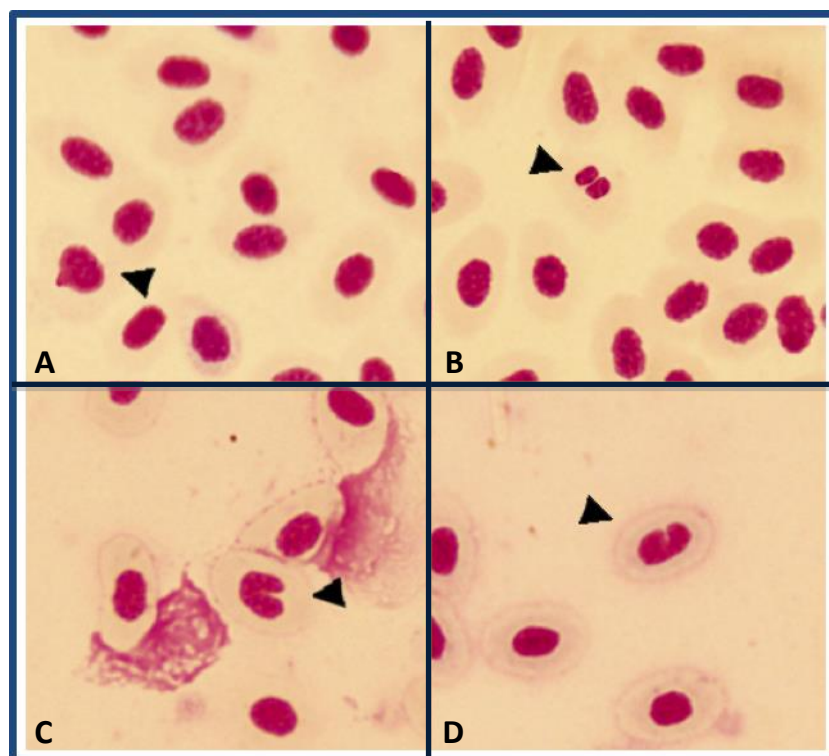


Figura 1.6. Anormalidades nucleares (cabeza de flecha). (A) Brote nuclear (B) Célula binucleada (C) Célula lobulada y (D) Escotadura nuclear

Dentro de dichas alteraciones nucleares pueden incluirse a los eritrocitos binucleados (EB), cuando la misma presenta dos núcleos de tamaño similar con su membrana nuclear intacta; brotes nucleares (BN- *buds*), cuando el núcleo celular presenta una pequeña evaginación de material genético que sobresale de la membrana nuclear. Esta evaginación contiene en su interior eucromatina y se encuentra unida al núcleo por un pedúnculo de material genético cuyo ancho puede ser ligeramente menor al ancho del BN o mucho más delgado, dependiendo del momento del proceso de extrusión del material; núcleos lobulados (NL), cuando el núcleo de la célula presenta una o más evaginaciones de la membrana nuclear, más grandes que los BN y escotaduras nucleares (EN), cuando los núcleos presentan vacuolas y una invaginación pronunciada de su membrana nuclear (Çavaş y Ergene-Gözükara, 2003; Strunjak-Perovic y col., 2009; Nikoloff y col., 2014b)(Fig. 1.6).

Se ha sugerido que la aparición de algunas AN y MNs son resultado de eventos genotóxicos relacionados con diferentes causas tales como problemas durante la segregación de los cromosomas que se encuentran alineados de manera incorrecta en la placa metafásica o que permanecen unidos entre ellos durante la división celular (Shimizu y col., 1998; Seriani y col., 2012; Çavaş, 2017), aparición de aneuploidías (Fernandes y col., 2007) y generación de procesos de degradación celular (Ateeq y col., 2002). También se ha sugerido que los NL y BN podrían originarse durante el proceso de eliminación de exceso ADN generado por amplificación génica a través de ciclo de ruptura-fusión-puente (RFP). Este ADN en exceso se ubicaría en la periferia del núcleo y sería posteriormente eliminado por un proceso de extrusión, formando un MN o, en el caso de que este proceso se vea interrumpido, la generación de un BN o un NL. Análisis estadísticos probaron una correlación positiva entre la aparición de BN y la formación de MNs (Çavaş, 2017). Fernandes y col. (2007) han sugerido que las EB y EN podrían ser indicadores de xenobióticos que actuarían mediante una mecanismo aneugénico. Se ha reportado, asimismo, que este efecto podría suceder por fallas durante la polimerización de las tubulinas y en consecuencia, la generación de alteraciones a nivel del aparato mitótico (Walia y col., 2013). Adicionalmente, Ateeq y col. (2002) sugirieron que los xenobióticos generan condiciones hipóxicas que resultan en la disminución de los niveles de ATP, que conduce a malformaciones morfológicas

en los eritrocitos por alteraciones en el ciclo normal de polimerización de tubulinas, proteínas motrices y rectoras del aparato mitótico.

El ensayo de MNs en peces fue reportado por primera vez en 1982 por Hoofman y de Raat (1982) empleando eritrocitos circulantes de *Umbra pygmaea* tratados con etilmetanosulfonato. Luego fue utilizado por Al-Sabti (1986) empleado en tres especies de ciprínidos con el fin de estudiar los efectos de la exposición a diferentes compuestos mutagénicos. Manna y Sadhukhan (1986) implementaron el ensayo de MNs en agallas e hígado de tilapia (*Oreochromis mossambicus*) expuestas a rayos X y cloruro de cadmio. Posteriormente, Williams y Metcalfe (1992) desarrollaron un ensayo de MNs *in vivo* en células hepáticas de *O. mykiss* y Arkhipchuk y Garanko (2005) lo utilizaron empleando células epiteliales provenientes de las aletas de *C. carpio*. Finalmente, Fassbender y Braunbeck (2013) realizaron una variante del ensayo empleando células gonadales de *D. rerio* expuestas a metilmetanosulfonato.

1.5.1.3 Electroforesis en gel de células únicas. Variedad alcalina del Ensayo Cometa. El ensayo cometa (EC) es una metodología sensible, rápida, simple y visual utilizada para analizar rupturas en la molécula de ADN de simple o doble cadena, sitios sensibles al álcali, uniones cruzadas ADN-ADN y ADN-proteína y rupturas de cadena simple asociadas a mecanismos de reparación del ADN (Singh, 1996; Çavaş, 2017). Esta técnica permite analizar el daño genotóxico inducido por un xenobiótico en células individuales embebidas en una capa de gel de agarosa. Estas células, luego de la exposición a un tóxico, son embebidas en agarosa la cual es colocada sobre un portaobjetos, entre otras dos capas de agarosa y posteriormente lisadas para remover las membranas celulares al igual que las proteínas que se encuentran unidas al ADN, dejando al núcleo desprovisto de su membrana nuclear, tomando la denominación de “nucleoide”. Luego del desenrollamiento del ADN en condiciones alcalinas, el mismo es sometido a una electroforesis induciendo a los fragmentos rotos o dañados de ADN migrar alejándose del nucleoide. Los fragmentos de ADN cargados negativamente migran libremente hacia el ánodo a través de un campo eléctrico en una solución de electroforesis (Azqueta y col., 2017; Çavaş, 2017). Luego de la neutralización y la tinción con un colorante con especificidad por el ADN, la imagen resultante a analizar se asemeja a un cometa, con una zona más definida denominada “cabeza” en la región

nuclear, y una región conteniendo el ADN fragmentado migrado, la “cola” del nucleoide (Fig. 1.7). La migración del ADN es directamente proporcional al daño que presenta el mismo (Fig. 1.8).

El EC tiene la ventaja de poder ser aplicado a cualquier población de células eucariotas, sin tener en cuenta su actividad mitótica o el período del ciclo celular donde se encontraban en el momento de la exposición al xenobiótico. Más aún, sólo se requiere una pequeña cantidad de tejido o de células de un tejido y adicionalmente a los métodos de categorización visual del daño, tiene la opción de ser analizado utilizando programas de computación. Los resultados pueden ser obtenidos en un lapso breve de análisis por parte de un observador (Tice y col., 2000; Collins, 2004; Azqueta y Collins, 2013).

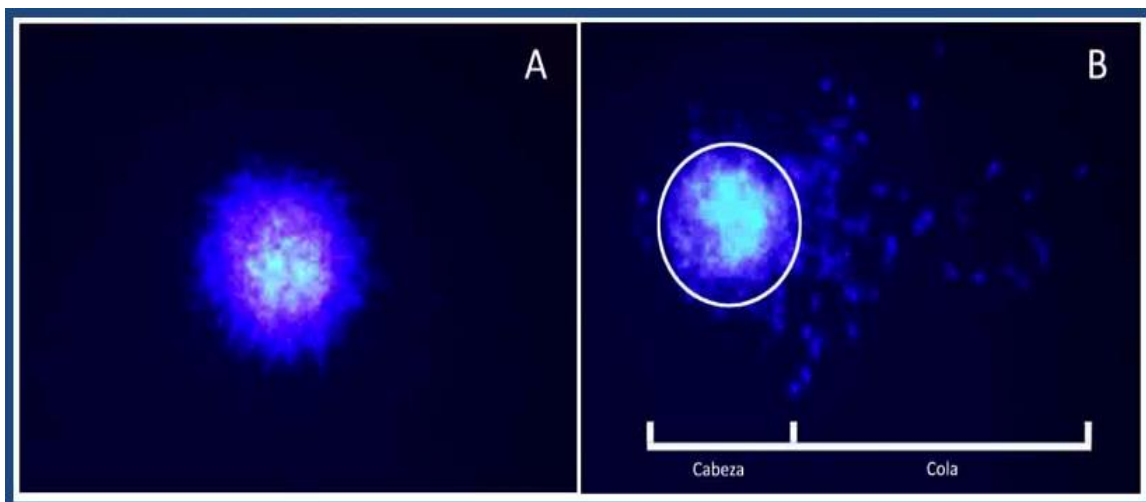


Figura 1.7: (A) Nucleoide sin daño (B) Nucleoide presentando rupturas en sus moléculas de ADN, evidenciados por su migración luego de la electroforesis adoptando el nucleoide la forma de un cometa.

El EC fue introducido por primera vez por Ostling y Johanson (1984), quienes empleando una línea celular tumoral de mamíferos irradiada, utilizaron la metodología con una solución de electroforesis a pH neutro (9,5) la que permitió la detección de lesiones de ADN de cadena doble. Posteriormente, Singh en sus investigaciones sobre el efecto de la radiación con rayos X y H₂O₂ desarrolló la variante alcalina de la técnica mediante el empleo de una solución de pH \geq 12 durante la electroforesis a la que son sometidas las muestras, lo cual adicionó la detección de lesiones de simple cadena y sitios sensibles al álcali (Singh y col., 1988). Entre las tinciones utilizadas se encuentran la impregnación argéntica y el uso de fluorocromos tales como el bromuro de etidio,

ioduro de propidio, SybrGreen y DAPI, entre los más empleados (Collins y col., 2008; Christofolletti y col., 2009; Vera-Candiotti y col., 2013b; Mustafa y col., 2015).

La cuantificación visual del daño en el ADN se realiza y expresa en unidades arbitrarias basadas en la clasificación de los nucleoides en cinco categorías (0-IV) de acuerdo a la extensión de la cola, propuesta por Çavaş y Konen (2007). Los nucleoides tipo 0-I agrupan a los nucleoides no dañados, los tipo II incluyen a los de nivel de daño leve, los de tipo III a aquellos nucleoides que presentan un nivel de daño medio y los nucleoides tipo IV, incluyen a los que presentan un grado de daño máximo (Fig. 1.8). En el análisis automatizado de los cometas, los programas de computación tales como el *OpenComet* y *NIH image* permiten el cálculo de más de 20 parámetros usando

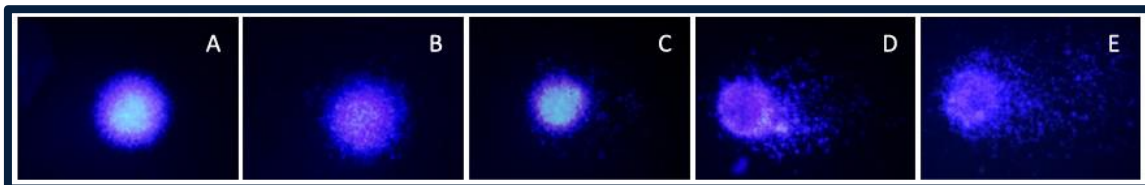


Figura 1.8: Categorías de daño utilizadas. (A y B) Nucleoides sin daño (cometas tipo 0-I), (C) nucleoides con daño leve (cometas tipo II), (D) daño intermedio (cometas tipo III), y (E) daño máximo (cometas tipo IV).

imágenes obtenidas en el momento de su estimación o capturadas con anterioridad (Çavaş, 2017). Entre los parámetros más utilizados y adoptados mundialmente en el campo de la Genética Toxicológica para expresar el nivel de daño en el ADN se encuentran el largo de la cola, el porcentaje de ADN contenido en la cola y el momento *Olive*. El largo de la cola, generalmente, incluye la distancia de migración del ADN desde el nucleoide. El porcentaje de ADN de la cola se calcula sustrayendo de la cantidad total del ADN del nucleoide el porcentaje de ADN presente en la cabeza del cometa. Finalmente, el momento *Olive* se define como el producto del largo de la cola y la fracción total de ADN presente en la misma (Dogan y Can, 2011; Martínez-Paz y col., 2013).

El EC fue aplicado por primera vez en peces por Pandrangi y col. (1995) con el fin de evaluar los efectos de la contaminación en ambientes marinos en eritrocitos del pez gato (*Ameirus nebulosus*) y en *C. carpio*. Posteriormente, la técnica fue empleada en hígado y agallas de *D. rerio* (Deventer, 1996), así como en hepatocitos del trucha reo

(*Salmo trutta*) (Mitchelmore y Chipman, 1998) y en el lenguado de invierno (*Pleuronectes americanus*) (Nacci y col., 1996).

Tanto el ensayo de micronúcleos (MNs) como el ensayo cometa (EC) se han convertido en metodologías ampliamente usadas para la evaluar la genotoxicidad al igual que la citotoxicidad de muchos xenobióticos, incluyendo plaguicidas, debido a su sensibilidad, confiabilidad y sencillez. Adicionalmente, su aplicación para la determinación de efectos genotóxicos en peces expuestos particularmente a herbicidas está ampliamente documentada, reportando la inducción de efectos genotóxicos en peces expuestos a glifosato como en el pacú blanco (*Piaractus mesopotamicus*) (Leveroni y col., 2017), *C. punctatus* (Nwani y col., 2013), la anguila europea (*Anguilla anguilla*) (Guilherme y col., 2010), la coridoras pimienta (*Corydoras paleatus*) (de Castilhos Ghisi y Cestari, 2013), el sábalo común (*Prochilodus lineatus*) (Calcavante y col., 2008), *O. niloticus* (Alvarez-Moya y col., 2013), *C. auratus* (Çavaş y Könen, 2007) y *C. decemmaculatus* (Vera-Candiotti, 2013b), entre otros; a atrazina en peces como *C. punctatus* (Nwani y col., 2011), *C. auratus* (Çavaş, 2011) y *R. quelen* (Dante y col., 2015); a 2,4-D en peces como el pez gato andador (*C. batrachus*) (Ateeq y col., 2005); a butaclor en peces como *C. carpio* (Mashinchian Moradi y col., 2012) y *C. batrachus* (Ateeq y col., 2005); a triclopir en peces como *A. anguilla* (Guilherme y col., 2015) y a cipermetrina en peces como *P. lineatus* (Simoniello y col., 2009) y *D. rerio* (Paravani y col., 2018); entre otros.

1.5.1.4 EC modificado empleando enzimas de restricción. Una modificación introducida en la metodología clásica del EC alcalino permite detectar, adicionalmente a las rupturas de cadena inducidas por xenobiótico, el daño ejercido en bases tanto púricas como pirimidínicas introducidas en la molécula de ADN. Esta modificación se logra a través de la adición de un período de incubación con endonucleasas de restricción capaces de reconocer específicamente diferentes tipos de bases dañadas en la molécula de ADN (Azqueta y Collins, 2013). En esta modificación, luego de la lisis, los geles de agarosa conteniendo los nucleoides son incubados con endonucleasas específicas o enzimas de restricción que reconocen y transforman lesiones en bases del ADN, en cortes de cadena, originando sitiosapurínicos. Por consiguiente, de existir bases dañadas, la endonucleasa específica reconoce dichos sitios, produce los cortes y esto será analizado por el observador como una mayor densidad (mayor momento de

cola) debido al aumento del número de fragmentos, o a una mayor longitud de la cola del cometa dado a una mayor migración de fragmentos de menor tamaño. Dentro de las enzimas de restricción más utilizadas se encuentran la endonucleasa III (Endo III) y la formamidopirimidina-ADN glicosilasa (Fpg) (Collins y col., 1996; Collins, 2004). La Endo III detecta pirimidinas oxidadas, escinde a las mismas e induce a la formación d sitios AP, lo que conlleva a la formación de cortes en el ADN. Por su parte, la Fpg reconoce y remueve purinas oxidadas del ADN como por ejemplo 8-oxoguanina, Fapy-Gua, Fapy-Ade y en menor medida, 8-oxoadenina, que posteriormente se escinden por su actividad AP liasa dando lugar a una brecha en la cadena de ADN (sitio-AP). Esta metodología ha sido aplicada en numerosos estudios por ser un biomarcador sensible de la estimación de daño oxidativo a nivel de la molécula de ADN (Collins y col., 1996; Wong y col., 2005; Kushwaha y col., 2011; Collins y Azqueta, 2012) y su aplicación ha permitido dilucidar los mecanismos de acción de compuestos genotóxicos, investigar enfermedades derivadas de la situación de estrés oxidativo, evaluar estrés oxidativo generado por ejercicio en el hombre o en animales, estudiar efectos antioxidantes en la dieta así como en la evaluación del estado ambiental (Azqueta y col., 2017). En peces, son escasos los estudios que han incluido Endo III y Fpg en la detección de bases oxidadas, entre ellos como ejemplo podemos citar la evaluación del insecticida monocrotofós en *C. auratus* (Zhao y col., 2015), del herbicida glifosato en *A. anguilla* (Marques y col., 2014), del estado de ríos y cuencas en el alburno (*Alburnus alburnus*) (Jovanović y col., 2017) y del efecto de condiciones hipóxicas en *C. carpio* (Mustafa y col., 2015), entre otros.

1.5.1.5 Biomarcadores enzimáticos y no enzimáticos. Los biomarcadores enzimáticos proveen información acerca de los procesos de detoxificación de xenobióticos o sus metabolitos en los organismos. Estos procesos de detoxificación involucran la conversión catalizada enzimáticamente de los xenobióticos a formas más solubles, las que puedan ser eliminadas de los organismos más fácilmente. En ocasiones, los xenobióticos o sus metabolitos pueden generar compuestos intermediarios que son aún más tóxicos que el contaminante original, produciendo una condición fisiológica anormal conocida como estrés oxidativo (Liu y col., 2006; Monteiro y col., 2006).

Las ROS son especies que están presentes en todas las células y se originan por procesos como la respiración celular, así también como parte de la respuesta celular a la presencia de determinados niveles de xenobióticos. Los productos de la reducción del O_2 son los radicales libres tales como el superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxilo ($\cdot OH$) al igual que la formación de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) proveniente del metabolismo celular. Se denominan radicales libres a aquellas moléculas que en su estructura presentan un electrón impar en su órbita externa, que les otorga una alta inestabilidad, pudiendo actuar como agentes oxidantes o reductores. Estas especies son muy reactivas y potencialmente deletéreas para los sistemas biológicos. Por lo expuesto, ante la elevada generación de ROS los organismos presentan diferentes sistemas de defensa antioxidante, los enzimáticos (ej. catalasa -CAT-, superóxido dismutasa -SOD-, peroxidasas, glutatión S-transferasa -GST-, entre otras) y los no enzimáticos (ej. vitaminas E -Vit. E- y glutatión -GSH-) (van der Oost, 2003; Lushchak, 2011). Estos actúan con el fin de disminuir la toxicidad del xenobiótico y facilitar su excreción (Santos y Martínez, 2012). De no ser efectivos estos mecanismos de detoxificación, se produce un desbalance entre la generación de ROS y su eliminación por los antioxidantes que resulta en una situación de estrés oxidativo (Cooke y col., 2006; Valko y col., 2006) que puede provocar diferentes efectos deletéreos tales como aumento de la peroxidación lipídica, inactivación enzimática, oxidación de hormonas y daños en el ADN, entre otros efectos adversos (Cavalcante y col., 2008; Newman y Clements, 2008; Amado y col., 2009; Limón-Pacheco y Gonsebatt, 2009; Pandey y col., 2011).

Entre los diferentes sistemas de defensa antioxidante que actúan como sistemas reguladores del balance oxidativo pueden mencionarse:

Catalasa (CAT): Constituye la primera barrera enzimática de detoxificación ante la presencia de ROS catalizando la reducción de H_2O_2 a H_2O y O_2 . Esta enzima actúa sobre uno de los productos que genera la SOD, una de las primeras enzimas que actúan frente a los ROS. SOD cataliza la conversión de aniones superóxido a peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Éste es luego detoxificado por acción de la CAT, específica para este sustrato, y la glutatión peroxidasa (GPx).

Glutatión reducido (GSH): El GSH es un tripéptido formado por los aminoácidos glutamina, cisteína y glicina que posee un rol importante en el sistema antioxidante de

la mayoría de las células. En el proceso de detoxificación, la GPx cataliza el metabolismo del H_2O_2 en H_2O , oxidando concomitantemente glutatión reducido (GSH), el cual es uno de los antioxidantes no enzimáticos más importantes de la célula (van der Oost, 2003). Otra enzima antioxidante que participa junto con el GPx en la regulación del GSH es la glutatión reductasa (GR) que reduce el glutatión oxidado (GSSG) y mantiene los niveles de GSH en valores fisiológicos normales (Hermes-Lima, 2004). Los xenobióticos pueden disminuir el contenido de GSH y alterar el balance entre GSH y su forma oxidada, GSSG (Machado y col., 2008).

Glutatión S-transferasa (GST): La GST es una familia de enzimas cuya principal función es catalizar las reacciones de fase II del metabolismo en los procesos de detoxificación de xenobióticos. Cataliza la unión de GSH a una variedad de compuestos tóxicos, incrementando su solubilidad y facilitando su excreción en medio acuoso, protegiendo proteínas y ADN. Adicionalmente, detoxifica productos de peroxidación lipídica derivados del estrés oxidativo.

Acetilcolinesterasa (AChE): Es una enzima cuya función es hidrolizar el neurotransmisor acetilcolina luego de que éste haya sido liberado y realizado su función en la transmisión del impulso nervioso. La AChE inactiva la acetilcolina, disminuyendo su función. Su actividad puede ser inhibida por distintos tipos de compuestos, causando una sobre estimulación de las fibras musculares llevando a una parálisis, e incluso muerte de los organismos (Ferrari y col., 2007). La medición de la actividad de AChE, en cerebro, músculo o sangre, ha sido utilizada en los últimos años para evaluar los efectos neurotóxicos inducidos por ciertos xenobióticos (Menéndez-Helman y col., 2012; Santos y Martinez, 2012).

2. Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis

Los herbicidas 2,4-D y DIC contenidos en sus formulaciones comerciales DMA[®] y Banvel[®] respectivamente, empleados de manera única o en mezclas binarias, producen efectos letales, comportamentales, genotóxicos y cambios en el balance oxidativo en *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Pisces: Poeciliidae).

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo de Tesis Doctoral es evaluar los efectos letales, comportamentales, genotóxicos y del daño oxidativo inducido por formulaciones comerciales de los herbicidas DIC y 2,4-D en ejemplares de *C. decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Pisces: Poeciliidae) expuestos en condiciones experimentales de laboratorio.

2.2.2 Objetivos específicos

- 1- Estimar la toxicidad inducida por los herbicidas DIC y 2,4-D en sus formulaciones comerciales Banvel[®] y DMA[®] mediante ensayos de mortalidad y alteraciones en el comportamiento luego de una exposición aguda en laboratorio en individuos de *C. decemmaculatus*.
- 2- Evaluar la genotoxicidad ejercida luego de una exposición aguda por formulaciones comerciales de herbicidas DIC y 2,4-D mediante el análisis de micronúcleos en eritrocitos circulantes y de lesiones primarias en la molécula de

ADN mediante el EC en células sanguíneas de *C. decemmaculatus* expuestos en condiciones experimentales de laboratorio.

- 3- Evaluar daño oxidativo ejercido por DIC y 2,4-D mediante la detección de bases púricas y pirimidínicas oxidadas en el ADN en células sanguíneas de *C. decemmaculatus* expuestos en condiciones experimentales de laboratorio.
- 4- Evaluar la toxicidad de DIC y 2,4-D mediante biomarcadores enzimáticos de estrés oxidativo como el contenido de glutatión-S-transferasa, catalasa y AChE y no enzimáticos como el contenido de glutatión reducido en hígado de *C. decemmaculatus* expuestos en condiciones experimentales de laboratorio.
- 5- Evaluar si la interacción ejercida por mezclas de los herbicidas mencionados incrementa la letalidad inducida por los mismos en individuos de *C. decemmaculatus* expuestos en condiciones experimentales de laboratorio.
- 6- Evaluar la genotoxicidad ejercida por formulaciones comerciales de herbicidas DIC y 2,4-D luego de una exposición crónica mediante el análisis de lesiones primarias en la molécula de ADN mediante el EC en células sanguíneas de *C. decemmaculatus* expuestos en condiciones experimentales de laboratorio.

3. Materiales y Métodos

3.1 Muestreo y aclimatación

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se emplearon ejemplares adultos de la especie *C. decemmaculatus* (Jenyns, 1842, Pisces: Poeciliidae; Fig. 1.8) recolectados en el arroyo San Juan, tributario ubicado dentro del Parque Provincial Pereyra Iraola (Reserva de la Biósfera, UNESCO), Partido de Berazategui, Provincia de Buenos Aires, Argentina (Latitud $-34^{\circ} 85' 95,60''$ (S), Longitud $-58^{\circ} 12' 54,59''$ (O); Fig. 3.1). Los ejemplares fueron capturados con un copo de mano, mantenidos con agua del mismo sitio de captura y transportados inmediatamente al laboratorio en un contenedor plástico. Allí, fueron colocados en peceras de vidrio de 40 L de capacidad con agua proveniente del lugar de captura. Posteriormente, cada 48 h el 25% del agua proveniente del lugar de captura fue reemplazada por agua de ensayo de clorinada previamente (48 h) por burbujeo constante (pH $7,55 \pm 0,1$; oxígeno disuelto, $6,3 \pm 0,3$ mg/L; amonio (NH_4^+) $<0,2$ mg/L; dureza, $143 \pm 23,5$ mg CaCO_3/L) hasta reemplazar la totalidad de la misma. Luego, el mantenimiento del acuario fue realizado una vez por semana. Los individuos fueron aclimatados a estas condiciones con un ciclo diario 16:8 h luz/oscuridad a $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ con aireación artificial constante, durante al menos durante 20 d antes del comienzo de cada experimento, según lo sugerido por Di Marzio y de acuerdo a las normas IRAM (Di Marzio, 1999; IRAM, 2008). Los peces fueron alimentados diariamente *ad libitum* con alimento en escamas para peces (TetraFin®, TetraWerke, Melle, Alemania). El cuidado y mantenimiento de los individuos se realizó siguiendo las recomendaciones propuestas en la guía 617/2002 de SENASA para la realización de pruebas biológicas (SENASA, 2013). El peso y longitud promedio de los

individuos utilizados en los experimentos fue de $0,26 \pm 0,1$ g y $29,5 \pm 2,7$ mm, respectivamente.



Figura 3.1: Sitio de recolección de ejemplares de *C. decemmaculatus*. Parque Provincial Pereyra Iraola, Partido de Berazategui, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

3.2 Compuestos químicos empleados

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se utilizaron formulados de agroquímicos actualmente registrados y comercializados en nuestro país de acuerdo a SENASA (2018). El formulado comercial Banvel® (57,7% DIC, CAS 1918-00-9) fue provisto por la empresa Syngenta Agro S.A. (Buenos Aires, Argentina) y el formulado DMA® (58,4% 2,4-D, CAS 2008-39-1) fue proporcionado por la empresa Dow Agrosciences Argentina (Buenos Aires, Argentina). La lista completa de los químicos utilizados durante los ensayos se encuentra detallada en la Tabla 3.1.

Para la obtención de las soluciones de ensayo a utilizar de cada agroquímico, se procedió en primer lugar a realizar una solución madre de cada herbicida, diluyendo una cantidad determinada del mismo en agua de ensayo de clorinada. A partir de esta solución madre, se realizaron diluciones de la misma hasta alcanzar las concentraciones establecidas para llevar a cabo los experimentos. En simultáneo, se prepararon las soluciones para los controles positivos y negativos. Todas las soluciones

fueron preparadas inmediatamente antes del inicio de cada experimento y de la renovación de las mismas según las necesidades de los diferentes modelos experimentales utilizados.

Tabla 3.1

Reactivos químicos utilizados en la presente Tesis Doctoral

Reactivo	CAS/ Número de catálogo	Origen
Aceite de inmersión	HX08819102	Merck KgaA
Ácido tricloroacético	76-03-9	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.)
Albúmina de suero bovino	A-7638	Sigma Chemical Co.
Agarosa bajo punto de fusión	A9414	Sigma Chemical Co.
Agarosa punto de fusión normal	A9539	Sigma Chemical Co.
CDNB (2,4-dinitroclorobenceno)	24438	Sigma Chemical Co.
Carbonato de sodio	A0841492 520	Merck KgaA
Ciclofosfamida	6055-19-2	Sigma Chemical Co.
Cloruro de potasio	7447-40-7	Sigma Chemical Co.
Cloruro de sodio	7647-14-5	Sigma Chemical Co.
DAPI	H1200	Vector Laboratories (Burlingame, CA, EE.UU.)
Dicromato de potasio	7778-50-9	Merck KgaA
Dimetilsulfóxido	67-68-5	Sigma Chemical Co.
Reactivo de Ellman	D8130-16	Sigma Chemical Co.
Ditiotreitol	D9779-1G	Sigma Chemical Co.
Endonucleasa III	MFCD02265700	Sigma Chemical Co.
Fosfato diácido de potasio	P-5379	Sigma Chemical Co.
Fosfato diácido de sodio	S-8282	Sigma Chemical Co.
Fosfato dipotásico	1551128	Sigma Chemical Co.
Formamidopirimidina-ADN glicosilasa	78783-53-6	Sigma Chemical Co.
Giemsa	HX933732	Merck KgaA
Glutation reducido	G4251-5G	Sigma Chemical Co.
Hidróxido de sodio	B0002198	Merck KgaA
Ioduro acetiltiocolina	1866-15-5	Sigma Chemical Co.
Metanol	K39504909	Merck KgaA
Ácido etilendiaminotetraacético disódico	6381-92-6	Sigma Chemical Co.
Peróxido de hidrógeno	1072100250	Merck KgaA (Darmstadt, Alemania)
Reactivo de Folin Ciocalteu	F9252	Sigma Chemical Co.
Sulfato de Cobre	A0629491 435	Merck KgaA
Tartrato de sodio	3930-19	J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, EE.UU)
Tris pH 7,5	T1378	Sigma Chemical Co.
Trizma®(ácido clorhídrico)	T3253	Sigma Chemical Co.
Triton X-100	9002-93-1	Sigma Chemical Co.

3.3 Mediciones analíticas de las concentraciones utilizadas

Las concentraciones de los agroquímicos en las diferentes soluciones de ensayo fueron determinadas por el laboratorio QV Chem (La Plata, Buenos Aires, Argentina), siguiendo los protocolos establecidos por el U.S. Geological Survey Report 01-4134 (Furlong y col., 2011). Los niveles de DIC y 2,4-D presentes en las formulaciones comerciales Banvel® y DMA®, respectivamente, fueron analizados por cromatografía líquida de alta eficacia usando un detector ultravioleta. Inmediatamente luego de la preparación (0 h) y a las 24 h luego del inicio del experimento se tomó una muestra de las soluciones a utilizar en cada ensayo. El límite de detección de DIC y 2,4-D fue de 0,5 mg/L. Las mediciones de cromo en las soluciones utilizadas se realizaron inmediatamente luego de su preparación y las mismas fueron analizadas con espectrometría de absorción atómica mediante aspiración directa en llama aire-acetileno (Método 3111 B) (APHA y col., 1998). Todas las concentraciones empleadas en la presente Tesis Doctoral fueron expresadas en mg de p.a./L que representan la concentración nominal de p.a. presente en cada formulación comercial o solución empleada y seleccionada para dichos estudios.

3.4 Bioensayos

3.4.1 Bioensayos agudos

Los experimentos agudos letales y subletales fueron realizados por un período de 96 h siguiendo los métodos estandarizados propuestos por la U.S. EPA para ensayos de toxicidad aguda en peces (USEPA, 1975; 2002a; IRAM, 2008), con modificaciones menores previamente reportadas para la especie según lo descrito por nosotros en las Publicaciones I y II y aquellas disponibles en la bibliografía (Fig. 3.2) (Vera-Candiotti y col., 2010; 2013b; 2015). Durante los experimentos agudos las soluciones fueron reemplazadas cada 24 h y los peces fueron mantenidos sin aireación y sin alimentación. Para la evaluación de los puntos finales los individuos fueron sacrificados

siguiendo los criterios propuestos por la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Garber y col., 2011) y considerando los procedimientos éticos del Comité de Ética de la Universidad Nacional de La Plata (Código11/N619), el Marco Ético de Referencia para la Investigación Biomédica: Principios Éticos para la Investigación con Laboratorios, Granjas y Animales Silvestres (CONICET, 2005) y la Guía para el Cuidado y Uso de Animales para Experimentación (INTA, 2008). Bajo este modelo experimental se realizaron los siguientes bioensayos: determinación de la CL50, alteraciones comportamentales, ensayo de MNs, Ensayo Cometa, Ensayo cometa modificado con enzimas de restricción, determinación de parámetros enzimáticos y no enzimáticos relacionados con la inducción de estrés oxidativo y de neurotoxicidad y la determinación de la toxicidad de mezclas de DIC y 2,4-D.

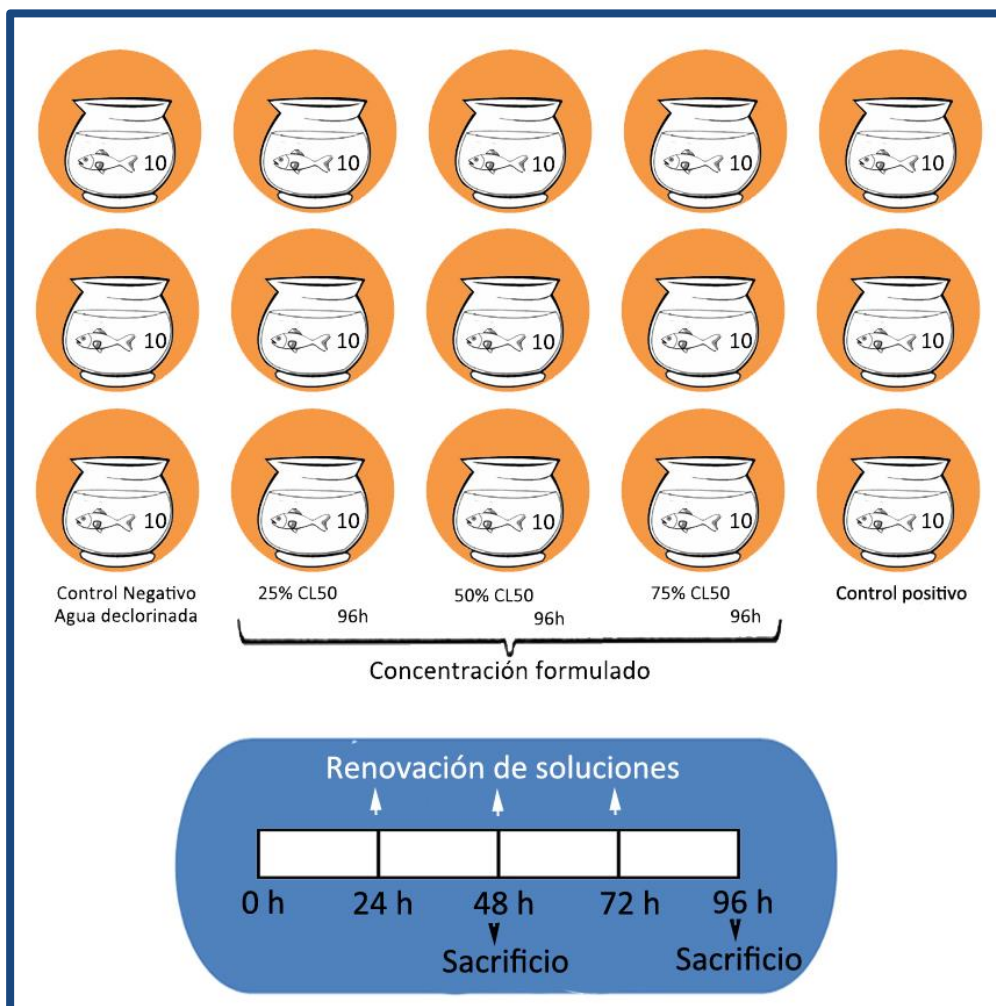


Figura 3.2: Diseño experimental de los ensayos agudos.

3.4.2 Bioensayos Crónicos

Los experimentos crónicos fueron realizados durante un período de 28 d (Fig.3.3). Durante los experimentos las soluciones fueron reemplazadas cada 72 h y los peces fueron mantenidos a lo largo de todo el ensayo con aireación constante y alimentados 1 h previa al recambio de soluciones.

Este modelo experimental se realizó para evaluar el efecto genotóxico de los herbicidas en estudio luego de una exposición crónica mediante la metodología de la variante alcalina del EC. Los especímenes fueron expuestos a dos concentraciones de cada herbicida, equivalentes al 2,5 y 5% de la $CL_{50_{96h}}$ (Fig. 3.3). Las concentraciones ensayadas fueron 41 y 82 mg/L de DIC, y 25,2 y 50,4 mg/L de 2,4-D contenidas en sus formulaciones comerciales Banvel® y DMA®, respectivamente. Cincuenta especímenes por concentración fueron mantenidos en cuatro acuarios de 5 L de volumen final con aireación continua. En simultáneo con la exposición a los herbicidas se preparó un quinto acuario con agua de red declorinada que fue utilizado como control negativo. Cada siete días, diez individuos fueron sustraídos de cada acuario (acuario control, acuarios con 2,5% y 5% de la $CL_{50_{96h}}$ de DIC y acuarios con 2,5% y 5% de la $CL_{50_{96h}}$ de 2,4-D) y se procedió a la obtención de las muestras de sangre para realizar el EC siguiendo el protocolo detallado en la sección 3.6.4.

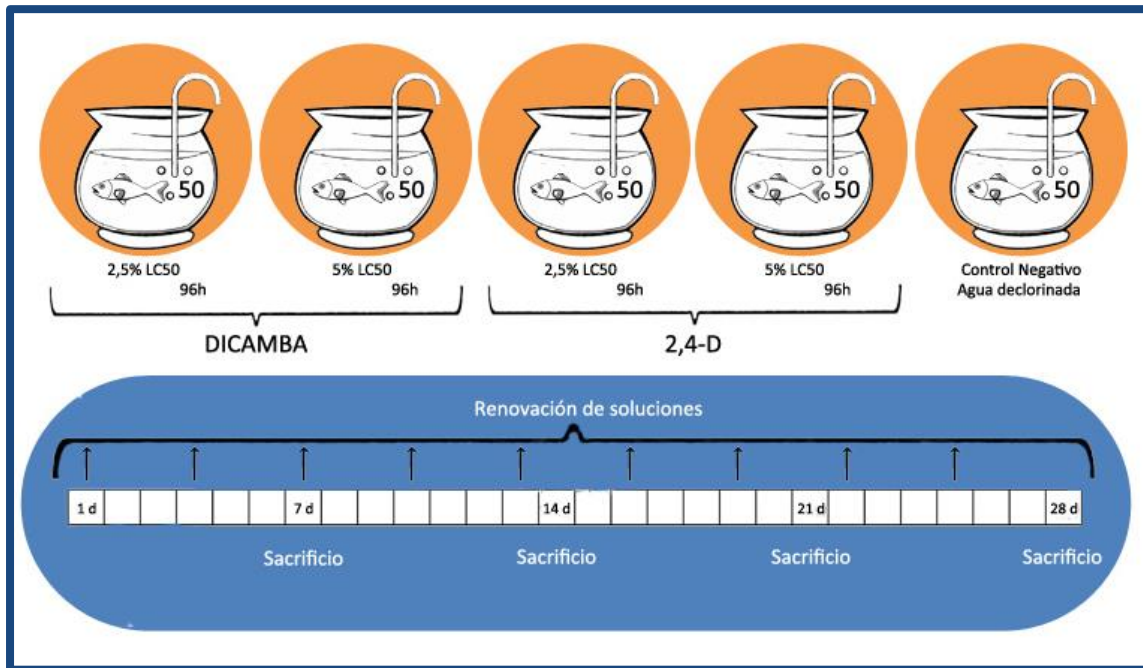


Figura 3.3: Diseño experimental del ensayo crónico.

3.5 Biomarcadores

3.5.1 Determinación de la concentración letal media (CL50)

Las CL50 fueron calculadas luego de la exposición aguda a cada herbicida. Adicionalmente se calcularon los parámetros de la concentración máxima en la cual no se observaron efectos (NOEC) inducidos por DIC y 2,4 D, así como la concentración mínima a la cual se observaron efectos (LOEC) inducidos por ambos herbicidas auxínicos estudiados.

Para determinar el rango de concentraciones de los herbicidas se realizaron ensayos preliminares siguiendo las recomendaciones propuestas por la U.S. EPA (2002a). Cada experimento consistió en exponer 10 especímenes elegidos al azar a las concentraciones de los herbicidas en estudio durante 96 h en un volumen final de 1 L de agua dechlorinada (Vera-Candiotti y col., 2013b; 2013a; 2014; 2015; Mugni y col., 2016; Ruiz de Arcaute y col., 2016). En la exposición de los individuos de *C. decemmaculatus* al herbicida DIC se utilizaron nueve concentraciones (816, 1152, 1296, 1440, 1584, 1728, 2208, 2688, y 2880 mg/L) según lo descrito en la Publicación I. Para el herbicida 2,4-D, se utilizaron 10 concentraciones (100, 250, 400, 800, 1100, 1200, 1300, 1400, 1600 y 2200 mg/L) según lo comunicado en la Publicación II. El

control negativo utilizado fue agua corriente de clorinada (pH $7,55 \pm 0,1$; oxígeno disuelto, $6,3 \pm 0,3$ mg/L; $\text{NH}_4^+ < 0,2$ mg/L; dureza, $143 \pm 23,5$ mg CaCO_3 /L), mientras que el control positivo consistió en una solución de cromo ($21,4$ mg $\text{Cr}_{(VI)}$ /L) (Vera-Candioti y col., 2011). Ambos controles (negativo y positivo) fueron realizados en el mismo momento que la exposición a los herbicidas. Se realizaron tres réplicas independientes hechas en simultáneo, en ellas la letalidad fue determinada cada 24 h por observación directa. Los individuos fueron considerados muertos en ausencia tanto de movimientos respiratorios como de respuesta frente al estímulo táctil suave de una pipeta Pasteur. Los valores de CL50 fueron determinados para las 24, 48, 72 y 96 h de exposición.

3.5.2 Análisis del comportamiento

El análisis del comportamiento fue realizado en los mismos individuos expuestos y no expuestos a los xenobióticos que se utilizaron en los experimentos de letalidad aguda para la determinación de la CL50. Los cambios comportamentales de los peces expuestos a las nueve concentraciones de DIC (816, 1152, 1296, 1440, 1584, 1728, 2208, 2688, y 2880 mg/L), a las diez concentraciones de 2,4-D (100, 250, 400, 800, 1100, 1200, 1300, 1400, 1600 y 2200 mg/L) y los de los peces sanos pertenecientes al grupo del control negativo fueron monitoreados y determinados cada 24 h, antes del reemplazo de las soluciones. Los cambios fueron registrados luego de agitar el agua suavemente con una pipeta Pasteur 5 veces y observando la actividad de los individuos expuestos al herbicida durante 1 min, contrastando la respuesta de los mismos con los pertenecientes al control negativo. Las respuestas optomotoras que diferían de las observadas en los controles negativos fueron clasificadas como “anormales” siguiendo el criterio propuesto por Sarikaya y Yilmaz (2003) y Yilmaz y col. (2004). Esta clasificación incluyó cuatro categorías: movimiento lento (ML), cuando los movimientos del pez eran extremadamente pausados; aglomeración en el fondo del acuario (AFA), cuando los individuos se congregaban en la parte más baja de la

columna de agua; reacción lenta (RL), cuando la respuesta a los estímulos decaía; y natación anormal (NA), cuando la habilidad natatoria de los individuos decrecía o se volvía errática. La prevalencia de un tipo de categoría fue calculada dividiendo el número de individuos con una respuesta particular por el número de individuos observados.

3.5.3 Cuantificación de la frecuencia de micronúcleos y anomalías nucleares

El ensayo de MNs fue realizado luego de la exposición aguda en eritrocitos de la sangre periférica circulante de acuerdo al procedimiento descrito previamente por Vera-Candioti (2013a; 2013b; 2014; 2015) y reportado por nosotros en detalle en las Publicaciones I y II. Cada experimento consistió en exponer 5 especímenes elegidos al azar en contenedores de 1 L de capacidad a tres concentraciones equivalentes al 25, 50 y 75 % de la CL50_{96h}. En el caso de DIC las concentraciones utilizadas fueron 410, 820 y 1229 mg/L. En la exposición a 2,4-D, las concentraciones utilizadas fueron 252, 504 y 756 mg/L. De manera simultánea a los tratamientos con DIC y 2,4-D, se ensayaron controles negativos utilizando agua de red declorinada y positivos utilizando ciclofosfamida (CF, 10 mg/L). La frecuencia de MNs fue determinada en eritrocitos periféricos maduros luego de 48 y 96 h de iniciado el experimento, siguiendo las recomendaciones propuestas para el ensayo de MNs en peces (Çavaş y Ergene-Gözükara, 2005; de Lemos y col., 2008; Vera-Candioti y col., 2010; 2013a; 2013b). Los experimentos fueron realizados por triplicado y en simultáneo para cada punto experimental.

Transcurrido el tiempo de exposición, los individuos fueron anestesiados por inmersión en agua helada a 2-4 °C (Summerfelt y Smith, 1990; Ackerman y col., 2005) y una muestra de sangre fue obtenida mediante un corte transversal a la altura del opérculo (Vera-Candioti y col., 2010; 2013a; 2013b; 2015). Se realizaron dos extendidos de sangre sobre portaobjetos por cada individuo, que luego fueron secadas al aire a temperatura ambiente, siguiendo técnicas citogenéticas convencionales. Posteriormente, los preparados fueron fijados en etanol frío (4°C;100% v/v) durante 20 min y luego teñidos con una solución de Giemsa al 5% durante 12 min. Los preparados fueron numerados y observados bajo microscopía óptica (Olympus BX50/CX35) con un

aumento 1000X. Se analizaron 1500 eritrocitos por cada ejemplar y los datos fueron expresados como el número total de MNs en 1000 células analizadas, como fuera previamente sugerido por otros autores (Cabagna y col., 2006; Vera-Candioti y col., 2010; Pérez-Iglesias y col., 2014). La identificación de los MNs se realizó siguiendo los criterios reportados previamente por otros autores (Fenech, 2000; 2007) y detallados en la Sección 1.5.1.2 del Capítulo I de la presente Tesis Doctoral.

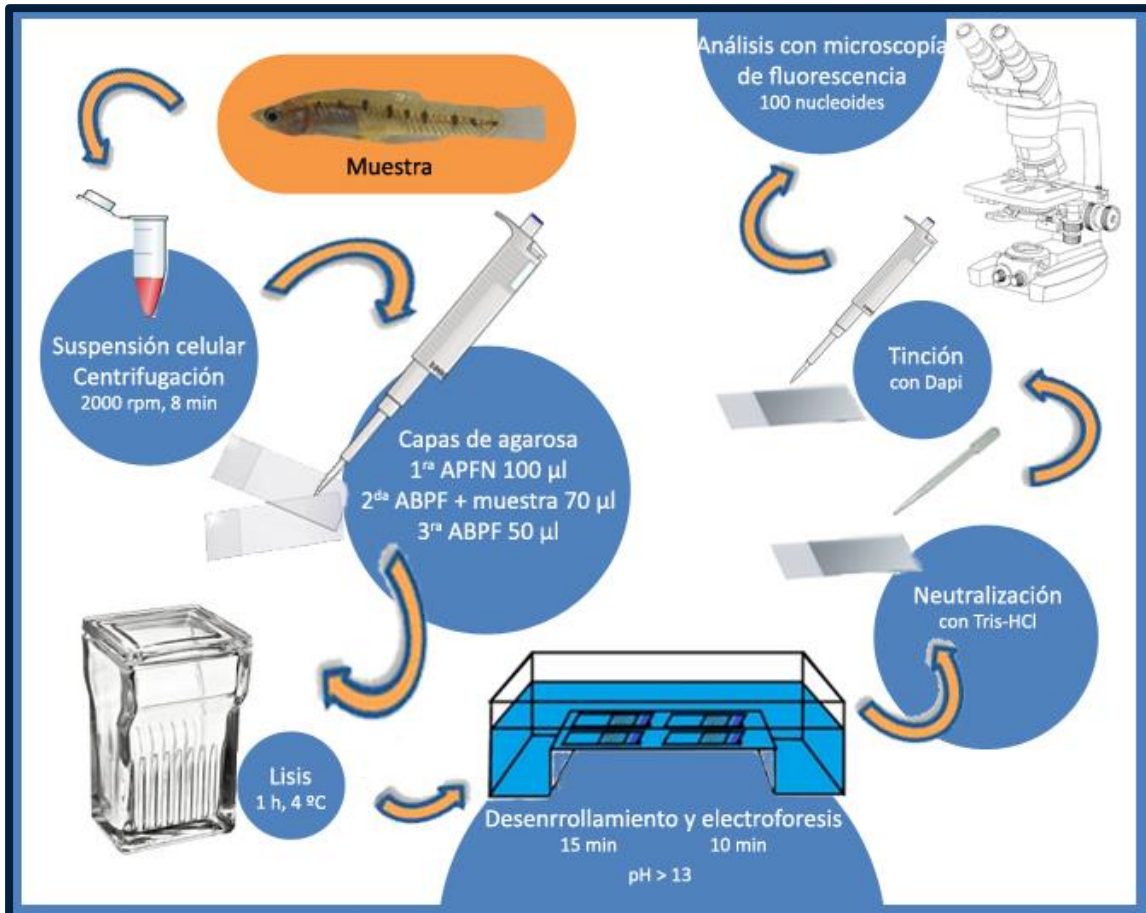
En los mismos 1500 eritrocitos analizados para la cuantificación de MNs, fueron analizadas otras anormalidades nucleares. Para ello, se siguieron los criterios de examinación establecidos por Çavaş y Ergene-Gözükara (2003), Nikoloff y col. (2014b) y Strunjak-Perovic y col. (2009), clasificando las anormalidades en cuatro categorías: eritrocitos binucleados (EBs), brotes nucleares (BN- *buds*), núcleos lobulados (NLs) y escotaduras nucleares (ENs) según lo descrito en la Sección 1.5.1.2 del Capítulo I (Fig. 1.6).

3.5.4. Cuantificación de la inducción de daño primario en el ADN mediante electroforesis en gel de células únicas: Ensayo Cometa (EC) variante alcalina

La cuantificación del efecto genotóxico de los herbicidas a nivel de ADN se llevó a cabo empleando la metodología de electroforesis en gel de células únicas o ensayo cometa (EC). Se realizó siguiendo el procedimiento alcalino propuesto por Singh y col. (1996) con modificaciones menores reportadas previamente en detalle por nosotros en las Publicaciones I y II al igual que por otros autores (Nikoloff y col., 2014b; Pérez-Iglesias y col., 2014; Ruiz de Arcaute y col., 2014a; 2014b). Para el análisis del efecto genotóxico se utilizaron los mismos individuos expuestos a concentraciones equivalentes al 25, 50 y 75% de la CL50_{96h} que luego fueron empleados para el ensayo de MNs (ver Sección 3.6.3). En simultáneo con la exposición a los herbicidas DIC y 2,4-D, se utilizaron como controles negativos y positivos agua de red de clorinada y CF (10 mg/L), respectivamente. En adición a la muestra de sangre obtenida para el ensayo de MNs mediante un corte transversal a la altura del opérculo, otra muestra fue tomada para la realización del EC. La misma fue diluida en 1 ml de buffer fosfato salino (pH 7,4; temperatura ambiente). Luego de ser centrifugada (2000 rpm, 8 min), una alícuota de 30 µl de la misma fue mezclada con 70 µL de agarosa de bajo punto de fusión (ABPF) al

0,5%. La mezcla resultante se extendió formando una capa sobre un portaobjetos al que previamente se le había realizado una capa con 100 μL de agarosa punto de fusión normal (APFN) 0,5%. Posteriormente al extendido de la segunda capa, se cubrió la misma con un cubreobjetos y se colocó a 4°C por 10 min. Pasado este tiempo y comprobada la solidificación del gel, se removió el cubreobjetos y las muestras fueron cubiertas por una tercera capa de 50 μL de ABPF al 0,5%. El preparado fue cubierto nuevamente con un cubreobjetos y colocado a 4°C hasta su solidificación. Seguidamente, se procedió a remover suavemente los cubreobjetos y los preparados fueron colocados en una solución de lisis (1% sarcocinato de sodio; 2,5 M NaCl; 100 mM Na₂EDTA; 10 mM Tris, pH 10,0; 1% TritonX-100; 10% DMSO) por un período de 1 h a 4°C. Luego, las preparaciones fueron colocadas en una cuba de electroforesis horizontal junto con el buffer de electroforesis (1 mM Na₂EDTA; 300 mM NaOH) por 15 min a 4°C, para permitir el desenrollamiento del ADN. Posteriormente, se realizó la

Figura 3.4: Protocolo del ensayo cometa (variante alcalina).



electroforesis en el mismo buffer y temperatura por 10 min a 25 V y 250 mA (0,8 V/cm). Pasado este tiempo, las muestras fueron neutralizadas con una solución de Tris-HCl (0,4 M; pH 7.5), y luego coloreadas con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato; Vectashield mounting medium H1200) para su posterior análisis mediante microscopía de fluorescencia (Fig. 3.4).

Los preparados fueron examinados con un aumento 1000X, en un microscopio de fluorescencia Olympus BX50 equipado con los filtros adecuados. El daño en el ADN fue determinado visualmente en 100 nucleoides no solapados entre sí elegidos al azar y el daño en el ADN fue cuantificado según el patrón de migración del ADN, esto es, la longitud de la cola respecto de la cabeza del cometa (Fig. 3.5). El daño observado fue clasificado en cuatro clases (Çavaş y Könen, 2007): células sin daño (cometas tipo 0-I), sin espículas alrededor de la cabeza y sin cola (Clase 0, Fig. 3.5 A) o con espículas alrededor de la cabeza y sin cola (Clase I, Fig. 3.5 B); células con daño leve (cometas tipo II), en los que el largo de la cola es menor al diámetro de la cabeza (Fig. 3.5 C); células con daño intermedio (cometas tipo III), en los que el largo de la cola es hasta dos veces el diámetro de la cabeza (Fig. 3.5 D) y células con daño máximo (cometas

tipo IV) en los que el largo de la cola es mayor a dos veces el diámetro de la cabeza (Fig. 3.5 E). Los resultados fueron expresados como porcentaje de cada categoría de nucleoside analizado (tipo 0 y I, tipo II, tipo III y tipo IV) y como el número medio de células dañadas (suma de las clases II, III, y IV). El Índice de Daño Genético (IDG) fue calculado para cada tratamiento realizado siguiendo las recomendaciones de Pitarque y col. (1999) utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{IDG} = (1 \times \text{I} + 2 \times \text{II} + 3 \times \text{III} + 4 \times \text{IV}) / N_{(0-IV)}$$

donde **0-IV** representan las clases de nucleosides y $N_{(0-IV)}$ representa el total de los nucleosides analizados.

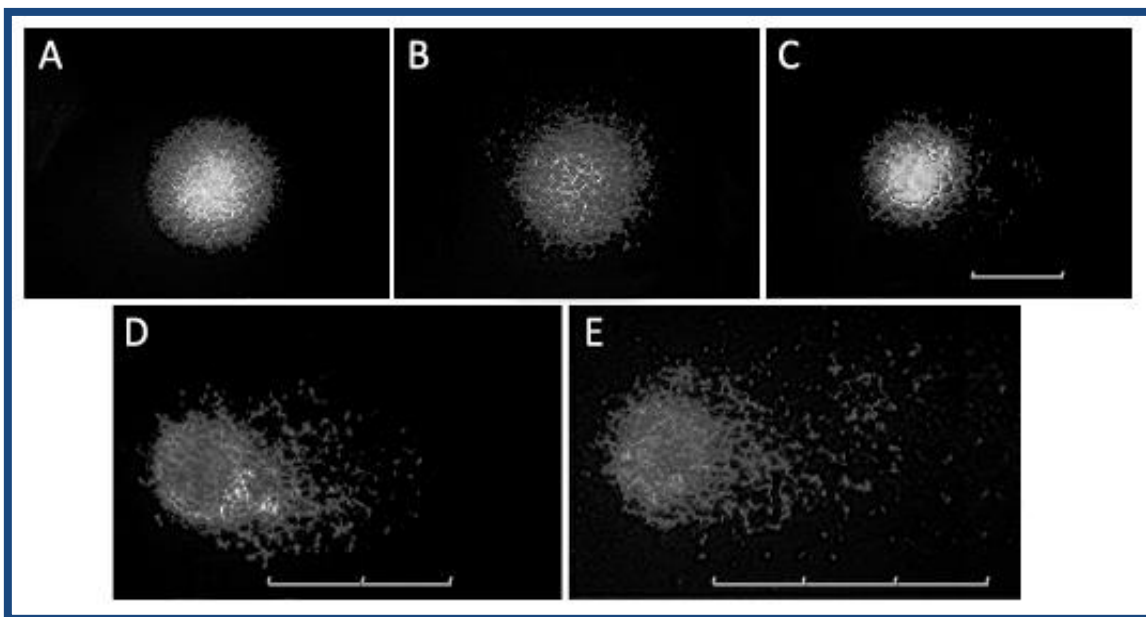


Figura 3.5: Categorías de daño utilizadas. (A y B) Nucleosides sin daño (cometas tipo 0-I), (C) nucleosides con daño leve (cometas tipo II), (D) daño intermedio (cometas tipo III) y (E) daño máximo (cometas tipo IV). La línea blanca indica la longitud de la cola con respecto a la cabeza del cometa.

3.5.5 Cuantificación de la inducción de lesiones primarias en el ADN mediante electroforesis en gel de células únicas o Ensayo Cometa alcalino modificado con enzimas de restricción

El daño oxidativo causado por los herbicidas DIC y 2,4-D a nivel de ADN se cuantificó empleando la metodología de la variante alcalina de la electroforesis en gel de células únicas (EC) modificado con endonucleasas de restricción, según lo descrito por Collins y col. (1996) y Guilherme y col. (2012), con algunas modificaciones menores propuestas oportunamente (Pérez-Iglesias y col., 2017). Cada experimento consistió en

exponer 5 individuos elegidos al azar en contenedores de 1 L de capacidad durante 96 h al 25 % de la CL50_{96h}, tanto de DIC (410 mg/L) como de 2,4-D (252 mg/L). Como control negativo fue empleado agua de clorinada y como control positivo H₂O₂ (50 µL, 50 µM, 5 min, 4 °C). Las condiciones de ensayo fueron las mismas que se utilizaron para el ensayo de MNs y el EC (ver Secciones 3.4.3 y 3.4.4). El EC fue realizado siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.4.4. hasta el momento de la lisis. Luego de la misma, los preparados fueron lavados tres veces con un buffer para enzimas (BEnz) (HEPES 40 mM; KCl 1 M; EDTA 0,5 mM; albúmina de suero bovino 0,2 mg/mL; pH 8,0), durante 5 min entre cada lavado y a temperatura ambiente. Realizado este paso y siguiendo las recomendaciones de Collins (2004) y Collins y col. (1993), se colocó sobre cada preparado 50 µL de una solución conteniendo las enzimas de restricción Endo III (0,5 U) o Fpg (0,13 U) y luego fueron cubiertos con un cubreobjetos para su posterior incubación. Previo a su uso, las enzimas Endo III y Fpg fueron diluidas en el BEnz en una proporción de 1:1000 o 1:3000, respectivamente. Adicionalmente a la incubación con las enzimas de restricción, se realizaron dos tipos de controles para cada tratamiento empleado, un control negativo que se incubó con H₂O y otro que se incubó 30 o 45 min con 50 µL del BEnz con la finalidad de comprobar si el buffer tiene la capacidad de dañar *per se* a la molécula del ADN. Luego de realizadas dichas incubaciones, las preparaciones fueron nuevamente colocadas en cámara húmeda (37 °C) durante, 30 o 45 min en presencia de las enzimas Endo III o Fpg, respectivamente. Pasado el tiempo de incubación, se procedió a retirar el cubreobjetos y colocar las preparaciones en la cuba de electroforesis donde se realizó el desenrollamiento y la posterior corrida electroforética, siguiendo el protocolo detallado en la sección 3.4.4.

Los datos fueron expresados utilizando el número medio de células dañadas y el Índice de Daño Genético (IDG) (ver Sección 3.4.4). Adicionalmente, se calculó el Daño Oxidativo Neto ejercido en el ADN (DO) para cada tratamiento utilizando la siguiente fórmula (Domijian y col., 2006; Mikloš y col., 2009; Collins y Azqueta, 2012; Soloneski y Larramendy, 2017):

$$DO = [(\%IDG \text{ buffer} + \%IDG \text{ enzima} + \%IDG \text{ herbicida}) - (\%IDG \text{ buffer} + \%IDG \text{ herbicida})]$$

3.5.6 Biomarcadores enzimáticos y no enzimáticos de estrés oxidativo

Los mismos individuos utilizados para la realización del EC modificado con enzimas de restricción fueron empleados para la determinación del estrés oxidativo. Las concentraciones de exposición de los herbicidas utilizadas fueron 410 mg/L y 252 mg/L de DIC y 2,4-D, respectivamente, ambas equivalentes al 25 % de la CL50_{96h}. Luego del sacrificio y la obtención de sangre para el EC modificado con enzimas de restricción, la sección media de los especímenes (correspondiente a los tejidos viscerales) fue conservada en nitrógeno líquido (-195,8 °C) hasta el momento de su procesamiento. Llegado el momento, los tejidos fueron descongelados y pesados. Luego se procedió a realizar un homogenato con un buffer de homogeneización post mitocondrial (BHPM) conteniendo NaH₂PO₄ (0,1 M), KCl (0,15 M), EDTA (1mM), DTT (1 mM) y 10% v/v glicerol, a pH 8. Para ello se utilizó un homogeneizador vidrio/teflón en frío a 3000 rpm. A continuación, se procedió a centrifugar el homogenato a 10000 x g durante 10 min a 4 °C para obtener la fracción sobrenadante, la cual fue alicuotada y conservada a -80 °C. Al momento de realizar la medición, las muestras fueron descongeladas y los siguientes biomarcadores enzimáticos fueron determinados:

- Catalasa (CAT) (EC1.11.1.6). La actividad de CAT fue medida siguiendo el método propuesto por Baudhuin y col. (1964). La mezcla de reacción consistió en 10 µL de homogenato, 1,5 mL de buffer fosfato (NaH₂PO₄ 0,05 M; pH 7,2) y 9 µL de H₂O₂ (17,8 mM). Se registraron los cambios en la absorbancia a 25 °C 240 nm cada 10 s durante 1 min utilizando una cubeta de cuarzo. La actividad enzimática fue expresada en µmoles H₂O₂ consumidos/min mg proteína.
- Glutación-S-transferasa (GST) (EC2.5.1.18). Fue determinada siguiendo el protocolo propuesto por Habig y col. (1974). La mezcla de reacción consistió en 10 µL de homogenato, 1,1 mL buffer fosfato (NaH₂PO₄ 0,1 M; pH 6,5), 140 µL GSH (10 mM) en agua miliQ y 70 µL 1-cloro-2,4-dinitrobenzoceno (CDNB; 20 mM) como sustrato. Se registraron los cambios en la absorbancia a 25 °C a 340 nm cada 30 s durante 2 min utilizando una cubeta de cuarzo. La actividad enzimática fue expresada como µmoles de CDBN conjugado/min mg proteína. Por último, se realizó una estimación de la diferencia entre la actividad total registrada - actividad de los blancos, obteniéndose la actividad enzimática neta.

-
-
- Glutación (GSH). Fue determinado utilizando el método descrito por Ellman (1959). El homogenato fue tratado con 10% de ácido tricloroacético (ATA) en una relación 1:1 y centrifugado a 10000x g por 10 min a 4 °C. El sobrenadante fue utilizado para realizar la estimación de GSH. La mezcla de reacción consistió en 100 µL del sobrenadante, 1,1 mL de ATA 5% y 1 mL de DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-dinitrobenzoico, 1,5 mM en buffer fosfato 0,25 M; pH 8,0). Luego de una incubación de 15 min, se determinó la formación de aniones tiolato a temperatura ambiente, a 412 nm, comparándose con la curva estándar de GSH. Dicha curva fue generada con GSH (0,1 mM) en ATA 5%, con alícuotas de 10, 20, 40, 80 y 100 nmoles. La GSH fue determinada como ácidos tioles solubles y los resultados fueron expresados como µmoles de tioles solubles/g de tejido.
 - El contenido de proteínas en tejido (PT) fue determinado de acuerdo a Lowry y col. (1951) usando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar. Se incubó 2 µL de homogenato en tubos conteniendo 1 mL del Reactivo C (50 mL Na₂CO₃ 2% en NaOH 0,1 N; 1 mL de CuSO₄.5H₂O 0,5% en tartrato de Na 1%) y se llevó a 1200 µL con agua miliQ. Luego se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. A continuación, se adicionaron 100 µL de reactivo de Folin Ciocalteau previamente diluido 1:1 con agua miliQ y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. Pasado el tiempo se procedió a la lectura a 750 nm, y luego se realizó una recta patrón usando 10-30 µg/µL de BSA.

Todas las medidas de los biomarcadores utilizados fueron realizadas por triplicado en cada muestra y las estimaciones fueron hechas sobre el porcentaje promedio de valores normalizados. La actividad de cada enzima fue calculada en términos del contenido de proteína de la muestra. Los datos fueron expresados como media ± EE.

3.5.7 Biomarcador de neurotoxicidad

Los individuos utilizados para la realización del EC modificado con enzimas de restricción y biomarcadores de estrés oxidativo también fueron empleados para la determinación acetilcolinesterasa (AChE). Las concentraciones de exposición de los herbicidas utilizadas fueron 410 mg/L y 252 mg/L de DIC y 2,4-D, respectivamente, ambas equivalentes al 25 % de la CL50_{96h}. La preparación de los homogenatos fue realizada según lo detallado en la sección 3.6.6. La determinación de AChE fue realizada según el método de Ellman y col. (1961) utilizando 10 µL homogenato, incubados con 3 mL buffer fosfato (K₂HPO₄/KH₂PO₄; 0,1 M; pH 8), 100 µL de DTNB (0.01 M en buffer fosfato pH 7) y 20 µL del sustrato (ioduro de acetiltiocolina, 0,075 M). La mezcla se homogenizó y se registraron los cambios en la absorbancia a 412 nm cada 30 s durante 2 min. Luego se procedió a calcular la actividad enzimática neta (actividad total registrada - actividad de blancos). Los resultados fueron expresados como nmoles de sustrato hidrolizado/min mg proteína. La actividad enzimática se calculó utilizando un coeficiente de extinción molar de 13,6 mM/cm.

3.5.8. Determinación de la toxicidad aguda de mezclas de los herbicidas dicamba y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)

Con la finalidad de evaluar el efecto de la toxicidad de los herbicidas como parte de combinaciones equitóxicas y no equitóxicas se emplearon las formulaciones de los herbicidas DIC y 2,4-D, Banvel® y DMA® respectivamente, de acuerdo a la metodología propuesta por Warne (2003) y detallada por nosotros en detalle en la Publicación III. Dicha metodología se basa en el concepto de la “Unidad Tóxica”, definida como la concentración de una mezcla de por lo menos dos xenobióticos capaces de inducir un efecto determinado. De esta manera, una unidad tóxica (UT) fue asignada arbitrariamente como la concentración de los plaguicidas que fuera capaz de inducir el 50% de la mortalidad en *C. decemmaculatus* luego de 96 h de exposición (valor equivalente a la CL50_{96h} inducida por la mezcla). Se evaluó la toxicidad de la mezcla conformada por las formulaciones de los herbicidas DIC y 2,4-D. La exposición aguda fue realizada durante 96 h, en recipientes de 1 L de capacidad donde fueron mantenidos 10 individuos adultos elegidos al azar. Se realizaron tres réplicas independientes hechas en simultáneo en las cuales la letalidad fue determinada cada

24 h por observación directa. Los valores de CL50 fueron determinados para las 24, 48, 72 y 96 h de exposición.

Para la realización de las mezclas equitóxicas, los formulados fueron mezclados de tal forma que cada uno de los mismos aportase a la misma el mismo efecto tóxico. De esta manera, se realizaron 9 mezclas en las cuales la suma de UT de ambos herbicidas fue igual a 0,125; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 y 4 UT, como fue sugerido por varios autores (Warne, 2003; Brodeur y col., 2014; 2016). Así, por ejemplo, si la concentración de la mezcla de los plaguicidas es igual a 1 UT, comprende 0,5 UT del formulado que contiene DIC (en nuestro caso, 50% de la CL50_{96h}) y 0,5 del formulado que contiene 2,4-D (en nuestro caso, 50% de la CL50_{96h}). Para las mezclas no equitóxicas se realizaron cuatro series de experimentos, que incluyeron cinco concentraciones de exposición cada uno, siguiendo las recomendaciones de Warne (2003) y Brodeur y col. (2014; 2016). Se llevaron a cabo dos series de experimentos, comprendiendo entre ambos un total de 10 mezclas. En una serie, la concentración del formulado de DIC fue mantenida fija en 0,33 UT, y en la otra 0,66 UT. En cada una de estas series la concentración del formulado de 2,4-D fue 0,01, 0,05, 0,1, 1 o 2 UT. De manera similar, se realizaron otras dos series de experimentos en las que la concentración del formulado de 2,4-D se mantuvo fija en 0,33 o 0,66 UT, mientras que la concentración del formulado de DIC fue 0,01; 0,05; 0,1; 1 o 2 UT. Se realizaron tres réplicas independientes de cada serie que fueron hechas en simultáneo. La letalidad fue determinada cada 24 h por observación directa. Los individuos fueron considerados muertos en ausencia tanto de movimientos respiratorios como de respuesta al estímulo suave de una pipeta Pasteur. En base a los resultados de mortalidad se calculó el valor en UT que causó el 50% de la mortalidad (UT50). Los resultados de las mezclas no equitóxicas se representaron en un isoblograma, un gráfico de dos dimensiones en el que cada eje representa la concentración (en UTs) de los xenobióticos A y B (en este caso, DIC y 2,4-D). La línea diagonal que cruza el gráfico se denomina isobola, que une los valores de 1 UT de cada eje, y corresponde al efecto de adición de concentraciones de los dos xenobióticos. Si las combinaciones que ejercen el 50% de la mortalidad caen debajo y a la izquierda de la línea de aditividad, la mezcla se considera sinérgica, mientras que si caen arriba y a la derecha de la línea de aditividad, el efecto de la mezcla se considera antagónico (Fig. 3.6).

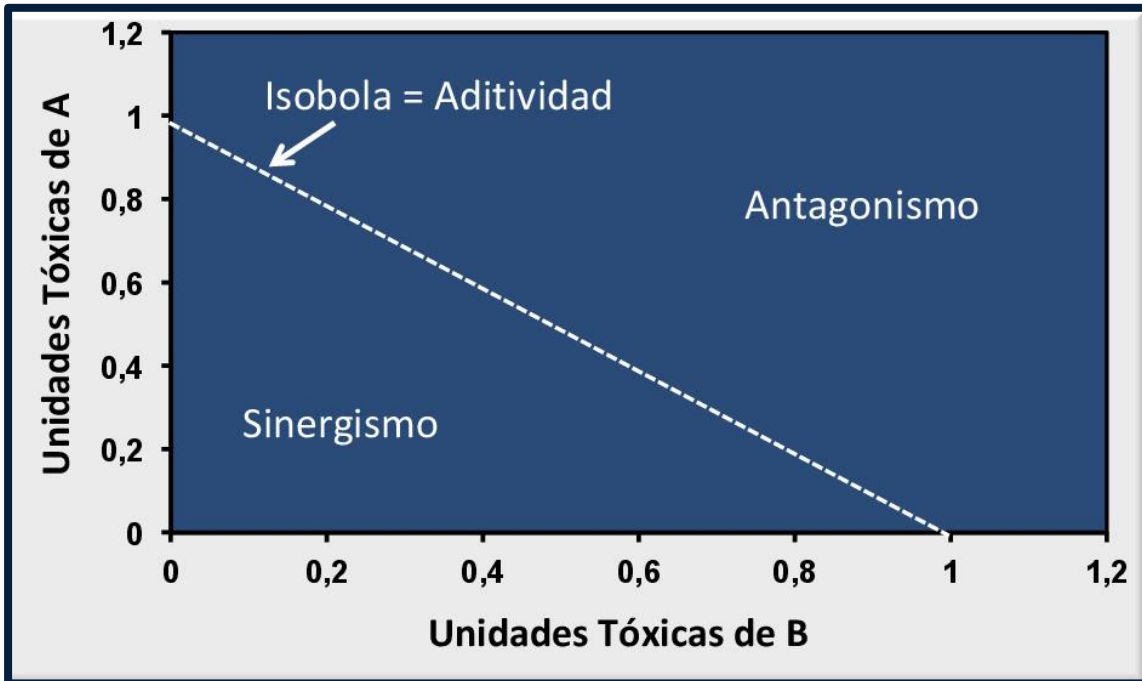


Figura 3.6: Isoblograma mostrando la línea de aditividad (isobola) y las regiones que representan sinergismo (a la izquierda de la isobola) y antagonismo (a la derecha de la isobola)

3.6 Estadística

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa de computación Statistica 7.0. Para comparar las mediciones analíticas de las concentraciones utilizadas de cada herbicida, se realizó un test de *t* de Student. El análisis de los datos de mortalidad y el cálculo de las CL50 se realizó usando el programa de computación de análisis estadístico Probit (U. S. EPA, versión 1.5), basado en el método de Finney (1971) o por un método de interpolación lineal cuando el programa Probit no era aplicable (USEPA, 1899). Para analizar la relación concentración-respuesta se estimaron las curvas de dosis-respuesta a 96 h con sus límites de confianza al 95%. Los coeficientes de regresión y correlación fueron calculados para estimar la significancia de cada curva (Zar, 2010). Para el análisis de los efectos inducidos por los herbicidas utilizados respecto al control positivo en los ensayos agudos se realizó un ANOVA de una vía junto con el test *a posteriori* de Tukey. De la misma manera, para comparar los efectos observados inducidos por las concentraciones evaluadas de cada herbicida con el control negativo se realizó un ANOVA de una vía junto con el test *a posteriori* de Dunnet, lo que permitió estimar los valores de LOEC y NOEC. Para el análisis de los

efectos inducidos por los herbicidas luego del ensayo crónico se realizó un ANOVA de dos vías junto con el test *a posteriori* de Tukey.

Los supuestos del ANOVA fueron corroborados con el test de Bartlett de homogeneidad de varianza y un test de χ^2 para la normalidad. En los casos en que estos supuestos no fueron cumplidos los datos se analizaron realizando el método no paramétrico Kruskal-Wallis. Para los puntos finales letales y subletales (mortalidad, comportamiento, MNs, CBs, BNs, NLs, y ENs, células dañadas, IDG y biomarcadores enzimáticos) se calculó la proporción de individuos afectados por cada acuario. Posteriormente, se realizó una transformación angular de cada proporción utilizando la transformación arcoseno. Para evaluar la relación entre las concentraciones y los resultados se realizó una regresión lineal simple y un análisis de correlación. Finalmente, el análisis para realizar la comparación en el EC modificado con enzimas de restricción del DO producido por cada enzima respecto al buffer de la enzima se realizó un test de *t* de Student para diferencia de medias (Zar, 2010). El nivel de significancia tomado para todos los análisis fue 0,05; a menos que se indicara lo contrario.

4. Resultados

Las Tablas y Figuras presentadas en las secciones 4.2.1-4.2.4 y 4.2.7 corresponden a las presentadas en los trabajos publicados incluidos en el Anexo I de la presente Tesis Doctoral. Las mismas han sido graficadas nuevamente en la presente Sección para facilitar la lectura e interpretación de los resultados.

4.1 Mediciones analíticas de las concentraciones utilizadas (Publicaciones I, II, III, IV y V)

A lo largo del presente trabajo de Tesis Doctoral se realizaron los correspondientes análisis químicos de las soluciones preparadas al inicio de cada experimento (tiempo 0 h) como a las 24 h de su preparación. El test de *t* de Student realizado entre los resultados obtenidos y brindados por la empresa encargada de su determinación revelaron que no hubieron diferencias significativas entre las concentraciones del ingrediente activo, tanto para el herbicida DIC como para 2,4-D. (rango de concentración, $97 \pm 5\%$ recuperación) ($P > 0,05$).

4.2 Bioensayos agudos

4.2.1 Efectos letales. Determinación de la concentración letal media (CL50) (Publicaciones I y II)

El análisis de la mortalidad mediante el método Probit permitió la determinación de la CL50 tanto para el p.a. DIC como para el 2,4-D presentes en las formulaciones comerciales Banvel® y DMA®, respectivamente. Las estimaciones fueron realizadas a las 24, 48, 72 y 96 h de exposición.

Los datos de mortalidad obtenidos en ejemplares de *C. decemmaculatus* luego del tratamiento con el herbicida DIC presente en la formulación comercial Banvel® se presentan en la Tabla 4.1 (ver Publicación I). Los resultados mostraron los siguientes valores de CL50: CL50_{24h}= 2358 mg/L (rango, 714–7812), CL50_{48h}= 2473 mg/L (rango, 2144–3087), CL50_{72h}= 1941 mg/L (rango, 1725–2216) y CL50_{96h}= 1639 mg/L (rango, 1471–1808).

Tabla 4.1

Efectos letales observados en *Cnesterodon decemmaculatus* luego de la exposición aguda a dicamba presente en su formulación comercial Banvel®

Número de individuos	Concentración (mg/L)	Mortalidad (número de individuos muertos)			
		24 h	48 h	72 h	96 h
30	CN ^a	1	1	1	1
30	816	3	3	3	3
30	1152	2	2	2	7
30	1296	2	3	9	12
30	1440	2	6	10	12
30	1584	5	6	10	13
30	1728	0	13	16	17
30	2208	3	9	16	18
30	2688	3	13	21	27
30	2880	15	22	24	30
30	CP ^b	4	8	11	14

^a, CN: Control negativo; ^b, CP: Control positivo: 21,4 mg Cr_(VI)/L.

Un análisis de regresión reveló que los valores de CL50 no fueron afectados por el tiempo de exposición a DIC ($r = -0,90$, $P > 0,05$).

Los datos de mortalidad en *C. decemmaculatus* luego de la exposición al formulado comercial basado en el herbicida 2,4-D, DMA®, se presentan en la Tabla 4.2 (ver Publicación II). Las CL50 obtenidas fueron las siguientes: CL50_{24h}= 1647 mg/L (rango, 1556–1777), CL50_{48h}= 1247 mg/L (rango, 1192–1295), CL50_{72h}= 1081 mg/L (rango, 1007–1142) y CL50_{96h}= 1008 mg/L (rango, 929–1070).

Tabla 4.2

Efectos letales observados en *Cnesterodon decemmaculatus* luego de la exposición aguda a ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) presente en la formulación comercial DMA®

Número de individuos	Concentración (mg/L)	Mortalidad (número de individuos muertos)			
		24 h	48 h	72 h	96 h
30	CN ^a	0	0	0	0
30	100	0	0	0	0
30	250	0	0	0	0
30	400	0	0	0	0
30	800	3	4	5	7
30	1100	3	8	12	15
30	1200	3	15	23	25
30	1300	7	14	20	23
30	1400	6	20	25	28
30	1600	8	30	30	30
30	2200	29	30	30	30
30	CP ^b	4	8	11	14

^a, CN: Control negativo; ^b, CP: Control positivo: Cr_(VI) (21,4 mg/L).

Analizando los valores de mortalidad en función del tiempo, se puede observar una tendencia a la disminución de la CL50 a lo largo del tratamiento continuo con 2,4-D, pero la misma no alcanza valores estadísticamente significativos luego de realizado el análisis de regresión ($r = 0,94$, $P > 0,05$).

4.2.2 Efectos subletales. Análisis en los patrones de comportamiento (publicaciones I y II)

Se evaluaron cambios en el comportamiento en ejemplares de *C. decemmaculatus* expuestos a distintas concentraciones de DIC y 2,4-D presentes en las formulaciones comerciales Banvel® y DMA®, respectivamente. Dentro de las alteraciones comportamentales se analizaron los siguientes patrones: aglomeración en el fondo del acuario (AFA), movimientos lentos (ML), natación anormal (NA) y reacción lenta (RL). Los individuos afectados con cada tipo de alteración comportamental para los herbicidas DIC y 2,4-D se presentan en la Tabla 4.A.

Tabla 4.A

Individuos afectados con alteraciones en el comportamiento registrados en *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos al herbicida dicamba en su formulación comercial Banvel^{®a} y al formulado 2,4-D en su formulación comercial DMA[®]

Compuesto	Concentración (mg/L)	24 h				48 h				72 h				96 h			
		ML	AFA	RL	NA	ML	AFA	RL	NA	ML	AFA	RL	NA	ML	AFA	RL	NA
DIC	0	0	12	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0
	1200	0	15	0	0	0	15	0	0	6	24	24	9	6	9	6	9
	1350	3	15	3	0	15	15	0	0	21	21	15	9	6	24	6	9
	1500	15	30	9	0	6	9	0	0	18	18	12	12	27	27	12	9
	1650	15	18	3	0	3	15	6	6	18	24	24	15	21	21	21	21
	1800	30	30	18	12	12	15	6	9	12	12	12	3	12	12	12	9
	2300	30	30	30	12	24	24	21	21	18	21	21	9	18	18	18	9
	2800	30	27	18	12	21	21	21	21	18	18	18	12	9	9	9	9
2,4-D	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0	0	15	0	0
	800	14	24	10	16	13	24	14	16	15	25	7	17	7	22	8	15
	1100	13	20	9	14	11	19	15	16	12	16	14	17	5	6	7	14
	1200	15	17	15	21	10	11	9	16	5	5	7	7	2	4	2	5
	1300	13	15	18	18	8	9	15	15	9	9	9	9	2	6	2	6
	1400	12	10	13	13	0	4	6	10	2	1	2	5	1	1	2	2
	1600	6	6	13	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2200	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

AFA, aglomeración en el fondo del acuario; ML, movimiento lento; RL, reacción lenta; NA, natación anormal.

Los valores de NOEC y LOEC de cada cambio comportamental observado para los herbicidas DIC y 2,4-D se presentan en la Tabla 4.3 y 4.4, respectivamente.

Tabla 4.3

Efectos en el comportamiento de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos al herbicida dicamba en su formulación comercial Banvel^{®a}

Tiempo de exposición (h)	Efecto	NOEC		LOEC	
		Número de animales analizados	Valor ^a	Número de animales analizados	Valor ^a
24	AFA	28	1296	28	1440***
	ML	28	1296	28	1440***
	RL	28	1296	28	1440**
	NA	25	1584	30	1728***
48	AFA	24	1584	17	1728*
	ML	28	1152	27	1296**
	RL	17	1728	21	2208***
	NA	24	1440	24	1584*
72	AFA	29	0	28	1152***
	ML	28	1152	21	1296***
	RL	29	0	28	1152***
	NA	29	0	28	1152***
96	AFA	23	1152	18	1296*
	ML	18	1296	18	1440***
	RL	18	1296	18	1440*
	NA	29	0	23	1152*

^a, Resultados expresados en mg/L. AFA, aglomeración en el fondo del acuario; ML, movimiento lento; RL, reacción lenta; NA, natación anormal. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; diferencias significativas con respecto al control negativo.

Luego de la exposición a DIC (ver Publicación I), se observó el efecto AFA con valores de NOEC y LOEC de 1296 y 1440 mg/L; 1584 y 1728 mg/L; 0 y 1152 mg/L; 1152 y 1296 mg/L de DIC en peces expuestos por 24 ($P < 0,001$), 48 ($P < 0,05$), 72 ($P < 0,001$) y 96 h ($P < 0,05$), respectivamente. Para ML, los valores de NOEC y LOEC encontrados fueron de 1296 y 1440 mg/L para 24 y 96 h ($P < 0,001$) y de 1152 y 1296 mg/L para las 48 ($P < 0,01$) y 72 h de exposición ($P < 0,001$), respectivamente. El efecto RL fue observado con valores de NOEC y LOEC de 1296 y 1440 mg/L, 1728 y 2208 mg/L; 0 y 1152 mg/L; 1296 y 1440 mg/L de DIC en especímenes expuestos por 24 ($P < 0,01$), 48

($P < 0,001$), 72 h ($P < 0,001$) y 96 h ($P < 0,05$), respectivamente. Finalmente, NA fue observada a todos los tiempos, obteniendo valores de NOEC y LOEC de 1584 y 1728 mg/L para 24 h de tratamiento ($P < 0,001$), 1440 y 1584 mg/L para 48 h de exposición ($P < 0,05$) y de 0 y 1152 para 72 ($P < 0,001$) y 96 h ($P < 0,05$) de tratamiento (Tabla 4.3).

Luego de la exposición de *C. decemmaculatus* al herbicida 2,4-D (ver Publicación II), se observaron cambios en AFA sólo en aquellos peces expuestos por 24 h ($P < 0,01$) con valores de NOEC y LOEC de 400 y 800 mg/L 2,4-D, respectivamente. El efecto AFA no fue observado en los peces expuestos por 48, 72 ni 96 h de exposición ($P > 0,05$). Valores similares de NOEC y LOEC fueron obtenidos para ML tras 24 h ($P < 0,01$) y 48 h ($P < 0,001$) de exposición, no siendo observado este efecto a las 72 ni 96 h de exposición ($P > 0,05$). El efecto RL fue observado con valores de NOEC y LOEC de 400 y 800 mg/L para 24 ($P < 0,001$) y 48 h ($P < 0,01$) de exposición; y 800 y 1100 mg/L 2,4-D para 72 h ($P < 0,001$), respectivamente. El efecto RL no fue observado a las 96 h de exposición ($P > 0,05$).

Por último, la única anomalía observada durante todo el experimento fue la presencia de NA ($P < 0,01$) con valores de NOEC y LOEC de 400 y 800 mg/L 2,4-D para 24, 48, 72 y 96 h de exposición (Tabla 4.4).

Tabla 4.4

Efectos en el comportamiento de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos al herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en su formulación comercial DMA^{®a}

Tiempo de exposición (h)	Efecto	NOEC		LOEC	
		Número de animales analizados	Valor ^a	Número de animales analizados	Valor ^a
24	AFA	30	400	27	800**
	ML	30	400	27	800**
	RL	30	400	27	800***
	NA	30	400	27	800**
48	AFA	-	-	-	-
	ML	30	400	26	800***
	RL	30	400	26	800**
	NA	30	400	26	800***
72	AFA	-	-	-	-

	ML	-	-	-	-
	RL	25	800	18	1100***
	NA	30	400	25	800***
96	AFA	-	-	-	-
	ML	-	-	-	-
	RL	-	-	-	-
	NA	30	400	23	800**

^a, Resultados expresados en mg/L. ML, movimiento lento; AFA, aglomeración en el fondo del acuario; RL, reacción lenta; NA, natación anormal. **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; diferencias significativas con respecto al control negativo.

4.2.3 Estudios a nivel citogenético. Cuantificación de la frecuencia de micronúcleos y anormalidades nucleares (publicaciones I y II)

Los resultados del análisis de MNs en eritrocitos circulantes de *C. decemmaculatus* expuestos a 410, 820 y 1229 mg/L de DIC en su formulado comercial Banvel® se muestran en la Tabla 4.5 (ver Publicación I). Se observó un aumento significativo de la frecuencia de MNs en los eritrocitos circulantes de los peces expuestos a CF (control positivo, 5 mg/L) a las 48 h de tratamiento ($P < 0,05$) pero no en los individuos expuestos durante 96 h ($P > 0,05$). Luego del tratamiento con diferentes concentraciones de DIC se observó que los peces expuestos a la concentración más alta (1229 mg/L) de DIC por 48 h mostraron un aumento en la frecuencia de MNs ($P < 0,05$), pero dicho incremento no se observó en peces expuestos por 96 h ($P > 0,05$) en ninguna de las concentraciones ensayadas. Cuando se analizaron otras ANs diferentes a los MNs, se observó un aumento significativo únicamente a 48 h de tratamiento. Analizando la frecuencia de ENs, se observó un incremento significativo en peces expuestos a las tres concentraciones ensayadas 410, 820 y 1229 mg/L de DIC ($P < 0,001$, $P < 0,05$, and $P < 0,001$, respectivamente). Adicionalmente, sólo el tratamiento con 1229 mg/L del herbicida mostró un aumento en la frecuencia de EBs ($P < 0,01$) y NLs ($P < 0,01$). Por otra parte, el tratamiento con el herbicida DIC no modificó la frecuencia de BN cuando fue comparado con los controles negativos e independientemente de la concentración ensayada ($P > 0,05$). Finalmente, a 96 h de exposición, no se observaron diferencias significativas entre las frecuencias de ANs con respecto a los controles negativos ($P > 0,05$). Sin embargo, cuando se analizaron las frecuencias de NL en peces expuestos a 1229 mg/L de DIC, se pudo ver

una tendencia a su incremento cuando fueron comparadas con el control negativo, aunque esta diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa ($P > 0,05$) (Tabla 4.5).

Tabla 4.5

Frecuencia (%) de MNs y otras anomalías nucleares en eritrocitos de sangre periférica de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos al herbicida dicamba en su formulación comercial Banvel®^a

Tiempo de exposición (h)	Concentración (mg/L)	Número de animales analizados	Número de células analizadas	MNs ^b	Otras Anomalías Nucleares ^b			
					ENs	NLs	EBs	BN
48	CN ^c	15	22599	0,09 ± 0,04	1,86 ± 0,34	0,04 ± 0,04	0,00 ± 0,00	1,77 ± 0,33
	410	15	23032	0,09 ± 0,09	6,13 ± 0,98***	0,18 ± 0,12	0,00 ± 0,00	3,10 ± 0,88
	820	15	23132	0,22 ± 0,10	3,94 ± 0,92*	0,17 ± 0,07	0,04 ± 0,04	3,54 ± 0,84
	1229	15	22837	0,44 ± 0,14*	8,43 ± 1,55***	0,70 ± 0,28**	0,35 ± 0,15**	4,63 ± 1,30
	CP ^d	15	22632	0,44 ± 0,15*	4,52 ± 0,81*	0,09 ± 0,06	0,00 ± 0,00	4,07 ± 0,59
96	CN ^c	15	22583	0,13 ± 0,07	2,96 ± 0,71	0,04 ± 0,04	0,00 ± 0,00	1,77 ± 0,44
	410	15	22771	0,48 ± 0,22	7,00 ± 2,42	0,22 ± 0,18	0,04 ± 0,04	4,12 ± 1,21
	820	15	22664	0,22 ± 0,08	4,35 ± 0,93	0,53 ± 0,23	0,00 ± 0,00	2,78 ± 0,77
	1229	14	22731	0,13 ± 0,07	7,15 ± 1,87	0,81 ± 0,34	0,04 ± 0,04	3,56 ± 0,77
	CP ^d	15	23035	0,47 ± 0,16	8,24 ± 2,18	0,44 ± 0,16	0,13 ± 0,09	4,10 ± 1,09

^a, Los resultados son expresados como el número medio de anomalías/1000 células ± EE. ^b, MNs, micronúcleos; ENs, escotaduras nucleares; NLs, núcleos lobulados; EBs, eritrocitos binucleados; BNs: brotes nucleares. ^c, CN: Control negativo. ^d, CP: Control positivo: ciclofosfamida (CF, 10 mg/L). *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; diferencias significativas con respecto al control negativo

Los resultados del análisis de MNs en eritrocitos circulantes de *C. decemmaculatus* expuestos a 252, 504 y 756 mg/L de 2,4-D en su formulado comercial DMA[®] se muestran en la Tabla 4.6 (ver Publicación II). Los resultados mostraron un aumento en la frecuencia de MNs en peces expuestos a CF (control positivo, 10 mg/L) al cabo de 48 h de tratamiento ($P < 0,05$), pero no en aquellos peces expuestos a CF por 96 h ($P > 0,05$). Luego del tratamiento con 2,4-D y al cabo 48 h de exposición, se observó un aumento significativo en la frecuencia de MNs en peces tratados con 252, 504 y 756 mg/L de 2,4-D respecto a los valores del control negativo ($P < 0,05$; $P < 0,01$ y $P < 0,001$ respectivamente). Cuando realizamos la misma comparación a las 96 h de exposición, se registró un aumento significativo en la frecuencia de MNs en todas las concentraciones ensayadas ($P < 0,001$) (Tabla 4.6). Un análisis de regresión reveló que el incremento en la frecuencia de MNs no fue afectado por la concentración de 2,4-D a las 48 ($P > 0,05$; $r = 0,24$) ni a 96 h de exposición ($P > 0,05$; $r = 0,05$). Cuando otras ANs diferentes de MNs fueron analizadas, se observó un aumento en la frecuencia de ENs únicamente en aquellos individuos expuestos a 504 mg/L 2,4-D durante 96 h ($P < 0,01$). Adicionalmente, un aumento en la frecuencia de BNs fue observada, luego de 48 h de tratamiento, sólo en aquellos ejemplares expuestos a 756 mg/L ($P < 0,05$), y luego de 96 h de tratamiento en peces expuestos a 504 mg/L ($P < 0,05$). Luego del tratamiento con 2,4-D contenido en la formulación comercial DMA[®] no se registraron variaciones en las frecuencias de NLs y CBs, independientemente de la concentración y del tiempo de exposición ($P > 0,05$; Tabla 4.6).

Tabla 4.6

Frecuencia (%) de MNs y otras anomalías nucleares en eritrocitos de sangre periférica de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos al herbicida su formulación comercial DMA^a en su formulación comercial DMA^a

Tiempo de exposición (h)	Concentración (mg/L)	Número de animales analizados	Número de células analizadas	MNs ^b	Otras Anomalías Nucleares ^b			
					ENs	NLs	EBs	BN
48	CN ^c	15	22814	0,09 ± 0,06	3,78 ± 0,95	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,01 ± 0,24
	252	15	22571	0,58 ± 0,15*	3,15 ± 0,71	0,09 ± 0,06	0,04 ± 0,04	0,93 ± 0,25
	504	15	22189	0,94 ± 0,26**	4,55 ± 1,15	0,09 ± 0,09	0,00 ± 0,00	1,27 ± 0,38
	756	15	22568	1,06 ± 0,21***	3,06 ± 0,85	0,00 ± 0,00	0,09 ± 0,08	3,77 ± 1,19*
	CP ^d	15	22595	0,53 ± 0,11*	4,74 ± 0,78	0,09 ± 0,06	0,00 ± 0,00	3,94 ± 0,60**
96	CN ^c	15	22601	0,13 ± 0,07	2,12 ± 0,65	0,04 ± 0,04	0,00 ± 0,00	1,33 ± 0,42
	252	15	22586	1,06 ± 0,23***	3,54 ± 0,73	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	2,08 ± 0,49
	504	15	22621	1,46 ± 0,25***	5,43 ± 0,82**	0,66 ± 0,47	0,09 ± 0,08	3,48 ± 0,82*
	756	14	21130	1,37 ± 0,29***	2,94 ± 0,47	0,14 ± 0,10	0,05 ± 0,04	1,14 ± 0,34
	CP ^d	15	22921	0,43 ± 0,16	8,88 ± 2,13	0,44 ± 0,16	0,09 ± 0,08	4,29 ± 1,09**

^a, Los resultados son expresados como el número medio de anomalías/1000 células ± EE. ^b, MNs, micronúcleos; ENs, escotaduras nucleares; NLs, núcleos lobulados; EBs, eritrocitos binucleados; BN: brotes nucleares. ^c, CN: Control negativo. ^d, CP: Control positivo: ciclofosfamida (CF, 10 mg/L). *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$; diferencias significativas con respecto al control negativo.

4.2.4 Cuantificación de la inducción de lesiones primarias en la molécula de ADN mediante electroforesis en gel de células únicas o Ensayo Cometa (variante alcalina)(publicaciones I y II)

Los resultados del EC obtenidos para células sanguíneas circulantes de *C. decemmaculatus* expuestos durante 48 y 96 h a 410, 820 y 1229 mg/L del herbicida DIC en su formulación comercial Banvel® se presentan en la Tabla 4.7. Asimismo, los valores medios de las frecuencias de nucleoides con distintos grados de daño se grafican en la Figura 4.1 (ver Publicación I).

Los peces tratados con CF (control positivo, 20 mg/L) mostraron un aumento en el IDG y en el porcentaje de nucleoides dañados tanto en individuos expuestos por 48 como por 96 h ($P < 0,001$). En individuos expuestos a DIC, se observó un aumento significativo del IDG en todos los tratamientos, tanto a las 48 como a las 96 h de

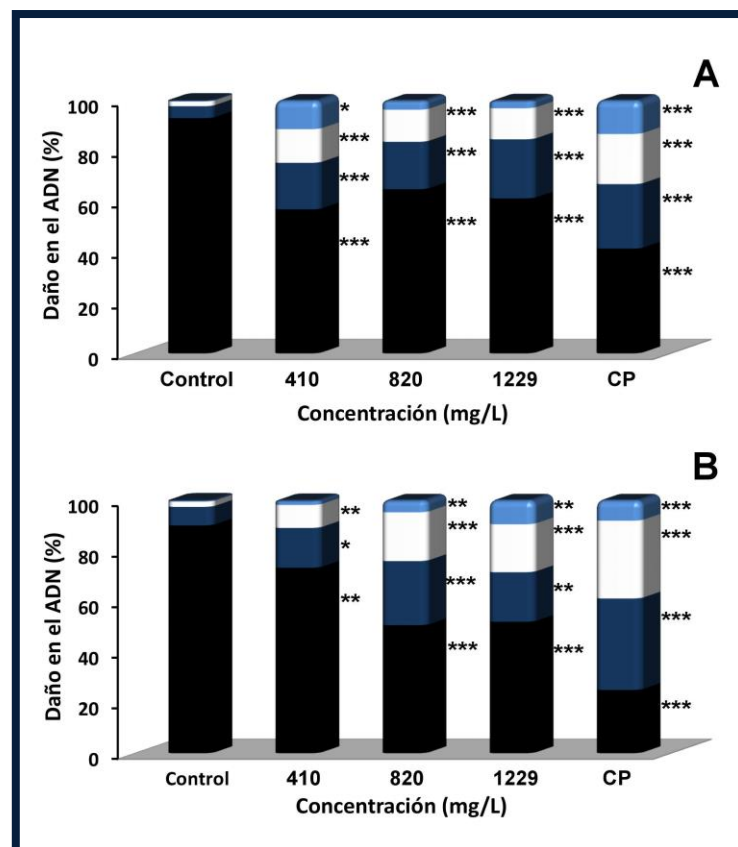


Figura 4.1: Frecuencias de nucleoides en individuos de *C. decemmaculatus* expuestos al herbicida dicamba en su formulación comercial Banvel® luego de 48 (A) y 96 h (B). Barra negra: nucleoides no dañados, tipo 0-I; barra azul: tipo II; barra blanca: tipo III y barra celeste: tipo IV.

exposición ($P < 0,001$). Esta alteración en el IDG se debió, a las 48 h de exposición, a un aumento en la frecuencia de los nucleoides tipo II y III ($P < 0,001$) al igual que a una disminución concomitante de los nucleoides tipo 0-I ($P < 0,001$).

Además, se observó un aumento en los nucleoides tipo IV en los peces tratados por 410 mg/L por 48 h ($P < 0,05$). A las 96 h de exposición, esta alteración se debió al aumento en la frecuencia de los nucleoides tipo II y III en el rango de concentraciones de 410-1229 mg/L ($P < 0,05$) y a una disminución de los nucleoides tipo 0-I ($P < 0,01$). Adicionalmente, aumentó la frecuencia de los nucleoides tipo IV ($P < 0,01$) en los individuos tratados con las concentraciones 820 y 1229 mg/L de DIC durante 96 h. Finalmente, un análisis de regresión demostró que el IDG aumentó en función de la concentración de DIC a las 96 h ($r = -0,40$; $P < 0,01$), pero no así a las 48 h de tratamiento ($r = 0,12$; $P > 0,05$).

Tabla 4.7

Análisis del daño en el ADN medido con el Ensayo Cometa en células sanguíneas de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos al herbicida dicamba en su formulado comercial Banvel®

Compuestos	Concentración (mg/L)	Tiempo de exposición (h)	Número de animales analizados	Número de nucleoides analizados	% de nucleoides dañados (II+III+IV)	IDG ± EE ^a
CN ^b		48	13	1126	6,93	0,73 ± 0,08
		96	15	1607	9,89	0,67 ± 0,06
Dicamba	410	48	15	1531	43,04 ***	1,65 ± 0,15***
		96	15	1442	26,63 **	1,23 ± 0,09***
	820	48	15	1631	35,07 ***	1,21 ± 0,14***
		96	15	1596	49,37 ***	1,60 ± 0,11***
	1229	48	15	1647	38,68 ***	1,28 ± 0,09***
		96	13	1345	48,03 ***	1,70 ± 0,14***
CP ^c	10	48	15	1528	58,57 ***	1,90 ± 0,12***
		96	15	1567	74,98 ***	2,14 ± 0,09***

^a, IDG: Índice de daño genético. EE: Error estándar ^b, CN: Control negativo. ^c, CP: Control positivo: ciclofosfamida (CF, 10 mg/L). *** $P < 0,001$; diferencias significativas con respecto al control negativo

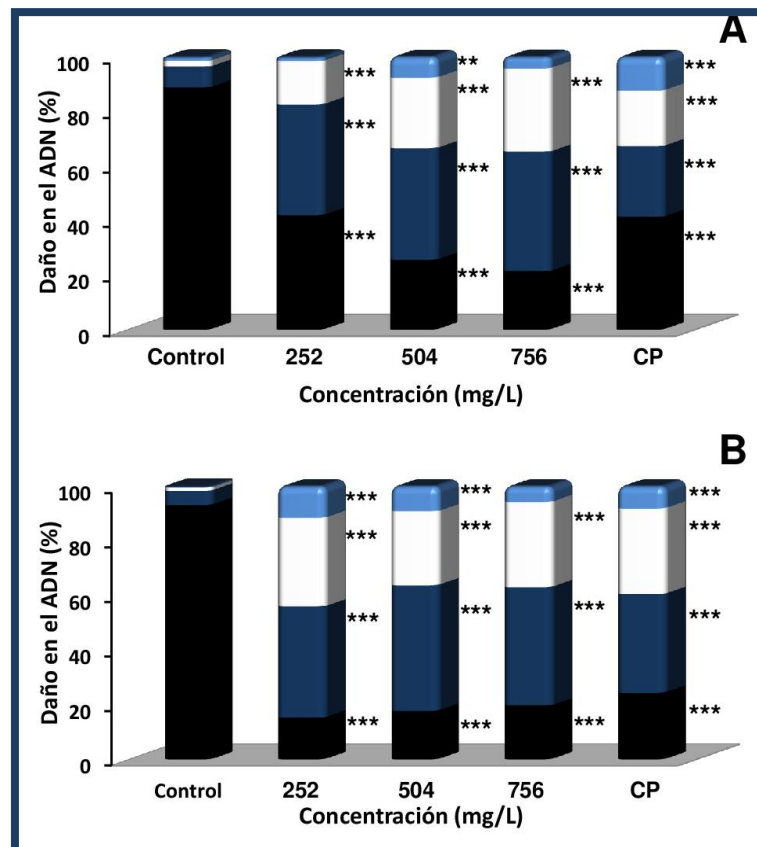


Figura 4.2: Frecuencias de nucleóides en individuos de *C. decemmaculatus* expuestos al herbicida 2,4-D en su formulación comercial DMA® luego de 48 (A) y 96 h (B). Barra negra: nucleóides no dañados, tipo 0-I; barra azul: tipo II; barra blanca: tipo III y barra celeste: tipo IV.

Los resultados obtenidos en el EC luego de la exposición a 252, 504 y 756 mg/L de 2,4-D en su formulación comercial DMA® durante 48 y 96 h de tratamiento se muestran en la Tabla 4.8, y la media de las frecuencias de nucleóides con distintos grados de daño se grafican en la Fig. 4.2 (ver Publicación II). El tratamiento con CF indujo un aumento en el IDG y en el porcentaje de nucleóides daños luego de 48 y 96 h de exposición ($P < 0,001$). En los peces expuestos a 2,4-D se observó un aumento significativo del IDG en todos los tratamientos (252, 504 y 756 mg/L) tanto a las 48 como a 96 h de exposición ($P < 0,001$). En especímenes expuestos por 48 h, esta alteración fue debida a un aumento en la frecuencia de los nucleóides tipo II y III ($P < 0,001$) en todas las concentraciones ensayadas, a un aumento en la frecuencia de nucleóides tipo IV en los peces tratados con 504 mg/L durante 48 h ($P < 0,01$) y a una disminución de los nucleóides tipo 0-I ($P < 0,001$).

Cuando el mismo análisis se realizó al cabo de 96 h de exposición, la alteración del IDG fue debida al aumento de la frecuencia de los nucleoides tipo II y III para todos los tratamientos efectuados ($P < 0,001$) y a una disminución de los nucleoides tipo 0-I ($P < 0,001$). Un análisis de regresión demostró que la variación del IDG fue dependiente de la concentración para las 48 h de exposición, pero no para las 96 h ($P < 0,01$; $P > 0,05$; respectivamente).

Tabla 4.8

Análisis del daño en ADN medido con el ensayo cometa en células sanguíneas de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos de manera aguda al herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en su formulación DMA®

Compuestos	Concentración (mg/L)	Tiempo de exposición (h)	Número de animales analizados	Número de nucleoides analizados	% de nucleoides dañados (II+III+IV)	IDG ± EE ^a
CN ^b		48	15	1547	11,25	0,69 ± 0,09
		96	15	1601	6,75	0,60 ± 0,05
2,4-D	252	48	15	1639	58,08***	1,57 ± 0,08***
		96	15	1575	84,70***	2,26 ± 0,12***
	504	48	15	1414	74,40***	2,29 ± 0,09***
		96	15	1704	82,22***	2,00 ± 0,10***
	756	48	15	1728	78,59***	1,85 ± 0,10***
		96	15	1584	80,30***	2,13 ± 0,07***
CP ^c	10	48	15	1633	58,67***	1,83 ± 0,09***
		96	15	1463	75,60***	2,26 ± 0,08***

^a, IDG: Índice de daño genético. EE: Error estándar ^b, CN: Control negativo. ^c, CP: Control positivo: ciclofosfamida (CF, 10 mg/L). *** $P < 0,001$; diferencias significativas con respecto al control negativo.

4.2.5 Cuantificación de la inducción de lesiones primarias en el ADN mediante electroforesis en gel de células únicas o Ensayo Cometa alcalino modificado con enzimas de restricción (publicación V)

Los resultados del EC modificado con la incorporación de las endonucleasas de restricción Endo III y Fpg obtenidos para eritrocitos circulantes de *C. decemmaculatus*, expuestos por 48 y 96 h a 410 mg/L DIC o 252 mg/L 2,4-D se presentan en la Tabla 4.9

y en la Tabla 4.10, respectivamente, y los niveles de daño oxidativo (DO), se grafican en la Figura 4.3 (ver publicación V). Se verificó la capacidad de Endo III y Fpg para reconocer bases oxidadas en el ADN de ejemplares de *C. decemmaculatus* mediante la incubación de los nucleoides con un agente clastógeno de reconocida capacidad de inducción de daño oxidativo. Para ello, se utilizó 50 μM de H_2O_2 como control positivo. Luego del tratamiento con H_2O_2 , el análisis demostró un aumento en el porcentaje de nucleoides dañados, IDG y niveles de DO en los preparados tratados con el CP que fueron posteriormente incubados con las enzimas Endo III y Fpg en relación a los valores obtenidos en las preparaciones no tratadas con las endonucleasas ($P < 0,001$) (Tabla 4.9; Fig.4.3).

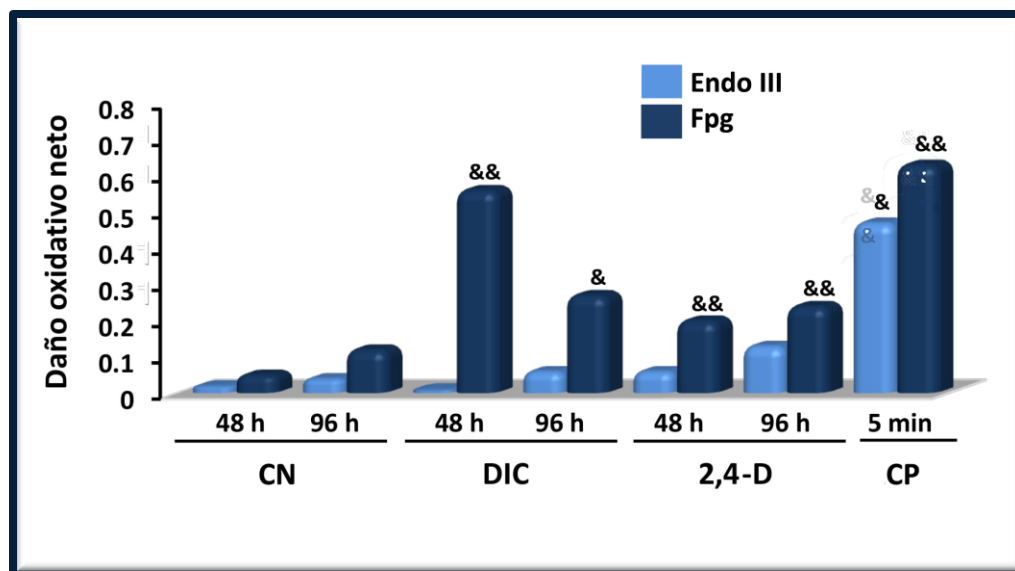


Figura 4.3: Daño oxidativo neto (DO) inducido por los herbicidas dicamba y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en sus formulados comerciales Banvel® y DMA®, respectivamente. Barra celeste: post-tratamiento con Endo III; Barra azul oscuro: post-tratamiento con Fpg. El DO fue calculado como la diferencia entre los IDG obtenidos luego de la incubación con la enzima y con el buffer. H_2O_2 fue usado como control positivo. &, $P < 0,05$; &&, $P < 0,01$; diferencias significativas con el respectivo buffer de enzima.

En los individuos expuestos a la formulación comercial de DIC, el valor de IDG fue 4,06 y 2,54 veces mayor respecto al control negativo luego de 48 y 96 h de tratamiento, respectivamente ($P < 0,001$; Tabla 4.9). Estas diferencias resultaron del aumento en la frecuencia de todas las categorías de nucleoides dañados (tipos II—IV; $0,01 > P < 0,001$) y a una disminución en la frecuencia de los nucleoides no dañados para ambos tiempos de exposición (tipo 0—I; $P < 0,001$; Tabla 4.9).

Luego del post-tratamiento con Fpg se observó un aumento en el IDG y en el DO cuando los resultados fueron comparados con los observados en ausencia de endonucleasas (células tratadas sólo con buffer-Fpg) en peces expuestos a DIC durante tanto 48 ($P < 0,01$) como 96 h ($P < 0,05$) (Tabla 4.9; Fig. 4.3). Las diferencias observadas

Tabla 4.9

Análisis del daño en el ADN medido con el Ensayo Cometa modificado en células de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos de manera aguda al herbicida dicamba en su formulado comercial Banvel®

Compuestos	Tiempo de exposición (h)	Tratamiento	Nº de animales analizados	Nº de nucleoides analizados	% de nucleoides por categoría de daño				% de nucleoides dañados (II+III+IV)	IDG ^a ± EE		
					Tipo 0+I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV				
CN ^b	48 h	-	10	1036	92,47	7,24	0,29	0,00	7,53	0,49 ± 0,12		
		Buffer Endo III	10	1045	57,51 [#]	38,76 [#]	3,73 [#]	0,00	42,49 [#]	1,46 ± 0,04 [#]		
		Endo III	10	1014	54,73 [#]	43,00 [#]	2,27	0,00	45,27 [#]	1,48 ± 0,04 [#]		
		Buffer Fpg	10	1056	58,90 [#]	33,52 [#]	7,58 [#]	0,00	41,10 [#]	1,48 ± 0,03 [#]		
		Fpg	10	1024	51,86 [#]	42,29 [#]	5,85 [#]	0,00	48,14 [#]	1,53 ± 0,06 [#]		
		-	9	946	91,86	7,72	0,42	0,00	8,14	0,48 ± 0,12		
	96 h	Buffer Endo III	10	1016	59,84 [#]	36,02 [#]	4,14 [#]	0,00	40,16 [#]	1,44 ± 0,04 [#]		
		Endo III	10	1036	54,63 [#]	42,08 [#]	3,29	0,00	45,37 [#]	1,48 ± 0,04 [#]		
		Buffer Fpg	10	1022	61,25 [#]	34,15 [#]	4,60 [#]	0,00	38,75 [#]	1,43 ± 0,02 [#]		
		Fpg	10	1070	47,29 [#]	46,64 [#]	6,07 [#]	0,00	52,71 [#]	1,58 ± 0,05 [#]		
		Dicamba	48 h	410 mg/L	10	1001	40,46***	27,27***	18,18***	14,09***	59,54***	1,99 ± 0,16***
				Buffer Endo III	10	1046	15,87***	41,59	30,11***	12,43***	84,13***	2,39 ± 0,13***
Endo III	10			1019	15,80***	41,51	30,32***	12,37***	84,20***	2,40 ± 0,06***		
Buffer Fpg	10			1023	15,84***	41,35	30,11***	12,70***	84,16***	2,40 ± 0,13***		
Fpg	10			1011	8,51***	19,09***&&	40,36***&	32,04***&&	91,49***	2,96 ± 0,06***&&		
-	9			946	91,86	7,72	0,42	0,00	8,14	0,48 ± 0,12		
96 h	410 mg/L		10	1100	73,64***	16,73**	8,27***	1,36	26,36***	1,22 ± 0,11***		
	Buffer Endo III		10	1011	37,88**	44,21**	16,72***	1,19***	62,12***	1,81 ± 0,03***		
	Endo III		10	1008	33,33**	49,50**	14,29***	2,88***	66,67***	1,87 ± 0,03***		
	Buffer Fpg		9	890	33,82**	51,01***	14,27***	0,90***	66,18***	1,82 ± 0,04***		
	Fpg		10	999	23,62***	45,55**	29,43***&	1,40***	76,38***	2,09 ± 0,11***&		
	-		9	946	91,86	7,72	0,42	0,00	8,14	0,48 ± 0,12		
CP ^c	5 min	50 µM	10	1027	70,89*	21,52*	7,59*	0,00	29,11***	1,21 ± 0,15***		
		Buffer Endo III	10	1014	14,69***	45,96	34,22**	5,13**	85,31***	2,25 ± 0,14***		
		Endo III	10	1117	4,85***	38,77	37,59***	18,79***	95,15***	2,72 ± 0,16***&		
		Buffer Fpg	9	899	19,13***	44,38	32,26***	4,23**	80,87***	2,21 ± 0,13***		
		Fpg	9	907	6,95***	26,90**	43,00***	23,15***	93,05***&&	2,84 ± 0,17***&&		
		-	9	946	91,86	7,72	0,42	0,00	8,14	0,48 ± 0,12		

^a, IDG: Índice de daño genético; ^b, CN: Control negativo; ^c, CP: Control positivo: peróxido de hidrógeno (H₂O₂, 50 µM). #, P < 0.001; diferencias significativas con respecto a los valores de control negativo. *, P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001; diferencias significativas con su respectivo grupo control. &, P < 0.01; &&, P < 0.01; diferencias significativas con su respectivo control de buffer de enzima.

en el daño en el ADN en peces expuestos a DIC por 48 h con la incubación con Fpg fueron debido al aumento de la frecuencia de los nucleoides tipo II, III y IV ($0,05 > P < 0,01$). Adicionalmente, luego de 96 h de exposición, se observó un aumento de los nucleoides tipo III ($P < 0,05$) (Tabla 4.9). Contrariamente, el post-tratamiento con Endo III no indujo ninguna variación en el nivel de daño en el ADN, IDG y DO en peces expuestos a DIC, para ambos tiempos de exposición, cuando los resultados fueron comparados con el grupo tratado con buffer-Endo III (Tabla 4.9; Fig. 4.3).

En peces expuestos a la formulación comercial de 2,4-D, el valor de IDG fue 3,84 y 5,10 veces mayor al control negativo luego de 48 y 96 h de exposición, respectivamente ($P < 0,001$; Tabla 4.10). Estas diferencias resultaron del aumento en la frecuencia de todas las categorías de nucleoides dañados, tipos II ($P < 0,001$), III ($P < 0,001$) y IV ($P < 0,01$), y una disminución de la frecuencia de los nucleoides no dañados (tipo 0-I; $P < 0,001$; Tabla 4.10).

Luego del post-tratamiento con Fpg se observó un aumento en el IDG y en el DO, cuando los resultados fueron comparados contra el grupo sin tratamiento con la endonucleasa (células tratadas sólo con buffer-Fpg), en peces expuestos a 2,4-D durante tanto 48 como 96 h ($P < 0,01$) (Tabla 4.10; Fig. 4.3). Las diferencias observadas en el daño en el ADN en peces expuestos a 2,4-D tanto luego de 48 como de 96 h de exposición fue debido al aumento de la frecuencia de los nucleoides tipo II y IV ($0,05 < P < 0,001$; Tabla 4.10).

Por otro lado, el post-tratamiento con Endo III no indujo diferencias en el nivel de daño en el ADN, IDG y DO en nucleoides expuestos a 2,4-D tanto por 48 como por 96 h, cuando los resultados fueron comparados con aquellas preparaciones solamente expuestas al buffer-Endo III (Tabla 4.10; Fig. 4.3)

Tabla 4.10

Análisis del daño en el ADN medido con el Ensayo Cometa modificado en células de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos de manera aguda al herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en su formulado comercial DMA^a

Compuestos	Tiempo de exposición (h)	Tratamiento	Nº de animales analizados	Nº de nucleoides analizados	% de nucleoides por categoría de daño				% de nucleoides dañados (II+III+IV)	GDI ^a ± EE
					Tipo 0+I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV		
CN ^b	48 h	-	10	1036	92,47	7,24	0,29	0,00	7,53	0,49 ± 0,12
		Buffer Endo III	10	1045	57,51 [#]	38,76 [#]	3,73 [#]	0,00	42,49 [#]	1,46 ± 0,04 [#]
		Endo III	10	1014	54,73 [#]	43,00 [#]	2,27	0,00	45,27 [#]	1,48 ± 0,04 [#]
		Buffer Fpg	10	1056	58,90 [#]	33,52 [#]	7,58 [#]	0,00	41,10 [#]	1,48 ± 0,03 [#]
		Fpg	10	1024	51,86 [#]	42,29 [#]	5,85 [#]	0,00	48,14 [#]	1,53 ± 0,06 [#]
	96 h	-	9	946	91,86	7,72	0,42	0,00	8,14	0,48 ± 0,12
		Buffer Endo III	10	1016	59,84 [#]	36,02 [#]	4,14 [#]	0,00	40,16 [#]	1,44 ± 0,04 [#]
		Endo III	10	1036	54,63 [#]	42,08 [#]	3,29	0,00	45,37 [#]	1,48 ± 0,04 [#]
		Buffer Fpg	10	1022	61,25 [#]	34,15 [#]	4,60 [#]	0,00	38,75 [#]	1,43 ± 0,02 [#]
		Fpg	10	1070	47,29 [#]	46,64 [#]	6,07 [#]	0,00	52,71 [#]	1,58 ± 0,05 [#]
2,4-D	48 h	252 mg/L	10	1101	33,61***	43,51***	20,53***	2,35**	66,39***	1,88 ± 0,09***
		Buffer Endo III	10	1068	12,73***	45,13	39,61***	2,53**	87,27***	2,32 ± 0,04***
		Endo III	10	1042	14,40***	43,86	30,52***	11,22**	85,60***	2,38 ± 0,03***
		Buffer Fpg	10	1032	16,76***	47,09	33,14***	3,01***	83,24***	2,22 ± 0,03***
		Fpg	10	1021	15,77***	39,18 ^{&}	32,32***	12,73***&&&	84,23***	2,42 ± 0,06***&&
	96 h	252 mg/L	10	1058	13,80***	37,24***	35,73***	13,23***	86,20***	2,45 ± 0,16***
		Buffer Endo III	10	1048	9,35***	29,01*	39,31***	22,33***	90,65***	2,74 ± 0,05***
		Endo III	10	1007	9,04***	20,16***	45,68***	25,12***	90,96***	2,87 ± 0,06***
		Buffer Fpg	10	1048	9,26***	28,82***	40,17***	21,75***	90,74***	2,74 ± 0,05***
		Fpg	10	1021	6,37***	20,47***&	41,82***	31,34***&	93,63***	2,98 ± 0,06***&&
CP ^b	5 min	50 µM	10	1027	70,89*	21,52*	7,59*	0,00	29,11***	1,21 ± 0,15***
		Buffer Endo III	10	1014	14,69***	45,96	34,22**	5,13**	85,31***	2,25 ± 0,14***
		Endo III	10	1117	4,85***	38,77	37,59***	18,79***	95,15***	2,72 ± 0,16***&
		Buffer Fpg	9	899	19,13***	44,38	32,26***	4,23**	80,87***	2,21 ± 0,13***
		Fpg	9	907	6,95***	26,90**	43,00***	23,15***	93,05***&&	2,84 ± 0,17***&&

^a, IDG: Índice de daño genético; b, CN: Control negativo; b, CP: Control positivo: peróxido de hidrógeno (H₂O₂, 50 µM). [#], P < 0.001; diferencias significativas con respecto a los valores de control negativo. *, P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; diferencias significativas con su respectivo grupo control. &, P < 0.05; &&, P < 0.01; &&&, P < 0.001; diferencias significativas con su respectivo control de buffer de enzima.

4.2.6 Biomarcadores de estrés oxidativo (publicación V)

Los resultados del estrés oxidativo mediante la determinación de la actividad enzimática y no enzimática del estrés oxidativo estimados en la región media de *C. decemmaculatus* expuestos a 410 y 252 mg/L de DIC y 2,4-D, concentraciones equivalentes al 25% de las respectivas CL50_{96h}, contenidos en sus formulaciones comerciales Banvel® y DMA®, respectivamente, se encuentran detallados en la Tabla 4.11 (ver publicación V).

Los valores promedio de la actividad de CAT registrados para el control negativo fueron $12,86 \pm 2,34$ y $13,52 \pm 2,96$ $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ hidrolizado/min mg proteína para las 48 y las 96 h de exposición, respectivamente ($P > 0,05$). La actividad de la enzima CAT aumentó significativamente en los individuos expuestos durante 48 y 96 h tanto a DIC ($P < 0,001$) como a 2,4-D ($P < 0,001$ Tabla 4.10).

Los valores control registrados para la actividad de GST fueron $0,04 \pm 0,01$ $\mu\text{mol CDNB conjugado/min mg proteína}$ tanto para 48 como para 96 h de tratamiento ($P = 1,00$). En peces expuestos tanto a DIC como a 2,4-D la actividad de GST se vio aumentada de manera significativa comparada con los valores registrados para el control negativo tanto a las 48 ($0,05 > P < 0,01$) como a las 96 h de exposición ($P < 0,001$; Tabla 4.11).

Al analizar los valores de los controles, la actividad promedio de GSH fue $3,17 \pm 0,56$ y $2,60 \pm 0,16$ $\mu\text{mol/g peso húmedo}$ a las 48 y 96 h de exposición, respectivamente ($P > 0,05$). En peces expuestos a DIC, la concentración de GSH decreció con respecto a los valores control a las 48 h de exposición ($P < 0,05$) pero no a las 96 h ($P > 0,05$). Al analizar la actividad de GSH en peces expuestos a 2,4-D se observó un resultado opuesto. Luego de 48 h de tratamiento no se observaron diferencias significativas entre los valores observados entre tratados y controles ($P > 0,05$). Contrariamente en aquellos individuos expuestos durante 96 h se registró una disminución en la actividad de GSH con respecto a valores control ($P < 0,01$; Tabla 4.11).

4.2.7 Biomarcador de neurotoxicidad

Los resultados de la inducción de neurotoxicidad mediante la determinación de la AChE estimada en la región media de *C. decemmaculatus* expuestos a 410 y 252

mg/L de DIC y 2,4-D, concentraciones equivalentes al 25% de las respectivas $CL_{50_{96h}}$, contenidos en sus formulaciones comerciales Banvel® y DMA®, respectivamente, se encuentran detallados en la Tabla 4.11 (ver publicación V). La actividad promedio registrada para enzima AChE fue $384,71 \pm 17,33$ y $372,21 \pm 37,25$ nmol de sustrato hidrolizado/min mg proteína tanto para aquellos individuos expuestos por 48 como 96 h ($P > 0,05$). La actividad de AChE fue inhibida con respecto a los valores control en peces expuestos tanto a DIC como a 2,4-D luego de 96 h de exposición ($P < 0,01$) pero no al cabo de 48 h de tratamiento ($P < 0,05$; Tabla 4.11).

Tabla 4.11

Análisis de parámetros de estrés oxidativo y neurotoxicidad en células de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestas al herbicida dicamba en su formulado comercial Banvel® y al herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en su formulado comercial DMA®

Compuestos	Tiempo de exposición (h)	Biomarcadores (Media ± EE) ^a				
		Pr	CAT	GST	GSH	AChE
CN ^b	48	106,82 ± 13,18	12,86 ± 2,34	0,04 ± 0,01	3,17 ± 0,56	384,71 ± 17,33
DIC		98,22 ± 7,78	51,59 ± 6,40***	0,09 ± 0,01**	1,56 ± 0,15*	343,87 ± 89,81
2,4-D		80,30 ± 8,45	68,91 ± 20,27***	0,07 ± 0,01*	2,08 ± 0,13	267,11 ± 45,79
CN ^b	96	115,58 ± 16,18	13,52 ± 2,96	0,04 ± 0,01	2,60 ± 0,16	372,21 ± 37,25
DIC		81,02 ± 7,85*	30,08 ± 3,82***	0,07 ± 0,01***	2,06 ± 0,25	217,48 ± 65,07**
2,4-D		57,18 ± 4,81***	41,55 ± 6,57***	0,10 ± 0,01***	1,04 ± 0,03**	164,24 ± 34,54**

^a, Biomarcadores: Pr: contenido de proteínas expresado como mg/g; CAT: catalasa como $\mu\text{moles H}_2\text{O}_2$ hidrolizados/min mg Pr; GST: glutation-S-transferasa como $\mu\text{moles CDNB conjugado/min mg Pr}$; GSH: contenido de glutation como tioles ácidos solubles $\mu\text{moles/g}$. AChE: nmol de sustrato hidrolizado/min mg Pr; EE: Error estándar. ^b, CN: Control negativo

4.2.8 Toxicidad aguda de mezclas binarias de los herbicidas dicamba y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético 2,4-D (Publicación III)

Como se mencionara en el acápite 3.6.7 de la Sección Materiales y Métodos del presente trabajo de Tesis Doctoral, para la interpretación de los resultados del efecto de mezclas binarias de los agroquímicos por nosotros estudiados se decidió arbitrariamente definir a la Unidad Tóxica inducida por un determinado herbicida, sea tanto DIC como 2,4-D, a la concentración del p.a. capaz de inducir la mortalidad del 50% de los ejemplares expuestos bajo estudio al cabo de un lapso determinado de exposición. En nuestros estudios, en particular, la misma fue equivalente a la CL50_{96h}. Los resultados de los ensayos de mortalidad realizados para analizar este aspecto permitieron calcular las UT que provocaron el 50% de mortalidad de los peces tratados con distintas concentraciones de mezclas, tanto equitoxicas como no equitoxicas. Los datos de mortalidad de las mezclas equitoxicas se presentan en la Tabla 4.12. La supervivencia del grupo control fue del 100%. Los resultados revelaron una UT50_{96h} de 1,02 (rango, 0,96-1,08) para la mezcla equitóxica de DIC y 2,4-D en sus formulaciones comerciales Banvel®-DMA® (ver Publicación III).

Tabla 4.12

Efectos letales observados en *Cnesterodon decemmaculatus* luego de la exposición aguda a mezclas binarias equitoxicas de dicamba y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético 2,4-D en sus formulaciones comerciales Banvel® y DMA®, respectivamente.

Concentración (UT) ^a		Número de individuos	Mortalidad (número de individuos muertos)			
			24 h	48 h	72 h	96 h
CN ^b		30	0	0	0	0
DIC	2,4-D					
0,0625	0,0625	30	0	0	0	1
0,125	0,125	30	1	1	2	3
0,25	0,25	30	1	1	2	2
0,5	0,5	30	2	4	9	14
0,75	0,75	30	4	23	28	28
1	1	30	2	27	30	30
1,25	1,25	30	12	30	30	30
1,5	1,5	30	30	30	30	30
2	2	30	30	30	30	30

^a, Unidad Tóxica (UT), concentración de un plaguicida que causa el 50% de la mortalidad. ^b, CN: Control negativo

Los datos detallados de la mortalidad inducida en las mezclas no equitoxicas se presentan en la Tabla 4.13. El isoblograma que se muestra en la Figura 4.4 resume los datos obtenidos para las 4 series de mezclas no equitoxicas realizadas. La línea diagonal que cruza el gráfico se denomina isobola, que une los valores de 1 UT de cada eje, y corresponde al efecto de adición de concentraciones de los dos xenobióticos. El isoblograma incluido en la Figura 4.4 claramente demuestra que las combinaciones que ejercen el 50% de la mortalidad caen debajo y a la izquierda de la línea de aditividad, por lo que se demuestra un sinergismo en las combinaciones no equitoxicas de las formulaciones comerciales de DIC y 2,4-D por nosotros desarrolladas (Fig. 4.4).

Tabla 4.13

Efectos letales observados en *Cnesterodon decemmaculatus* luego de la exposición aguda a mezclas binarias no equitoxicas de dicamba y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en sus formulaciones comerciales Banvel® y DMA®, respectivamente.

Concentración (UT) ^a		Número de individuos	Mortalidad (número de individuos muertos)			
			24 h	48 h	72 h	96 h
CN ^b		30	0	0	0	0
DIC	2,4-D					
0,33	0,01	30	0	5	6	8
0,33	0,05	30	0	1	4	8
0,33	0,1	30	1	6	7	8
0,33	0,5	30	4	10	12	16
0,33	1	30	6	15	30	30
0,33	2	30	30	30	30	30
0,66	0,01	30	1	3	6	8
0,66	0,05	30	1	4	6	8
0,66	0,1	30	1	3	5	9
0,66	0,5	30	5	9	12	15
0,66	1	30	5	14	22	22
0,66	2	30	30	30	30	30
2,4-D	DIC					
0,33	0,01	30	2	6	8	9
0,33	0,05	30	7	8	10	10
0,33	0,1	30	1	6	8	10
0,33	0,5	30	2	8	9	12
0,33	1	30	7	8	15	24
0,33	2	30	16	27	30	30
0,66	0,01	30	1	2	3	5
0,66	0,05	30	3	4	5	6
0,66	0,1	30	4	6	8	10
0,66	0,5	30	4	6	11	14
0,66	1	30	8	11	23	28
0,66	2	30	27	30	30	30

^a, Unidad Tóxica (UT), concentración de un plaguicida que causa el 50% de la mortalidad. ^b, CN: Control negativo.

Los resultados demuestran que la toxicidad de DIC en su formulación comercial Banvel® se ve sinergizada cuando se combina en mezclas no equitóxicas con 2,4-D en su formulación comercial DMA®. Esto se vio evidenciado cuando se analizó la concentración de 0,33 o 0,66 UT de DIC en combinación con 2,4-D (Fig. 4.4). La figura 4.4 muestra que 0,33 UT de DIC requiere 0,19 UT (rango, 0,10-0,38) de 2,4-D para inducir el mismo efecto que cuando 0,66 UT de DIC se mezcla con 0,23 (rango, 0,11-0,48) UT de 2,4-D. De manera similar, la toxicidad de 2,4-D en su formulación comercial DMA® se ve sinergizada cuando se combina con DIC en su formulación comercial Banvel®, utilizando tanto 0,33 como 0,66 UT (Fig.4.4). Los resultados demostraron que 0,33 y 0,66 UT de 2,4-D requieren 0,13 UT (rango, 0,04-0,45) y 0,23 (rango, 0,13-0,40) de 2,4-D para inducir el 50 % de la mortalidad de los peces expuestos a estas concentraciones. Finalmente, se observó que, al analizar las mezclas de ambos herbicidas, la toxicidad ejercida cuando se utilizó 0,33 UT de cada formulación fue mayor que la toxicidad ejercida cuando se utilizó 0,66 UT (Fig. 4.4).

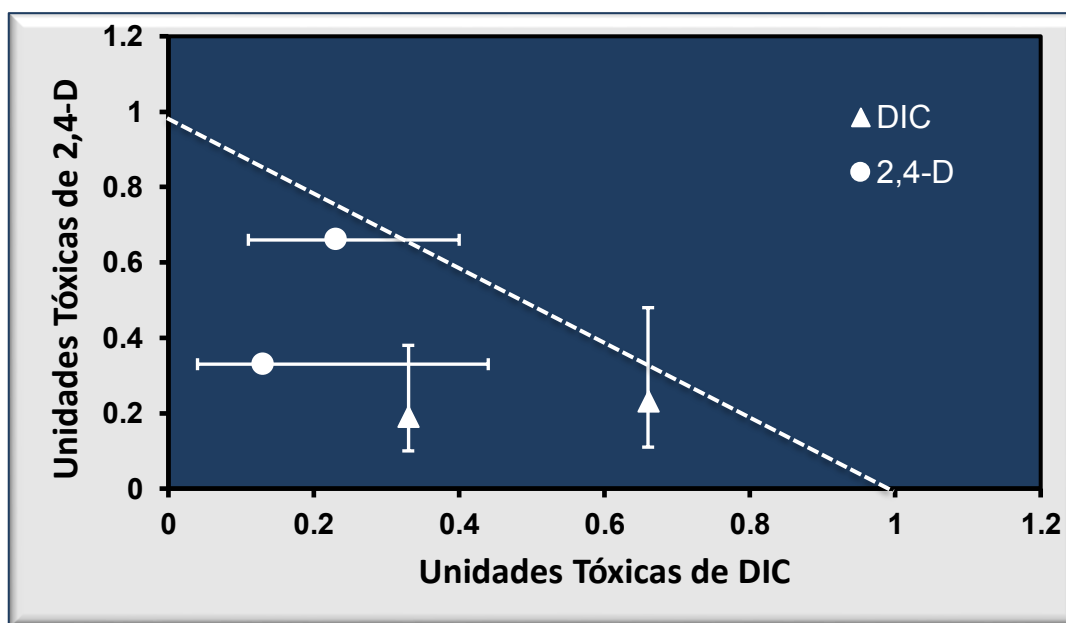


Figura 4.4: Isoblograma ilustrando las unidades tóxicas (UT) de mezclas no equitóxicas de los herbicidas dicamba y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en sus formulaciones comerciales Banvel® y DMA®, respectivamente, que causan el 50% de la mortalidad (UT50) en *C. decemmaculatus* luego de 96 h de exposición. Las barras de error presentes en cada punto experimental representan los intervalos de confianza al 95%.

4.3 Ensayos crónicos. Cuantificación de la inducción de lesiones primarias en el ADN mediante el Ensayo cometa (publicación IV)

Los resultados del EC crónico obtenidos luego de la exposición a DIC con concentraciones de 2,5 y 5% de la CL50_{96h} se presentan en la Tabla 4.14 y Figura 4.5 (ver publicación IV). Luego de la exposición a 2,5% CL50_{96h} (41 mg/L DIC), se observó un aumento significativo del IDG luego de 7 ($P < 0,001$), 14 ($P < 0,001$) y 21 d ($P < 0,05$). En el caso de los individuos expuestos al 5% CL50_{96h} (82 mg/L DIC), tal incremento fue observado sólo luego de 7 d de exposición ($P < 0,001$; Tabla 4.13). Adicionalmente, se observó un aumento significativo en el porcentaje de nucleoides dañados en los peces tratados con el 2,5% y 5 % de la CL50_{96h} luego de 7 d de exposición ($P < 0,001$), mientras que luego de 14 d de exposición tal aumento fue observado sólo en los individuos tratados con el 2,5% CL50_{96h} ($P < 0,001$).

En el tratamiento con el 2,5% de la CL50_{96h} de DIC, el mayor porcentaje de nucleoides dañados fue observado luego de 14 d de exposición con un valor de 58,30%, mientras que este porcentaje disminuyó hasta alcanzar el valor mínimo de 21,04% luego de 28 d de exposición. El porcentaje de nucleoides dañados para el tratamiento del 5% de la CL50_{96h} de DIC tuvo su valor máximo (77,20%), a los 7 d de exposición, mientras que el valor mínimo observado fue 20,04% luego de 21 d de exposición. El daño en el ADN observado para los peces expuestos a DIC fue tiempo-dependiente, tanto para la concentración de 2,5% de la CL50_{96h} ($r = -0,74$, $P < 0,05$) como para 5% de la CL50_{96h} ($r = -0,84$, $P < 0,01$). La variación en los nucleoides dañados fue dada por un aumento de los nucleoides II y III ($P < 0,001$) a los 7 d de exposición. A los 14 d de tratamiento, el aumento en los nucleoides dañados fue debido al incremento de los nucleoides tipo III ($0,01 > P < 0,001$). Adicionalmente, luego de 14 d se observó un aumento en la frecuencia de los nucleoides tipo II en los individuos tratados con el 2,5% ($P < 0,001$). Finalmente, se observó una disminución significativa de los nucleoides 0-I en los individuos tratados con 2,5% luego de 7 y 14 d de exposición y en los individuos tratados con 5% sólo luego de 7 d de tratamiento ($P < 0,001$; Fig. 4.5).

Los valores de IDG observados en el tratamiento con el 5% de la CL50_{96h} de DIC mostraron un valor máximo de 2,07 a los 7 d de exposición y un valor mínimo de 0,95 a

los 28 d de exposición. Para el tratamiento de 2,5% de la CL50_{96h} de DIC el valor máximo de IDG fue 1,66, observado luego de 14 d de exposición. Adicionalmente, al valor mínimo de IDG fue 0,99, observado luego de 28 d de exposición (Tabla 4.14).

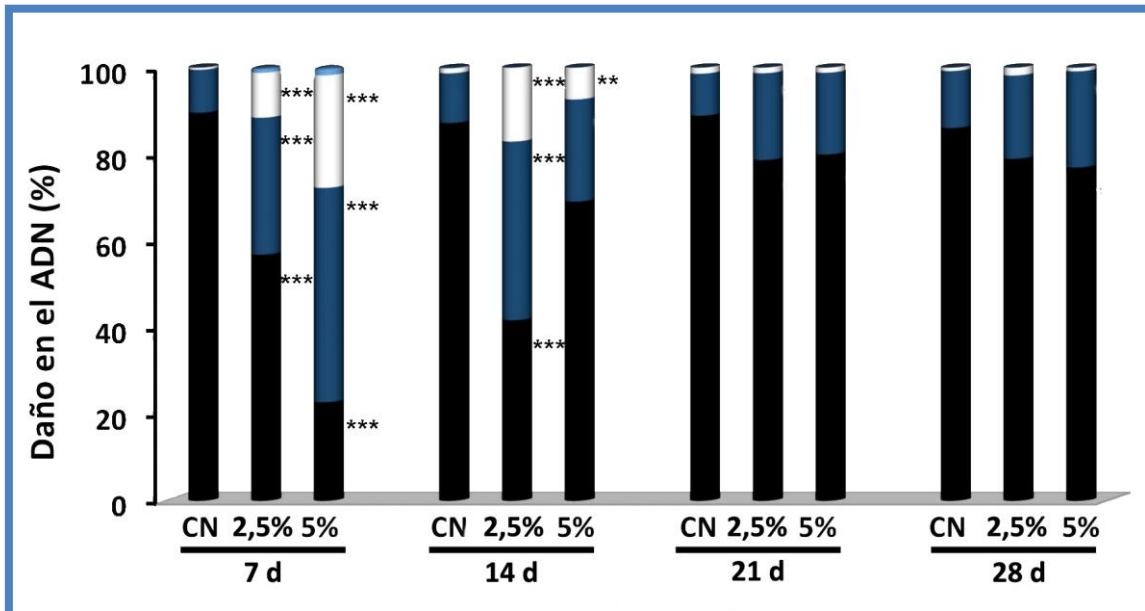


Figura 4.5: Frecuencias de nucleoides en individuos de *C. decemmaculatus* expuestos al herbicida dicamba en su formulación comercial Banvel® luego de 7, 14, 21 y 28 d. Barra negra: nucleoides no dañados, tipo 0-I; barra azul: tipo II; barra blanca: tipo III y barra celeste: tipo IV. CN: Control negativo. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; diferencias significativas con respecto al control negativo.

Los valores de IDG observados en el tratamiento con el 5% de la CL50_{96h} de DIC mostraron un valor máximo de 2,07 a los 7 d de exposición y un valor mínimo de 0,95 a los 28 d de exposición.

Tabla 4.14

Análisis del daño en el ADN medido con el Ensayo Cometa en células sanguíneas de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos de manera crónica a herbicida dicamba en su formulado comercial Banvel®

Compuestos	Concentración (mg/L)	Tiempo de exposición (d)	Número de animales analizados	Número de nucleoides analizados	Categorías de los nucleoides % ± EE				% de nucleoides dañados (II+III+IV)	IDG ± EE ^a
					Tipo 0+I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV		
CN ^b		7	10	1027	89,58	9,93	0,49	0	10,42	0,69 ± 0,05
		14	10	1003	87,24	11,46	1,10	0,20	12,76	0,77 ± 0,07
		21	10	1010	88,91	9,70	1,39	0	11,09	0,72 ± 0,11
		28	10	1048	86,07	13,17	0,76	0	13,93	0,74 ± 0,07
Dicamba	2,5% CL50 _{96h}	7	10	1177	56,84***	31,6***	10,37***	1,19	43,16***	1,38 ± 0,11***
		14	10	1163	41,7***	41,27***	17,03***	0	58,30***	1,66 ± 0,08***
		21	10	1018	78,68	20,04	1,28	0	21,32	1,11 ± 0,04**
		28	10	1112	78,96	19,24	1,80	0	21,04	0,99 ± 0,09
	5% CL50 _{96h}	7	10	1013	22,8***	49,46***	25,96***	1,78	77,20***	2,07 ± 0,06***
		14	10	1064	69,08	23,59	7,33**	0	30,92	1,15 ± 0,14
		21	10	1048	79,96	18,89	1,15	0	20,04	0,99 ± 0,08
		28	9	947	76,98	22,18	0,84	0	23,02	0,95 ± 0,06

^a, IDG: Índice de daño genético. EE: Error estándar. ^b, CN: Control negativo. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; diferencias significativas con respecto al control negativo

Los resultados obtenidos luego de la exposición crónica a 2,4-D en su formulación comercial DMA® se presentan en la Tabla 4.15 y en la Figura 4.6 (ver publicación IV). En peces tratados con ambas concentraciones de 2,4-D (2,5 y 5% de la CL50_{96h}) se observó un aumento significativo del porcentaje de nucleoides dañados a los 7, 14, 21 y 28 d de exposición con respecto al control negativo ($P < 0,001$) (Tabla 4.15). En ambas concentraciones ensayadas, a partir del daño observado en el día 7 (83,67% y 81,56%, para 2,5% y 5% de la CL50_{96h}, respectivamente) se observó un aumento gradual y significativo en el daño hasta el día 21 de tratamiento, momento en el cual se observó el nivel máximo de daño (90,05% y 89,67% para 2,5% y 5% de la CL50_{96h}, respectivamente). Sin embargo, el nivel de daño observado disminuyó desde el día 21 hasta el día 28 de iniciada la exposición al herbicida (74,49% y 71,99% para 2,5% and 5%, respectivamente), aunque continuó siendo significativamente mayor al daño observado en el grupo control. El daño en el ADN observado en los peces expuestos a 2,4-D fue tiempo-independiente, tanto para la concentración de 2,5% ($r = -0,48$, $P > 0,05$) como para la concentración de 5% de la CL50_{96h} ($r = -0,41$, $P > 0,05$). El aumento en los nucleoides dañados fue dado por un aumento significativo de los nucleoides tipo II, III y IV ($P < 0,001$) a los 7 d de exposición. A los 14 d, el incremento estuvo dado por el aumento significativo de los nucleoides tipo II y III ($P < 0,001$). Adicionalmente, a los 14 d de exposición se observó un aumento de los nucleoides tipo IV en los individuos tratados con la concentración equivalente al 2,5% de la CL50_{96h} ($P < 0,01$) (Fig. 4.6). En los peces expuestos por 21 d la variación en la frecuencia de nucleoides dañados fue dada por un aumento en la frecuencia de los nucleoides tipo II, III y IV ($P < 0,001$). Por último, a los 28 d el incremento del porcentaje de daño estuvo dado por un aumento significativo en los nucleoides tipo II-IV y II-III en los individuos expuestos al 2,5% y 5% de la CL50_{96h}, respectivamente ($P < 0,001$). Finalmente, a los 7, 14, 21 y 28 d se observó una disminución significativa de los nucleoides no dañados, tipo 0-I ($P < 0,001$) (Fig. 4.6).

De manera similar, se observó un aumento significativo del IDG tanto para el tratamiento con el 2,5% de la CL50_{96h} de 2,4-D como para el realizado empleando una concentración del 5% de la CL50_{96h}, para los cuatro tiempos de exposición evaluados, 7, 14, 21 y 28 d ($P < 0,001$) (Tabla 4.15).

El valor máximo de IDG en la concentración de 2,5% de la CL50_{96h} fue 2,60, observada a los 21 d de exposición, mientras que el menor valor observado fue 2,14, luego de 28 d de tratamiento (Tabla 4.15). Los valores de IDG observados en el tratamiento con el 5% de la CL50_{96h} de 2,4-D mostraron un valor máximo de 2,61 a los 7 d de exposición y un valor mínimo de 1,97 a los 28 d de exposición (Tabla 4.15).

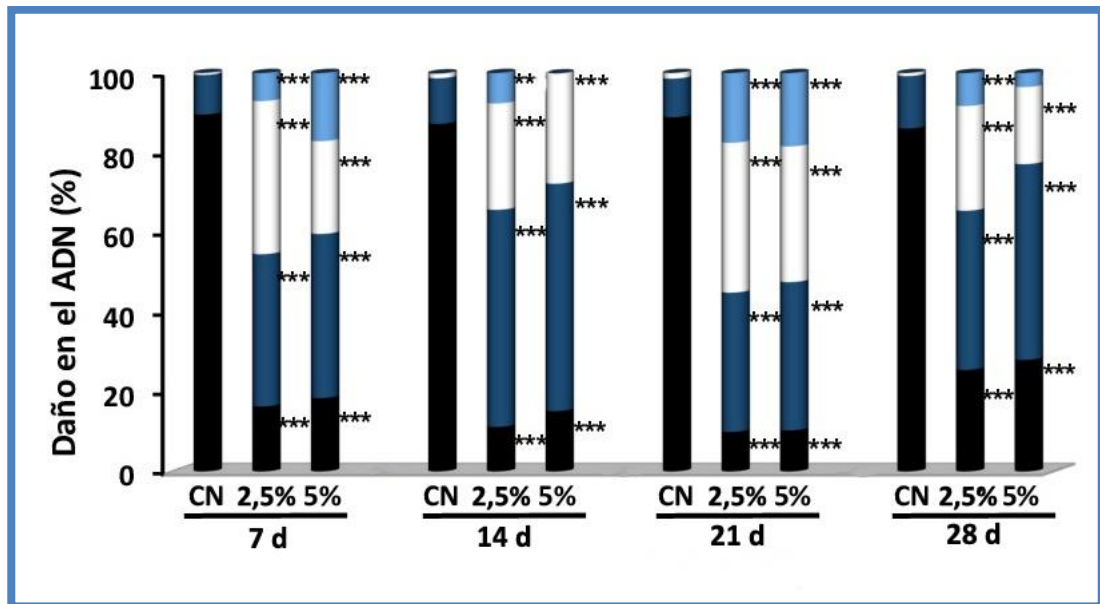


Figura 4.6: Frecuencias de nucleoides en individuos de *C. decemmaculatus* expuestos al herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en su formulación comercial DMA® luego de 7, 14, 21 y 28 d. Barra negra: nucleoides no dañados, tipo 0-I; barra azul: tipo II; barra blanca: tipo III y barra celeste: tipo IV. CN: Control negativo. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; diferencias significativas con respecto al control negativo.

Tabla 4.15

Análisis del daño en el ADN medido con el Ensayo Cometa en células sanguíneas de *Cnesterodon decemmaculatus* expuestos de manera crónica al herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en su formulado comercial DMA®

Compuestos	Concentración (mg/L)	Tiempo de exposición (h)	Número de animales analizados	Número de nucleoides analizados	Categorías de los nucleoides % ± EE				% de nucleoides dañados (II+III+IV)	IDG ± EE ^a
					Tipo 0+I	Tipo II	Tipo III	Tipo IV		
CN ^b		7	10	1027	89,58	9,93	0,49	0	10,42	0,69 ± 0,05
		14	10	1003	87,24	11,47	1,10	0,20	12,76	0,77 ± 0,07
		21	10	1010	88,91	9,70	1,39	0	11,09	0,72 ± 0,11
		28	10	1048	86,07	13,17	0,76	0	13,93	0,74 ± 0,07
2,4-D	2,5% CL50 _{96h}	7	10	1078	16,33***	38,22***	38,40***	7,05***	83,67***	2,36 ± 0,09***
		14	10	1046	11,19***	54,49***	26,67***	7,65**	88,81***	2,30 ± 0,06***
		21	10	1256	9,95***	34,95***	37,58***	17,52***	90,05***	2,60 ± 0,12***
		28	10	1184	25,51***	39,95***	26,26***	8,28***	74,49***	2,14 ± 0,06***
	5% CL50 _{96h}	7	9	976	18,44***	41,19***	23,26***	17,11***	81,56***	2,39 ± 0,10***
		14	10	1135	15,15***	57,09***	27,58***	0,18	84,85***	2,13 ± 0,04***
		21	10	1220	10,33***	37,21***	34,02***	18,44***	89,67***	2,61 ± 0,11***
		28	10	989	28,01***	49,14***	19,31***	3,54	71,99***	1,97 ± 0,09***

^a, IDG: Índice de daño genético. EE: Error estándar. ^b, CN: control negativo. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; diferencias significativas con respecto al control negativo

5. Discusión

Los resultados del presente trabajo de Tesis Doctoral aportan información sobre los efectos deletéreos ejercidos por los herbicidas auxínicos DIC y 2,4-D, contenidos en las formulaciones comerciales Banvel® (57,7% p.a.) y DMA® (58,4% p.a.), respectivamente, los que son ampliamente utilizados en la agricultura argentina. Los posibles efectos nocivos inducidos por estos herbicidas auxínicos fueron evaluados mediante biomarcadores de efecto tanto letales como subletales. Entre los primeros se emplearon ensayos de mortalidad agudos y entre los subletales se analizaron efectos deletéreos en el comportamiento, genotóxicos, enzimáticos y no enzimáticos en ejemplares adultos de la especie *C. decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae), especie objeto de estudio, expuestos en condiciones experimentales de laboratorio. Asimismo, se realizaron bioensayos con el objetivo de esclarecer los posibles mecanismos de daño a nivel de la molécula de ADN que dichos compuestos ejercen. Del mismo modo, se analizaron los posibles efectos por interacción deletéreos inducidos en *C. decemmaculatus* luego de la aplicación de mezclas de ambos compuestos y, por último, se evaluaron, asimismo, los efectos genotóxicos inducidos en el ADN de *C. decemmaculatus* luego de una exposición crónica a los herbicidas.

Los resultados de los estudios de letalidad mediante la estimación de la CL50 revelaron que el formulado DMA®, conteniendo 58,4% de 2,4-D, indujo una toxicidad 1,62 veces mayor a la ejercida por el formulado Banvel®, conteniendo 57,7% de DIC en su presentación comercial. En cuanto a los resultados del análisis de la alteración en los patrones de comportamiento, los individuos de *C. decemmaculatus* fueron expuestos a las mismas concentraciones utilizadas para la determinación de la CL50

tanto para DIC como para 2,4-D. Luego de la exposición, se observaron patrones de comportamiento que difirieron significativamente con respecto a los valores controles para los cuatro tiempos de exposición comprendidos en el lapso de 0-96 h (Publicaciones I y II).

Con respecto a los resultados del análisis de la genotoxicidad inducida por ambas formulaciones comerciales, el ensayo de MNs reveló un aumento significativo del efecto genotóxico únicamente a las 48 h de exposición para la concentración más alta ensayada del formulado de DIC (1229 mg/L), equivalente al 75% de la $CL_{50_{96h}}$ respecto de los valores controles. Adicionalmente, para el formulado basado en 2,4-D, la inducción de MNs fue observada para ambos tiempos de exposición (48 y 96 h) en las tres concentraciones ensayadas, equivalentes al 25, 50 y 75% de la $CL_{50_{96h}}$ (252, 504 y 756 mg/L). En cuanto a la inducción de daño genotóxico estimado mediante el EC, se observó un aumento significativo con respecto a los valores controles en el porcentaje de nucleoides dañados y en el índice de daño genético (IDG) tanto para el formulado de DIC como para el de 2,4-D, con todas las concentraciones ensayadas luego de 48 y de 96 h de exposición (Publicaciones I y II).

En peces tratados con el 25% de la $CL_{50_{96h}}$ tanto de DIC como de 2,4-D, el análisis del EC modificado con enzimas de restricción puso en evidencia que únicamente las células de los peces que recibieron un post-tratamiento con la enzima Fpg mostraron un aumento significativo del daño oxidativo (DO), no siendo así en los tratados con Endo III, tanto luego de 48 como de 96 h (Publicación V).

En cuanto a los resultados de los biomarcadores enzimáticos y no enzimáticos, luego de la exposición aguda a los formulados de DIC y 2,4-D, tanto la actividad de CAT como GST aumentaron significativamente con respecto a valores controles tanto a las 48 como a las 96 h de exposición. Por el contrario, la actividad de GSH mostró una tendencia hacia la disminución de su actividad a las 48 y a las 96 h, siendo la misma significativa para el formulado conteniendo DIC sólo a las 48 h y para el formulado 2,4-D sólo a las 96 h. Por último, el análisis de la actividad de AChE demostró una tendencia hacia la disminución de su actividad luego del tratamiento con ambas formulaciones de auxínicos tanto a las 48 como a las 96 h, llegando a ser significativa sólo luego de las 96 h de exposición (Publicación V).

Los resultados concernientes a evaluar la toxicidad y posibles interacciones resultantes de la mezcla entre los formulados de DIC y 2,4-D, Banvel® y DMA®, respectivamente, demostraron para mezclas equitóxicas un patrón aditivo, mientras que para mezclas no equitóxicas se observó un patrón sinérgico en las cuatro combinaciones no equitóxicas ensayadas (Publicación III).

Finalmente, la evaluación de los efectos genotóxicos inducidos por ambos herbicidas mediante la variante alcalina del EC luego de una exposición crónica empleando concentraciones equivalentes al 2,5% y 5% de la CL50_{96h}, demostró que ambos compuestos fueron capaces de inducir lesiones primarias en el ADN, luego de los 7, 14, 21 y 28 d de exposición a DIC y 2,4-D (Publicación IV).

Es importante destacar que en la presente Tesis Doctoral se emplearon los herbicidas DIC y 2,4-D en sus formulaciones comerciales Banvel® (57,7% p.a.) y DMA® (58,4% p.a.), respectivamente. Es sabido que, en la agricultura, los plaguicidas son usualmente comercializados y empleados en formulados, en los cuales el p.a. se encuentra combinado con otros componentes tales como solventes, emulsionantes y tensioactivos, entre otros, que mejoran la penetración y rendimiento del plaguicida (WHO, 1990). Aunque las formulaciones de plaguicidas son desarrolladas bajo procesos estrictamente regulados para que su impacto en el ser humano y en el ambiente sea el mínimo posible, serias dudas han surgido en torno a los riesgos que dichos compuestos pueden ejercer en la salud de los trabajadores ocupacionales, residentes de las áreas adyacentes a las zonas de aplicación al igual que sobre la biota en general, así como por los residuos potenciales generados y de los cuales se han detectado niveles de los mismos presentes en alimentos y agua para consumo humano (WHO, 1990).

Desde hace varias décadas se han reportado numerosas investigaciones demostrando que los excipientes presentes en las formulaciones comerciales tienen la habilidad de inducir toxicidad y daño celular por sí mismos, en adición a los efectos inherentes al p.a. (USEPA, 1982; Mann y Bidwell, 1999; Soloneski y Larramendy, 2010; Molinari y col., 2013; Nikoloff y col., 2014a). Por lo tanto, las evaluaciones de riesgo sobre la biota también deben considerar los efectos inducidos por estos excipientes. Desafortunadamente, la identidad de los compuestos presentes en los formulados comerciales Banvel® y DMA® no han sido informados por los fabricantes, ya que, en

nuestro país, la identidad de los excipientes que conforman una determinada formulación comercial se encuentran protegidos por ley y son considerados secreto comercial.

Por lo expuesto anteriormente, resulta de importancia vital, en adición a la determinación de los efectos inducidos por los p.a., la evaluación de los efectos deletéreos de las formulaciones de plaguicidas tal cual son comercializadas y empleadas tanto en la agricultura a gran escala como en zonas urbanas o peri-urbanas, ya que, en definitiva, son a las que están expuestas los organismos en el medio ambiente, incluyendo los seres humanos.

Durante los últimos diez años nuestro grupo de trabajo ha empleado ejemplares de vertebrados acuáticos, entre ellos de *C. decemmaculatus*, como especies de estudio para evaluar los efectos letales y subletales de diversas formulaciones comerciales de agroquímicos usados tanto en la agricultura mundial como en Argentina, en lo particular. Entre los compuestos evaluados en ejemplares adultos de *C. decemmaculatus* podemos citar las formulaciones Lorsban® 48E y CPF Zamba®, ambos conformados por el insecticida clorpirifós al 48% (Vera-Candioti y col., 2014), las formulaciones Aficida® y Patton Flow®, ambas conteniendo el insecticida carbámico pirimicarb al 50% (Vera-Candioti y col., 2010; 2011; 2015) y dos formulaciones del herbicida glifosato al 48%, Panzer® y Credit® (Vera-Candioti y col., 2013a). En todos los casos, la estimación de la CL50 se utilizó como biomarcador de letalidad, mientras que la inducción de MNs y rupturas en la cadena de ADN analizadas mediante el EC se utilizaron como biomarcadores de genotoxicidad. Adicionalmente, variaciones en la relación eritrocitos/eritroblastos en muestras de sangre periférica de ejemplares expuestos fue utilizada como biomarcador de citotoxicidad (Vera-Candioti y col., 2013b). Por último, recientemente nuestro grupo de trabajo evaluó la toxicidad inducida por mezclas de los herbicidas glifosato, DIC y 2,4-D, mediante estudios de letalidad aguda en *C. decemmaculatus* (Ruiz de Arcaute y col., 2018).

Cabe resaltar que nuestras investigaciones constituyen la primera evidencia del uso de biomarcadores de efecto genotóxico y de estrés oxidativo para evaluar la capacidad deletérea ejercida por los herbicidas DIC y 2,4-D en sus variantes comerciales Banvel® y DMA®, respectivamente, así como también en la evaluación de la letalidad inducida por la mezcla de ambos compuestos utilizadas actualmente en el

agro de nuestro país, empleando el poecílido *C. decemmaculatus* como modelo experimental de estudio.

5.1 Evaluación de la letalidad inducida por dicamba y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en sus formulaciones comerciales Banvel® y DMA®

El peligro potencial que un xenobiótico representa para el ecosistema acuático es determinado luego de la estimación de la toxicidad aguda para mamíferos, la toxicidad aguda para bacterias, toxicidad aguda para peces y de la realización de ensayos de disociación biológica del compuesto (Yilmaz y col., 2004). Aunque los ensayos de toxicidad inicialmente se llevaban a cabo empleando bacterias e invertebrados tales como rotíferos y cladóceros, éstos no pueden reemplazar a los ensayos de toxicidad empleado vertebrados tales como peces, debido a que éstos constituyen generalmente el último eslabón dentro de la cadena trófica del ambiente acuático (Castano y col., 1996; Yilmaz y col., 2004).

Los ensayos de toxicidad aguda brindan información acerca de los efectos inducidos a corto plazo por un compuesto en organismos de prueba con el objetivo de determinar su sensibilidad y luego poder compararla con la manifestada en otras especies (USEPA, 1975; ASTM, 2007; Casarett y Doull's, 2008). Estos resultados son luego utilizados para implementar el diseño y la selección de las concentraciones a utilizar en ensayos subletales posteriores realizados bajo condiciones experimentales de laboratorio (Casarett y Doull's, 2008). Asimismo, es dable esperar que dichos resultados sean tomados como referencia por diferentes instituciones gubernamentales para determinar, en última instancia, niveles guía de calidad y de consumo del agua de los seres humanos (WHO, 2008). En términos generales, un ensayo de toxicidad aguda consiste en exponer a un grupo de individuos a diversas concentraciones de un contaminante por un plazo corto de tiempo para luego evaluar los efectos inducidos por el mismo. Entre los efectos evaluados, se encuentran la mortalidad y varios efectos subletales, por ejemplo, malformaciones, alteraciones del comportamiento al igual que distintos efectos fisiológicos, entre otros (ASTM, 2007; Casarett y Doull's, 2008). El parámetro más utilizado para expresar los resultados de

mortalidad es la CL50, la cual es definida como la concentración de una sustancia que produce la muerte del 50% de los individuos expuestos a la misma en un lapso de exposición determinado. También es utilizado el cálculo de la concentración efectiva 50 (CE50), que determina la concentración de una sustancia que produce un determinado efecto en el 50% de los individuos expuestos a la misma. Asimismo, podemos incluir el NOEC, el cual determina de entre las concentraciones testeadas, la concentración más alta a la cual no fue observado un determinado efecto adverso y el LOEC, que determina la concentración más baja a partir de la cual se comenzó a observar dicho efecto (USEPA, 1975; ASTM, 2007; Casarett y Doull's, 2008). Dichos parámetros son ampliamente utilizados en la evaluación de la toxicidad de un compuesto y en su posterior comparación con respecto a los efectos inducidos por otros contaminantes.

Los efectos letales observados en el presente trabajo de Tesis Doctoral (Publicación I y II), inducidos por los formulados comerciales de DIC y 2,4-D, Banvel® y DMA®, respectivamente, permitieron determinar que la formulación conteniendo 2,4-D fue más tóxica que el formulado conteniendo DIC. El análisis de la letalidad reveló una CL50_{96h} de 1639 mg/L (rango, 1471-1808 mg/L) para DIC en su formulación comercial Banvel®. Por otra parte, cuando se analizó la letalidad inducida por el herbicida 2,4-D en su formulación DMA®, la CL50_{96h} observada fue 1008 mg/L (rango, 929-1070 mg/L). De esta manera, cuando se expusieron ejemplares de *C. decemmaculatus* durante 96 h a la formulación del herbicida DIC, fue necesario utilizar 1,62 veces más que de la formulación conteniendo 2,4-D para obtener el mismo efecto, en este caso, el 50% de la mortalidad. Una evaluación de los datos reportados hasta el presente de la letalidad inducida por DIC y 2,4-D, estimados como valores de CL50_{96h}, pone en evidencia que el efecto letal de estos herbicidas ha sido analizado en diferentes matrices bióticas distintas a la especie empleada en nuestro trabajo de Tesis Doctoral. En la Tabla 5.1 se encuentran resumidos los estudios previos realizados en distintas especies expuestas a DIC y 2,4-D.

Tabla 5.1

CL50_{96h} reportadas para distintos organismos luego de la exposición a los herbicidas auxínicos dicamba y al ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D)

Compuesto	Grupo	Especie	CL50 _{96h} (mg/L)	Referencia
DIC	Crustáceos	Amphipoda	3,9	Mayer (1974)
CAS 1918009		<i>Paleomonetes pugio</i>	> 100	U.S. EPA (1992)
		<i>Paleomonetes kadiakensis</i>	> 560	Mayer y Ellersieck (1986)
		<i>Uca pugilator</i>	> 180	U.S. EPA (1992)
		<i>Caecidotea brevicauda</i>	> 100	Mayer y Ellersieck (1986) Sanders (1989), U.S. EPA (1992)
		<i>Gammarus lacustris</i>	3,9	
		<i>Gammarus fasciatus</i>	>100	Mayer y Ellersieck (1986)
	Anfibios	<i>Limnodynastes peronii</i>	106	Johnson (1976)
		<i>Adelotus brevis</i>	185	Johnson (1976)
	Peces	<i>Lepomis macrochirus</i>	135,3	U.S. EPA (1992)
			>500	Mayer y Ellersieck (1986)
		<i>Cyprinodon variegatus</i>	> 180	U.S. EPA (1992)
		<i>Oncorhynchus mykiss</i>	135,4	U.S. EPA (1992)
			153	Johnson (1978)
	<i>Oncorhynchus clarkii</i>	50	Lorz y col. (1971)	
	<i>Gambusia affinis</i>	465	Johnson (1978)	
	<i>Cnesterodon decemmaculatus</i>	1639	Presente trabajo de Tesis Doctoral, Publicación I	
2,4-D	Crustáceos	<i>Caridina laevis</i>	872	Sucahyo y col. (2008)
CAS 2008391		<i>Daphnia magna</i>	35	Alexander 1985
		<i>Procambarus clarkii</i>	185	Green y Abdelghani (2004)
			1389	Cheah y col. (1980)
		<i>Procambarus sp.</i>	750,1	Abdelghani y Col. (1997)
		<i>Gammarus fasciatus</i>	> 100	Mayer y Ellersieck (1986)
		<i>Micropterus dolomieu</i>	236	Mayer y Ellersieck (1986)
		<i>Trichogaster pectoralis</i>	153	Ooi (1988)
	Anfibios	<i>Limnodynastes peronii</i>	287	Johnson (1976)
		<i>Pseudacris triseriata</i>	100	Sanders (1970)
		<i>Rhinella marina</i>	282,84	Figueiredo y col. (2014)
			288	Johnson (1976)
		<i>Adelotus brevis</i>	200	Johnson (1976)
		<i>Physalaemus centralis</i>	515,75	Figueiredo y col. (2014)
	Peces	<i>Pimephales promelas</i>	266-800	Mayer & Ellersieck (1986)
			106-318	U.S. EPA (1992)
			344	Alexander y col. (1985)
		<i>Tinca tinca L.</i>	48	Sarikaya y col. (2003)
		<i>Ictalurus punctatus</i>	100-395	Mayer y Ellersieck (1986)
		<i>Lepomis macrochirus</i>	100-177	Mayer y Ellersieck (1986)
	<i>Menidia beryllina</i>	469	U.S. EPA (1992)	
	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	> 100	Mayer y Ellersieck (1986)	
	<i>Oncorhynchus mikiss</i>	420	Mayer y Ellersieck (1986)	

	250	U.S. EPA (1992)
	707	Fairchild y col. (2008)
	117	Bills y col. (1981)
<i>Cnesterdodon decemmaculatus</i>	1009	Presente trabajo de Tesis Doctoral, Publicación II

Del análisis de la presente Tabla se puede observar que la evaluación de la toxicidad inducida por el herbicida DIC mediante la determinación de la CL50_{96h} fue realizada sólo en cinco especies de peces. Para la mojarra oreja azul (*Lepomis macrochirus*), la CL50_{96h} reportada por la U.S. EPA (1992) es de 135,3 mg/L p.a. DIC y por Mayer y Ellersieck (1986) mayor a 500 mg/L p.a. DIC. El valor de CL50_{96h} reportada para *C. variegatus*, fue mayor a 180 mg/L p.a. DIC (USEPA, 1992). Para *O. mykiss*, la CL50_{96h} reportada es de 135,4 y 153 mg/L p.a. DIC (Johnson, 1978; USEPA, 1992). Para *O. clarkii* el valor de CL50_{96h} reportado por Lorz y col. (Lorz y col., 1979) es de 50 mg/L p.a. DIC, y para *G. affinis* el valor de CL50_{96h} es de 465 mg/L de una formulación no especificada (Johnson, 1978).

En cuanto al herbicida 2,4-D, se ha evaluado la toxicidad en siete especies de peces. Entre ellos, la carpita cabezona (*Pimephales promelas*) con un valor de CL50_{96h} reportado por Mayer y Ellersieck (1986) de 266-800 mg/L p.a. 2,4-D, por la U.S. EPA (1992) de 106-318 mg/L p.a. 2,4-D y por Alexander y col. (1985) de 344 mg/L p.a. 2,4-D. Los valores de CL50_{96h} reportados para la especie *Tinca* L. son de 48 mg/L 2,4-D (Sarıkaya y Yilmaz, 2003), y para el pez gato americano (*Ictalurus punctatus*) de 100-395 mg/L p.a. 2,4-D (Mayer y Ellersieck, 1986). Para *L. macrochirus*, el valor reportado de CL50_{96h} es de entre 100 a 177 mg/L p.a. 2,4-D (Mayer y Ellersieck, 1986). Adicionalmente, para el plateadito salado (*Menidia beryllina*), la CL50_{96h} reportada fue de 469 mg/L (USEPA, 1992; compuesto no especificado) y para el salmón real (*O. tshawytscha*) mayor a 100 mg/L p.a. 2,4-D (Mayer y Ellersieck, 1986). Por último, para la especie *O. mykiss* el valor de CL50_{96h} reportada en distintos estudios fue de 420 mg/L p.a. 2,4-D (Mayer y Ellersieck, 1986), 117 (Bills y col., 1981), 250 (USEPA, 1992) y 707 mg/L (Fairchild y col., 2008). Ésta última concentración es la única obtenida para *O. mykiss* empleando un formulado comercial de 2,4-D (56,7% Nufarm), el resto fueron obtenidas ensayando el p.a.

Nuestros resultados mostraron un valor de $CL_{50_{96h}}$ de 1639 mg/L para el herbicida DIC en su formulado comercial Banvel®. Teniendo en cuenta estos resultados y considerando las categorías de toxicidad propuestas por la EU (Mazzatorta y col., 2002), DIC pertenecería a la categoría de compuestos que pueden causar efectos adversos a largo plazo (categoría IV) (Mazzatorta y col., 2002). De la misma manera, podría ser clasificado como un compuesto clase IV (“prácticamente no tóxico”) para la U.S. EPA (2001) y como un compuesto clase II (“moderadamente peligroso”) para la WHO (2009). Adicionalmente, según la clasificación para organismos acuáticos propuesta por la U.S. EPA, DIC podría ser clasificado como un compuesto prácticamente no tóxico (USEPA, 2001).

En cuanto al herbicida 2,4-D en su formulación comercial DMA®, el valor de $CL_{50_{96h}}$ obtenido en el presente trabajo de Tesis Doctoral fue de 1008 mg/L. Siguiendo el mismo criterio, el herbicida 2,4-D según el valor de $CL_{50_{96h}}$ obtenido puede ser clasificado según la U.S. EPA (2001) como un compuesto prácticamente no tóxico (clase IV). De acuerdo con la UN (2011), puede ser clasificado como un compuesto nocivo (categoría III). Finalmente, según los criterios propuestos por la EU (Mazzatorta y col., 2002) el 2,4-D puede ser clasificado como un compuesto que puede causar daños a largo plazo para la vida acuática (categoría IV), y como un compuesto “moderadamente peligroso” según la WHO (2009). Adicionalmente, siguiendo la clasificación para organismos acuáticos propuesta por la U.S. EPA, el herbicida 2,4-D podría ser clasificado, al igual de DIC, como un compuesto prácticamente no tóxico para *C. decemmaculatus* (USEPA, 2008).

Si comparamos los valores de $CL_{50_{96h}}$ reportados en el presente trabajo de Tesis Doctoral para el herbicida DIC en su formulación comercial Banvel® con aquellos en la literatura para distintas especies de peces expuestas a DIC (Tabla 5.1), *C. decemmaculatus* puede ser considerada como la especie menos sensible reportada hasta el momento, ubicándose detrás de *G. affinis*, con una $CL_{50_{96h}}$ de 465 mg/L (Johnson, 1978) y de *L. macrochirus*, con una $CL_{50_{96h}}$ superior a los 500 mg/L (Mayer y Ellersieck, 1986). En conclusión, la formulación Banvel®, conteniendo 57,7% de DIC ejercería una mortalidad mucho menor que otras formulaciones comerciales con este herbicida como p.a.

Es relevante destacar que en general, las curvas de sensibilidad indicarían que las especies nativas de Argentina son más sensibles con respecto a las especies modelo utilizadas del hemisferio norte. A modo de ejemplo, Iturburu y col. (2017) reportaron para *Australoheros facetus*, otra especie sudamericana una $CL_{50_{96h}} < 10$ mg/L de imidacloprid en su formulado comercial Imida Nova 351 (NOVA) (35% p.a.), mientras que para el mismo insecticida, la $CL_{50_{96h}}$ reportada para *O. mykiss* y *C. carpio* es de 211 y 280 mg/L (Tisler y col. 2009). Específicamente para *C. decemmaculatus*, tal afirmación no debería ser considerada como válida, dado que se ha observado que la especie muestra una sensibilidad mayor o menor que especies boreales tomadas como modelo experimental, dependiendo el compuesto evaluado. Tal es el caso del glifosato, para el cual se reportó una $CL_{50_{96h}}$ de 15,68-100 mg/L para *C. decemmaculatus* (Vera-Candioti y col. 2013; Carriquiriborde y col. 2007; Brodeur y col. 2016). Opuestamente, en especies nativas del hemisferio norte como *C. variegatus*, *C. carpio* y *O. mykiss*, la $CL_{50_{96h}}$ reportada para este herbicida fue de 240 mg/L (USEPA, 1992), 11-520,77 mg/L (Ma y Li, 2015; Sun, 1987) y 7,6-240 mg/L (Mayer y Ellersieck, 1986), respectivamente (Tabla 5.2). Una respuesta de sensibilidad semejante se obtuvo para el insecticida clorpirifós. La $CL_{50_{96h}}$ reportada para *C. decemmaculatus* es de 0,03-0,21 mg/L (Paracampo y col., 2015; Vera-Candioti y col. 2014), mientras que para *C. punctatus* 0,81 mg/L (Phipps y Holcombe, 1985) y para *L. macrochirus* 0,88 mg/L (USEPA, 2013). Por otro lado, estudios evidenciando una menor sensibilidad de *C. decemmaculatus* fueron reportados para cipermetrina por Brodeur y col. (2016) con una $CL_{50_{96h}}$ 0,19-0,43 mg/L, mientras que ha sido determinada una $CL_{50_{96h}}$ de 0,0017, 0,0071 y 0,001 mg/L para *C. carpio* (Saha y col. 2008), *O. mykiss* (Lakota y col. 1987) y *L. macrochirus* (El-Sabae y col. 1983; USEPA, 2013), respectivamente. Resultados similares fueron obtenidos para el insecticida pirimicarb, para el que Vera-Candioti reportó una $CL_{50_{96h}}$ de 88-225 mg/L, mientras que para especies como *C. variegatus*, *P. promelas* y *O. mykiss* las $CL_{50_{96h}}$ reportadas fueron > 100, >101 y 29-300 mg/L (USEPA, 2013), respectivamente.

Al realizar esta comparación para el herbicida 2,4-D en su formulación comercial DMA[®], *C. decemmaculatus* puede ser considerada, al igual que para DIC, como la especie menos sensible reportada hasta el momento evaluando 2,4-D ubicándose luego de *O. mykiss*, con una $CL_{50_{96h}}$ máxima reportada de 707 mg/L (Fairchild y col.,

2008). En base a estos resultados, podría afirmarse que el herbicida 2,4-D en su formulación comercial DMA[®], compuesta por el 58,4% de p.a., ejercería una mortalidad mucho menor que las formulaciones comerciales evaluadas hasta el momento con este herbicida como p.a.

Es importante tener en cuenta que al realizar estas comparaciones sobre la sensibilidad de *C. decemmaculatus* con respecto a otras especies estudiadas, las mismas son aproximadas, ya que si bien todos los ensayos fueron llevados a cabo exponiendo a los individuos a la misma variante química de cada compuesto, cada ensayo fue llevado a cabo empleando un determinado p.a. y/o formulado comercial, cuyas cantidades tanto de p.a. como de excipientes difieren dentro de cada composición comercial estudiada.

Los valores de CL50_{96h} informados por estudios previos realizados en *C. decemmaculatus* expuestos a distintos compuestos se encuentran resumidos en la Tabla 5.2. De acuerdo con resultados reportados en el presente trabajo de Tesis Doctoral, *C. decemmaculatus* es aproximadamente 0,6 veces más sensible al herbicida 2,4-D que a DIC, pudiendo ser considerados ambos herbicidas auxínicos (ya sean pertenecientes a la familia de los ácidos benzoicos, como DIC; o a la familia de los ácidos fenoxi-carboxílicos, como el 2,4-D) compuestos de menor toxicidad para *C. decemmaculatus* que cualquier otro agroquímico estudiado hasta el momento (Tabla 5.2). Estudios adicionales deberían ser llevados a cabo para verificar si esta afirmación se puede extender a las otras familias de herbicidas auxínicos (ácidos piridino-carboxílicos, pirimidino-carboxílicos y quinolino-carboxílicos), o es particular de los formulados estudiados en el presente trabajo.

Tabla 5.2

LC50_{96h} reportadas para la especie *Cnesterodon decemmaculatus*

Compuesto	CL50 _{96h} ^a	Referencia
Cloruro de zinc	41	Gómez y col. (1998)
Sulfato de cobre	0,16	Villar y col. (2000)
	0,65	Casares y col. (2012)
Cromo	21,4	Vera-Candioti y col. (2011)
Pirimicarb	225,5	Vera-Candioti y col. (2010)
	88	Vera-Candioti y col. (2015)
Clorpirifós	0,21	Vera-Candioti y col. (2014)
	0,03	Vera-Candioti y col. (2014)

	0,10	Paracampo y col. (2015)
Endosulfán	0,005	Mugni y col. (2012)
Paraquat	52,48-67,4	Di Marzio y col. (1994)
Cipermetrina	0,43	Carriquiriborde y col. (2007)
	0.19	Brodeur y col. (2016)
	0.26	Brodeur y col. (2016)
Glifosato	>100	Carriquiriborde y col. (2007)
	15,68	Vera-Candioti y col. (2013)
	91,73	Vera-Candioti y col. (2013)
	41	Brodeur y col. (2016)
	53	Brodeur y col. (2016)
Dicamba	1639	Presente trabajo de Tesis Doctoral, Publicación I
2,4-D	1008	Presente trabajo de Tesis Doctoral, Publicación II

^a, Valor expresado en mg/L

5.2 Evaluación de los efectos en el comportamiento inducidos por dicamba y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en sus formulaciones comerciales Banvel® y DMA®

El comportamiento se define como la secuencia de acciones cuantificables que implican efectos acumulativos de diversos procesos biológicos como genéticos, bioquímicos y fisiológicos que se manifiestan en un individuo y que apuntan a la aptitud máxima y la supervivencia del organismo. Es una manifestación de la conexión entre la fisiología y la ecología de un organismo y su entorno (Little y Brewer, 2001), por lo cual resulta un indicador importante de la presencia de tóxicos y cambios ambientales. Los cambios comportamentales, en general, son estimadores más sensibles que otros marcadores como la letalidad o el crecimiento (Little y Finger, 1990). Es importante destacar que, aunque la mortalidad no es un comportamiento, la mayoría de los síntomas del comportamiento pueden culminar eventualmente con la muerte del individuo (Quarcoo y col., 2014).

En el presente trabajo de Tesis Doctoral, se estudiaron las alteraciones en el comportamiento de *C. decemmaculatus* expuestos a concentraciones subletales de los herbicidas DIC y 2,4-D en sus formulaciones comerciales Banvel® y DMA®. Los siguientes efectos fueron observados luego del tratamiento y durante los distintos

tiempos de exposición (24, 48, 72 y 96 h): AFA, aglomeración en el fondo del acuario; ML, movimiento lento; RL, reacción lenta y NA, natación anormal.

En los individuos expuestos al herbicida DIC, se pudo observar que a medida que aumenta el tiempo de exposición, la concentración a la cual se comienzan a observar los efectos en el comportamiento (LOEC) son cada vez menores. Así, a las 24 h de iniciado el tratamiento, las alteraciones en el comportamiento comienzan a observarse a partir de la concentración de 1440 mg/L, a las 48 h en la concentración de 1296 mg/L, y a las 72 y 96 h de exposición en la concentración de 1152 mg/L. Esto podría explicarse por el deterioro del estado de los individuos a medida que aumenta el tiempo de exposición debido a la mayor toxicidad inducida por el compuesto. Es importante destacar que el presente estudio es el primer reporte de inducción de alteraciones en el comportamiento en vertebrados acuáticos ejercidos por el herbicida DIC.

En los individuos expuestos al herbicida 2,4-D, se puede observar que prácticamente todos los efectos, con todos los tiempos analizados, se registran a partir de la concentración de 800 mg/L. Esto es coincidente con lo observado en el ensayo de letalidad, en el que concentraciones menores a 800 mg/L no indujeron efecto alguno, probando ser insuficientes para causar toxicidad relacionada a estos puntos finales. Por otro lado, a medida que transcurre el tiempo de exposición se observan menor cantidad de alteraciones luego del análisis en los patrones de comportamiento. Así, a las 24 h de exposición se observaron las cuatro alteraciones comportamentales (AFA, ML, RL y NA), a las 48 h sólo se observaron tres (ML, RL y NA), a las 72 h sólo dos (RL y NA) y a luego de 96 h de tratamiento la única alteración observada fue NA. Este patrón de comportamiento podría sugerirse de acuerdo a un proceso de aclimatación de los organismos a la exposición al herbicida, como ha sido reportado en distintas especies de peces expuestas a plaguicidas, entre ellas el pez *C. auratus* luego de la exposición a nicosulfuron (Saglio y col., 2003), a *O. mykiss* expuestos a deltametrina (Goulding y col., 2013) y permetrina (Kumaraguru y Beamish, 1983). Futuros estudios son necesarios para confirmar esta teoría y dilucidar los posibles mecanismos por los cuales 2,4-D inducen las alteraciones en el comportamiento observadas y como los individuos de *C. decemmaculatus* podrían adquirir una determinada tolerancia luego de la exposición al herbicida en estudio.

En cuanto a la inducción de alteraciones en el comportamiento por el herbicida 2,4-D en peces, Sarikaya y Yilmaz (2003) informaron efectos en *C. carpio* luego de la exposición aguda a 2,4-D en su variante éster en el rango de concentraciones de 4,8-144 mg/L. Entre los efectos en el comportamiento observados se encontraron movimientos repentinos, pérdida del equilibrio, natación anormal, dificultades respiratorias, aglomeración en la superficie del acuario, secreción excesiva de mucus al igual que alteraciones en la pigmentación. El formulado de 2,4-D utilizado en dicho estudio fue Ester´H (48% éster 2,4-D), y la CL50_{96h} reportada por estos autores fue de 64,24 mg/L. Algunos de estos efectos son coincidentes con los observados por nosotros en el presente estudio, aunque las concentraciones efectivas fueron menores, tanto para los efectos letales como para los comportamentales. En adición, Hansen y col. (1969, 1972) estudiaron los efectos de 2,4-D en concentraciones de 1 y 10 mg/L en *C. variegatus* (Hansen, 1969) y *G. affinis* (Hansen y col., 1972) observando comportamientos tendientes a evitar la exposición al contaminante.

En relación a los efectos adversos en el comportamiento observados en el presente trabajo de Tesis Doctoral, otros autores han reportado que bajo condiciones de estrés como las que implican la exposición a plaguicidas, los individuos afectados en el patrón normal de comportamiento podrían ser menos activos en la competencia inter e intraespecífica, manifestando una menor aptitud física durante la evasión de sus posibles depredadores o en una menor eficiencia durante la obtención de alimento (Quarcoo y col., 2014). Esto los conduciría a una limitación en la energía disponible para procesos metabólicos normales, afectando patrones como el crecimiento y la reproducción de los organismos, pudiendo, en última instancia, causar efectos letales. A nivel ecosistema, estos efectos adversos llevarían a una disminución poblacional, con graves consecuencias en distintos procesos tanto ecológicos como evolutivos (Gliwicz, 1994; Preston y col., 1999; Relyea y Hoverman, 2006).

Diferentes tipos de alteraciones en el comportamiento inducidas por plaguicidas fueron evaluadas desde el comienzo del uso masivo de los mismos. Broley (1958) reportó en áreas rociadas con DDT, patrones anormales de anidación, cortejo y reproducción en el águila calva (*Haliaeetus leucocephalus*) (Broley, 1958). Varios estudios demostraron que plaguicidas organofosforados, organoclorados y carbamatos alteraron el comportamiento en peces (Bell, 2001; Tierney y col., 2008), renacuajos

(Relyea, 2012), aves (Holmes y Boag, 1990) y mamíferos (Vom Saal y col., 1995; Porter y col., 1999; Flynn y col., 2001). Específicamente para peces, se observaron alteraciones en la natación, pérdida del equilibrio, dificultades en la respiración, cambios en la pigmentación, entre otros efectos, reportados para *C. carpio* luego de la exposición a 2,4-D en su variante éster (Sarıkaya y Yılmaz, 2003). Alteraciones en la natación también reportada por Wang y col. (2018) en individuos de *D. rerio* expuestos a paraquat, por Qiu y col. (2017) en *O. latipes* expuestos a clorpirifós, Otros efectos, como comportamientos tendientes a evitar la exposición a contaminantes fueron observados en varias especies, entre ellas por ejemplo las ya mencionadas *C. variegatus* (Hansen, 1969) y *G. affinis* (Hansen y col., 1972) expuestos a 2,4-D y en *O. mykiss* expuestos a glifosato en concentraciones de 40 mg/L (Hildebrand y col., 1982; Tierney y col., 2007; 2013), entre otros. Efectos relacionados con patrones natatorios y sociales como agrupamiento o la búsqueda de refugio fueron observados en el pez *C. auratus* expuestos al herbicida atrazina en concentraciones de 0,5 a 50 µg/L (Saglio y Trijasse, 1998). Específicamente en ejemplares de *C. decemmaculatus*, Paracampo y col. (2015) reportaron efectos adversos como natación anormal, menor actividad natatoria y patrones respiratorios anormales luego de la exposición a clorpirifós en el rango de concentraciones de 30-135 µg/L. Adicionalmente, Bonifacio y col. (2017) informaron alteraciones durante la natación y uso del espacio en *C. decemmaculatus* y en la mojarra de agua dulce (*Cheirodon interruptus*) expuestos a clorpirifós.

Gormley y col. (2003) evaluaron los efectos inducidos por el insecticida endosulfán en huevos y juveniles de *O. latipes* luego una exposición por 24 h. Estos autores reportaron que, en ambos casos, los individuos mostraron alteraciones en comportamientos natatorios así como en los reproductivos manifestados como variaciones en la cantidad de huevos producidos. Esto remarca que la exposición a plaguicidas puede tener consecuencias negativas en los organismos que exceden el tiempo de exposición (Gormley y Teather, 2003). Efectos similares fueron observados por Frank y col. (2018) quienes reportaron que *D. rerio* que durante la exposición aguda a concentraciones del insecticida bifentrin no manifestaron efectos inmediatos en el comportamiento, pero sí tiempo después, una vez concluida la fase de exposición (Frank y col., 2018).

Aunque varios estudios han reportado alteraciones en los patrones de

comportamiento frente a la exposición a distintos herbicidas, la importancia y consecuencias de estas alteraciones en la supervivencia, crecimiento, desarrollo y reproducción o sustentabilidad de las poblaciones de peces no han sido cuantificadas. Es conocido que los efectos sobre el comportamiento de las especies expuestas pueden ser adaptativos y puede ocurrir un fenómeno de habituación a las nuevas condiciones ambientales (Allen, 2010). En este sentido, son necesarios más estudios tanto a nivel poblacional como de las comunidades de las cuales forman parte para evaluar los efectos y consecuencias de estas alteraciones luego de la exposición a xenobióticos.

5.3 Evaluación de la genotoxicidad inducida por dicamba y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en sus formulaciones comerciales Banvel® y DMA®

5.3.1 Inducción de micronúcleos

Los efectos genotóxicos son considerados como uno de los efectos subletales más graves de los productos agroquímicos. Si un compuesto reacciona con el ADN nuclear, puede tener efectos mutagénicos y carcinogénicos en los organismos expuestos elevando el riesgo de producir enfermedades genéticas hereditarias, carcinogénesis, disfunción reproductiva y defectos de nacimiento, entre otros (Ahmad y Ahmad, 2016). En la actualidad uno de los biomarcadores de efecto más utilizados a nivel mundial desarrollado para el estudio y caracterización de agentes genotóxicos es el análisis de la frecuencia de MNs, ya sea en ensayos *in vitro* e *in vivo*, como también en estudios de monitoreo ambiental (Mudry y Carballo, 2006). Este biomarcador permite la detección de pequeños fragmentos cromosómicos o cromosomas acéntricos en células interfásicas inducidos por agentes clastogénicos, o cromosomas enteros que han quedado rezagados en la anafase-telofase luego de la acción de un agente aneugénico afectando la segregación normal de los cromosomas durante la división celular (OECD, 2010). Dada las características de esta metodología, el análisis de la frecuencia de MNs debe ser restringido a células que atravesaron la primera división mitótica después del tratamiento con el agente en estudio, ya que las lesiones inducidas en el ADN, consecuencia de un efecto clastogénico y/o aneugénico, quedan

excluidas de los núcleos de las nuevas células como pequeñas porciones de material extranuclear luego de la metafase-anafase mitótica (Fenech, 2007).

Los resultados de la presente Tesis Doctoral demostraron que el herbicida DIC aumentó significativamente la frecuencia de MNs en eritrocitos periféricos de los individuos de *C. decemmaculatus* expuestos por 48 h únicamente luego del tratamiento con la concentración más alta ensayada (1229 mg/L). Con relación a este comportamiento, podría sugerirse que las concentraciones menores a 1229 mg/L de DIC no fueron lo suficientemente altas para inducir daño cito o genotóxico, que lleve a la formación de MNs durante el período de tratamiento agudo empleado (48 h). Por otro lado, luego de 96 h de exposición, ninguna de las tres concentraciones ensayadas fue capaz de inducir un aumento significativo de la frecuencia de MNs. Los resultados demuestran que la concentración más alta ensayada (1229 mg/L) fue capaz de aumentar la frecuencia de MNs significativamente después de 48 h, pero no luego de 96 h de exposición. Este efecto podría deberse a que algunos xenobióticos pueden alterar el normal funcionamiento del proceso de eritropoyesis, llevado a cabo en estos organismos principalmente por el riñón, provocando un aumento desmesurado de eritrocitos circulantes normales que trata de llevar a una compensación entre las poblaciones afectadas y las no afectadas, con una consecuente disminución de su frecuencia relativa, generando un efecto de “dilución” de las células alteradas dentro de las poblaciones sanguíneas circulantes y analizadas (Udroiu, 2006). En adición, cuando estos organismos son expuestos a un xenobiótico, los eritrocitos circulantes son constantemente removidos del torrente sanguíneo por un órgano hemocaterético como el bazo (Rabello-Gay, 1991; Ali y col., 2008). Por lo expuesto, la menor frecuencia de MNs observada luego del tratamiento en la concentración más alta del formulado de DIC luego de 96 h de exposición podría deberse a la generación de un patrón de tolerancia de los individuos expuestos al tratamiento continuo.

La inducción de MNs ejercido por el herbicida DIC ha sido reportada previamente en la bibliografía. González y col. (2011) utilizaron este ensayo en sistemas *in vitro* empleando células CHO-K1 para la evaluación de DIC y el formulado Banvel®, observando inducción de MNs y BN en el rango de concentraciones de 50-400 µg/L y 50-500 µg/L para DIC y Banvel®, respectivamente luego de un tratamiento agudo de 24 h de exposición. Del mismo modo, en modelos vegetales, Mohammed y Ma (1999)

informaron la inducción significativa de MNs en *Tradescantia* expuesta a concentraciones de 50-200 mg/L por 6 h.

En relación con las AN, solo fueron observadas modificaciones significativas en su frecuencia luego de 48 h de exposición, siendo la mayor proporción de ellas encontradas en la concentración más alta empleada, en concordancia con lo observado luego del análisis de MNs. Se observaron alteraciones de las EN con las tres concentraciones ensayadas, 410, 820 y 1229 mg/L mientras que NL y EB, sólo en la concentración más elevada (1229 mg/L). Estudios previos demostraron que estas anomalías morfológicas nucleares pueden ser consideradas indicadoras de inestabilidad o daño genético (Çavaş y Ergene-Gözükara, 2005; Gökalp Muranlı y Güner, 2011), siendo nuestros resultados coincidentes con estas observaciones. Asimismo, algunos autores han sugerido que los BN podrían originarse como consecuencia de eliminación del ADN generado durante procesos de amplificación génica nuclear (Fenech y col., 2003; 2011). El ADN amplificado se localiza selectivamente en sitios específicos en la periferia del núcleo y se elimina mediante extrusión durante la fase S del ciclo celular. Asimismo, se ha sugerido que también pueden originarse como consecuencia de mecanismos de reparación del ADN que eliminan algunas regiones del material genético al igual que por la pérdida de cromosomas duplicados generados en células aneuploides (Fenech y col., 2011). Los BN se caracterizan por tener la misma morfología que un micronúcleo, con la excepción de que están unidos al núcleo principal por un pedúnculo de material nucleoplásmico BN pueden formarse cuando un puente nucleoplásmico entre dos núcleos se rompe, debido a procesos de tensión y los restos se retraen hacia los núcleos (Fenech y col., 2011 y referencias citadas allí). Adicionalmente, se ha sugerido que fragmentos de ADN sin la presencia de centrómeros se encuentra con mayor prevalencia en BN que en MNs, mientras que ADN centromérico o telomérico se encuentra con mayor prevalencia en MNs que en BN (Fenech y col., 2011). Con relación a esto, se reportó que la inducción de MNs y AN como los BN en eritrocitos de peces están fuertemente correlacionados (Carrasco y col., 1990; Ergene y col., 2007; Çavaş, 2008).

Actualmente es aceptado que los MNs pueden originarse a partir de fragmentos de cromosomas acéntricos, fragmentos de cromátidas acéntricas o cromosomas

completos que no se unieron correctamente al huso mitótico durante el proceso de segregación en la anafase y como resultado no fueron incluidos en los núcleos hijos (Fenech y col., 2011). Es conocido que los fragmentos de cromosomas acéntricos pueden originarse a través de diversos mecanismos, como la reparación defectuosa de la doble cadena de ADN, lo cual puede conducir tanto a intercambios -simétricos o asimétricos de cromátidas o de cromosomas como a fragmentos de dichas estructuras. Además, los fragmentos acéntricos de cromosomas también pueden originarse a través de rupturas de ADN que no han sido correctamente reparadas. Del mismo modo, se ha sugerido que los MNs podrían generarse como consecuencia de procesos de reparación del ADN mediante la escisión de bases dañadas (por ejemplo, 8-oxo-deoxiguanosina) así como la eliminación de uracilos que podrían llevar a la generación de rupturas en la doble cadena de ADN y a la formación de MNs. Recientemente se demostró que los MNs también pueden originarse de fragmentos de material cromosómico durante la formación y ruptura de puentes nucleoplásmicos en la telofase. Además, se ha propuesto que la formación de MNs generados durante la segregación anómala de cromosomas enteros durante la anafase (proceso aneugénico), estaría relacionado con varios mecanismos responsables de su formación (Fenech y col., 2011). Entre ellos, podemos citar la hipometilación de citosinas en secuencias repetidas tanto centroméricas como pericentroméricas. En condiciones normales, el ADN satélite está altamente metilado en sus residuos de citosina, situación que puede cambiar a causa de distintos síndromes o tratamientos que afectan el proceso de metilación normal. Esta situación puede llevar a la segregación defectuosa de esos cromosomas o a su pérdida de cromatina bajo la forma de MNs debido a un ensamblaje incorrecto entre las proteínas del cinetocoro con las tubulinas polimerizadas durante la formación del huso mitótico. Por este motivo, las alteraciones que afectan la dinámica entre el cinetocoro y los microtúbulos pueden ser causa de formación de MNs debido a la pérdida cromosómica(s) durante la anafase. A modo de ejemplo, se ha sugerido que los cromosomas dicéntricos que resultan de fusiones terminales teloméricas pueden estar involucrados a eventos de mal segregación cromosómica durante la anafase mitótica (Fenech y col., 2011).

En un estudio previo llevado a cabo por nuestro grupo de investigación González y col. (2011), evaluaron mediante ensayos *in vitro* en células CHO-K1 los posibles

mecanismos vinculados a la inducción de MNs ejercidos tanto por el herbicida DIC en su presentación pura como por el formulado Banvel®. Para esto, los autores emplearon el ensayo de citoma para estimar la frecuencia de MNs inducida en células binucleadas en combinación con el empleo de anticuerpos anti-proteínas cinetocóricas (CREST) con el fin de dilucidar el origen clastogénico y/o aneugénico de los MNs. Al mismo tiempo, analizaron un índice de daño relacionando la frecuencia de puentes nucleoplásmicos con la frecuencia de MNs y asumiendo que los puentes nucleoplásmicos se originan principalmente por reordenamientos cromosómicos complejos que ocurren por efecto clastogénico en tanto los MNs podrían ser inducidos por actividad aneugénica o clastogénica (Thomas y col., 2003). Los resultados de los ensayos realizados permitieron sugerir que el origen de MNs inducidos por el herbicida generado por ambos mecanismos, tanto aneugénico como clastogénico (González y col., 2011).

En cuanto a los resultados del ensayo de MNs luego de la exposición aguda al herbicida 2,4-D en su formulación comercial DMA®, los resultados de la presente Tesis Doctoral demostraron un aumento significativo de la frecuencia de MNs en eritrocitos periféricos de los individuos de *C. decemmaculatus* luego de la exposición por 48 y 96 h, con todas las concentraciones de exposición ensayadas (252, 504 y 756 mg/L). Resultados similares en los que se observó la inducción de MNs luego de 48 y 96 h de exposición fueron reportados para peces expuestos a distintos xenobióticos, entre ellos metales como el mercurio en *C. carpio*; sales como cloruro de cadmio en el rohu (*Labeo rohita*); insecticidas como clorpirifós en *C. punctatus* (Ali y col., 2009) y en *C. decemmaculatus* (Vera-Candioti y col., 2014), y al herbicida glifosato en especímenes de *C. auratus* (Çavaş y Könen, 2007) y *C. decemmaculatus* (Vera-Candioti y col., 2013a), entre otras. Específicamente para 2,4-D, en ensayos concordantes con nuestros resultados fueron obtenidos tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*. Dentro de los primeros, se reportó la inducción de MNs en linfocitos humanos a concentraciones de 0.4 and 4 µg/mL (Zeljezic y Garaj-Vrhovac, 2004). En ensayos *in vivo*, se observó la inducción de MNs en linfocitos humanos de personas ocupacionalmente expuestas a 2,4-D (Garaj-Vrhovac y Zeljezic, 2001). Además, se observó un incremento en la frecuencia de Mn en diferentes organismos acuáticos como en larvas de anfibios como la rana toro (*Lithobates catesbeianus*) tratados con una concentración de 1,97 mg/L por 3, 5 y 9 días (Mesak y col., 2018) y en peces como *C. punctatus* tratados con

concentraciones de 25, 50 y 75 mg/L de 2,4-D, siendo la máxima frecuencia observada para la concentración más alta luego de 96 h de tratamiento (Farah y col., 2003). Adicionalmente, Ateeq y col. reportaron inducción de MNs en individuos de *C. batrachus* expuestos a concentraciones de 25 mg/L por 96 h (Ateeq y col., 2002).

Se ha sugerido que éste incremento significativo en la frecuencia de MNs podría deberse tanto a la generación y acumulación de eritrocitos micronucleados como a una deficiente actividad hemocaterética por parte del bazo para eliminar a los eritrocitos dañados los cuales permanecerían en circulación sin ser eliminados de manera inmediata (Çavaş y Könen, 2007; 2008; Çavaş, 2008; Ali y col., 2009). Por otro lado, este efecto también podría explicarse, tal como lo propone Udroui (2006) por una actividad eritropoyética deficiente, por lo que los eritrocitos dañados no serían reemplazados eficientemente por eritrocitos sanos.

Adicionalmente, la formulación de 2,4-D también indujo AN luego de ambos tiempos de exposición, poniendo en evidencia la capacidad de la formulación DMA[®] de inducir daño e inestabilidad génica. Luego de 48 h de exposición se observó alteraciones en la frecuencia de BN con la concentración más alta ensayada (756 mg/L). En adición, luego de 96 h sólo se observó una inducción significativa de AN con la concentración de 504 mg/L, con la modificación de las frecuencias de EN y BN. Estos resultados de AN son coincidentes con la mayor inducción de MNs observada en la concentración de 504 mg/L (1,46 MNs/1000 eritrocitos) indicando una toxicidad del herbicida que estaría interfiriendo con el balance entre los procesos de hemopoyético/hemocaterético de estos peces.

5.3.2 Inducción de daño primario en la cadena de ADN medidas mediante el EC

El EC en su versión alcalina permite detectar diferentes tipos de daño ejercido en la molécula de ADN tales como rupturas de cadena doble, rupturas de cadena simple, al igual que otro tipo de lesiones como sitios sensibles al álcali y uniones cruzadas ya sean ADN-ADN y/o ADN-proteínas (Fenech, 2000). Este ensayo es ampliamente utilizado en la caracterización de las propiedades genotóxicas de distintos xenobióticos, tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (Collins y Azqueta, 2012; Nikoloff y col., 2014a; Azqueta y col., 2017). Es un método rápido y sencillo, con una sensibilidad mayor que otros biomarcadores en la detección de daño genotóxico,

incluyendo al ensayo de MNs. Reportes avalando esta afirmación fueron publicados tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*. Dentro de los primeros podemos incluir los estudios realizados en linfocitos humanos de sangre periférica evaluando la genotoxicidad inducida por el herbicida terbutrin (Moretti y col., 2002) y los estudios realizados en células CHO-K1 evaluando los efectos inducidos por el herbicida flurocloridona (Nikoloff y col., 2012), entre otros muchos trabajos publicados al respecto. Dentro de los estudios *in vivo* evaluando los efectos genotóxicos que encontraron una sensibilidad mayor luego del empleo de la metodología del EC podemos incluir los estudios llevados a cabo por Cavalcante y col. (Cavalcante y col., 2008), quienes emplearon ambas metodologías en el estudio de los efectos genotóxicos inducidos por glifosato en *P. lineatus*; los llevados a cabo por Vera-Candioti y col. (2014) en el estudio de los efectos del insecticida clorpirifós y el herbicida glifosato en *C. decemmaculatus* (Vera-Candioti y col., 2013a), por Pérez-Iglesias y col. (2015) quienes evaluaron los efectos inducidos por el herbicida imazetapir en renacuajos de la rana del zarzal (*Boana pulchella*), Orozco-Hernández y col. (2017) quienes evaluaron mediante estas metodologías los efectos genotóxicos inducidos por 17 β -estradiol en células sanguíneas de *C. carpio*, entre otros.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral demostraron que la exposición aguda a todas las concentraciones ensayadas de DIC (410-1229 mg/L) aumentaron de manera significativa la frecuencia de lesiones primarias en el ADN estimadas mediante el EC en su variante alcalina. En los peces expuestos tanto a 48 como a 96 h, se observó un aumento significativo de la frecuencia de células dañadas con una concomitante disminución de las no dañadas, así como un aumento significativo en la frecuencia de IDG ejercido por DIC en su formulado comercial Banvel® con respecto a los valores control. Cabe recordar que la frecuencia de nucleoides dañados es indicadora del número de células que han sufrido daño en su ADN, mientras que el IDG representa, además de las células dañadas, la magnitud de dicho daño, ponderando los niveles de daño observados en el cálculo del índice.

En ambos tiempos de exposición evaluados la exposición aguda a DIC en el rango de 410-1229 mg/L aumentó la frecuencia de lesiones primarias en el ADN estimadas con el EC alcalino, resultado que difiere de lo observado al analizar el ensayo de MNs. Una explicación posible para esto puede estar relacionada al diferente estado celular

de las células blanco que fueron empleadas para cada punto final. Mientras el daño en el ADN es estimado por el EC en una población celular circulante heterogénea, los MNS son determinados en células proliferativas con lesiones que han pasado por al menos un ciclo de división celular, por lo que es probable que 48 h resulte un tiempo demasiado corto para que este proceso suceda y el daño se manifieste, como fue sugerido con anterioridad (Nikoloff y col., 2014b). La capacidad genotóxica de DIC evaluada por Perocco y col. (1990) en ratas expuestas a este herbicida, por Sorensen y col. (2005), quienes observaron que este herbicida no indujo daño primario en la cadena de ADN de células CHO luego de la exposición a concentraciones de 10 μ M- 10 mM durante 4 h mediante el empleo del EC. Por el contrario, estudios llevados a cabo por nuestro grupo de trabajo en el pasado demostraron que DIC aumentó el porcentaje de células dañadas y el IDG en células CHO-K1 expuestas durante 90 min a un rango de concentraciones de 50–500 μ g/mL (González y col., 2007). Esta diferencia de resultados podría deberse a las mayores concentraciones y tiempo de exposición empleados por González y col. (2007) y a la mayor citotoxicidad observada en el primero de los estudios (Sorensen y col., 2005). Por último, González y col. (2009) evaluaron el rol protector de la vitamina E mediante los ensayos ICHs, progresión del ciclo celular y viabilidad celular en células CHO-K1 luego de un tratamiento de 12-24 con DIC como p.a. y en su formulado comercial Banvel[®]. Sus resultados permitieron postular que el daño inducido por DIC como p.a. sería a través de mecanismos oxidativos, ya que el tratamiento con vitamina E previno la inducción de muerte celular, retrasos en el ciclo celular y la inducción de ICHs. En adición, observaron que el formulado comercial Banvel[®] ejercería daño a través de otros mecanismos ya que las muestras tratadas con vitamina E mostraron una protección incompleta (González y col., 2009). Es importante destacar que hasta el momento no hay realizados estudios en peces empleando el herbicida auxínico DIC, por lo cual nuestros resultados representan la primera evidencia *in vivo* de inducción de daño primario en el ADN ejercido por DIC empleando el EC en eritrocitos de peces.

En cuanto a los resultados del EC en peces expuestos a 2,4-D en su formulación comercial DMA[®], mostraron que la exposición aguda a todas las concentraciones de exposición ensayadas (252, 504 y 756 mg/L) aumentó la frecuencia de lesiones primarias en el ADN estimadas mediante el EC alcalino, tanto luego de 48 como de 96

h. Este resultado es coincidente con los análisis realizados utilizando las mismas concentraciones de 2,4-D en el ensayo de MNs. La inducción de lesiones primarias en el ADN evaluando los efectos inducidos por el herbicida auxínico 2,4-D fue reportada en diversos estudios *in vitro* e *in vivo*. Resultados positivos fueron observados *in vitro* en células SHE expuestas a 11,5 µg/mL (Maire y col., 2007), en células CHO-K1 expuestas a 2,4-D puro en el rango de concentraciones de 200 µM – 4 mM (Sorensen y col., 2005) y a concentraciones de 2 µg/mL (González y col., 2005). En el estudio llevado a cabo por González y col. (2005), adicionalmente se estudió al herbicida 2,4-D en su formulado comercial DMA®, el cual también ejerció efectos genotóxicos en la misma población celular estudiada (González y col., 2005). En adición se han reportado la inducción de lesiones primarias en el ADN tanto en cultivos de linfocitos humanos de personas fumadoras que fueron tratados con concentraciones de 10 µM de 2,4-D (Sandal y Yilmaz, 2011) como en cultivos de “Epithelioma Papulosum Cyprini” (EPC), una línea celular de peces derivada de la carpa común, *C. carpio* tratados con este herbicida auxínico (Bokán y col., 2013). En modelos vegetales, se reportó la inducción de daño utilizando el EC en *Phaseolus vulgaris* luego de la exposición a concentraciones 0,01 mg/L 2,4-D (Cenkci y col., 2010).

La información referente a la inducción de lesiones primarias en el ADN evaluadas *in vivo* en peces inducidas por 2,4-D es escasa. Se ha reportado la inducción de rupturas en el ADN evaluado con el EC empleando 2,4-D en *C. batrachus* expuestos a concentraciones de 25 mg/L 2,4-D (Ateeq y col., 2005) y en *O. mykiss* en concentraciones de 5 mg/L (Martínez-Tabche y col., 2004).

Los resultados de nuestros estudios demostraron que 2,4-D puede ser considerado un agente deletéreo con efectos genotóxicos tanto a nivel cromosómico como a nivel de la molécula de ADN para *C. decemmaculatus*. Adicionalmente, nuestras observaciones revelaron que el EC fue una metodología más sensible que el ensayo de MNs en la detección temprana daño en el ADN cuando las mismas concentraciones fueron ensayadas, avalando lo propuesto en la bibliografía como se mencionó previamente. Recientemente, la IARC evaluó el riesgo de exposición de tres insecticidas, DDT, lindano y 2,4-D. En esta evaluación, el potencial genotóxico de 2,4-D ha sido confirmado por diversos ensayos *in vivo* e *in vitro* que incluyen la capacidad de

inducir daño cromosómico y de ADN en diferentes matrices bióticas (Soloneski y Larramendy, 2011; IARC, 2015 y referencias citadas allí).

El ensayo del EC se ha convertido en un valioso biomarcador en peces, tanto para estudiar áreas contaminadas *in situ* (Barbosa y col., 2010; Otter y col., 2012), como para estudiar los efectos *in vivo* de xenobióticos luego de exposición directa o indirecta (Cavalcante y col., 2008; Ali y col., 2009; Vera-Candioti y col., 2013b). La ventaja que presenta este ensayo es que las células no necesitan atravesar un ciclo de duplicación celular para manifestar el daño ejercido, a diferencia de otras técnicas empleadas en citogenética como el ensayo de MNs, ICHs o aquellas para detectar aberraciones cromosómicas (Lee y Steinert, 2003; Ali y col., 2009). Los resultados del presente trabajo de Tesis Doctoral representan la primera evidencia *in vivo* de inducción de daño primario en el ADN ejercido por 2,4-D utilizando el EC en eritrocitos de *C. decemmaculatus*, poniendo de manifiesto el potencial genotóxico de este herbicida auxínico. Finalmente, estos hallazgos apoyan el concepto de que el EC es un método altamente sensible para detectar daño en el ADN inducido por contaminantes ambientales.

5.4 Evaluación de la inducción de lesiones primarias en la molécula de ADN mediante el Ensayo Cometa modificado con enzimas de restricción

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se llevó a cabo la metodología del ensayo EC modificado que incluyó, luego de la exposición a los herbicidas auxínicos DIC y 2,4-D, el post-tratamiento de las muestras de sangre de *C. decemmaculatus* con endonucleasas de restricción que digieren lesiones específicas de bases del ADN. Mediante esta metodología, la determinación y cuantificación de bases oxidadas mediante el aumento del daño observado en el ADN proporciona información sobre alteraciones genotóxicas y situaciones de estrés oxidativo resultantes de la exposición a uno o a varios xenobióticos. En adición, la introducción de endonucleasas específicas como Fpg o Endo III con la capacidad de reconocer las bases oxidadas en la metodología del EC en su versión alcalina, brinda información adicional sobre el

posible mecanismo de daño que ejerce un xenobiótico sobre la molécula de ADN (Collins y col., 1993; Azqueta y col., 2017; Soloneski y col., 2017).

En el presente trabajo de Tesis Doctoral, luego de verificar el potencial genotóxico de los herbicidas DIC y 2,4-D en *C. decemmaculatus*, se realizó esta metodología con el objetivo de obtener información adicional e intentar dilucidar el posible mecanismo por el cual DIC y 2,4-D, como p.a. de los formulados comerciales Banvel® y DMA® respectivamente, ejercen su efecto e inducen daño en el ADN. Para ello se realizó, luego del período de lisis de las muestras, una incubación con dos enzimas de restricción: Endo III y Fpg, que empleadas en combinación con el EC permiten revelar la presencia de bases pirimidínicas o purinas oxidadas, respectivamente.

Nuestros resultados demostraron, en concordancia con los resultados obtenidos previamente para el EC alcalino, que tanto la exposición a concentraciones de 410 mg/L DIC como a 252 mg/L 2,4-D fueron capaces de inducir daño en el ADN de células sanguíneas de *C. decemmaculatus*. Adicionalmente mediante esta técnica, se pudo comprobar que parte de este daño está producido por oxidación de purinas, siendo esto evidenciado luego del post tratamiento con Fpg. Contrariamente, luego del post tratamiento con Endo III no se registró un aumento significativo en los nucleoides dañados, por lo que los herbicidas auxínicos empleados no inducirían la oxidación de bases pirimidínicas. Nuestros resultados revelaron adicionalmente que el post tratamiento con el buffer de enzimas aumentó el nivel de daño cuando fue comparado con el CN, siendo estos resultados coincidentes con lo reportado por otros investigadores como Collins y Azqueta (2012), Pérez-Iglesias y col. (2017), Soloneski y col. (2016; 2017).

Hasta el momento en la bibliografía son pocos los trabajos que emplearon la metodología del EC modificado para tratar de dilucidar el tipo de daño que producen los plaguicidas sobre el ADN de peces. Entre ellos y en concordancia con nuestras observaciones, resultados positivos fueron informados luego del post tratamiento con la endonucleasa Fpg en *A. anguilla* expuesta a glifosato en su formulación comercial Roundup® (Guilherme y col., 2012) y en *A. alburnus* cuando se evaluó la contaminación del río Velika Morava (Jovanović y col., 2017). El único antecedente empleando esta metodología con el fin de evaluar el mecanismo por el cual produce daño el herbicida

2,4-D fue realizado sobre otro vertebrado acuático, el sapo común (*Rhinella arenarum*) (Lajmanovich y col., 2015). En este trabajo se informaron resultados negativos tanto para la inducción de daño en el ADN mediante el EC (versión alcalina) como por el EC modificado con Fpg en individuos expuestos a 2,4-D en su formulación comercial Asi Max 50® (50% 2,4-D) (Lajmanovich y col., 2015). Estos resultados no son coincidentes con lo observado por nosotros en *C. decemmaculatus*. Hasta el momento no tenemos una respuesta clara para explicar estos resultados, sin embargo, es importante destacar que estas observaciones obtenidas por Lajmanovich y col (2015) fueron obtenidas luego de emplear concentraciones cerca de 12 veces menores que las empleadas en el presente trabajo de Tesis Doctoral.

Por otro lado, es importante destacar que hasta el momento no hay antecedentes de estudios que evalúen el tipo de daño inducido con DIC mediante la metodología del EC modificado con enzimas de restricción en ninguna matriz biótica. Adicionalmente, para 2,4-D, no fueron realizados hasta el momento estudios utilizando esta metodología en peces, por lo cual este estudio demuestra el daño oxidativo en el ADN causado por la exposición a estos herbicidas auxínicos no sólo en el pez Neotropical *C. decemmaculatus*, sino para peces a nivel global.

5.5 Evaluación de las alteraciones en biomarcadores enzimáticos y de neurotoxicidad

Muchos xenobióticos, incluidos los herbicidas, pueden producir ROS a través de distintos mecanismos como la inactivación de enzimas antioxidantes, el agotamiento de los antioxidantes celulares no enzimáticos, peroxidación lipídica de membranas, entre otros (Kaya y Yigit, 2012). La producción de ROS puede sobrepasar la capacidad antioxidante de las células lo que conduce a una situación de estrés oxidativo y al agotamiento de la defensa antioxidante de los organismos (Lushchak, 2011; Muthulakshmi y col., 2018) causando daño irreversible en macromoléculas y afectando así la función celular (Costantini y Verhulst, 2009; Poletta y col., 2016). Esta situación puede finalmente culminar en la inducción de daño a nivel de ADN, células, tejidos y órganos (Hulbert y col., 2007; Poletta y col., 2016) y afectar, en algunos casos, los patrones de comportamiento a nivel individual.

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se evaluó el estrés oxidativo inducido en individuos de *C. decemmaculatus* expuestos a DIC y 2,4-D en sus formulaciones comerciales Banvel® (57.7% DIC) y DMA® (58.4% 2,4-D), respectivamente, mediante la evaluación de alteraciones en la actividad de marcadores antioxidantes como CAT, GSH y GST. El análisis de los resultados evidenció un aumento significativo en la actividad de las enzimas antioxidantes CAT y GST en los peces expuestos durante 48 y 96 h a DIC y 2,4-D. El aumento en la actividad de CAT, ha sido reportado previamente en la bibliografía como una respuesta habitual en peces expuestos a varios plaguicidas, incluyendo herbicidas, en especies como *D. rerio* luego de la exposición a diquat (Wang y col., 2018), en *R. quelen* (Persch y col., 2017) y *L. obtusidens* (Gluszczak y col., 2011) expuestos a las formulación basada en glifosato Roundup® y en la perca trepadora (*Anabas testudineus*) y el pez gato de aguijón (*Heteropneustes fossilis*) expuestos a la formulación basada en glifosato, Excel Mera 71 (Samanta y col., 2014). Observaciones similares fueron reportadas en *P. lineatus* expuestos a atrazina (Paulino y col., 2012) y a *C. carpio* expuestos a simazina (Stara y col., 2012). De manera similar, la actividad de GST aumentó luego de 48 y 96 h de exposición a los herbicidas DIC y 2,4-D. Se ha reportado que el incremento en la actividad de GST podría estar relacionado a situaciones de estrés oxidativo. Estudios avalando esto han sido informados empleando *O. niloticus* y *C. carpio* expuestos a 2,4-D y azinfosmetil (Oruç y Uner, 2002; Oruc y col., 2004) así como a los compuestos terbutilazina y metribuzina (Hostovsky y col., 2012). Adicionalmente, un aumento en la actividad de GST fue reportada para el pez híbrido *Leiarius marmoratus* × *Pseudoplatystoma reticulatum* expuesto a glifosato en su formulación Roundup Original® (de Moura y col., 2017) así como a *P. lineatus* expuesto a atrazina (Paulino y col., 2012). Por lo expuesto, el aumento en la actividad de CAT y GST podría ayudar a prevenir el daño oxidativo en *C. decemmaculatus* causado por la exposición a los herbicidas DIC y 2,4-D.

Asimismo y ampliando lo expuesto previamente, cabe mencionar que ha sido sugerido en estudios realizados en ejemplares de *O. mykiss* expuesto a 2,4-D que la GST tendría un rol determinante en la detoxificación de xenobióticos incluido este pesticida en el medio acuático (Dierickx, 1985). Del mismo modo, estudios realizados in vitro en hepatocitos de rata expuestos a 2,4-D y a diferentes ácidos fenoxiacéticos, demostrarían que estos herbicidas se conjugarían directamente con el GST. De esta

forma, se ha sugerido que la unión GST-herbicida fenoxiacético ejercería un efecto protector del efecto deletéreo inducido por estos compuestos (Dierickx, 1983). Finalmente cabe mencionar que se desconoce acciones o efectos semejantes para el caso del otro herbicida auxínico evaluado en este trabajo de Tesis Doctoral como es el DIC.

Con respecto al tripéptido GSH, los resultados del presente trabajo de Tesis Doctoral revelaron una disminución en su actividad tanto en peces tratados por 48 como por 96 h a los herbicidas DIC y 2,4-D en sus respectivas formulaciones, Banvel® y DMA®. El glutati6n desempeña un papel esencial en el metabolismo y eliminaci6n de xenobi6ticos y forma parte de la primera l6nea de defensa frente al estr6s oxidativo (Finkel, 2000). Actúa como cofactor de ciertas enzimas desintoxicantes, participa en el transporte, actúa como eliminador de ROS, protege los lípidos de membrana de los agentes oxidantes y también regenera las vitaminas E y C, ampliamente conocidas por su capacidad antioxidante a sus formas reactivas. Los xenobi6ticos que entran en contacto con la célula pueden ser removidos por conjugaci6n con GSH mediante un mecanismo facilitado por GST, lo cual reduce los niveles de GSH (Zhang y col., 2004). La inhibici6n de las enzimas antioxidantes puede favorecer la reacci6n de Haber-Weiss, así como la acumulaci6n de oxiradicales que se combinan con H₂O₂ para formar el radical hidroxilo (% OH) que a su vez genera la oxidaci6n de biomoléculas esenciales como los lípidos y las proteínas. Resultados similares a los observados por nosotros fueron reportados en peces luego de la exposici6n a plaguicidas. Entre ellos el eperlano del delta (*Hypomesus transpacificus*) expuesto a flurocloridona y a glifosato (Jin y col., 2018) así como a *O. mykiss* expuesto a linuron (Topal y col., 2017), entre otros.

Adicionalmente, se evaluó la alteraci6n del biomarcador de neurotoxicidad, AChE. La inhibici6n de AChE conduce a una sobre estimulaci6n del sistema nervioso del organismo, por lo que estos herbicidas poseerían potencial neurotóxico. Es vasta la bibliografía que sostiene que AChE es un parámetro sensible para evaluar neurotoxicidad ejercida por xenobi6ticos, como plaguicidas organofosforados, piretroides y carbamatos (Kumar y col., 2009; Salbego y col., 2010). Se ha reportado una disminuci6n dosis-dependiente en la actividad AChE de *C. punctatus* expuestos a los insecticida λ-cialotrina y a cipermetrina (Kumar y col., 2009), en *L. obtusidens* luego

de la exposición a glifosato en su formulación Roundup® (Salbego y col., 2010; Glusczak y col., 2011) y en *H. transpacificus* expuesto a flurocloridona, penoxsulam y imazamox en las formulaciones comerciales Sonar® AS, Galleon® y Clearcast®, respectivamente (Jin y col., 2018). El estudio de alteraciones enzimáticas y del comportamiento ha proveído medidas integradas entre la neurotoxicidad mediada por la inhibición de la AChE en el tejido nervioso y las alteraciones comportamentales exhibidas por los organismos expuestos a distintos plaguicidas (Brewer y col., 2001; Kavitha y Rao, 2008). En peces, la actividad de la AChE posee un rol importante en la capacidad motora, de predación y en las interacciones sociales (Rodríguez-Fuentes y col., 2015). En la bibliografía se ha reportado una asociación positiva entre la disminución de la actividad de esta enzima y el deterioro en el comportamiento luego de la exposición a plaguicidas (Sandahl y col., 2005; Baldwin y col., 2009; Rodrigues y col., 2012), afectando entre otros, la locomoción y el equilibrio (Saglio y col., 1996; Rodrigues y col., 2012). Adicionalmente, las alteraciones en AChE podrían alterar el desarrollo temprano de los organismos (Behra y col., 2002). De acuerdo con estas observaciones, la disminución en la actividad de AChE observada en el presente trabajo de Tesis Doctoral podría relacionarse con las alteraciones en los patrones de comportamiento informados previamente en organismos de *C. decemmaculatus* expuestos de manera aguda a concentraciones subletales de DIC y 2,4-D (Sección 5.2), efecto observado y reportado previamente en estudios llevados a cabo con distintos plaguicidas en otras especies. Entre ellos, Ballesteros y col. (2009), observaron una disminución en la actividad natatoria que fue asociada con una inhibición de la AChE del músculo luego de una exposición de 24 h al insecticida endosulfán. Otros estudios llevados a cabo en *I. punctatus* y en el pez serrano (*Serranus scriba*) informaron una correlación entre alteraciones comportamentales y la inhibición de la AChE signo de intoxicación aguda por carbamatos y organofosforados, respectivamente (Bretaud y col., 2001 y bibliografía citada allí), siendo coincidentes con las observaciones realizadas por nosotros en el presente trabajo de Tesis Doctoral.

Por último, se observó una disminución en el contenido total de proteínas, indicando que los herbicidas auxínicos empleados causan alteraciones en el metabolismo de estas macromoléculas en los individuos expuestos. La disminución del contenido de proteínas en distintos tejidos en órganos como el hígado, los riñones, el

cerebro y las branquias de peces expuestos a distintos xenobióticos se encuentra bien documentando en la bibliografía. La reducción en los niveles de proteínas ha sido observada en peces expuestos a plaguicidas. Entre ellos a insecticidas como fenvalerato (Tripathi y Verma, 2004), clorpirifós (Rao y Ramaneswari, 2000; Naqvi y col., 2017), malation (Lal y col., 2013; Naqvi y col., 2017), α -cipermetrina (Tripathi y Singh, 2013), cipermetrina (Kumar y col., 2009; Ullah y col., 2014; Naqvi y col., 2017), λ -cialotrina (Kumar y col., 2009; Naqvi y col., 2017), permetrina (Sapana Devi y Gupta, 2014), σ -metrina (Sapana Devi y Gupta, 2014), fenitrotion (Sancho y col., 1998; Katsiadaki y col., 2006), diazinon (Ozcan Oruç y col., 2006) y endosulfán (Tripathi y Verma, 2004) y a herbicidas como atrazina (Persch y col., 2017), linuron (Katsiadaki y col., 2006), bentiocarb (Seshagiri y col., 1987), glifosato (Gluszczak y col., 2011; Samanta y col., 2014), monocrotofos (Rao y Ramaneswari, 2000), fipronil (Ghazanfar y col., 2018), buprofezin (Ghazanfar y col., 2018) y quinclorac (Persch y col., 2017), entre otros. Distintas explicaciones fueron propuestas con el fin de explicar este fenómeno, entre ellas que la disminución de los niveles de proteínas podrían estar dados por una respuesta fisiológica del organismo para compensar el estrés inducido por el xenobiótico, generando un aumento en la actividad proteolítica y/o una reducción en la síntesis de proteínas (Naqvi y col., 2017). Adicionalmente se ha sugerido que la exposición a ciertos xenobióticos podría producir un desbalance hormonal que afecta los niveles de contenido proteico en los tejidos, o daño en el ADN que conduciría a necrosis celular y a una alteración de la actividad de las enzimas (Al-Harbi y col., 2014; Naqvi y col., 2017). En base a los resultados expuestos, no podemos proponer ninguna explicación como la responsable del efecto observado por nosotros. Sí podemos afirmar que la disminución en el contenido de proteínas fue mayor en los individuos expuestos a 2,4-D que en los expuestos a DIC, y que esta disminución aumentó con el tiempo de exposición para ambos herbicidas estudiados.

Es sabido que si la generación de ROS excede la capacidad antioxidante de la célula puede causar tanto cambios en el ADN como su degradación (Cadet y col., 2003; Reinecke y Reinecke, 2004; Deyashi y Chakraborty, 2016). Se ha reportado que los efectos perjudiciales producidos por DIC y 2,4-D podrían estar asociados con la generación de ROS (Espandiari y col., 1998; Peixoto y col., 2008a). Los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral luego del análisis de la oxidación de

purinas en el ADN demostrado mediante el EC modificado (Sección 5.3) y el análisis de las alteraciones de enzimas antioxidantes se encuentran en concordancia con esta afirmación. Las alteraciones observadas en las actividades de las enzimas antioxidantes podrían atribuirse al hecho de que, bajo estrés oxidativo severo, las células intentan contrarrestar los efectos oxidantes activando o silenciando genes que codifican diversas enzimas del sistema de defensa, factores de transcripción y proteínas estructurales (Deyashi y Chakraborty, 2016).

Para 2,4-D se ha reportado en la bibliografía evidencia de su participación en la producción de estas especies reactivas (Oruç y Uner, 2002; Romero-Puertas y col., 2004; Bukowska, 2006). Estrés oxidativo inducido por 2,4-D ha sido reportado en estudios empleando tanto sistemas *in vitro* como *in vivo*. En ensayos *in vitro* con linfocitos humanos se observó el aumento de SOD y GPx luego del tratamiento con 2,4-D en el rango de concentraciones de 10-500 mg/L (IARC, 2015) y bibliografía citada allí). En este estudio la concentración de 500 mg/L redujo el nivel de GSH comparado con los valores control (Bukowska 2003). Adicionalmente, en ensayos utilizando levaduras como *S. cerevisiae* una formulación comercial de 2,4-D indujo aumentos de radicales hidroxilos (IARC, 2015 y bibliografía citada allí). En hepatocitos de ratas se observó la disminución de GSH y la inducción de peroxidación lipídica. En sistemas *in vivo*, es vasta la información empleando ratas como objeto de estudio, donde se detectó el aumento de los niveles de enzimas antioxidantes, peroxidación lipídica y oxidación proteica, así como efectos deletéreos en riñón e hígado luego de la exposición a 2,4-D (IARC, 2015 y bibliografía citada allí). Específicamente para peces, la inducción de estrés oxidativo ha sido reportado en *C. auratus* (Atamaniuk y col., 2013; Kubrak y col., 2013; Matviishyn y col., 2014), *D. rerio* (Li y col., 2009), *C. carpio* (Oruc y col., 2004) y *O. niloticus* (Oruc y col., 2004).

Con respecto a la información evaluando la inducción de estrés oxidativo inducido por el herbicida DIC, se observó en plantas como *S. tuberosum* el aumento de la actividad de la enzima antioxidante GST (Peixoto y col., 2003; 2008b) y en el amor de hortelano (*Galium aparine*) la inducción de daño tisular y muerte celular por peroxidación lipídica (Grossmann y col., 2001). En modelos animales como las ratas, se informó el aumento de peroxidación lipídica luego de la exposición a DIC (Espandiari y

col., 1995) y la pérdida de la actividad fosforilativa en mitocondrias (Peixoto y col., 2003).

Los resultados demuestran que ambos herbicidas auxínicos DIC y 2,4-D, en sus formulaciones comerciales Banvel® y DMA® actúan como agentes oxidantes en organismos no blanco tales como el pez Neotropical *C. decemmaculatus*. En adición, los resultados destacan que los biomarcadores empleados son valiosos para la evaluación de ambientes acuáticos contaminados, al menos cuando se emplean peces tales como *C. decemmaculatus*.

5.6 Evaluación de la letalidad inducida por mezclas de dicamba y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en sus formulaciones comerciales Banvel® y DMA®

En el modelo de agricultura actual, el empleo de varios plaguicidas al mismo tiempo formando parte de diferentes combinaciones llamadas mezclas, es una estrategia comúnmente utilizada para controlar y prevenir la aparición de plantas no deseadas (Ge y col., 2014). Esta estrategia se aplica como consecuencia del aumento de resistencia a plaguicidas, con el objetivo de aumentar su espectro de acción. Cada formulado tiene su requerimiento de manejo y preparación, y para ser utilizadas en mezclas se deben realizar pruebas de compatibilidad, mediante las cuales se decide el orden de mezclado de los diferentes plaguicidas al igual que otros aspectos a tener en cuenta como el volumen de pulverización, las características del agua de dilución y la temperatura ambiente, entre otros (Herzfeld y Sargent, 2011).

En la presente Tesis Doctoral, las posibles interacciones (sinergismo, antagonismo o aditividad) prevalentes en mezclas equitóxicas y no equitóxicas entre las formulaciones comerciales de DIC y 2,4-D fueron analizadas en *C. decemmaculatus* expuestos en condiciones controladas de laboratorio utilizando un modelo experimental agudo semiestático (USEPA, 1975; 2002b; IRAM, 2008).

De la aplicación de una mezcla de dos, o más sustancias deletéreas sobre una misma matriz biótica podrían ser definidas tres tipos de interacciones básicas resultantes: aditividad, cuando la toxicidad de la mezcla es igual a la esperada de la suma de las toxicidades conocidas de cada compuesto individual que está presente en

dicha mezcla (ej. $1+1=2$); sinergismo, cuando la toxicidad de la mezcla es mayor a la esperada si la mezcla fuese aditiva (ej. $1+1>2$) y antagonismo, cuando la toxicidad de la mezcla es menor a la esperada si la mezcla fuese aditiva (ej. $1+1<2$) (Calamari y Alabaster, 1980; Calabrese, 1991; Warne, 2003; Brodeur y col., 2016). Uno de los modelos para evaluar la toxicidad inducida por una mezcla de compuestos en laboratorio fue propuesta por Warne (2003) mediante la utilización de mezclas equitóxicas y no equitóxicas. Para esto, introdujo el término y concepto de Unidad Tóxica (UT). De acuerdo con el autor, su valor es asignado como equivalente a la concentración de un compuesto determinado que es capaz de inducir el 50% de la mortalidad en el organismo en estudio ($1UT=CL50_{96h}$). En las mezclas equitóxicas, siguiendo este modelo y tomando como ejemplo más simple el de una mezcla binaria, o en otras palabras mezcla de 2 tóxicos, cada compuesto participa en una concentración equivalente expresada en UT. De esta forma, si la mezcla tiene un valor final de UT de 1, significa que en la misma está formada por 0,5 UT del compuesto A y 0,5 UT del compuesto B. Inversamente, en el caso de las mezclas no equitóxicas, los componentes no están presentes en la mezcla aportando la misma toxicidad en función de sus UT. Si la mezcla no equitóxica tiene un valor final de UT de 1, significa que, a modo de ejemplo, en la misma podrían participar 0,2 UT del compuesto A y 0,8 UT del compuesto B, para que en conjunto ejerzan un efecto equivalente a 1 UT. Este método permite estimar en ensayos de exposición aguda, la toxicidad de una mezcla de dos xenobióticos mediante la determinación de la letalidad, por ejemplo, o cualquier otro punto final que se pretenda evaluar con la condición de que a dicho efecto se le asigne arbitrariamente un valor de 1 UT independientemente de las concentraciones reales de los compuestos participantes en la misma (Warne, 2003).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral demostraron un valor de UT_{50} de 1,02 (rango, 0,96-1,08) para la mezcla equitóxica de los formulados comerciales de DIC y 2,4-D, Banvel® y DMA®, respectivamente. Teniendo en cuenta que esta UT_{50} es cercana a la unidad, podría sugerirse que la formulación analizada ejerce una interacción aditiva para la mezcla binaria de DIC y 2,4-D. Cuando se analizaron las mezclas no equitóxicas de los herbicidas para evaluar su posible toxicidad, nuestros resultados demostraron la existencia de interacciones sinérgicas en las cuatro combinaciones de las formulaciones comerciales de DIC y 2,4-D, Banvel® y DMA®,

respectivamente. En consecuencia, estos resultados sugieren que las mezclas de las formulaciones de DIC y 2,4-D son más tóxicas cuando se aplican en combinaciones no equitóxicas que la suma de sus toxicidades individuales.

De acuerdo con el diseño experimental empleado, la determinación de $UT50_{96h}$ se logra con una única mezcla equitóxica capaz de inducir la mortalidad del 50% del organismo expuesto. Sin embargo, cuando se emplean mezclas no equitóxicas, y de acuerdo con las sugerencias de Warne (2003), el tipo de interacción toxicológica que prevalece en la mezcla resulta de al menos cuatro observaciones experimentales independientes. Por lo tanto, las conclusiones que se obtienen a partir de los ensayos no equitóxicos deberían ser consideradas más representativas de la situación que tiene lugar cuando dos agroquímicos se aplican conjuntamente en el ambiente.

Durante los últimos años se publicaron distintos trabajos reportando los efectos tóxicos y genotóxicos ejercidos por mezclas de plaguicidas. Entre ellos, se informó un sinergismo leve en las mezclas entre glifosato e imazapir, triclopir o un surfactante de aceite vegetal en *Ceriodaphnia dubia* y *P. promelas* (Tatum y col., 2012). De manera similar, los efectos tóxicos de la mezcla entre glifosato y dimetoato se evaluó en la lombriz *Eisenia andrei*, el isópodo *Porcellionides pruinosus* y en semillas de nabo (*Brassica rapa*) (Santos y col., 2011). Más aún, los estudios reportados por Santos y col. (2011) mostraron un efecto sinérgico cuando ejemplares del invertebrado *P. pruinosus* fueron expuestos a 5 o 10 veces la concentración usada a campo. Sin embargo, cuando se estudió la capacidad de germinación de *B. rapa* a concentraciones realistas se observó un patrón sinérgico, mientras que a concentraciones 5 o 10 veces mayores que las concentraciones de campo, el efecto observado fue antagónico (Santos y col., 2011). De manera similar, se reportaron efectos sinérgicos en la abeja europea (*Apis mellifera*) expuestas a mezclas binarias de imidacloprid con 7 agroquímicos distintos (Zhu y col., 2017) y en el pez cebra *D. rerio* expuestos a combinaciones binarias de clorpirifós y β -cipermetrina (Zhang y col., 2017). Adicionalmente, en un trabajo reciente nuestro grupo de investigación (2016) reportó un patrón sinérgico para la mezcla de formulaciones comerciales de glifosato (Credit® 48%) en combinación con el formulando comercial basado en DIC Banvel® evidenciado mediante el EC en células circulantes de renacuajos de *R. arenarum* (Soloneski y col., 2016). De los trabajos existentes evaluando la toxicidad de mezclas, solo tres se basaron en el mismo diseño

experimental empleado en el presente trabajo, el descrito por Warne empleando el diseño experimental de UT50 (Warne, 2003). Brodeur y col. (Brodeur y col., 2014; Brodeur y col., 2016) analizaron mezclas binarias de formulaciones basadas en glifosato y cipermetrina en *R. arenarum* y en *C. decemmaculatus*. Sus resultados demostraron efectos opuestos dependiendo de la especie empleada. Para *R. arenarum*, la mezcla de glifosato y cipermetrina tuvo efectos sinérgicos, mientras que para *C. decemmaculatus* el efecto observado fue antagónico, por inhibición de la toxicidad de la cipermetrina por parte del glifosato. En adición a estos trabajos, recientemente nuestro grupo evaluó la interacción de glifosato con DIC y 2,4-D en *C. decemmaculatus*, observando una interacción antagónica para ambas mezclas equitóxicas, mientras que para mezclas no equitóxicas se observó una interacción antagónica para la mezcla entre glifosato y DIC, mientras que para la mezcla entre glifosato y 2,4-D se observó un efecto sinérgico.

Aunque los tratamientos *in vivo* de este ensayo cubrieron un amplio rango de concentraciones, la menor concentración ensayada de DIC y 2,4-D en mezclas no equitóxicas fue de 0,01 UT, valores que corresponden a 17,07 mg/L y 10,08 mg/L para DIC y 2,4-D, respectivamente. Por este motivo, estos valores se encuentran dentro de un rango de concentraciones relativamente alto con respecto a los valores detectados en EE. UU. de 2,1 µg/L de DIC para el agua de escorrentía superficial y 24 µg/L de 2,4-D para las aguas superficiales (Phillips y Bode, 2004; Tagert y col., 2014), incluso considerando las tasas de aplicación recomendadas de 1500 cm³/hL para DIC y 3,5 L/ha para 2,4-D, en Argentina (CASAFE, 2017a). Por lo expuesto, se esperaría que las concentraciones empleadas de ambos herbicidas sean casi improbables de encontrarse en el ambiente, tal vez sólo observadas en eventos específicos (por ejemplo, aplicación directa o descarga accidental). Sin embargo, no podemos descartar que las poblaciones de peces, y también los trabajadores y población de áreas rurales así como la biota en general, puedan estar expuestos el algún momento de su ciclo de vida a este rango de concentraciones de agroquímicos de manera accidental.

La utilización de mezclas trae como consecuencia que a los distintos compartimentos ambientales lleguen e interaccionen mezclas de sustancias o compuestos cuyo efecto y potencial toxicidad puede variar significativamente de la que pueden presentar los mismos al actuar de manera individual (Cox y Surgan, 2006;

Soloneski y col., 2016). Cabe destacar que en los ensayos realizados en la presente Tesis Doctoral se utilizaron dos formulaciones de herbicidas comercializados en Argentina, Banvel® (57,7% DIC) y DMA® (58,4% 2,4-D) por lo que, teniendo en cuenta que la toxicidad de un p.a. puede diferir significativamente de la de la formulación que lo contiene, como fue expuesto anteriormente, se debe tener precaución con el concepto de mezclas binarias de las dos formulaciones comerciales que fueron evaluadas. Las mezclas ensayadas involucraron formulaciones completas de herbicidas, que incluyen las mezclas de varios componentes por sí mismas como la presencia de excipientes (USEPA, 1982). En adición, no podemos asumir que la proporción de cada constituyente de las mezclas que usamos siga un mismo perfil en sistemas acuáticos ya que los diferentes componentes pueden sufrir diferentes patrones de transformación o degradación en el medio ambiente. Por lo tanto, en el ambiente se podrían producir diferentes patrones de ocurrencia, divergiendo de los que evaluamos. Más estudios son necesarios para revelar si el patrón de toxicidad ejercido por las mezclas de Banvel® y DMA® en el *C. decemmaculatus* es atribuible a los p.a. por sí mismos o es resultado de la presencia de otros compuestos presentes en las formulaciones ensayadas. Por último, los resultados de las combinaciones equitóxicas de ambos herbicidas podrían indicar que la interacción de la mezcla es aditiva. Sin embargo, los resultados demostraron la existencia de interacción sinérgica cuando se ensayaron combinaciones no equitóxicas de herbicidas formulados con Banvel® o DMA®. Los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral representan la primera evidencia de la letalidad ejercida por una mezcla de dos herbicidas auxínicos ampliamente utilizados, DIC y 2,4-D, no solo para el pez *C. decemmaculatus* sino también para otras matrices bióticas.

5.7 Cuantificación de la inducción de lesiones primarias en el ADN luego de exposición crónica

La importancia del empleo de estudios de toxicidad crónica en organismos acuáticos radica en poder para identificar aquellos xenobióticos con la capacidad de

inducir daño en el ADN luego de una exposición prolongada, que podría aumentar la aparición de potenciales enfermedades, entre ellas la carcinogénesis. Los resultados demostraron que luego de la exposición crónica a concentraciones de 25,2 y 50,4 mg/L de 2,4-D, equivalentes al 2,5% y 5% de los valores de CL50_{96h} reportados previamente (Sección 5.1, Publicación II, ver Anexo I), aumentaron las frecuencias de rupturas en el ADN estimadas utilizando el EC en peces expuestos por 7, 14, 21 y 28 d. Por otro lado, la exposición a las concentraciones de 41 y 82 mg/L DIC, aumentaron la frecuencia de rupturas en el ADN en los peces expuestos por 7-14 d y 7 d para las concentraciones 2,5% y 5%, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los resultados informados previamente (Sección 5.2.2), que demuestran que después de una exposición aguda de 96 h a los formulados comerciales de DIC y 2,4-D en el rango de concentración 410-1229 y 252-756 mg/L, respectivamente, se observó una mayor frecuencia de rupturas en el ADN, independientemente de la duración del tratamiento (Publicaciones I y II).

La frecuencia de células dañadas observadas luego de la exposición crónica a DIC, equivalente al 2,5% de los valores de CL50_{96h} para este herbicida, fue significativamente mayor que la del CN luego de 7 y 14 d de tratamiento. Por otra parte, la frecuencia de células dañadas aumentó significativamente luego de 7 d de tratamiento en los individuos expuestos al 5% de la CL50_{96h}. Adicionalmente, los resultados del DIC revelaron que con un período de tan solo 7 d fue suficiente para inducir rupturas en el ADN en las dos concentraciones de DIC analizadas. Sin embargo, el tiempo requerido para la inducción del nivel máximo de daño en el ADN varió dependiendo de la concentración de DIC. Cuando se empleó 82 mg/L DIC, este nivel fue observado en el día 7, mientras que para la concentración de 41 mg/L DIC, el nivel más alto de daño en el ADN se observó el día 14. Luego del pico máximo de daño, éste fue disminuyendo al transcurrir 21 y 28, pero sin alcanzar los valores del CN. Esta disminución en la genotoxicidad inducida por el herbicida DIC podría deberse al hecho que los organismos expuestos podrían generar un mecanismo de tolerancia al efecto genotóxico a lo largo del periodo de exposición, respuesta similar que fuera observada durante la inducción de MNs, donde se observó un incremento significativo de la inestabilidad genómica al cabo de 48 h de exposición pero no luego de 96 h luego del tratamiento continuo con DIC.

De manera similar, los resultados revelaron un aumento significativo en la inducción de daño en el ADN en muestras de *C. decemmaculatus* expuestas crónicamente a las dos concentraciones subletales de 2,4-D analizadas. La frecuencia de células dañadas observadas en *C. decemmaculatus* luego de la exposición crónica a concentraciones equivalentes al 2,5% y 5% de CL50_{96h}, fueron significativamente más altas que las del grupo control en todos los tiempos analizados (7-28 d). Estos hallazgos concuerdan con estudios previos reportados para el herbicida. La toxicidad crónica de 2,4-D ha sido reportada en la mosca de la fruta *D. melanogaster* al aumentar la frecuencia de mutaciones cuando se empleó un ensayo de mutación y recombinación somática (Kaya y col., 1999). En ratas y ratones expuestos con 2,4-D, Charles y col. (Charles y col., 1996) informaron una baja toxicidad y alteraciones oncogénicas después de la ingesta prolongada de 2,4-D. De manera similar, se observaron alteraciones en las células germinales de ratas expuestas crónicamente a la formulación comercial conteniendo 2,4-D, Tordon 75D[®], y daño testicular y reducción de células espermáticas en sus crías (Oakes y col., 2002). Hasta el momento, no se han reportado estudios en peces expuestos de manera crónica a 2,4-D y DIC, por lo que estos resultados demuestran por primera vez el efecto genotóxico de estos dos herbicidas en un organismo acuático, como *C. decemmaculatus*, después de las condiciones de exposición a largo plazo. Los resultados revelaron que tan sólo en un período de 7 d se observó inducción de rupturas en el ADN en peces tratados con 2,4-D. Adicionalmente, el nivel máximo de daño en el ADN fue observado a los 21 d, en ambas concentraciones de 2,4-D. A los 28 d de exposición, el daño disminuyó en relación con el observado el día 21, pero nunca alcanzó los valores del CN. El nivel de daño en el ADN observado en las células sanguíneas de *C. decemmaculatus* no fue dependiente del tiempo para ambas concentraciones de 2,4-D evaluadas entre 7 y 28 d.

Los resultados obtenidos concuerdan con investigaciones previas reportadas en sistemas *in vitro* e *in vivo* expuestos a varios plaguicidas donde se ha observado un mecanismo adaptativo de tolerancia (Çavaş y Könen, 2007; Chang y col., 2009; Mezzelani y col., 2018). En líneas generales se observa una tendencia a la disminución del daño en el ADN hacia el final del período de exposición. Una explicación a este efecto podría ser debido a un mecanismo de tolerancia que genera la adaptación al

estrés inducido en órganos hematopoyéticos de *C. decemmaculatus*, que aumenta su resistencia en condiciones de exposición crónica. Es sabido que una exposición continua a xenobióticos ambientales puede aumentar la resistencia de los organismos expuestos, incluso a concentraciones letales (Campana y col., 1999; de Lemos y col., 2001; Mezzelani y col., 2018). Algunos autores han demostrado que después de tratamientos crónicos, la frecuencia del daño del ADN en las células sanguíneas de los peces, así como en los hemocitos de los mejillones, disminuye después de 15 y 60 d de exposición, respectivamente (Campana y col., 1999; de Lemos y col., 2001; Mezzelani y col., 2018). Esto parece estar relacionado con el reemplazo celular continuo de las células dañadas con el fin de mantener las condiciones fisiológicas normales (Mersch y col., 1996; Çavaş y Könen, 2007). Otra explicación posible podría sugerirse, la que estaría relacionada con la perturbación de los procesos enzimáticos participantes en los mecanismos de desintoxicación (Kumar y col., 2012), o en la activación génica de enzimas como P450 en diversos tejidos, que proporcionaría un mecanismo de defensa contra la inducción de daño en el ADN después de la exposición (Espandiari y col., 1995; 1999). Para poder confirmar estas hipótesis más estudios serían necesarios.

Los xenobióticos con un patrón evidente de toxicidad crónica pueden tener consecuencias indeseables en la biota en concentraciones muy inferiores a las que producen efectos agudos (Aronzon y col., 2011). Los resultados muestran que el uso del EC en células sanguíneas puede detectar lesiones de ADN a concentraciones bajas de herbicidas auxínicos después de tratamiento crónico. Adicionalmente, este estudio confirma que el EC es un biomarcador sensible para evaluar las propiedades genotóxicas crónicas de los herbicidas auxínicos, específicamente DIC y 2,4-D, al menos cuando se emplea un pez pequeño como *C. decemmaculatus* como el modelo experimental.

5.8 Consideraciones generales

A nivel mundial distintas poblaciones de especies, particularmente de vertebrados acuáticos, se encuentran en un proceso de declive (Tierney y col., 2010; Ogada, 2014). Esta situación en la mayoría de los casos está asociada a las prácticas agrícolas actuales, que tienen como base el uso indiscriminado de plaguicidas, y que

como consecuencia principal provocan la transformación y contaminación del ambiente (Mann y col., 2009). Entre las consecuencias de la intensificación de la agricultura junto con el empleo masivo de agroquímicos podemos mencionar la pérdida y/o modificación del hábitat, las enfermedades, el cambio climático, la introducción de especies exóticas, la sobreexplotación del suelo, entre otros (Howard, 1991). En los últimos años, los peces se han convertido en un modelo de estudio ampliamente utilizado y validado para la evaluación del riesgo potencial existente en el ambiente debido a las diferentes actividades antrópicas. Como fue expuesto anteriormente, está ampliamente documentado en la bibliografía que distintos xenobióticos, entre los que se encuentran los plaguicidas, ejercen numerosos efectos deletéreos sobre las poblaciones ictícolas (McKenzie y col., 2007; Cavalcante y col., 2008; Lazartigues y col., 2013; Zhao y col., 2014).

DIC y 2,4-D pueden ingresar al ambiente a través de diferentes efluentes y derrames resultantes de su fabricación, almacenamiento y transporte, o directamente a través de su aplicación como agentes herbicidas. Por su rápida degradación, estos herbicidas no se bioacumulan en organismos terrestres o acuáticos, pero sí en algunas algas (WHO, 2003). Residuos de DIC y 2,4-D pueden ingresar a los cuerpos de agua de diversas maneras, incluyendo aplicación directa o deriva accidental, a través de depósitos en lechos de secado, fondos de estanque o canales de irrigación, escorrentía de suelos y lixiviación a través de la columna de suelo (Norris, 1981). La contribución del agua subterránea a los diferentes cuerpos de agua superficial depende del tipo de suelo. En suelos arenosos de grano grueso y bajo contenido orgánico se espera que lixivien hacia las aguas subterráneas (Ghassemi y col., 1981; Norris, 1981). Adicionalmente, si bien la contaminación del suelo y aguas subterráneas por escorrentía y transporte de los plaguicidas a través de los diferentes compartimentos ambientales, ha sido el foco de muchas investigaciones, hay evidencias de que procesos previos y posteriores a la utilización de los productos, tales como el transporte, la preparación y limpieza de los tanques pueden actuar como una fuente puntual de contaminación para el medio ambiente (Gan y col., 1996; Helweg y col., 1999; Higginbotham y col., 1999; Poggi-Varaldo, 1999; Suciu y col., 2011).

La aplicación de plaguicidas en el campo involucra generalmente tres procesos: la preparación de la solución del plaguicida en el tanque, la aplicación de la

preparación en las tierras de cultivo, y por último la limpieza del tanque y los envases con los cuales se comercializa y transporta a los plaguicidas. Es conocido que la solución de aplicación tiene el potencial para introducir en el medio ambiente volúmenes de plaguicidas altamente concentrados, pero en los últimos años surgieron evidencias que la fase de limpieza posterior a la aplicación podría también ser fuente de contaminación que no debe ser subestimada (Castillo y col., 2008; Osborne y col., 2015). En relación a esto, se han reportado concentraciones de plaguicidas más altas en el suelo debajo de la preparación de plaguicidas y las áreas de limpieza que en otras áreas del terreno, debido a una combinación de derrames, goteos y liberación de enjuagues (Higginbotham y col., 1999; Helweg y col., 2002). Particularmente para DIC y 2,4-D, concentraciones entre 3-3,6 mg/L han sido reportadas para mediciones realizadas en Colorado, Estados Unidos luego del segundo lavado de los elementos utilizados en su aplicación (Osborne y col., 2015).

Para la utilización de todos los formulados de plaguicidas se indica a los trabajadores agrícolas seguir de manera estricta las pautas de preparación descritas en el marbete del producto. En particular para los herbicidas auxínicos DIC y 2,4-D, debido a la alta volatilización que presentan, en algunos países se ha establecido que los trabajadores agrícolas deban estar capacitados para minimizar posibles efectos colaterales en otras zonas o cultivos aledaños. Por lo tanto, ya sea por una ineficiente dilución o degradación, después de aplicarse pueden alcanzar concentraciones que podrían presentar efectos tóxicos en la biota acuática. Desafortunadamente, es poca o nula la información en la literatura sobre los niveles de DIC y 2,4-D existentes en cuerpos de agua de nuestro país. Sólo un reporte informa niveles de 2,4-D de 0,99 µg/L en el arroyo El Crespo, en el Partido de Balcarce, donde fue detectado en el 83,87% de las muestras analizadas (Pérez y col., 2017). Teniendo en cuenta esto, los tratamientos realizados en estos estudios, aunque abarcaron un amplio rango de concentraciones, son mayores a las encontradas en el ambiente y a las recomendadas para el uso de estos formulados comerciales. Aun así, aunque las concentraciones de herbicidas auxínicos utilizadas en estos estudios podrían ser consideradas improbables en el ambiente, las mismas podrían ser encontradas durante eventos puntuales como en el caso de aplicación directa, descargas accidentales o de la generación de residuos derivados del manejo inadecuado. Por lo expuesto no podemos descartar la

posibilidad que aplicaciones reiteradas de los herbicidas auxínicos DIC y 2,4-D empleados en diferentes cultivos del agro de nuestro país puedan ingresar en los ambientes acuáticos, pudiendo ocasionar efectos deletéreos no sólo sobre los peces sino sobre otras poblaciones de organismos acuáticos.

5.9 Conclusiones finales

En base a los objetivos planteados y los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral, podemos llegar a las siguientes consideraciones finales:

- Los herbicidas auxínicos evaluados, DIC y 2,4-D en sus formulaciones comerciales Banvel® y DMA® fueron capaces de ejercer efectos letales y subletales como alteraciones en el comportamiento, efectos genotóxicos y alteraciones en los niveles basales de enzimas antioxidantes en *C. decemmaculatus*.
- Las formulaciones comerciales Banvel® (57,4% DIC) y DMA® (58,4% 2,4-D) en base a los resultados de los ensayos de letalidad deberían ser consideradas como compuestos nocivos (categoría III) (UN, 2011) para *C. decemmaculatus* de acuerdo con los patrones internacionales de clasificación de riesgo toxicológico para especies acuáticas.
- El formulado comercial DMA® basado en 2,4-D ejerció un efecto tóxico mayor que el formulado comercial Banvel® basado en el herbicida DIC sobre *C. decemmaculatus*.
- Ambas formulaciones comerciales evaluadas produjeron alteraciones en el comportamiento, las cuales fueron observadas durante todos los tiempos de exposición.
- La formulación comercial Banvel® (DIC 57,7%) fue capaz de aumentar la frecuencia de MNs en la concentración más alta evaluada sólo a las 48 h de exposición. Por otro lado, la formulación comercial DMA® (58,4% 2,4-D) fue capaz de incrementar la frecuencia de MNs tanto a las 48 como a las 96 h en todas las concentraciones ensayadas. El ensayo de MNs es un biomarcador validado en el campo de la Genética Toxicológica para evaluar y para detectar respuestas tempranas luego de la exposición a concentraciones subletales de distintos xenobióticos, entre ellos los herbicidas. Estos resultados confirman su utilidad

para evaluar efectos a nivel citogenético en especies autóctonas y realizar evaluaciones y monitoreos ambientales, al menos de vertebrados acuáticos.

- Ambas formulaciones demostraron ser capaces de inducir efectos genotóxicos evidenciado por un incremento de lesiones primarias en la cadena de ADN de células sanguíneas de ejemplares adultos de *C. decemmaculatus* expuestos en condiciones de laboratorio y evaluadas y cuantificadas empleando el EC en su versión alcalina. Los resultados del presente trabajo de Tesis Doctoral concuerdan con los antecedentes que proponen al EC como una metodología más sensible que el ensayo de MNs para detectar efectos deletéreos del ADN por exposición a bajas concentraciones de los herbicidas auxínicos DIC y 2,4-D, al menos en sus formulaciones comerciales Banvel® y DMA®, respectivamente.
- Mediante la metodología del EC modificado mediante tratamientos con enzimas de restricción fue posible comprobar la capacidad del herbicida DIC en su formulado comercial Banvel® y del herbicida 2,4-D en su formulado comercial DMA® de inducir daño oxidativo en bases púricas del ADN, pero no pirimidínicas.
- Adicionalmente, ambos herbicidas auxínicos produjeron alteraciones en los parámetros antioxidantes de *C. decemmaculatus*, pudiendo concluir que tanto DIC como 2,4-D deberían ser considerados agentes oxidantes. La evaluación de mezclas equitóxicas y no equitóxicas de las formulaciones comerciales basadas en DIC y 2,4-D permitió determinar que en mezclas equitóxicas la interacción dominante entre ambos compuestos es la aditividad mientras que en mezclas no equitóxicas se observó un comportamiento sinérgico entre las mismas.
- El herbicida DIC fue capaz de inducir lesiones primarias en el ADN luego de una exposición crónica de 7 y 14 d a una concentración equivalente al 2,5% de la CL50_{96h} y luego de 7 d a una concentración equivalente a 5% de la CL50_{96h}. El herbicida 2,4-D fue capaz de inducir lesiones primarias en la molécula de ADN luego de una exposición crónica durante un lapso de 7-28 d a concentraciones equivalentes al 2,5% y 5% de la CL50_{96h}, observándose la máxima inducción de daño luego del tratamiento en los menores tiempos de exposición.
- Ambos herbicidas auxínicos ejercieron efectos letales y subletales, entre ellos efectos cito y genotóxicos y efectos indicadores de estrés oxidativo en el organismo de prueba empleado, *C. decemmaculatus*.

-
-
- Nuestras investigaciones constituyen la primera evidencia del empleo del poecílido Neotropical *C. decemmaculatus* utilizando los ensayos de MNs y el EC como biomarcadores de efecto a la exposición de dos formulaciones comerciales de herbicidas auxínicos ampliamente usados en Argentina y a nivel mundial.

Finalmente, es importante destacar que si bien los ensayos en laboratorio no reproducen las mismas condiciones del medio natural ni las interacciones complejas que ocurren en él, los estudios realizados en el presente trabajo de Tesis Doctoral han demostrado mediante los diferentes ensayos realizados que los herbicidas auxínicos DIC y 2,4-D presentes en las formulaciones Banvel® y DMA® son capaces de inducir efectos letales, genotóxicos, citotóxicos y el efecto de estrés oxidativo en el pez Neotropical *C. decemmaculatus*. Es relevante destacar que las concentraciones empleadas en el presente trabajo de Tesis Doctoral se encuentran en el orden de mg/L, mientras que hasta el presente, las detectadas en el ambiente acuático se encuentran en el orden de µg/L. Aun así, debido a la amplia utilización de DIC y 2,4-D en el agro argentino, a la poca información sobre sus concentraciones en el ambiente en nuestro país, sumado al prácticamente nulo control del estado sobre las prácticas de manejo agrícola, no podemos descartar la posibilidad que estos herbicidas lleguen al ambiente acuático ejerciendo efectos deletéreos no sólo sobre la especie evaluada, *C. decemmaculatus*, sino también sobre otros organismos acuáticos.

Estudios futuros son necesarios para poder determinar claramente el perfil toxicológico de DIC y 2,4-D en sus formulaciones comerciales a fin de evaluar el riesgo no sólo para organismos expuestos, sino para la salud humana.

Bibliografía

- Ackerman, P.A., Morgan, J.D. y Iwama, G.K. (2005) Anesthetics. In: Canadian Council on Animal Care (Ed.), *The Care and use of Fish in Research, Teaching and Testing*. Canadian Council on Animal Care, Ottawa, CA. 53-54.
- Adhikari, N. y Grover, I.S. (1988) Genotoxic effects of some systemic pesticides: *in vivo* chromosomal aberrations in bone marrow cells in rats. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 12, 235-242.
- Ahmad, I. y Ahmad, M. (2016) Fresh water fish, *Channa Punctatus*, as a model for pendimethalin genotoxicity testing: a new approach toward aquatic environmental contaminants. *Environmental Toxicology* 31, 1520-1529.
- Al-Harbi, Mohammad, S., El-Rahman, A., Fawzia, A.A., El-Shenawy, Nahla, S., Al-Mutrafi y Warda, M. (2014) The beneficial effects of ascorbic acid during chlorpyrifos-induced oxidative stress and histopathological changes in *Oreochromis spilurus*. *Toxicology and Environmental Health Sciences* 6, 203-216.
- Al-Sabti, K. (1986) Comparative micronucleated erythrocyte cell induction in three cyprinids by five carcinogenic-mutagenic chemicals. *Cytobios* 47, 147-154.
- Al-Sabti, K. y Metcalfe, C.D. (1995) Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research* 343, 121-135.
- Alavanja, M.C.D., M, Samanic, C., Lubin, J.H., Lynch, C.F., Knott, C., Barker, J., Hoppin, J.A., Sandler, D.P., Coble, J., Thomas, K. y Blair, A. (2004) Pesticides and lung cancer risk in the agriculture health study cohort. *American Journal of Epidemiology* 160, 876-885.
- Alexander, H.C., Gersich, F.M. y Mayes, M.A. (1985) Acute toxicity of four phenoxy herbicides to aquatic organisms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 35, 314-321.
- Ali, D., El-Shehawi, A.M. y Sheehy, M.A. (2008) Micronucleus test in fish genome: a sensitive monitor for aquatic pollution. *African Journal of Biotechnology* 7, 606-612.
- Ali, D., Nagpure, N.S., Kumar, S., Kumar, R., Kushwaha, B. y Lakra, W.S. (2009) Assessment of genotoxic and mutagenic effects of chlorpyrifos in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Food and Chemical Toxicology* 47, 650-656.
- Alvarez-Moya, C., Reynoso Silva, M., Valdez Ramírez, C., Gómez Gallardo, D., León Sánchez, R., Canales Aguirre, A. y Feria Velasco, A. (2013) Comparison of the *in vivo* and *in vitro*

-
-
- genotoxicity of glyphosate isopropylamine salt in three different organisms. *Genetics and Molecular Biology* 37, 105-110.
- Allen, S.L. (2010) Regulatory aspects of acute neurotoxicity assessment, in: R I Krieger, J Doull, J J van Hemmen, E Hodgson, H I Maibach, L Ritter, J Ross y W Slikker (Ed.), *Handbook of Pesticide Toxicology* Elsevier, Burlington, MA, pp. 587–602.
- Amado, L.L., Garcia, M.L., Ramos, P.B.F., R F, Zafalon, B., Ferreira, L.R., Yunes, J.S. y Monserrat, J.M. (2009) A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms. Application to evaluate microcystins toxicity. *Science of The Total Environment* 409, 2115-2123.
- Amer, S.M. y Ali, E.M. (1974) Cytological effects of pesticides V. Effects of some herbicides on *Vicia faba*. *Cytologia (Tokio)* 39, 633-643.
- Annabi, A., Said, K. y Messaoudi, I. (2015) Monitoring and assessment of environmental disturbance on natural *Gambusia affinis* populations - Histopathological analysis. *Environmental Monitoring and Assessment* 187, 318-326.
- Anzalone, A. (2007) Herbicidas. Modos y mecanismos de acción en plantas. Universidad Centro Occidental "Lisandro Alvarado" 80 pág.
- APHA, AWWA y WEF (1998) Standard methods for the examination of water and waste water. American Public Health Association 20th Edition.
- Arias, E. (2007) Cytogenetic effects of short- and long- term exposure of chick embryos to the phenoxyherbicide 2,4-D. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 48, 462-466.
- Arkhipchuk, V.V. y Garanko, N.N. (2005) Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on *in vivo* fish fin cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62, 42-52.
- Aronzon, C.M., Sandoval, M.T., Herkovits, J. y Pérez-Coll, C.S. (2011) Stage-dependent toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic on the embryonic development of a South American toad, *Rhinella arenarum*. *Environmental Toxicology* 26, 373-381.
- ASTM (2007) Standard guide for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates, and amphibians. Biological effects and environmental fate. American Society for Testing and Materials E 729-96.
- Atamaniuk, T.M., Kubrak, O.I., Storey, K.B. y Lushchak, V.I. (2013) Oxidative stress as a mechanism for toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D): studies with goldfish gills. *Ecotoxicology* 22, 1498-1508.
- Ateeq, B., Abul Farah, M., Niamat Ali, M. y Ahmad, W. (2002) Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. *Mutation Research* 518, 135-144.
- Ateeq, B., Farah, M.A. y Ahmad, W. (2005) Detection of DNA damage by alkaline single cell gel electrophoresis in 2,4-dichlorophenoxyacetic-acid- and butachlor-exposed erythrocytes of *Clarias batrachus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62, 348-354.
- Azqueta, A. y Collins, A.R. (2013) The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of Toxicology* 87, 949-968.
- Azqueta, A., Costa-Amaral, I.C. y Collins, A.R. (2017) Chapter 2: High-throughput measurement of DNA breaks and oxidised bases with the comet assay, *The comet assay in toxicology*, pp. 67-92.
- Baldwin, D.H., Spromberg, J.A., Collier, T.K. y Scholz, N.I. (2009) A fish of many scales: extrapolating sublethal pesticide exposures to the productivity of wild salmon populations. *Ecological Applications* 19, 2004-2015.
-
-

-
-
- Ballesteros, M.L., Durando, P.E., Nores, M.L., Diaz, M.P., Bistoni, M.A. y Wunderlin, D.A. (2009) Endosulfan induces changes in spontaneous swimming activity and acetylcholinesterase activity of *Jenynsia multidentata* (Anablepidae, Cyprinodontiformes). *Environmental Pollution* 157, 1573-1580.
- Barbosa, J.S., Cabral, T.M., Ferreira, D.N., Agnez-Lima, L.F. y Batistuzzo de Medeiros, S.R. (2010) Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 320-325.
- Barry, K.H., Koutros, S., Andreotti, G., Sandler, D.P., Bourdette, L.A., Yeager, M., Beane Freeman, L.E.L., J H, Ma, X., Zheng, T., Alavanja, M.C.R. y Berndt, S.I. (2012) Genetic variation in nucleotide excision repair pathway genes, pesticide exposure and prostate cancer risk. *Carcinogenesis* 33, 331-337.
- Baudhuin, P., Beaufy, H., Rahman-Li, Y., Sellinger, O.Z., Wattiaux, R., Jacques, P. y De Duve, C. (1964) Tissue fractionation studies. 17. Intracellular distribution of monoamine oxidase, alanine aminotransferase, D-amino acid oxidase and catalase in rat liver tissue. *Biochemistry Journal* 92, 179-184.
- Beggel, S., Werner, I., Connon, R.E. y Geist, J.P. (2009) Sublethal toxicity of commercial insecticide formulations and their active ingredients to larval fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Science of The Total Environment* 408, 3169-3175.
- Behra, M., Cousin, X., Bertrand, C., Vonesch, J.L., Biellmann, D., Chatonnet, A. y Strähle, U. (2002) Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nature Neuroscience* 5, 111-118.
- Bell, A.M. (2001) Effects of an endocrine disrupter on courtship and aggressive behavior of male three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Animal Behaviour* 62, 775-780.
- Benitez, J.A., Cerón-Bretón, R.M., Cerón-Bretón, J.G. y Rendón-Von-Osten, J. (2014) The environmental impact of human activities on the Mexican coast of the Gulf of Mexico: Review of status and trends. *WIT Transactions on Ecology and the Environment* 181, 37-50.
- Bernal-Rey, D.L., Dos Santos Afonso, M. y Menendez-Helman, R.J. (2017) Effects of chlorpyrifos on acetylcholinesterase activity in two freshwater fish species (*Cnesterodon decemmaculatus* and *Gambusia affinis*). *International Journal of Environment and Health* 8, 316-330.
- Bhatti, P., Blair, A., Bell, E.M., Rothman, Lan, Q., Barr, D.B., Needham, L.L., Portengen, L., Figgs, L.W. y Vermeulen, R. (2010) Predictors of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid exposure among herbicide applicators. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology* 20, 160-168.
- Bills, T.D., Marking, L.L. y Mauck, W.L. (1981) Polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) residues in rainbow trout: effects on sensitivity to nine fishery chemicals. *North American Journal of Fisheries Management* 1, 200-203.
- Bokán, K., Syberg, K., Jensen, K. y Rank, J. (2013) Genotoxic potential of two herbicides and their active ingredients assessed with comet assay on a fish cell line, epithelioma papillosum cyprini (EPC). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 76, 1129-1137.
- Bonifacio, A.F., Ballesteros, M.L., Bonansea, R.I., Filippi, I., Amé, M.V. y Hued, A.C. (2017) Environmental relevant concentrations of a chlorpyrifos commercial formulation affect
-
-

-
-
- two neotropical fish species, *Cheirodon interruptus* and *Cnesterodon decemmaculatus*. *Chemosphere* 188, 486-493.
- Bonifacio, A.F., Cazenave, J., Bacchetta, C., Ballesteros, M.L., De Los Ángeles Bistoni, M., Amé, M.V., Bertrand, L. y Hued, A.C. (2016) Alterations in the general condition, biochemical parameters and locomotor activity in *Cnesterodon decemmaculatus* exposed to commercial formulations of chlorpyrifos, glyphosate and their mixtures. *Ecological Indicators* 67, 88-97.
- Brethead, S., Saglio, P. y Toutant, J.P. (2001) Behavioral dysfunctions correlate to altered physiology in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to cholinesterase-inhibiting chemicals. *Archives of Environmental and Contamination Toxicology* 40, 70-76.
- Brewer, S.K., Little, E.E., DeLonay, A.J., Beauvais, S.L., Jones, S.B. y Ellersieck, M.R. (2001) Behavioral dysfunctions correlate to altered physiology in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to cholinesterase-inhibiting chemicals. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 40, 70-76.
- Brodeur, J.C., Mempel, S., Anglesio, A.B., Cristos, D., D'Andrea, M.A. y Poliserpi, M.B. (2016) Toxicities of glyphosate- and cypermethrin-based pesticides are antagonistic in the ten-spotted livebearer fish (*Cnesterodon decemmaculatus*). *Chemosphere* 155, 429-435.
- Brodeur, J.C., Poliserpi, M.B., D'Andrea, M.F. y Sanchez, M. (2014) Synergy between glyphosate- and cypermethrin-based pesticides during acute exposures in tadpoles of the common South American toad *Rhinella arenarum*. *Chemosphere* 112, 70-76.
- Broley, C. (1958) The plight of the American bald eagle. *Audobon Magazine* 60, 162-171.
- Brühl, C.A., Pieper, S. y Weber, B. (2011) Amphibians at risk? Susceptibility of terrestrial amphibian life stages to pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 2465-2472.
- Bukowska, B. (2006) Toxicity of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid - molecular mechanisms. *Polish Journal of Environmental Studies* 15, 365-374.
- Bunch, T.R., Gervais, J.A., Buhl, K. y Stone, D. (2012) Dicamba Technical Fact Sheet. National Pesticide Information Center, Oregon State University Extension Services http://npic.orst.edu/factsheets/archive/dicamba_tech.html.
- Burmeister, L.F. (1990) Cancer in Iowa farmers: recent results. *American Journal of Industrial Medicine* 18, 295-301.
- Cabagna, M.C., Lajmanovich, R.C., Peltzer, P.M., Attademo, A.M. y Ale, E. (2006) Induction of micronuclei in tadpoles of *Odontophrynus americanus* (Amphibia: Leptodactylidae) by the pyrethroid insecticide cypermethrin. *Toxicological and Environmental Chemistry* 88, 729-737.
- Cabrera, C., Ortega, E., Lorenzo, M.L. y Lopez, M.D.C. (1998) Cadmium contamination of vegetable crops, farmlands, and irrigation waters. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 154, 55-81.
- Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D. y Ravanat, J.L. (2003) Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutation Research* 531, 5-23.
- Calabrese, E.J. (1991) *Multiple Chemical Interactions*. Lewis Publisher, Chelsea, Mi, USA. pag.
- Calamari, D. y Alabaster, J.S. (1980) An approach to theoretical models in evaluating the effects of mixtures of toxicants in the aquatic environment. *Chemosphere* 9, 533-538.
- Calcavante, D., Bueno dos Reis Martinez, C. y Sofia, S.H. (2008) Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutation Research* 655, 41-46.
-
-

-
-
- Camargo, F.A.O., Silva, L.S., Merten, G.H., Carlos, F.S., Baveye, P.C. y Triplett, E.W. (2017) Brazilian agriculture in perspective: Great expectations vs reality. *Advances in Agronomy* 141, 53-114.
- Campana, M.A., Panzeri, A.M., Moreno, V.J. y Dulout, F.N. (1999) Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*. *Mutation Research* 438, 155-161.
- Carrasco, K.R., Tilbury, K.L. y Mayers, M.S. (1990) Assessment of the piscine micronuclei test as an *in situ* biological indicator of chemical contaminants effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 47, 2123-2136.
- Carriquiriborde, P., Díaz, J., Mugni, H., Bonneto, C. y Ronco, A.E. (2007) Impact of cypermethrin on stream fish populations under field-use in biotech-soybean production. *Chemosphere* 68, 613-621.
- CASAFE (2009) La Argentina 2050. La revolución tecnológica del agro. Hacia el desarrollo integral de nuestra sociedad. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes, 744.
- CASAFE (2017a) Guía de Productos Fitosanitarios para la Republica Argentina, 18 ed. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes, Buenos Aires. pag.
- CASAFE (2017b) Mercado de productos fitosanitarios / Año 2011 vs 2012. <http://www.casafe.org/publicaciones/estadisticas/>. Last accessed March 2018, p. 9.
- Casares, M.V., de Cabo, L.I., Seoane, R. y Natale, O. (2013) Acute silver toxicity to *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces: Poeciliidae) in a river with extreme water-quality characteristics *Acta Toxicológica Argentina* 21, 93-101.
- Casares, M.V., De Cabo, L.I., Seoane, R.S., Natale, O.E., Castro Rios, M., Weigandt, C., De Iorio, A.F. y p. (2012) Measured copper toxicity to *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces: Poeciliidae) and predicted by biotic ligand model in Pilcomayo River water: A step for a cross-fish-species extrapolation. *Journal of Toxicology* 2012, 1-11.
- Casarett, L.J. y Doull's, J. (2008) *Toxicology: The basic science of poisons*. McGraw-Hill. 1280 pag.
- Castano, A., Cantarino, M.J., Castillo, P. y Tarazona, J.V. (1996) Correlation between the RTG-2 cytotoxicity test EC50 and *in vivo* LC50 rainbow trout bioassay. *Chemosphere* 32, 2141–2157.
- Castillo, M.D.P., Torstensson, L. y Stenstrom, J. (2008) Biobeds for environmental protection from pesticide use-A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 6206-6219.
- Castro Scarone, S., Espínola Moltedo, J.C., Miguez Caramés, D. y Viana Matturro, F. (2002) Los bioensayos como herramienta de evaluación de la toxicidad de los efluentes industriales en Uruguay, Informe final. International Development Research Centre (IDRC), File 04464, Canadá. pag.
- Cattaneo, R., Loro, V.L., Spanevello, R., Silveira, F.A., Luzb, L., Miron, D.S., Fonseca, M.B., Moraes, B.S. y Clasen, B. (2008) Metabolic and histological parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to commercial formulation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) herbicide. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 92, 133-137.
- Cavalcante, D.G., Martinez, C.B. y Sofia, S.H. (2008) Genotoxic effects of Roundup on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutation Research* 655, 41-46.
- Çavaş, T. (2008) *In vivo* genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: Micronucleus test on acridine orange stained fish cells. *Food and Chemical Toxicology* 46, 352-358.
-
-

-
-
- Çavaş, T. (2011) *In vivo* genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. *Food and Chemical Toxicology* 49, 1431-1435.
- Çavaş, T. (2017) The use of fish as model aquatic organisms in genotoxicity studies. Non-traditional aquatic models, in: Larramendy, M (Ed.), *Ecotoxicology and Genotoxicology*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 243-277.
- Çavaş, T. y Ergene-Gözükara, S. (2003) Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutation Research* 538, 81-91.
- Çavaş, T. y 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.
- Çavaş, T. y 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, 263-268.
- Çavaş, T. y Könen, S. (2008) *In vivo* genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay. *Aquatic Toxicology* 90, 154-159.
- Cenkci, S., Yildiz, M., Ciğerci, I.H., Bozdağ, A., Terzi, H. y Terzi, E.S. (2010) Evaluation of 2,4-D and dicamba genotoxicity in bean seedlings using comet and RAPD assays. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 1558-1564.
- Cessna, A.J. y Elliot, J.A. (2004) Seasonal variation of herbicide concentrations in prairie farm dugouts. *Journal of Environmental Quality* 33, 302-315.
- Collins, A.R. (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology* 26, 249-261.
- Collins, A.R. y Azqueta, A. (2012) DNA repair as a biomarker in human biomonitoring studies; further applications of the comet assay. *Mutation Research* 736, 122-129.
- Collins, A.R., Dusinská, M., Gedik, C.M. y Stetina, R. (1996) Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environmental Health Perspectives* 104, 465-469.
- Collins, A.R., Duthie, S.J. y Dobson, V.L. (1993) Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 14, 1733-1735.
- Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C. y Stetina, R. (2008) The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23, 143-151.
- Comfort, S.D., Inskip, W.P. y Macur, R.E. (1992) Degradation and transport of dicamba in a clay soil. *Journal of Environmental Quality* 21, 653-658.
- CONICET (2005) Reference ethical framework for biomedical research: ethical principles for research with laboratory, farm and wild animals, in: CONICET (Ed.).
- Conway, G. (1997) *The doubly Green revolution: food for all in the twenty-first century*. Cornell University Press, Nueva York. 360 pp.
- Cooke, M.S., Olinski, R. y Evans, M.D. (2006) Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clinica Chimica Acta* 365, 30-49.
- Corcoran, S., Menone, M.L., Amé, M.V., Lukaszewicz, G., Garanzini, D., Iturburu, F.G., Metcalfe, C. (2017) Detection of current-use pesticides in Argentinian surface waters using polar organic chemical integrative samplers (POCIS). SETAC Latin America 12th Biennial Meeting. Santos, Brasil, 7-10 Septiembre 2017.
-
-

-
-
- Costantini, D. y Verhulst, S. (2009) Does high antioxidant capacity indicate low oxidative stress? *Functional Ecology* 23, 506-509.
- Cox, C. y Sorgan, M. (2006) Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. *Environmental Health Perspectives* 114, 1803-1806.
- Chang, J.K., Li, C.J., Liao, H.J., Wang, C.K., Wang, G.J. y Ho, M.L. (2009) Anti-inflammatory drugs suppress proliferation and induce apoptosis through altering expressions of cell cycle regulators and pro-apoptotic factors in cultured human osteoblasts. *Toxicology* 258, 148-156.
- Charles, J.M., Bond, D.M., Jeffries, T., Yano, B.L., Stott, W.T. y Johnson, K.A. (1996) Chronic dietary toxicity/oncogenicity studies on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in rodents. *Fundamentals of Applied Toxicology* 33, 166-172.
- Christofoletti, C.A., David, J.A. y Fontanetti, C.S. (2009) Application of the comet assay in erythrocytes of *Oreochromis niloticus* (Pisces): A methodological comparison. *Genetics and Molecular Biology* 32, 155-158.
- da Fonseca, M.B., Glusczak, L., Moraes, B.S., de Menezes, C.C., Pretto, A., Tierno, M.A., Zanella, R., Gonçalves, F.F. y Loro, V.L. (2008) The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69, 416-420.
- Dante, L., Piancini, S., Souza Santos, G., Tincani, F.H. y Cestari, M.M. (2015) Piscine micronucleus test and the comet assay reveal genotoxic effects of Atrazine herbicide in the neotropical fish *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicology and Environmental Contamination* 10, 55-60.
- De, A., Bose, R., Kumar, A. y Mozumdar, S. (2014) Worldwide pesticide use, in: De A., Bose R., Kumar A., Mozumdar S. (Ed.), *Targeted delivery of pesticides using biodegradable polymeric nanoparticles*. Springer, India, pp. 5-6.
- de Castilhos Ghisi, N. y Cestari, M.M. (2013) Genotoxic effects of the herbicide Roundup® in the fish *Corydoras paleatus* (Jenyns 1842) after short-term, environmentally low concentration exposure. *Environmental Monitoring and Assessment* 185, 3201-3207.
- de la Torre, F.R. (1997) Toxicity of Reconquista river water: bioassays with juvenile *Cnesterodon decemmaculatus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 58, 558-565.
- de la Torre, F.R., Ferrari, L. y Salibián, A. (2002) Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 131, 271-280.
- de la Torre, F.R., Salibián, A. y Ferrari, L. (2007) Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish. *Chemosphere* 68, 1582-1590.
- de Lemos, C.T., Iranço, F.d.A., de Oliveira, N.C., de Souza, G.D. y Fachel, J.M. (2008) Biomonitoring of genotoxicity using micronuclei assay in native population of *Astyanax jacuhiensis* (Characiformes: Characidae) at sites under petrochemical influence. *Science of The Total Environment* 406, 337-343.
- de Lemos, C.T., Rödel, P.M., Terra, N.R. y Erdtmann, B. (2001) Evaluation of basal micronucleus frequency and hexavalent chromium effects in fish erythrocytes. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 1320-1324.
-
-

-
-
- de Moura, F.R., Brentegani, K.R., Gemelli, A., Sinhoin, A.P. y Sinhoin, V.D.G. (2017) Oxidative stress in the hybrid fish jundiara (*Leiarius marmoratus* x *Pseudoplatystoma reticulatum*) exposed to Roundup Original®. *Chemosphere* 185, 445-451.
- Deventer, K. (1996) Detection of genotoxic effects on cells of liver and gills of *B. rerio* by means of single cell gel electrophoresis. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 56, 911-918.
- Deyashi, M. y Chakraborty, S.B. (2016) Pesticide induced oxidative stress and the role of antioxidant defense system in animal body. *Harvest* 2, 1-14.
- Di Marzio, W.D. (1999) Estudio de los efectos de sustancias contaminantes sobre peces de agua dulce. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata. Tesis Doctoral.
- Di Marzio, W.D., Alberdi, J.L., Sáenz, M.E. y Tortorelli, M.D.C. (1998) Effects of paraquat (Osaquat® formulation) on survival and total cholinesterase activity in male and female adults of *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). *Environmental Toxicology and Water Quality* 13, 55-59.
- Di Marzio, W.D., Sáenz, M., Alberdi, J., Tortorelli, M. y Galassi, S. (2005) Risk assessment of domestic and industrial effluents unloaded into a freshwater environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61, 380-391.
- Di Marzio, W.D. y Tortorelli, M.C. (1994) Effects of paraquat on survival and total cholinesterase activity in fry of *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 52, 274-278.
- Díaz Báez, M.C., Pica Granados, Y., Ronco, A., Sobrero, C., Bulus Rossini, G., Feola, G., Forget, G. y Sánchez-Bain, A. (2004) Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, Mexico - Canadá. 189 pp.
- Dierickx P.J. (1983) Interaction of chlorophenoxyalkyl acid herbicides with rat-liver glutathione S-transferases. *Food and Chemical Toxicology* 21, 575-579
- Dierickx P.J. (1985) Hepatic glutathione S-transferases in rainbow trout and their interaction with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 1,4-benzoquinone. *Comparative Biochemistry and Physiology part C* 82, 495-500
- Dogan, D. y Can, C. (2011) Hematological, biochemical, and behavioral responses of *Oncorhynchus mykiss* to dimethoate. *Fish Physiology and Biochemistry* 37, 951-995.
- Domijian, A., Zeljezic, D., Kopjar, N. y Peraica, M. (2006) Standard and Fpg-modified comet assay in kidney cells of ochratoxin A- and fumonisin B1-treated rats. *Toxicology* 222, 53-59.
- Donald, D.B., Cessna, A.J., Sverko, E. y Glozier, N.E. (2007) Pesticides in surface drinking-water supplies of the northern Great Plains. *Environmental Health Perspectives* 115, 1183-1191.
- Duhan, K.S., Kumar, R., Kumar, N., Kaur, P., Nehra, K. y Surekha (2017) Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. *Biotechnology Reports* 24, 11-23.
- Duke, S.O. y Powles, S.B. (2008) Glyphosate: A once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science* 64, 319-325.
- Egan, J.F. y Mortensen, D.A. (2012) Quantifying vapor drift of dicamba herbicides applied to soybean. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31, 1023-1031.
-
-

-
-
- Eissa, B.L., Ossana, N.A., Ferrari, L. y Salibián, A. (2010) Quantitative behavioral parameters as toxicity biomarkers: fish responses to waterborne cadmium. *Archives of Environmental and Contamination Toxicology* 58, 1032-1039.
- El-Sebae, A. H., El-Bakary, A. S., Le Patourel, J., Kadous, E. and Macklad, M. F. (1983) Effect of Photoperiodism on Fish Susceptibility to Insecticides. In: *Proceedings of the 2nd International Conference on Photochemistry and Photobiology*, Alexandria, Egypt 2: 961-966
- Elsek, T. y Filipic, M. (2011) Organophosphorous pesticides - Mechanisms of their toxicity, in: Stoytcheva, Prof. Margarita (Ed.), *Pesticides - The impacts of pesticides exposure*. InTech, 446 pp.
- Ellman, G.L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Archives Biochemistry Biophysics* 82, 70-77.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andreas, V.Jr. y Feathersone, R.M. (1961) A new and rapid colimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemistry and Pharmacology* 7, 88-95.
- Ensminger, M., Budd, R., Kelley, K. y Goh, K. (2013) Pesticide occurrence and aquatic benchmark exceedances in urban surface waters and sediments in three urban areas of California, USA, 2008-2011. *Environmental Monitoring and Assessment* 185, 3697-3710.
- Ergene, S., Cavas, T., Celik, A., Koleli, N., Kaya, F. y Karahan, A. (2007) Monitoring of nuclear abnormalities in peripheral erythrocytes of three fish species from the goksu delta (Turkey): Genotoxic damage in relation to water pollution. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 16, 385-391.
- Espandiar, P., Glauert, H.P., Lee, E.Y. y Robertson, L.W. (1999) Promoting activity of the herbicide dicamba (2-methoxy-3, 6-dichlorobenzoic acid) in two stage hepatocarcinogenesis *International Journal of Oncology* 14, 79-84.
- Espandiar, P., Ludewig, G., Glauert, H.P. y Robertson, L.W. (1998) Activation of hepatic NF- κ B by the herbicide dicamba (2-methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid) in female and male rats. *Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology* 12, 339-344.
- Espandiar, P., Thomas, V.A., Glauert, H.P., O'Brien, M., Noonan, D. y Robertson, L.W. (1995) The herbicide dicamba (2-methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid) is a peroxisome proliferator in rats. *Fundamentals of Applied Toxicology* 26, 85-90.
- Evans, H.J., Nearya, G.J. y Williamson, F.S. (1959) The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and Gamma-rays on *Vicia faba* roots and the effect of oxygen. Part II. Chromosome damage: the production of micronuclei. *International Journal of Radiation Biology* 1, 216-229.
- Faimili, M., Garaventa, F., Piazza, V.G., G, Corra, C., Magillo, F., Pittore, M., Giacco, E., Gallus, L., Falugi, C. y Tagliaferro, G. (2006) Swimming speed alteration of larvae of *Balanus amphitrite* (Darwin) as a behavioral end-point toxicological bioassays. *Marine Biology* 149, 87-96.
- Fairchild, J.F., Allert, A., Sappington, L.S., Nelson, K.J. y Valle, J. (2008) Using accelerated life testing procedures to compare the relative sensitivity of rainbow trout and the federally listed threatened bull trout to three commonly used rangeland herbicides (picloram, 2,4-D, and clopyralid). *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 623-630.
- FAO-WHO (2006) Manual on development and use of FAO and WHO specifications for pesticides FAO/WHO Joint Meeting on Pesticide Specifications (JMPS).
-
-

-
-
- FAO (2001) Integrated Pest Management (IPM). 2001.03-13, <http://www.fao.org/ag/agp/agpp/ipm/>.
- FAO (2002) Código Internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas. <http://www.fao.org/3/a-a0220s.pdf>. Último acceso: Junio 2018.
- FAO (2013) Towards a new green revolution. <http://www.fao.org/docrep/x0262e/x0262e06.htm>. Último acceso, Junio 2018.
- FAO (2017a) Efectos económicos de las plagas y enfermedades transfronterizas. <http://www.fao.org/docrep/003/x9800s/x9800s16.htm>. Último acceso Mayo 2018.
- FAO (2018) Towards a new green revolution. <http://www.fao.org/docrep/x0262e/x0262e06.htm>. Último acceso Mayo 2018.
- FAO, F., OMS, PMA y UNICEF (2017b) El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo 2017. <http://www.fao.org/3/a-17695s.pdf>. Último acceso Junio 2018.
- Farah, M.A., Ateeq, B. y Ahmad, W. (2006) Antimutagenic effect of neem leaves extract in freshwater fish, *Channa punctatus* evaluated by cytogenetic tests. *Science of the Total Environment* 364, 200-214.
- Farah, M.A., Bushra-Ateeq, M., Niamat-Ali, M. y Ahmad, W. (2003) Evaluation of genotoxicity of PCP and 2,4-D by micronucleus test in freshwater fish *Channa punctatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54, 25-29.
- Fassbender, C. y Braunbeck, T. (2013) Assessment of genotoxicity in gonads, liver and gills of zebrafish (*Danio rerio*) by use of the comet assay and micronucleus test after *in vivo* exposure to methyl methanesulfonate. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 91, 89-95.
- Félix-Cañedo, T.E., Durán-Álvarez, J.C. y Jiménez-Cisneros, B. (2013) The occurrence and distribution of a group of organic micropollutants in Mexico City's water sources. *Science of the Total Environment* 454-455, 109-118.
- Fenech, M. (2000) The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research* 455, 81-95.
- Fenech, M. (2007) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 2, 1084-1104.
- Fenech, M. y Crott, J.W. (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. *Mutation Research* 504, 131-136.
- Fenech, M., Chang, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. y Zeiger, E. (2003) HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research* 534, 65-75.
- Fenech, M., Kirsch-Volders, M., Natarajan, A.T., Surrallés, J., Crott, J.W., Parry, J., Norppa, H., Eastmond, D.A., Tucker, J.D. y Thomas, P. (2011) Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear *bud* formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* 26, 125-132.
- Fernandes, T.C.C., Mazzeo, D.E. y Marin-Morales, M. (2007) Mechanism of micronuclei formation in poliploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicida. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 88, 252-259.
- Ferrari, A., Venturino, A. y D'Angelo, A.M.P. (2007) Muscular and brain cholinesterase sensitivities to azinphos methyl and carbaryl in the juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 146C, 308-313.
-
-

-
-
- Ferrari, L. (2017) Manual de procedimiento básico para la cría de *Cnesterodon decemmaculatus* en laboratorio. EdUnLu, Luján. 49 pp.
- Filkowski, J., Besplug, J., Burke, P., Kovalchuk, I. y Kovalchuk, O. (2003) Genotoxicity of 2,4-D and dicamba revealed by transgenic *Arabidopsis thaliana* plants harboring recombination and point mutation markers. *Mutation Research* 542, 23-32.
- Finkel, T.H., N J (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. *Nature* 408, 239-247.
- Finney, D.J. (1971) Probit Analysis. Cambridge Univ. Press, London. pag.
- Flynn, K.M., Delclos, K.B. y Newbold, R.R.F., S A (2001) Behavioural responses of rats exposed to long-term dietary vinclozolin. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 49, 1658-1665.
- Frank, D.F., Miller, G.W., Harvey, D.J., Brander, S.M., Geist, J., Connon, R.E. y Lein, P.J. (2018) Bifenthrin causes transcriptomic alterations in mTOR and ryanodine receptor-dependent signaling and delayed hyperactivity in developing zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 200, 51-61.
- Furlong, E.T., Anderson, B.D., Werner, S.L., Soliven, P.P., Coffey, L.J. y Burkhardt, M.R. (2011) Methods of analysis by the US Geological Survey National Water Quality Laboratory - Determination of pesticides in water by graphitized carbon-based solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. US Geological Survey Water Resources Investigations Report 01-4134, 73 pp.
- Gan, J., Becker, L., Koskinen, C. y Buhler, D.D. (1996) Degradation of atrazine in two soils as a function of concentration. *Journal of Environmental Quality* 25, 1064-1072.
- Garaj-Vrhovac, V. y Zeljezic, D. (2001) Cytogenetic monitoring of croatian population occupationally exposed to a complex mixture of pesticides. *Toxicology* 165, 153-162.
- Garber, J.C., Barbee, R.W. y Bielitzki, J.T. (2011) Guide for the care and use of laboratory animals. Committee for the update of the guide for the care and use of laboratory animals. Washington, DC: National Academies Press, 246 pp.
- Gaworecki, K.M. y Klaine, S.J. (2008) Behavioral and biochemical responses of hybrid striped bass during and after fluoxetine exposure. *Aquatic Toxicology* 88, 207-213.
- Ge, H., Lin, Z., Yao, Z., Gao, Z., Cong, Y. y Yu, H. (2014) Balance between herbicidal activity and toxicity effect: a case study of the joint effects of triazine and phenylurea herbicides on *Selenastrum capricornutum* and *Photobacterium phosphoreum*. *Aquatic Toxicology* 150, 165-174.
- Ghassemi, M., Fargo, L., Painter, P., Quinlivan, S., Scofield, R. y Takata, A. (1981) Environmental Fates and Impacts of Major Forest Use Pesticides. Report P. A-101-148. U.S. Environmental Protection Agency. Office of Pesticides and Toxic Substances. Washington D.C, 501 pp.
- Ghazanfar, M., Shahid, S. y Qureshi, I.Z. (2018) Vitamin C attenuates biochemical and genotoxic damage in common carp (*Cyprinus carpio*) upon joint exposure to combined toxic doses of fipronil and buprofezin insecticides. *Aquatic Toxicology* 196, 43-52.
- Gliwicz, Z.M. (1994) Relative significance of direct and indirect effects of predation by planktivorous fish on zooplankton. *Hydrobiologia* 272, 201-210.
- Glozier, N.E., Struger, J., Cessna, A.J., Gledhill, M., Rondeau, M. y Ernst, W.R. (2012) Occurrence of glyphosate and acidic herbicides in select urban rivers and streams in Canada. *Environmental Science and Pollution Research* 19, 821-834.
-
-

-
-
- Gluszczak, L., Loro, V.L., Pretto, A., Moraes, B.S., Raabe, A., Duarte, M.F., da Fonseca, M.B., de Menezes, C.C. y Valladao, D.M.D. (2011) Acute exposure to glyphosate herbicide affects oxidative parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology 61, 624-630.
- Gökalp Muranlı, F.D. y Güner, U. (2011) Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. Mutation Research 726, 104-108.
- Gómez, S., Villar, C. y Bonetto, C. (1998) Zinc toxicity in the fish *Cnesterodon decemmaculatus* in the Paraná River and Río de La Plata estuary. Environmental Pollution 99, 159-165.
- González, M., Soloneski, S., Reigosa, M.A. y Larramendy, M.L. (2005) Genotoxicity of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and a commercial formulation, 2,4-dichlorophenoxyacetid acid dimethylamine salt. I. Evaluation of DNA damage and cytogenetic endpoints in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells. Toxicology in Vitro 19, 289-297.
- González, N., Soloneski, S. y Larramendy, M. (2011) A combination of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay and centromeric identification for evaluation of the genotoxicity of dicamba. Toxicology Letters 207, 204-212.
- González, N.V., Soloneski, S. y Larramendy, M.L. (2006) Genotoxicity analysis of the phenoxy herbicide dicamba in mammalian cells *in vitro*. Toxicology in Vitro 20, 1481-1487.
- González, N.V., Soloneski, S. y Larramendy, M.L. (2007) The chlorophenoxy herbicide dicamba and its commercial formulation banvel induce genotoxicity in Chinese hamster ovary cells. Mutation Research 634, 60-68.
- González, N.V., Soloneski, S. y Larramendy, M.L. (2009) Dicamba-induced genotoxicity on Chinese hamster ovary (CHO) cells is prevented by vitamin E. Journal of Hazardous Materials 163, 337-343.
- Gormley, K.L. y Teather, K.L. (2003) Developmental, behavioral, and reproductive effects experienced by Japanese medaka (*Oryzias latipes*) in response to short-term exposure to endosulfan. Ecotoxicology and Environmental Safety 54, 330-338.
- Goulding, A.T., Shelley, L.K., Ross, P.S. y Kennedy, C.J. (2013) Reduction in swimming performance in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following sublethal exposure to pyrethroid insecticides. Comparative Biochemistry and Physiology Part C 157, 280-286.
- Grabińska-Sota, E., Wiśniowska, E. y Kalka-Beata Scieranka, J. (2002) Genotoxicological effects of some phenoxyherbicides and their metabolites on *Bacillus subtilis* M45 Rec- and H17 Rec+ strain. Chemosphere 47, 81-85.
- Graf, U. y Würzler, F.E. (1996) The somatic white-ivory eye spot test does not detect the same spectrum of genotoxic events as the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Environmental and Molecular Mutagenesis 27, 219-226.
- Greene, C., Kuehne, L., Rice, C., Fresh, K. y Penttila, D. (2015) Forty years of change in forage fish and jellyfish abundance across greater Puget Sound, Washington (USA): Anthropogenic and climate associations. Marine Ecology Progress Series 525, 153-170.
- Griffiths, C.A. y Paul, M.J. (2017) Targeting carbon for crop yield and drought resilience. Journal of the Science of Food and Agriculture 97, 4663-4671.
- Grisolia, C.K. y Starling, F.L. (2001) Micronuclei monitoring of fishes from Lake Paranoá, under influence of sewage treatment plant discharges. Mutation Research 491, 39-44.
-
-

-
-
- Grossmann, K. (2000) Mode of action of auxinic herbicides: a new ending to a long, drawn out story. *Trends in Plant Science* 5, 506-508.
- Grossmann, K. (2003) Mediation of herbicide effects by hormone interactions. *Journal of Plant Growth Regulation* 22, 109-122.
- Grossmann, K. (2010) Auxinic herbicides: current status of mechanism and mode of action. *Pest Management Science* 66, 113-120.
- Grossmann, K., Kwiatkowski, J. y Tresch, S. (2001) Auxin herbicides induce H₂O₂ overproduction and tissue damage in cleavers (*Galium aparine* L.). *Journal of Experimental Botany* 52, 1811-1816.
- Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M.A. y M, P. (2010) European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup-a glyphosate-based herbicide. *Mutagenesis* 25, 523-530.
- Guilherme, S., Santos, M.A., Barroso, C., Gaivão, I. y Pacheco, M. (2012) Differential genotoxicity of RoundUp formulation and its constituents in blood cells of fish (*Anguilla anguilla*): considerations of chemical interactions and DNA damaging mechanisms. *Ecotoxicology* 21, 1381-1390.
- Guilherme, S., Santos, M.A., Gaivão, I. y Pacheco, M. (2015) Genotoxicity evaluation of the herbicide Garlon® and its active ingredient (triclopyr) in fish (*Anguilla anguilla* L.) using the comet assay. *Environmental Toxicology* 30, 1073-1081.
- Gupta, R.C. (2014) *Biomarkers in Toxicology*. Academic Press, Elsevier. 1152 pp.
- Habig, W.H., Pabst, M.J. y Jakoby, W.B. (1974) Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249, 7130-7139.
- Hansch, C., Leo, A. y Hoekman, D. (1995) *Exploring QSAR: hydrophobic, electronic and steric constants*. American Chemical Society, Washington, DC. 348 pp.
- Hansen, B.H. (1969) Avoidance of pesticides by untrained sheepshead minnows. *Transactions of the American Fisheries Society* 98, 426-429.
- Hansen, D.J., Matthews, E., Nall, S.L. y Dumas, D.P. (1972) Avoidance of pesticides by untrained mosquitofish. *Gambusia affinis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 8, 46-51.
- Harris, S.A., Villeneuve, P.J., Crawley, C.D., Mays, J.E., Yeary, R.A., Hurto, K.A. y Meeker, J.D. (2010) National study of exposure to pesticides among professional applicators: an investigation based on urinary biomarkers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 10253-10261.
- Hay, J.R. (1974) Gains to the grower from weed science. *Weed Science* 22, 439-442.
- Helweg, A., Bay, H., Hansen, H.P.B., Rabolle, M., Sonnenborg, A. y Stenvang, L. (2002) Pollution at and below sites used for mixing and loading of pesticides. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 82, 583-590.
- Helweg, A., Fomsgaard, I.S., Reffstrup, T.K. y Sorensen, H. (1999) Degradation of mecoprop and isoproturon in soil influence of initial concentration. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 70, 133-148.
- Hermes-Lima, M. (2004) Oxygen in biology and biochemistry: role of free radical, in: Storey, K B (Ed.), *Functional metabolism: regulation and adaptation*. John Wiley and Sons Inc., New York, pp. 319-368.
-
-

-
-
- Herzfeld, D. y Sargent, K. (2011) Chapter 9. Pesticide application, procedimientos and equipment, in: Goodman, N (Ed.), *Private Pesticide Applicator Safety Education Training Manual*, 19th ed. University of Minnesota Extension, pp. 1-35.
- Higginbotham, S., Jones, R.L., Gatzweiler, E. y Mason, P.J. (1999) Pointing-source pesticide contamination: Quantification and practical solutions. Brighton Conference: Weeds 1-3, 681-686.
- Hildebrand, L.D., Sullivan, D.S. y Sullivan, T.P. (1982) Experimental studies of rainbow trout populations exposed to field applications of Roundup herbicide. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 11, 93–98.
- Holmes, S.B. y Boag, P.T. (1990) Effects of the organophosphorus pesticide fenitrothion on behavior and reproduction in zebra finches. *Environmental Research* 53, 62-75.
- Hooftman, R.N. y de Raat, W.K. (1982) Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate. *Mutation Research* 104, 147-152.
- Hostovsky, M., Blahova, J., Plhalova, L., Stepanova, S., Praskova, E., Marsalek, P. y Svobodova, Z. (2012) Oxidative stress parameters in early developmental stages of common carp (*Cyprinus carpio* L.) after subchronic exposure to terbuthylazine and metribuzin. *Neuro Endocrinology Letters* 33, 124-129.
- Howard, P.H. (1991) *Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals. Pesticides*. Lewis Publishers, Chelsea, MI. pag.
- Hrelia, P.V., F, Maffei, F., Morotti, M., Colacci, A., Perocco, P., Grilli, S. y Cantelli-Forti, G. (1994) Genetic safety evaluation of pesticides in different short-term tests. *Mutation Research* 321, 219-228.
- Hulbert, A.J., Pamplona, R., Buffenstein, R. y Buttemer, W.A. (2007) Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiological Reviews* 87, 1175–1213.
- IARC (2015) *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Some Organochlorine Insecticides and Some Chlorophenoxy Herbicides*. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 501 pp.
- INTA (2008) *Guía para cuidado y uso de animales para experimentación*. Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación, República Argentina.
- INTA (2012) *Evolución del mercado de herbicidas en Argentina*. https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta-_economia_y_desarrollo_agroind-_boletin1-2.pdf. Último acceso, Junio 2018.
- IRAM (2008) *Calidad ambiental-Calidad de agua. Determinación de la toxicidad letal aguda de sustancias en peces de agua dulce. Métodos semiestático*. Instituto Argentino de Normalización y Certificación Norma 29112, 23 pp.
- ISAAA (2016) *International service for de acquisition of agri-biotech applications. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2016*. ISAAA Brief. Ithaca, New York 52 pp.
- Iturburu, F.G., Zömisich, M., Panzeri, A.M. Crupkin, A.C., Contardo-Jara, V., Pflugmacher, S. y Menone M.L. (2017) Uptake, distribution in different tissues, and genotoxicity of imidacloprid in the freshwater fish *Australoheros facetus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36, 699–708
-
-

-
-
- Jayaraj, R., Megha, P. y Sreedev, P. (2016) Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdisciplinary Toxicology* 9, 90-100.
- Jin, J., Kurobe, T., Ramírez-Duarte, W.F., Bolotaolo, M.B., Lam, C.H., Pandey, P.K., Hung, T.C., Stillway, M.E., Zweig, L., Caudill, J., Lin, L. y Teh, S.J. (2018) Sub-lethal effects of herbicides penoxsulam, imazamox, fluridone and glyphosate on Delta Smelt (*Hypomesus transpacificus*). *Aquatic Toxicology* 197, 79-88.
- Johnson, C.R. (1978) Herbicide toxicities in the mosquito fish, *Gambusia affinis*. *Proceedings of the Royal Society of Queensland* 89, 25-27.
- Jovanović, J., Kolarević, S., Milošković, A., Radojković, N., Simić, V., Dojčinović, B., Kračun-Kolarević, M., Paunović, M., Kostić, J., Sunjog, K., Timilijić, J., Djordjević, J., Gačić, Z., Žegura, B. y Vuković-Gačić, B. (2017) Evaluation of genotoxic potential in the Velika Morava River Basin *in vitro* and *in situ*. *Science of the Total Environment* 15, 1289-1299.
- Kane, A.S., James, D.S., Geoffrey, T.G., Timothy, C.A.M. y Colin, H. (2004) A videobased movement analysis system to quantify behavioral stress responses of fish. *Water Research* 38, 3993-4001.
- Karasu Benli, A.C., Şahin, D., Selvi, M., Sarıkaya, R., Koçak Memmi, B. y Sepici Dinçel, A. (2016) The sublethal effects of (2,4-Dichlorophenoxy) acetic acid (2,4-D) on narrow-clawed crayfish (*Astacus leptodactylus*, Eschscholtz, 1823). *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju* 67, 289-296.
- Katsiadaki, I., Morris, S., Squires, C., Hurst, M.R., James, J.D. y Scott, A.P. (2006) Use of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) as a sensitive *in vivo* test for the detection of environmental antiandrogens. *Environmental Health Perspectives* 114, 115-121.
- Kaviraj, A., Unlu, E., Gupta, A. y El Nemr, A. (2014) Biomarkers of Environmental Pollutants. *BioMed Research International*.
- Kavitha, P. y Rao, J.V. (2008) Toxic effects of chlorpyrifos on antioxidant enzymes and target enzyme acetylcholinesterase interaction in mosquito fish, *Gambusia affinis*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 26, 192-198.
- Kaya, A. y Yigit, E. (2012) Interactions among glutathione s-transferase, glutathione reductase activity and glutathione contents in leaves of *Vicia faba* L. subjected to flurochloridone. *Fresenius Environmental Bulletin* 21, 1635-1640.
- Kaya, B., Yanikoglu, A. y Marcos, R. (1999) Genotoxicity studies on the phenoxyacetates 2,4-D and 4-CPA in the *Drosophila* wing spot test. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 19, 305-312.
- Kier, L.D.B., D J, Auletta, A.E., Von Halle, E.S., Brown, M.M., Simmon, V.F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M. y Rao, T.K. (1986) The *Salmonella typhimurium* / mammalian microsomal assay: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research* 168, 69-240.
- King, K.A., Grue, C.E., Grassley, J.M. y Hearsey, J.W. (2013) Pesticides in urban streams and prespawn mortality of Pacific coho salmon. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 65, 546-554.
- Knapp, G.W., Stezer, R.W. y Fuscoe, J.C. (2003) Quantitation of aberrant interlocus T-cells receptor rearrangements in mouse thymocytes and the effect of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 42, 37-43.
-
-

-
-
- Kojima, H., Katsura, E., Takeuchi, S., Niiyama, K. y Kobayashi, K. (2003) Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by *in vitro* reporter gene assays using Chinese hamster ovary cells. *Environmental Health Perspectives* 112, 524–531.
- Korte, C. y Jalal, S.M. (1982) 2,4-D induced clastogenicity and elevated rates of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. *Journal of Heredity* 73, 224-226.
- Kubrak, O.I., Atamaniuk, T.M., Husak, V.V. y Lushchak, V.I. (2013) Transient effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) exposure on some metabolic and free radical processes in goldfish white muscle. *Food and Chemical Toxicology* 59, 356-361.
- Kumar, A., Rai, D.A., Sharma, B. y Pandey, R.S. (2009) λ -cyhalothrin and cypermethrin induced *in vivo* alterations in the activity of acetylcholinesterase in a fresh-water fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Pesticide Biochemical and Physiology* 93, 96-99.
- Kumar, P., Kumar, R., Nagpure, N., Nautiyal, P., Dabas, A., Kushwaha, B. y Lakra, W.S. (2012) Genotoxic and mutagenic assessment of hexavalent chromium in fish following *in vivo* chronic exposure. *Human and Ecological Risk Assessment* 18, 855-870.
- Kumaraguru, A.K. y Beamish, F.W. (1983) Bioenergetics of acclimation to permethrin (NRDC-143) by rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 75, 247-252.
- Kumari, T.S. y Vaidyanath, K. (1989) Testing of genotoxic effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) using multiple genetic assay systems of plants. *Mutation Research* 226, 235-238.
- Kushwaha, S., Vikram, A., Trivedi, P.P. y Jena, G.B. (2011) Alkaline, Endo III and FPG modified comet assay as biomarkers for the detection of oxidative DNA damage in rats with experimentally induced diabetes. *Mutation Research* 726, 242-250.
- Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Simoniello, M.F., Poletta, G.L., Junges, C.M., Peltzer, P.M., Grenón, P. y Cabagna-Zenklusen, M.C. (2015) Harmful effects of the dermal intake of commercial formulations containing chlorpyrifos, 2,4-D, and glyphosate on the common toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). *Water, Air, and Soil Pollution* 226, 1-12.
- Lakota, S., Raszka, A., Utracki, T. and Chmiel, Z. (1997) Side-Effect of Deltamethrin and Cypermethrin in the Environment of Water Biocenoses. *Organika* 1987/1988, 71-77
- Lal, B., Sarang, M.K. y Kumar, P. (2013) Malathion exposure induces the endocrine disruption and growth retardation in the catfish, *Clarias batrachus* (Linn.). *General and Comparative Endocrinology* 181, 139-145.
- Lazartigues, A., Thomas, M., Banas, D., Brun-Bellut, J., Cren-Olivé, C. y Feidt, C. (2013) Accumulation and half-lives of 13 pesticides in muscle tissue of freshwater fishes through food exposure. *Chemosphere* 91, 530-535.
- Lee, R.F. y Steinert, S. (2003) Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. Review. *Mutation Research* 544, 43–64.
- Lee, W.R., Abrahamson, S., Valencia, R., Von Halle, E.S., Würzler, F.E. y Zimmering, S. (1983) The sex-linked recessive lethal test for mutagenesis in *Drosophila melanogaster*: A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-TOX program. *Mutation Research* 123, 183-279.
- Leifer, Z., Kada, T., Mendel, M., Zeiger, E., Stafford, R. y Rosenkranz, H.S. (1981) An evaluation of test using DNA repair-deficient bacteria for predicting genotoxicity and carcinogenicity. A report of the U.S. EPA's Gene-TOX program. *Mutation Research* 87, 211-297.
-
-

-
-
- Leveroni, F.A., Diana, J., etti, C. y Pastori, M.C. (2017) Genotoxic response of blood, gill and liver cells of *Piaractus mesopotamicus* after an acute exposure to a glyphosate-based herbicide International Journal of Cytology, Cytosystematics and Cytogenetics 70, 21-28.
- Li, J. y Gramatica, P. (2010) QSAR classification of estrogen receptor binders and prescreening of potential pleiotropic EDCs. QSAR in environmental research 21, 7-8.
- Li, J., Li, Y. y Lu, J. (2009) Adsorption of herbicides 2,4-D and acetochlor on inorganic-organic bentonites. Applied Clay Science 46, 314-318.
- Liang, H.C., Razaviarani, V. y Buchanan, I. (2013) Pesticides and herbicides. Water Environment Research 85, 1601-1645.
- Limón-Pacheco, J. y Gonsebatt, M.E. (2009) The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. Mutation Research 674, 137-147.
- Little, E.E. y Brewer, S.K. (2001) Neurobehavioral toxicity in fish, *Target organ toxicity in marine and freshwater teleost systems: new perspectives*. Taylor and Francis, London and New York, pp. 141-176.
- Little, E.E. y Finger, S.E. (1990) Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. Environmental and Toxicological Chemistry 9, 13-19.
- Liu, W., Li, H., Tao, F., Li, S., Tian, Z. y Xie, H. (2013) Formation and contamination of PCDD/Fs, PCBs, PeCBz, HzCBz and polychlorophenols in the production of 2,4-D products. Chemosphere 92, 304-308.
- Liu, Y., Zhang, Y., Liu, J. y Huang, D. (2006) The role of reactive oxygen species in the herbicide acetachlor-induced DNA damage of *Bufo-raddei* tadpole liver. Aquatic Toxicology 78, 21-26.
- Loos, R., Locoro, G., Comero, S., Contini, S., Schwesig, D. y Werres, F. (2010) Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. Water Research 44, 4115-4426.
- Lorz, H.W., Glenn, S.W., Williams, R.H., Kunkel, C.M., Norris, L.A. y Loper, B.R. (1979) Effects of selected herbicides on smolting of coho salmon, Corvallis, United States. 115 pp.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randal, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry 193, 265-275.
- Lushchak, V.I. (2011) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. Aquatic Toxicology 101, 13-30.
- Ma, J. y Li, X. (2015) Alteration in the Cytokine Levels and Histopathological Damage in Common Carp Induced by Glyphosate. Chemosphere 128, 293-298
- Machado, M.V., Ravasco, P., Jesus, L., Marques-Vidal, P., Oliveira, C.R., Proenca, T., Baldeiras, I., Camilo, M.E. y Cortez-Pinto, H. (2008) Blood oxidative stress markers in non-alcoholic steatohepatitis and how it correlates with diet. Scandinavian Journal of Gastroenterology 43, 95-102.
- Madrigal-Bujaidar, E., Hernández-Ceruelos, A. y Chamorro, G. (2001) Induction of sister chromatid exchanges by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in somatic and germ cells of mice exposed *in vivo*. Food and Chemical Toxicology 39, 941-946.
- Maire, M.A., Rast, C., Landkocz, Y. y Vasseur, P. (2007) 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid: effects on Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation, c-Myc expression, DNA damage and apoptosis. Mutation Research 631, 124-136.
-
-

-
-
- Mann, R.M. y Bidwell, J.R. (1999) The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs. *Archives of Environmental and Contamination Toxicology* 36, 193-199.
- Mann, R.M., Hyne, R.V., Choung, C.B. y Wilson, S.P. (2009) Amphibians and agricultural chemicals: review of the risks in a complex environment. *Environmental Pollution* 157, 2903-2927.
- Manna, G.K. y Sadhukhan, A. (1986) Use of cells of gill and kidney of tilapia fish in micronucleus test (MNT). *Current Science* 55, 498-501.
- Marques, A., Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M.A. y Pacheco, M. (2014) Progression of DNA damage induced by a glyphosate-based herbicide in fish (*Anguilla anguilla*) upon exposure and post-exposure periods - Insights into the mechanisms of genotoxicity and DNA repair. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 166, 126-133.
- Martin-Guay, M., Paquette, A., Dupras, J. y Rivest, D. (2018) The new Green Revolution: Sustainable intensification of agriculture by intercropping. *Science of The Total Environment* 615, 767-772.
- Martínez-Paz, P., Morales, M., Martínez-Guitarte, J.L. y Morcillo, G. (2013) Genotoxic effects of environmental endocrine disruptors on the aquatic insect *Chironomus riparius* evaluated using the comet assay. *Mutation Research* 758, 41-47.
- Martínez-Tabche, L., Madrigal-Bujaidar, E. y Negrete, T. (2004) Genotoxicity and lipoperoxidation produced by paraquat and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mikiss*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 73, 146-152.
- Mashinchian Moradi, A., Alidoust Salimi, M., Shahhosseini, M.H. y Alidoust Salimi, P. (2012) Assessment of DNA damage induced by butachlor on *Cyprinus carpio* (L. 1758) using single cell gel electrophoresis. *International Journal of Marine Science Engineering* 2, 233-238.
- Matviishyn, T.M., Kubrak, O.I., Husak, V.V., Storey, K.B. y Lushchak, V.I. (2014) Tissue-specific induction of oxidative stress in goldfish by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid: mild in brain and moderate in liver and kidney. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 37, 861-869.
- Mayer, F.L. y Eilersieck, M.R. (1986) Manual of acute toxicity: interpretation and data base for 410 chemicals and 66 species of freshwater animals. USDI Fish and Wildlife Service, Washington DC. pag.
- Mazzatorta, P., Benfenati, E., Neagu, D. y Gini, G. (2002) The importance of scaling in data mining for toxicity prediction. *Journal of Chemical Information and Modeling* 42, 1250-1255.
- McDuffie, H.H., Pahwa, P., McLaughlin, J.R., Spinelli, J.J., Fincham, S., Dosman, J.A., Robson, D., Skinnider, L.F. y Choi, M.W. (2001) Non-Hodking's lymphoma and specific pesticide exposures in men: cross-Canada study of pesticides and health. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 10, 1155-1163.
- McKenzie, D.J., Garofalo, E., Winter, M.J., Ceradini, S., Verweij, F., Day, N., Hayes, R., Van Der Oost, R., Butler, P.J., Chipman, J.K. y Taylor, E.W. (2007) Complex physiological traits as biomarkers of the sub-lethal toxicological effects of pollutant exposure in fishes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 362, 2043-2059.
-
-

-
-
- McLaughlin, D. y Kinzelbach, W. (2015) Food security and sustainable resource management. *Water Resources Research* 51, 4966-4985.
- Meffe, R. y de Bustamante, I. (2014) Emerging organic contaminants in surface water and groundwater: A first overview of the situation in Italy. *Science of the Total Environment* 481, 280-295.
- Menéndez-Helman, R.J., Ferreyroa, G.V., dos Santos Afonso, M. y Salibián, A. (2012) Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 88, 6-9.
- Menéndez, A., Scaramuzza, F., Vélez, J.P. y Villarroel, D. (2015) La agricultura de precisión como sistema y la revolución tecnológica agropecuaria. INTA - Red Agricultura de Precisión. <https://inta.gob.ar/documentos/la-agricultura-de-precision-como-sistema-y-la-revolucion-tecnologica-agropecuaria>. Último acceso Mayo 2018.
- Menni, R.C. (2004) Peces y ambientes en la Argentina continental. Monografías del Museo Argentino de Ciencias Naturales 323 pp.
- Menni, R.C., Gómez, S.E. y López Armengol, F. (1996) Subtle relationships: freshwater fishes and the chemistry of water in southern South America. *Hydrobiologia* 328, 173-197.
- Mersch, J., Beauvais, M.N. y Nagel, P. (1996) Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. *Mutation Research* 371, 47-55.
- Mesak, C., de Oliveira Mendes, B., de Oliveira Ferreira, R. y Malafaia, G. (2018) Mutagenic assessment of *Lithobates catesbeianus* tadpoles exposed to the 2,4-D herbicide in a simulated realistic scenario. *Environmental Science and Pollution Research* 25, 15235-15244.
- Mezzelani, M., Gorbi, S., Fattorini, D., d'Errico, G., Consolandi, G., Milan, M., Bargelloni, L. y Regoli, F. (2018) Long-term exposure of *Mytilus galloprovincialis* to diclofenac, ibuprofen and ketoprofen: Insights into bioavailability, biomarkers and transcriptomic changes. *Chemosphere* 198, 238-248.
- Mikloš, M., Gajski, G. y Garaj-Vrhovac (2009) Usage of the standard and modified comet assay in assessment of DNA damage in human lymphocytes after exposure to ionizing radiation. *Radiology and Oncology* 43, 97-107.
- Ministerio de Salud (2007) Presidencia de la Nación, Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable. La problemática de los agroquímicos y sus envases, su incidencia en la salud de los trabajadores, la población expuesta por el ambiente. Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, 312 pp.
- Mitchelmore, C.L. y Chipman, J.K. (1998) Detection of DNA strand breaks in brown trout (*Salmo trutta*) hepatocytes and blood cells using the single cell gel electrophoresis (comet) assay. *Aquatic Toxicology* 41, 161-182.
- Mohammed, K.B. y Ma, T.H. (1999) Tradescantia-micronucleus and -stamen hair mutation assays on genotoxicity of the gaseous and liquid forms of pesticides. *Mutation Research* 426, 193-199.
- Molinari, G., Kujawski, M., Scuto, A., Soloneski, S. y Larramendy, M.L. (2013) DNA damage kinetics and apoptosis in ivermectin-treated Chinese hamster ovary cells. *Journal of Applied Toxicology* 33, 1260-1267.
- Monteiro, D.A., Almeida, J.A., Ratnin, E.T. y Kalinin, A.L. (2006) Oxidative biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorous insecticide
-
-

-
- Folisuper 600 (methyl parathion). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C* 143, 141-149.
- Moretti, M., Marcarelli, M., Villarini, M., Fatigoni, C., Scassellati-Sforzolini, G. y Pasquini, R. (2002) *In vitro* testing for genotoxicity of the herbicide terbutryn: cytogenetic and primary DNA damage. *Toxicology in Vitro* 16, 81-88.
- Mortensen, D.A., Egan, J.F., Maxwell, B.D., Ryan, M.R. y Smith, R.G. (2012) Navigating a critical juncture for sustainable weed management. *Bioscience* 62, 75-84.
- Mudry, M.D. y Carballo, M.A. (2006) *Genética toxicológica*. De los Cuatro Vientos Editorial, Buenos Aires. 672 pp.
- Mugni, H., Demetrio, P., Paracampo, A., Pardi, M., Bulus, G. y Bonetto, C. (2012a) Toxicity persistence in runoff water and soil in experimental soybean plots following chlorpyrifos application. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 89, 208-212.
- Mugni, H., Paracampo, A., Demetrio, P., Scalise, A., Solís, M., Fanelli, S. y Bonetto, C. (2016) Acute toxicity of endosulfan to the non-target organisms *Hyalella curvispina* and *Cnesterodon decemmaculatus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 70, 257-264.
- Mugni, H.A., Paracampo, A., Marrochi, N. y Bonetto, C. (2012b) Cypermethrin, chlorpyrifos and endosulfan toxicity to two non-target freshwater organisms. *Fresenius Environmental Bulletin* 21, 2085-2089.
- Mustafa, S.A., Karieb, S.S., Davies, S.J. y Jha, A.N. (2015) Assessment of oxidative damage to DNA, transcriptional expression of key genes, lipid peroxidation and histopathological changes in carp *Cyprinus carpio* L. following exposure to chronic hypoxic and subsequent recovery in normoxic conditions. *Mutagenesis* 30, 107-116.
- Muthulakshmi, S., Maharajan, K., Habibi, H.R., Kadirvelu, K. y Venkataramana, M. (2018) Zearalenone induced embryo and neurotoxicity in zebrafish model (*Danio rerio*): Role of oxidative stress revealed by a multi biomarker study. *Chemosphere* 198, 111-121.
- Nacci, D.E., Cayula, S. y Jackim, E. (1996) Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquatic Toxicology* 35, 197-210.
- Naqvi, G., Shoaib, N. y Ali, A.M. (2017) Pesticides impact on protein fish (*Oreochromis mossambicus*) tissues. *Indian Journal of Geo Marine Sciences* 49, 1864-1868.
- NCBI (2017) National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=1486.
- Newman, M.C. y Clements, W.H. (2008) *Ecotoxicology: a comprehensive treatment*. Taylor & Francis, Boca Raton, FL. 850 pp.
- Nikoloff, N., Larramendy, M.L. y Soloneski, S. (2014a) Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus and comet assay for evaluation of fluorchloridone-induced genotoxicity. *Environmental Toxicology* 29, 884-892.
- Nikoloff, N., Natale, G.S., Marino, D., Soloneski, S. y Larramendy, M. (2014b) Flurochloridone-based herbicides induced genotoxicity effects on *Rhinella arenarum* tadpoles (Anura: Bufonidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 100, 275-281.
- Nikoloff, N., Soloneski, S. y Larramendy, M.L. (2012) Genotoxic and cytotoxic evaluation of the herbicide fluorchloridone on Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *Toxicology in Vitro* 26, 157-163.
- Norris, L.A. (1981) The movement, persistence, and fate of the phenoxy herbicides and TCDD in the forest. *Residue Reviews* 80, 65-135.
-

-
-
- Nwani, C.D., Nagpure, N.S., Kumar, R., Kushwaha, B., Kumar, P. y Lakra, W.S. (2011) Mutagenic and genotoxic assessment of atrazine-based herbicide to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus test and single cell gel electrophoresis. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 31, 314-322.
- Nwani, C.D., Nagpure, N.S., Kumar, R., Kushwaha, B. y Lakra, W.S. (2013) DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in freshwater fish, *Channa punctatus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36, 539-547.
- Oakes, D.J., Webster, W.S., Brown-Woodman, P.D. y Ritchie, H.E. (2002) Testicular changes induced by chronic exposure to the herbicide formulation, Tordon 75D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid and picloram) in rats. *Reproductive Toxicology* 16, 281-289.
- OECD (1997) Glossary of Statistical Terms, Series F, No. 67. United Nations, New York.
- OECD (2010) *In vitro* mammalian cell micronucleus test (MNvit). <http://www.oecd.org/env/chemicalsafetyandbiosafety/testingofchemicals/50108793.pdf>. OECD Guideline for testing of Chemicals, 487 pp.
- Ogada, D.L. (2014) The power of poison: Pesticide poisoning of Africa's wildlife. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1322, 1-20.
- Orozco-Hernández, L., Gutiérrez-Gómez, A.A., SanJuan-Reyes, N., Islas-Flores, H., García-Medina, S., Galar-Martínez, M., Dublán-García, O., Natividad, R. y Gómez-Oliván, L.M. (2017) 17 β -Estradiol induces cyto-genotoxicity on blood cells of common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere* 1991, 118-127.
- Orton, F., Lutz, I., Kloas, W. y Routledge, E.J. (2009) Endocrine disrupting effects of herbicides and pentachlorophenol: *in vitro* and *in vivo* evidence. *Environmental Science and Technology* 43, 2144-2150.
- Oruc, E.O., Sevgiler, Y.U. y Uner, N. (2004) Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 137, 43-61.
- Oruç, E.O. y Uner, N. (2002) Marker enzyme assessment in the liver of *Cyprinus carpio* (L.) exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* 16, 182-188.
- Osborne, P.P., Xu, Z., Swanson, K.D., Walker, T. y Farmer, D.K. (2015) Dicamba and 2,4-D residues following applicator cleanout: A potential point source to the environment and worker exposure. *Journal of the Air & Waste Management Association* 65, 1153-1158.
- Ossana, N.A., Eissa, B.L., Baudou, F.G., Castañé, P.M., Soloneski, S. y Ferrari, L. (2016) Multibiomarker response in ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) exposed to Reconquista river water. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 133, 73-81.
- Ostling, O. y Johanson, K.J. (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 123, 291-298.
- Otter, R.R., Meier, J., Kubach, K.M., Lazorchak, J.M. y Klaine, S.J. (2012) The effects of urbanization on *Lepomis macrochirus* using the comet assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 84, 299-303.
- Ozcan Oruç, E., Uner, N., Sevgiler, Y., Usta, D. y Durmaz, H. (2006) Sublethal effects of organophosphate diazinon on the brain of *Cyprinus carpio*. *Drug and Chemical Toxicology* 29, 57-67.
-
-

-
-
- Pandey, A.K., Nagpure, N.S., Trivedi, S.P., Kumar, R. y Kushwaha, B. (2011) Profenofos induced DNA damage in freshwater fish, *Channa punctatus* (Bloch) using alkaline single cell gel electrophoresis. *Mutation Research* 726, 209-214.
- Pandurangi, R., Petras, M., Ralph, S. y Vrzoc, M. (1995) Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 26, 345-356.
- Paracampo, A., Solis, M., Bonneto, C. y Mugni, H. (2015) Acute toxicity of chlorpyrifos to the non-target organism *Cnesterodon decemmaculatus*. *International Journal of Environmental Health Research* 25, 96-103.
- Paravani, E.V., Simoniello, M.F., Poletta, G.L., Zolessi, F.R. y Casco, V.H. (2018) Cypermethrin: Oxidative stress and genotoxicity in retinal cells of the adult zebrafish. *Mutation Research* 8, 25-32.
- Paulino, M.G., Souza, N.E.S. y Fernandes, M.N. (2012) Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80, 6-13.
- Pavlica, M., Papes, D. y Nagy, B. (1991) 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid causes chromatin and chromosome abnormalities in plant cells and mutation in cultured mammalian cells. *Mutation Research* 263, 77-81.
- Peixoto, F.P., Gomes-Laranjo, J., Vicente, J.A. y Madeira, V.M.C. (2008a) Comparative effects of the herbicides dicamba, 2,4-D and paraquat on non-green potato tuber calli. *Journal of Plant Physiology* 165, 1125-1133.
- Peixoto, F.P., Gomes-Laranjo, J., Vicente, J.A. y Madeira, V.M. (2008b) Comparative effects of the herbicides dicamba, 2,4-D and paraquat on non-green potato tuber calli. *Journal of Plant Physiology* 165, 1125-1133.
- Peixoto, F.P., Vicente, J.A. y Madeira, V.M. (2003) The herbicide dicamba (2-methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid) interacts with mitochondrial bioenergetic functions. *Archives of Toxicology* 77, 403-409.
- Pereira, V.M., Bortolotto, J.W., Kist, L.W., Azevedo, M.B.D., Fritsch, R.S., Oliveira, R.D.L., Pereira, T.C.B., Bonan, C.D., Vianna, M.R. y Bogo, M.R. (2012) Endosulfan exposure inhibits brain AChE activity and impairs swimming performance in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neurotoxicology* 33, 469-475.
- Pérez-Iglesias, J.M., Ruiz de Arcaute, C., Natale, G.S.S., S E y Larramendy, M.L. (2017) Evaluation of imazethapyr-induced DNA oxidative damage by alkaline Endo III- and Fpg-modified single-cell gel electrophoresis assay in *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 142, 503-508.
- Pérez-Iglesias, J.M., Ruiz de Arcaute, C., Nikoloff, N., Dury, L., Soloneski, S., Natale, G.S. y Larramendy, M.L. (2014) The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation Glacoxan Imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 104, 120-126.
- Pérez-Iglesias, J.M., Soloneski, S., Nikoloff, N., Natale, G.S. y Larramendy, M.L. (2015) Toxic and genotoxic effects of the imazethapyr-based herbicide formulation Pivot H® on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 119, 15-24.
-
-

-
-
- Pérez, D.J., Okada, E., De Gerónimo, E. y Menone, M.L. (2017) Spatial and temporal trends and flow dynamics of glyphosate and other pesticides within an agricultural watershed in Argentina. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36, 3206-3216.
- Perocco, P., Ancora, G., Rani, P., Valenti, A.M., Mazzullo, M., Colacci, A. y Grilli, S. (1990) Evaluation of genotoxic effects of the herbicide dicamba using *in vivo* and *in vitro* test systems. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 15, 131-135.
- Persch, T.S.P., Weimer, R.N., Freitas, B.S. y Oliveira, G.T. (2017) Metabolic parameters and oxidative balance in juvenile *Rhamdia quelen* exposed to rice paddy herbicides: Roundup®, Primoleo®, and Facet®. *Chemosphere* 174, 98-109.
- Phillips, P.J. y Bode, R.B. (2004) Pesticides in surface water runoff in south-eastern New York State, USA: seasonal and stormflow effects on concentrations. *Pest Management Science* 60, 531-543.
- Phipps, G. L. y Holcombe, G. W. (1985) A method for aquatic multiple species toxicant testing: Acute toxicity of 10 chemicals to 5 vertebrates and 2 invertebrates. *Environmental Pollution* 38, 141-157
- Pilinskaia, M.A. (1974) The cytogenetic effect of herbicide 2,4-D on human and animal chromosomes. *Tsitologija Genetika* 8, 202-206.
- Pimentel, D., McLaughlin, L., Zepp, A., Lakitan, B., Kraus, T., Kleinman, P., Vancini, F., Roach, W.J., Graap, E., Keeton, W.S. y Selig, G. (1993) Environmental and economic effects of reducing pesticide use in agriculture. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 46, 273-288.
- Pitarque, M., Vaglenov, A., Nosko, M., Hirvonen, A., Norppa, H., Creus, A. y Marcos, R. (1999) Evaluation of DNA damage by the Comet assay in shoe workers exposed to toluene and other organic solvents. *Mutation Research* 441, 115-127.
- Plewa, M.J., Wagner, E.D., Gentile, G.J. y Gentile, J.M. (1984) An evaluation of the genotoxic properties of herbicides following plant and animal activation. *Mutation Research* 136, 233-245.
- Poggi-Varaldo, H.M. (1999) Agricultural wastes. *Water Environment Research* 71, 737-785.
- Poletta, G.L., Simoniello, M.F. y Mudry, M.D. (2016) Biomarkers of oxidative damage and antioxidant defense capacity in *Caiman latirostris* blood. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 179, 29-36.
- Pontón, R. (2008) La importancia de la soja para la Argentina. El balance de la economía argentina. Bolsa de Comercio de Córdoba. Instituto de Investigaciones Económicas. <http://www.bolsacba.com.ar/files/C2208.pdf>.
- Porter, W.P., Jaeger, J.W. y Carlson, I.H. (1999) Endocrine, immune, and behavioural effects of aldicarb (carbamate), atrazine (triazine) and nitrate (fertilizer) mixtures at groundwater concentrations. *Toxicology and Individual Health* 15, 133-150.
- Preston, B.J., Cecchine, G. y Snell, T.W. (1999) Effects of pentachlorophenol on predator avoidance behavior of the rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Aquatic Toxicology* 44, 201-212.
- Qiu, X., Nomichi, S., Chen, K., Honda, M., Kang, I.J., Shimasaki, Y. y Oshima, Y. (2017) Short-term and persistent impacts on behaviors related to locomotion, anxiety, and startle responses of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) induced by acute, sublethal exposure to chlorpyrifos. *Aquatic Toxicology* 192, 148-154.
-
-

-
-
- Quarcoo, F., Bonsi, C. y Tackie, N. (2014) Pesticides, the environment, and human health, in: Larramendy, M.L., Soloneski, S. (Eds.), *Pesticides. Toxic aspects*. InTech, Croatia, pp. 81-93.
- Rabello-Gay, M.N. (1991) Teste do micronúcleo em medula óssea, in: SBG (Ed.), *Mutagenese, teratogenese e carcinogenese: métodos e critérios de avaliação*, Ribeirão Preto, p. 246.
- Radosevich, S.R., Holt, J.S. y Ghersa, C.M. (2007) Ecology of weeds and invasive plants: Relationship to agriculture and natural resource management. Wiley-Interscience, Hoboken, USA. pag.
- Rao, L.M. y Ramaneswari, K. (2000) Effect of sublethal stress of endosulfan and monocrotophos on the biochemical components of *L. Rohita*, *M. Vittatus* and *C. Punctata*. Ecology and Environmental Conservation 6, 289–296.
- Reinecke, S.A. y Reinecke, A.J. (2004) The comet assay as biomarker of heavy metal genotoxicity in earthworms. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 46, 208-215.
- Relyea, R. y Hoverman, J. (2006) Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems. Ecology Letters 9, 1157-1171.
- Relyea, R.A. (2012) New effects of Roundup on amphibians: Predators reduce herbicide mortality; herbicides induce antipredator morphology. Ecological Applications 22, 634-647.
- Rodrigues, S., Antunes, S.C., Brandão, F.P., Castro, B.B., Gonçalves, F. y Nunes, B. (2012) Anticholinesterase drugs effects on biomarkers and behavior of pumpkinseed, *Lepomis gibbosus* (Linnaeus, 1758). Journal of Environment Monitoring 14, 1638-1644.
- Rodríguez-Fuentes, G., Rubio-Escalante, F.J., Noreña-Barroso, E., Escalante-Herrera, K.S. y Schlenk, D. (2015) Impacts of oxidative stress on acetylcholinesterase transcription, and activity in embryos of zebrafish (*Danio rerio*) following chlorpyrifos exposure. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 172-173, 19-25.
- Romero-Puertas, M.C., Rodríguez-Serrano, M., Corpas, F.J., Gómez, M., del Rio, L.A. y Sandalio, L.M. (2004) Cd-induced subcellular accumulation of O₂⁻ and H₂O₂ in pea leaves. Plant, Cell, and Environment 27, 1122-1134.
- Ruiz de Arcaute, C., Pérez-Iglesias, J.M., Nikoloff, N., Natale, G.S., Soloneski, S. y Larramendy, M.L. (2014a) Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. Ecological Indicators 45, 632-639.
- Ruiz de Arcaute, C., Soloneski, S. y Larramendy, M. (2016) Toxic and genotoxic effects of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-based herbicide on the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. Ecotoxicology and Environmental Safety 128, 222-229.
- Ruiz de Arcaute, C., Soloneski, S. y Larramendy, M.L. (2014b) Evaluation of the genotoxicity of a herbicide formulation containing 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (dicamba) in circulating blood cells of the tropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. Mutation Research 773, 1-8.
- Ruiz de Arcaute, C., Soloneski, S. y Larramendy, M.L. (2018) Opposite effects of mixtures of commercial formulations of glyphosate with auxinic herbicides on the ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). Environmental Pollution 240, 858-866.
-
-

-
-
- Saha, S. and Kaviraj, A. (2008) Acute Toxicity of Synthetic Pyrethroid Cypermethrin to Some Freshwater Organisms. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 80, 49-52
- Saglio, P., Bretaud, S., Rivot, E. y Olsén, K.H. (2003) Chemobehavioral changes induced by short-term exposures to prochloraz, nicosulfuron, and carbofuran in goldfish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 45, 515-524.
- Saglio, P. y Trijasse, S. (1998) Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 35, 484-491.
- Saglio, P., Trijasse, S. y Azam, D. (1996) Behavioral effects of waterborne carbofuran in goldfish. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 31, 232-238.
- Salbego, J., Pretto, A., Gioda, C.R., Cavalheiro de Menezes, c., Lazzari, R., Radunz, J., Baldisseriotto, B. y Loro, V.L. (2010) Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and haematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 58, 740-745.
- Samanic, C., Rusiecki, J., Dosemeci, M., Hou, L., Hoppin, J.A., Sandler, D.P., Lubin, J.H., Blair, A. y Alavanja, M.C. (2006) Cancer incidence among pesticide applicators exposed to dicamba in the agricultural health study. *Environmental Health Perspectives* 114, 1521-1526.
- Samanta, P., Pal, S., Mukherjee, A.K., Senapati, T., Kole, F. y Ghosh, A.R. (2014) Effects of almix herbicide on profile of digestive enzymes of three freshwater teleostean fishes in rice field condition. *Toxicology Reports* 1, 379-384.
- Sancho, E., Ferrando, M.D., Lleó, C. y Andreu-Moliner, E. (1998) Pesticide toxicokinetics in fish: accumulation and elimination. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 41, 245-250.
- Sandahl, J.F., David, H.B., Jeffrey, J.J. y Nathaniel, L.S. (2005) Comparative thresholds for acetylcholinesterase inhibition and behavioral impairment in coho salmon exposed to chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 136-145.
- Sandal, S. y Yilmaz, B. (2011) Genotoxic effects of chlorpyrifos, cypermethrin, endosulfan and 2,4-D on human peripheral lymphocytes cultured from smokers and nonsmokers. *Environmental Toxicology* 26, 433-442.
- Santos, M.J., Morgado, R., Ferreira, N.G., Soares, A.M. y Loureiro, S. (2011) Evaluation of the joint effect of glyphosate and dimethoate using a small-scale terrestrial ecosystem. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 1994-2001.
- Santos, T.G. y Martinez, C.B.R. (2012) Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. *Chemosphere* 89, 1118-1125.
- Sapana Devi, M. y Gupta, A. (2014) Sublethal toxicity of commercial formulations of deltamethrin and permethrin on selected biochemical constituents and enzyme activities in liver and muscle tissues of *Anabas testudineus*. *Pesticide Biochemical and Physiology* 115, 48-52.
- Sarandon, S. y Marasas, M.E. (2017) Brief history of agroecology in Argentina: origins, evolution, and future prospects. *Agroecology and Sustainable Food Systems* 41, 238-255.
- Sarikaya, R. y Yilmaz, M. (2003) Investigation of acute toxicity and the effect of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) herbicide on the behavior of the common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758; Pisces, Cyprinidae). *Chemosphere* 52, 195-201.
-
-

-
-
- Sasal, M.C., Boizard, H., Andriulo, A.E., Wilson, M.G. y Léonard, J. (2016) Platy structure development under no-tillage in the northern humid Pampas of Argentina and its impact on runoff. *Soil & Tillage Research* 173, 33-41.
- Satyavathi, V.V.J., P P, Elias, E.M. y Rao, M.B. (2004) Effects of growth regulators on *in vitro* plant regeneration in durum wheat. *Crop Science* 44, 1839-1846.
- Schinasi, L. y Leon, M.E. (2014) Non-Hodgkin Lymphoma and Occupational Exposure to Agricultural Pesticide Chemical Groups and Active Ingredients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Internationa Journal of Environmental Research and Public Health* 11, 4449-4527.
- Schlenk, D., Lavado, R., Loyo-Rosales, J.E., Jones, W., Maryoung, L., Riar, N., Werner, I. y Sedlak, D. (2012) Reconstitution studies of pesticides and surfactants exploring the cause of estrogenic activity observed in surface waters of the San Francisco Bay Delta. *Environmental Science and Technology* 46, 9106-9111.
- Schop, R.N., Hardy, M.H. y Goldberg, M.T. (1990) Comparison of the activity of topically applied pesticides and the herbicide 2,4-D in two short-term *in vivo* assays of genotoxicity in the mouse. *Fundaments of Applied Toxicology* 15, 666-675.
- SENASA (2011) Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Prohibición del principio activo endosulfán y sus productos formulados. Resolución 511/2011, 3 p.
- SENASA (2013) Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1506&io=18122>.
- SENASA (2018) Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. www.senasa.gov.ar/informacion/prod-vet-fito-y-fertilizantes/prod-fitosanitarios-y-fertili/registro-nacional-de-terapeutica-vegetal. Último acceso Junio, 2018.
- Seriani, R., Abessa, D.M.S., Kirschbaum, A.A., Pereira, C.D.S., Ranzani-Paiva, M.J.T., Assunção, A., Silveira, F.L., Romano, P. y Mucci, J.L.N. (2012) Water toxicity and cyto-genotoxicity biomarkers in the fish *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology* 7, 67-72.
- Seshagiri, R.K., Srinivas, M., Kashi Reddy, B., Swamy, K.S. y Chetty, C.S. (1987) Effect of benthocarb on protein metabolism of teleost, *Sarotherodon mossambica*. *International Journal of Environmental Health* 29, 440-450.
- Shimizu, N., Itoh, N., Utiyama, H. y Wahl, G.M. (1998) Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *Journal of Cell Biology* 140, 1307-1320.
- Silvetti, F. y Cáceres, D.M. (2015) La expansión de monocultivos de exportación en Argentina y Costa Rica. *Conflictos socioambientales y lucha campesina por la justicia ambiental*. *Mundo Agrario* 16 p.
- Simmon, V.F. (1979) *In vitro* microbiological mutagenicity and unscheduled DNA synthesis studies pf eighteen pesticides. Reaserch Triangle Park: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Reaserch and Development.
- Simoniello, M.F., Gigena, F., Poletta, G., Loteste, A., Kleinsorge, E., Campana, M., Scagnetti, J. y Parma, M.J. (2009) Alkaline comet assay for genotoxic effect detection in neotropical fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 83, 155-158.
-
-

-
-
- Singh, N.P. (1996) Microgel electrophoresis of DNA from individual cells: principles and methodology, in: Pfeifer, G P (Ed.), *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations*. Plenum Press, New York, 3-24 pp.
- 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 individual cells. *Experimental Cell Research* 175, 184-191.
- Solomon, K.R., Dalhoff, K., Volz, D. y Van der Kraak, G. (2014) Effects of herbicide on fish, in: Keith B. Tierney, Anthony P. Farrell, Colin J. Brauner (Ed.), *Fish Physiology: Organic Chemical Toxicology of Fishes*. Elsevier, New York, 369-409 pp.
- Solomon, K.R. y Thompson, D.G. (2003) Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B* 6, 289-324.
- Soloneski, S., González, N.V., Reigosa, M.A. y Larramendy, M.L. (2007) Herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-induced cytogenetic damage in human lymphocytes in vitro in presence of erythrocytes. *Cell Biology International* 31, 1316-1322.
- Soloneski, S., Kujawski, M., Scuto, A. y Larramendy, M.L. (2015) Carbamates: A study on genotoxic, cytotoxic, and apoptotic effects induced in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *Toxicology in Vitro* 29, 834-844.
- Soloneski, S. y Larramendy, M.L. (2010) Sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells treated with insecticide pirimicarb. *Journal of Hazardous Materials* 174, 410-415.
- Soloneski, S. y Larramendy, M.L. (2011) Herbicides in Argentina. Comparative evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects on mammalian cells exerted by auxinic members, in: Kortekamp, A (Ed.), *Herbicides and Environment*. InTech Rijeka, Croatia, 515-530 pp.
- Soloneski, S. y Larramendy, M.L. (2017) The use of the ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Pisces, Poeciliidae) in the genotoxic evaluation of environmental pollutants, in: Larramendy, Marcelo L. (Ed.), *Ecotoxicology and genotoxicology. - Non-traditional Aquatic Models*. The Royal Society of Chemistry, London, 327-346.
- Soloneski, S., Ruiz de Arcaute, C. y Larramendy, M. (2016) Genotoxic effect of a binary mixture of dicamba and glyphosate-based commercial herbicide formulations on *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) (Anura, Bufonidae) late-stage larvae. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 17811-17821.
- Soloneski, S., Ruiz de Arcaute, C., Nikoloff, N. y Larramendy, M. (2017) Genotoxicity of the herbicide imazethapyr in mammalian cells by oxidative DNA damage evaluation using the Endo III and Fpg alkaline comet assays. *Environmental Science and Pollution Research* 24, 10292-10300.
- Song, Y. (2014) Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide. *Journal of Integrative Plant Biology* 56, 106-113.
- Song, Y., Chen, M. y Zhou, J. (2017) Effects of three pesticides on superoxide dismutase and glutathione-S-transferase activities. *Archives of Environmental Protection* 43, 80-86.
- Sorensen, K.C., Stucki, J.W., Warner, R.E., Wagner, E.D. y Plewa, M.J. (2005) Modulation of the genotoxicity of pesticides reacted with redox-modified smectite clay. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 46, 174-181.
-
-

-
-
- Sorensen, K.C., Stucki, J.W. y Warner, R.E.P., M J (2004) Alteration of mammalian-cell toxicity of pesticides by structural iron(II) in ferruginous smectite. *Environmental Science and Technology* 38, 4373-4389.
- Stara, A., Machova, J. y Velisek, J. (2012) Effect of chronic exposure to simazine on oxidative stress and antioxidant response in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 33, 334-343.
- Strachan, S., Casini, M., Heldreth, K., Scocas, J., Nissen, S., Bukun, B., Lindenmayer, R.B., Shaner, D., Westra, P. y Brunk, G. (2010) Vapor movement of synthetic auxin herbicides: aminocyclopyrachlor, aminocyclopyrachlor-methyl ester, dicamba, and aminopyralid. *Weed Science* 58, 103-108.
- Strunjak-Perovic, I., Coz-Rakovac, R., Topic Popovic, N. y Jadan, M. (2009) Seasonality of nuclear abnormalities in gilthead sea bream *Sparus aurata* (L.) erythrocytes. *Fish Physiology and Biochemistry* 35, 287-291.
- Suciu, N.A., Ferrari, T., Ferrari, F., Trevisan, M. y Capri, E. (2011) Pesticide removal from waste spray-tank water by organoclay adsorption after field application to vineyards. *Environmental Science and Pollution Research* 18, 1374-1383.
- Summerfelt, R.C. y Smith, L.S. (1990) Anaesthesia, surgery and related techniques. In: Schreck, C.B., Moyle, P.B. (Eds.), *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society, Bethesda MD, 213-272.
- Sun, F. (1987) Evaluating Acute Toxicity of Pesticides to Aquatic Organisms: Carp, Mosquito Fish and Daphnids. *Plant Protection Bulletin (Taichung)* 29, 385-396
- Tagert, M.L.M., Massey, J.H. y Shaw, D.R. (2014) Water quality survey of Mississippi's Upper Pearl River. *Science of the Total Environment* 481, 564-573.
- Tatum, V.L., Borton, D.I., Streblov, W.R. y Louch, J.S., J P (2012) Acute toxicity of commonly used forestry herbicide mixtures to *Ceriodaphnia dubia* and *Pimephales promelas*. *Environmental Toxicology* 27, 671-684.
- Taylor, E., Gordon Holley, A. y Kirk, M. (2006) Pesticides development: a brief loof at the History. <http://www.walterreeves.com/gardening-q-and-a/why-do-we-use-poisons/attachment/pesticide-development-a-brief-look-at-the-history-2/>. Último acceso: Mayo 2018.
- Teixeira, M.C., Telo, J.P., Duarte, N.F. y Sá-Correia, I. (2004) The herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid induces the generation of free-radicals and associated oxidative stress responses in yeast. *Biochemistry and Biophysics Research Communications* 324, 1101-1107.
- Thomas, P., Umegaki, K. y Fenech, M. (2003) Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis* 18, 187-194.
- 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. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35, 206-221.
- Tierney, K.B., Baldwin, D.H., Hara, T.J., Ross, P.S., Scholz, N.L. y Kennedy, C.J. (2010) Olfactory toxicity in fishes. *Aquatic Toxicology* 96, 2-26.
- Tierney, K.B., Farrell, A.P. y Brauner, C.J. (2013) *Fish Physiology. Organic Chemical Toxicology of Fishes*. Elsevier Inc, New York. 574 p.
-
-

-
- Tierney, K.B., Sampson, J.L., Ross, P.S. y Sekela, M.A.K., C J (2008) Salmon olfaction is impaired by an environmentally realistic pesticide mixture. *Environmental Science Technology* 42, 4996-5001.
- Tierney, K.B., Sekela, M.A., Cobbler, C.E., Xhabija, B., Gledhill, M., Ananvoranich, S. y Zielinski, B.S. (2011) Evidence for behavioural preference toward environmental concentrations of urban-use herbicides in a model adult fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 2046-2054.
- Tierney, K.B., Singh, C.R., Ross, P.S. y Kennedy, C.J. (2007) Relating olfactory neurotoxicity to altered olfactory-mediated behaviors in rainbow trout exposed to three currently-used pesticides. *Aquatic Toxicology* 81, 55-64.
- Tilman, D., Cassman, K.G., Matson, P.A., Naylor, R. y Polasky, S. (2002) Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418, 671-677.
- Tisler, T., Jemec, A., Mozetic, B., Trebse, P. (2009) Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. *Chemosphere* 76, 907-914.
- Tomlin, C.D.S. (2006) *The Pesticide Manual, A World Compendium*, 14th ed. British Crop Protection Council, Surry, England. 1949 p.
- Topal, A., Alak, G., Altun, S., Erol, H.S. y Atamanalp, M. (2017) Evaluation of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine and NFkB activation, oxidative stress response, acetylcholinesterase activity, and histopathological changes in rainbow trout brain exposed to linuron. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 49, 14-20.
- Tripathi, G. y Singh, H. (2013) Impact of alphasmethrin on biochemical parameters of *Channa punctatus*. *Journal of Environmental Biology* 34, 227-230.
- Tripathi, G. y Verma, P. (2004) Endosulfan-mediated biochemical changes in the freshwater fish *Clarias batrachus*. *Biomedical and Environmental Sciences* 17, 47-56.
- U.S. Dept. of Agriculture/Forest Service (2004) Human Health and Ecological Risk Assessment for Dicamba (1918-00-9) SERA TR 04-43-17-06d, Appendix 6-3. https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0223_summary.pdf. Último acceso Mayo 2018. U.S. Department of Agriculture.
- Udroiu, I. (2006) The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology* 79, 201-204.
- Ullah, R., Zuberi, A., Ullah, S. y Ullah Dawar, F. (2014) Cypermethrin induced behavioral and biochemical changes in mahseer, *Tor putitora*. *The Journal of Toxicological Sciences* 39, 829-836.
- UN (2011) Peligros para el medio ambiente. Naciones Unidas Parte 4, 229 - 258.
- Unsworth, J. (2010) History of pesticide use. https://agrochemicals.iupac.org/index.php?option=com_sobi2&sobi2Task=sobi2Details&catid=3&sobi2Id=31. Último acceso Mayo 2018.
- USEPA (1974) United States Environmental Protection Agency. *Compendium of Registered Pesticides* U.S. Government Printing Office, Washington, DC.
- USEPA (1975) *Methods for acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates, and amphibians*. U.S. Government Printing Office, Washington, DC 660/3-75-009, 62 p.
- USEPA (1982) *Pesticide Assessment Guidelines Subdivision E. Hazard evaluation: wildlife and aquatic organisms* United States Environmental Protection Agency, Washington DC EPA-540/9-82-024.
- USEPA, 1989. Short- term method for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. Cincinnati: EPA/600/4-89/001
-

-
- USEPA (1992) Pesticide ecotoxicity database. <https://cfpub.epa.gov/ecotox/>. Último acceso Junio 2018.
- USEPA (2001) United States Environmental Protection Agency Report. Environmental Hazard Assessment and Ecological Risk Assessment Methodology. U.S. Government Printing Office, Washington, DC. Appendix H.
- USEPA (2002a) Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. Fifth edition. U.S. Government Printing Office, Washington, DC 821-R-02-012.
- USEPA (2002b) Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. U.S. Government Printing Office, Washington, DC.
- USEPA (2005) Reregistration eligibility decision (RED) for 2,4-D. U.S. Environmental Protection Agency, Washington DC 738-R-05-002.
- USEPA (2006) Reregistration eligibility decision for dicamba and associated salts. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/dicamba_red.pdf.
- USEPA (2007) Revised N-methyl carbamate cumulative risk assessment. Technical executive summary. U.S. Government Printing Office, Washington, DC, 277.
- USEPA (2008) Technical overview of ecological risk assessment - analysis phase: ecological effects characterization. <https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/technical-overview-ecological-risk-assessment-0>. Last accessed September, 2017. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- USEPA (2012) United States Code, Title 7 - Agriculture, Chapter 6 - Insecticides and Environmental Pesticide Control, Subchapter II - Environmental Pesticide Control. U.S. Government Printing Office, Washington, DC.
- USEPA (2013) Pesticide Ecotoxicity Database (Formerly: Environmental Effects Database (EEDB)). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- USEPA (2017) Pesticides industry sales and usage. 2008-2012 Market estimates, in: U.S. Government Printing Office, Washington, DC (Ed.), Washington, DC, 24 p.
- USEPA (2018) Types of pesticide ingredients. <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/types-pesticide-ingredients>. Último acceso, mayo 2018. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. y Mazur, M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160, 1-40.
- Van Bruggen, A.H.C., He, M.M., Shin, K., Mai, V., Jeong, K.C., Finckh, M.R. y Morris, J.G. (2018) Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. *Science of the Total Environment* 616–617, 255-268.
- van der Oost, R. (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers of oxidative stress in aquatic organism in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, 178-189.
- Venkov, P., Topashka-Ancheva, M., Georgieva, M., Alexieva, V. y Karanov, E. (2000) Genotoxic effect of substituted phenoxyacetic acids. *Archives in Toxicology* 74, 560-566.
- Vera-Candioti, J., Natale, G., Soloneski, S., Ronco, A.E. y Larramendy, M.L. (2010) Sublethal and lethal effects on *Rhinella arenarum* (Anura, Bufonidae) tadpoles exerted by the
-

-
-
- pirimicarb-containing technical formulation insecticide Aficida®. *Chemosphere* 78, 249–255.
- Vera-Candioti, J., Soloneski, S. y Larramendy, M.L. (2011) Acute toxicity of chromium on *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces: Poeciliidae). *Theoria* 20, 85-93.
- Vera-Candioti, J., Soloneski, S. y Larramendy, M.L. (2013a) 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.
- Vera-Candioti, J., Soloneski, S. y Larramendy, M.L. (2013b) Single-cell gel electrophoresis assay in the ten spotted live-bearer fish, *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842), as bioassay for agrochemical-induced genotoxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 98, 368-373.
- Vera-Candioti, J., Soloneski, S. y Larramendy, M.L. (2014) Chlorpyrifos-based insecticides induced genotoxic and cytotoxic effects in the ten spotted live-bearer fish, *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842). *Environmental Toxicology* 29, 1390-1398.
- Vera-Candioti, J., Soloneski, S. y Larramendy, M.L. (2015) Pirimicarb-based formulation-induced genotoxicity and cytotoxicity on the fresh water fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Pisces, Poeciliidae). *Toxicology and Industrial Health* 31, 1051-1060.
- Villar, C.A., Gomez, S.E. y Bentos, C.A. (2000) Lethal concentration of Cu in the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Cyprinodontiformes). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 65, 465-469.
- Vom Saal, F.S., Nagel, S.C., Palanza, P., Boehler, M., Parmigiani, S. y Welshons, W.V. (1995) Estrogenic pesticides: binding relative to estradiol in MCF-7 cells and effects of exposure during fetal life on subsequent territorial behavior in male mice. *Toxicological Letters* 77, 343-350.
- Wafa, T., Amel, N., Ikbal, C. y Mohammed, H. (2012) Oxidative stress induced by the 2,4-dichlorophenoxyacetic herbicide, in: Lushchak, V (Ed.), *Oxidative stress-environmental induction and dietary antioxidants*. InTech, Rijeka, Croatia, pp. 1-17.
- Wafa, T., Ikbal, C. y Mohamed, H. (2011) Environmental fate and effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic herbicide, in: Piotrowski, K D (Ed.), *Herbicides: Properties, Crop Protection and Environmental Hazards*, 161-187.
- Waite, D.T., Bailey, P., Sproull, J.F., Quiring, D.V., Chau, D.F.B., J y Cessna, A.J. (2005) Atmospheric concentrations and dry and wet deposits of some herbicides currently used on the Canadian prairies. *Chemosphere* 58, 693-703.
- Walia, G.K., Handa, D., Kaur, H. y Kalotra, R. (2013) Erythrocyte abnormalities in a freshwater fish, *Labeo rohita* exposed to tannery industry effluent. *International Journal of Pharma and Bio Sciences* 3, 287-295.
- Wang, X.H., Souders, C.L., Zhao, Y.H. y Martyniuk, C.J. (2018) Mitochondrial bioenergetics and locomotor activity are altered in zebrafish (*Danio rerio*) after exposure to the bipirydylum herbicide diquat. *Toxicology Letters* 283, 13-20.
- Warne, M.S.J. (2003) A review of the ecotoxicity of mixtures, approaches to, and recommendations for, their management. Environment Protection & Health Council, Adelaide, Australia. 251-276 pp.
-
-

-
-
- Waters, M.D.N., S, Simmon, V.F., Mitchell, A.D. y Jorgenson, T.A.V., R (1981) Pesticides: mutagenic and carcinogenic potential, in: Bandal, SK, Marco, G J, Golberg, L, Leng, M L (Eds.), *Pesticide chemist and modern toxicology*. American Chemical Society, Boston, pp. 89-113.
- Wauchope, R.D., Buttler, T.M., Hornsby, A.G. y Augustijn Beckers, P.W.M.B., J P (1992) SCS/ARS/CES Pesticide properties database for environmental decisionmaking. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 123, 1-157.
- Westlund, P. y Yargeau, V. (2017) Investigation of the presence and endocrine activities of pesticides found in wastewater effluent using yeast-based bioassays. *Science of the Total Environment* 607–608 744-751.
- WHO-FAO (2009) Pesticides residues in food, FAO Plant Production and Protection Paper World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 1-426 pp.
- WHO (1989) Environmental Health Criteria 84, Environmental Aspects - 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). International Programme on Chemical Safety, World Health Organization: Geneva, Switzerland.
- WHO (1990) Public health impacts of pesticides used in agriculture (WHO in collaboration with the United Nations Environment Programme, Geneva, 1990), Geneva, Switzerland.
- WHO (2003) 2,4-D in drinking-water. Background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality. Report WHO/SDE/WSH/03.04/70, Geneva, Switzerland.
- WHO (2004) IPCS Harmonization Project. Risk assessment terminology. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 122 pp.
- WHO (2008) Guidelines for Drinking-water Quality. http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/fulltext.pdf. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, Geneva, Switzerland. pag.
- WHO (2009) The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2009. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 81 pp.
- WHO (2011) Guidelines for drinking water quality. World Health Organization.
- Williams, R.C. y Metcalfe, C.D. (1992) Development of an *in vivo* hepatic micronucleus assay with rainbow trout. *Aquatic Toxicology* 23, 192-202.
- Wolter, C. y Arlinghaus, R. (2003) Navigation impacts on freshwater fish assemblages: the ecological relevance of swimming performance. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 13, 63-89.
- Wong, V.W.C., Szeto, Y.T., Collins, A.R. y Benzie, L.F.F. (2005) The comet assay: a biomonitoring tool for nutraceutical reaserch. *Current Topics in Nutraceutical Research* 3, 1-14.
- Woodward, D.F. (1982) Acute toxicity of mixtures of range management herbicides to *Cutthroat trout*. *Journal of Range Management* 35, 539-540.
- Woudneh, M.B., Sekela, M., Tuominen, T. y Gledhill, M. (2007) Acidic herbicides in surface waters of Lower Fraser Valley, British Columbia, Canada. *Journal of Chromatography. A* 1139, 121-129.
- Wright, T.R., Shan, G., Walsh, T.A., Lira, J.M., Cui, C., Song, P. y al., e. (2010) Robust crop resistance to broadleaf and grass herbicides provided by aryloxyalkanoate dioxygenase transgenes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 20240-202405.
-
-

-
-
- Yilmaz, M., Gül, A. y Karaköse, E. (2004) Investigation of acute toxicity and the effect of cadmium chloride ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) metal salt on behavior of the guppy (*Poecilia reticulata*). *Chemosphere* 56, 375-380.
- Yoder, J., Watson, M. y Benson, W.W. (1973) Lymphocyte chromosome analysis of agricultural workers during extensive occupational exposure to pesticides. *Mutation Research* 21, 335-340.
- Young, B., López, G.C., Cristos, D., Crespo, D., Somoza, G.M. y Carriquiriborde, P. (2017) Intersex and liver alterations induced by long-term sublethal exposure to 17 α -ethinylestradiol in adult male *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). *Environmental Toxicology and Chemistry* 7, 1738-1745.
- Zar, J.H. (2010) *Biostatistical Analysis*, 5 ed. Prentice Hall, New Jersey. 944 pp.
- Zeljezic, D. y Garaj-Vrhovac, V. (2004) Chromosomal aberrations, micronuclei and nuclear buds induced in human lymphocytes by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid pesticide formulation. *Toxicology* 200, 39-47.
- Zhang, J., Liu, L., Ren, L., Feng, W., Lv, P., Wu, W. y Yan, Y. (2017) The single and joint toxicity effects of chlorpyrifos and beta-cypermethrin in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. *Journal of Hazardous Materials* 334, 121-131.
- Zhang, J., Shen, H., Wang, X., Wu, J. y Xue, Y. (2004) Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. *Chemosphere* 55, 167-174.
- Zhang, X., Acevedo, S., Chao, Y., Chen, Z., Dinoff, T., Driver, J., Ross, J., Williams, R. y Krieger, R. (2011) Concurrent 2,4-D and triclopyr biomonitoring of backpack applicators, mixer/loader and field supervisor in forestry. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 46, 281-293.
- Zhao, F., Wang, B., Zhang, X.N., Tian, H., Wang, W. y Ru, S.G. (2015) DNA damage induced by monocrotophos pesticide and the underlying mechanism in hepatic cells of goldfish (*Carassius auratus*). *Zhongguo Huanjing Kexue/China Environmental Science* 35, 1553-1569.
- Zhao, Z., Wang, Y., Zhang, L., Cai, Y. y Chen, Y. (2014) Bioaccumulation and tissue distribution of organochlorine pesticides (OCPs) in freshwater fishes: A case study performed in Poyang Lake, China's largest lake. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 8740-8749.
- Zhou, F.B. (2008) Strengthen control on pollutant discharged of pesticide industry by stipulating discharge standards. *China Agrochemicals* 4, 4-9.
- Zhu, Y.C., Yao, J., Adamczyk, J. y Luttrell, R. (2017) Synergistic toxicity and physiological impact of imidacloprid alone and binary mixtures with seven representative pesticides on honey bee (*Apis mellifera*). *PLoS One* 12, e0176837.
- Zimmermann, F.K., von Borstel, R., Von Halle, E.S., Parry, J.M., Siebert, D., Zetterberg, G., Barale, R. y Loprieno, N. (1984) Testing of chemicals for genetic activity with *Saccharomyces cerevisiae*: a report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-TOX Program. *Mutation Research* 133, 199-244.
-
-



Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gen tox
Community address: www.elsevier.com/locate/mut res



Evaluation of the genotoxicity of a herbicide formulation containing 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (dicamba) in circulating blood cells of the tropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*



C. Ruiz de Arcaute^{a,b}, S. Soloneski^{a,b}, M.L. Larramendy^{a,b,*}

^a Cátedra de Citología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Calle 64 N° 3, B1904AMA La Plata, Argentina

^b Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 June 2014

Received in revised form 7 August 2014

Accepted 8 August 2014

Available online 19 August 2014

Keywords:

Banvel®

Lethality

Micronuclei

SCGE assay

Sublethal effects

Dicamba-based commercial formulation

ABSTRACT

Acute toxicity and genotoxicity of the dicamba-based commercial herbicide formulation Banvel® were evaluated on *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae) exposed under laboratory conditions. A lethal effect was used as the end point for mortality, whereas frequency of micronuclei (MNs) and DNA single-strand breaks evaluated by the single cell gel electrophoresis assay were employed as end points for genotoxicity. Mortality studies revealed an LC_{50 96h} value of 1639 mg/L (range, 1471–1808) of dicamba. Furthermore, behavioral changes, e.g., gathering at the bottom of the aquarium, slowness in motion, abnormal swimming, and slow reaction, were observed. Whereas increased frequency of MNs was observed when 1229 mg/L dicamba was assayed for 48 h, no induction of MNs was observed in fish exposed to the herbicide for 96 h, regardless of the concentration of dicamba. Furthermore, other nuclear abnormalities, i.e., binucleated cells and lobed and notched nuclei, were induced in fish exposed for 48 h but not 96 h. Increase in the genetic damage index was observed in those treatments (lasting for both 48 and 96 h) within the 410–1229 mg/L dicamba concentration-range. This study represents the first evidence of acute lethal and sublethal effects exerted by dicamba on a piscine species native to Argentina. The results could indicate that dicamba-based formulation Banvel® is the less toxic emerging pollutant reported so far for *C. decemmaculatus*. Finally, our findings highlight the properties of this herbicide that jeopardize nontarget living species exposed to this agrochemical.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Nowadays, it is almost impossible for many countries to decrease their use of pesticides without reducing crop yields [1]. These compounds can also be hazardous if not used appropriately, and many of them (if not all) may represent potential hazards to the environment due to the contamination of food, water, and air [2]. Furthermore, increasing their jeopardizing effects, anthropogenic activities are continuously introducing extensive amounts

of these compounds into the environment regardless of their persistence, bioaccumulation, and toxicity (www.epa.gov/pesticides/). However, it is well known that pesticides not only affect target organisms, but concomitantly also exert side effects on nontarget organisms [3,4].

Auxinic herbicides are among the most used pesticides worldwide. They are employed as agrochemicals for their selective control on broadleaf weeds. They comprise several compounds belonging to four different chemical families, i.e., phenoxyalkanoic acids, pyridinecarboxylic acids, quinolinecarboxylic acids, and benzoic acids [5].

Dicamba is a chlorinated benzoic acid-derivate compound that was first registered in 1967 in the United States as a postemergent herbicide [6]. It is currently used in agriculture and gardening to control the growth of different unwanted vegetable species, mainly in cereal grain crops, but also on sugar cane and soybeans, among others [7]. The herbicide is available in numerous commercial formulations as a single component or coformulated with a wide variety of other herbicides, such as 2,4-D, sulfonylureas or

Abbreviations: AS, abnormal swimming; BL, blebbed nuclei; BN, binucleated erythrocyte; CP, cyclophosphamide; GBA, gathering at the bottom of the aquarium; GDI, genetic damage index; LC₅₀, lethal concentration 50; LB, lobed nuclei; LOEC, lowest observed effect concentration; MN, micronucleus; NOEC, no observed effect concentration; NT, notched nuclei; SCGE, single cell gel electrophoresis; SM, slowness in motion; SR, slow reaction.

* Corresponding author at: Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Calle 64 Nro. 3 (esq. 120), B1904AMA La Plata, Argentina. Tel.: +54 221 424 9049.

E-mail address: marcelo.larramendy@gmail.com (M.L. Larramendy).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2014.08.001>

1383-5718/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

triazines, to provide a broader spectrum of weed control. These formulations are registered and sold in many countries all over the world [8]. As dicamba shares characteristics with other acidic herbicides, e.g., high water solubility, low volatility, and heavy agricultural use, that facilitate their incorporation into the aqueous environment, a growing number of studies have been performed stressing its environmental effects. Dicamba has been detected as a pollutant in agricultural, urban, and mixed agricultural/urban sites [9], in surface drinking-water reservoirs [10], and even in estuarine waters [11]. Furthermore, much is known about its effects on aquatic plants and risks to terrestrial organisms [7]. Toxicological data on this chlorinated acid herbicide are available and considered adequate to assess its potential hazards not only to humans, but also to other living species [7].

So far, dicamba's potential genotoxic hazard has been revealed by diverse *in vivo* [12–14] and *in vitro* assays [12,15,16]. Some recent studies demonstrated that dicamba should be considered a DNA-damaging agent. Induction of sister chromatid exchanges (SCEs) and alteration in both cell-cycle progression and mitotic indices in human lymphocytes *in vitro* and Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells have been reported [17,18]. Additionally, the herbicide was reported to induce DNA-strand breaks revealed by the single cell gel electrophoresis (SCGE) assay [18] as well as micronuclei (MNs) in CHO-K1 cells [19]. Finally, positive results were also reported when applying the *Tradescantia*-micronucleus assay [14].

The dicamba DNA damage mechanism is not yet totally known. It is known that dicamba induces tissue damage and cell death in cleavers (*Gallium aparine* L.) by lipid peroxidation [20]. Furthermore, it was suggested recently that dicamba-induced lesions on DNA could be attributable to reactive oxygen species delivered *in vitro* [17,20,21].

Fish are suitable aquatic vertebrates to be employed as reliable environmental lethality, cytotoxicity, and genotoxicity bioindicator organisms due to either their role in the aquatic trophic chain and their sensitivity to low concentrations of emerging pollutants, characteristic of polluted aquatic environments. Furthermore, the capability of fish to efficiently metabolize and accumulate chemical pollutants is well documented [22,23]. The MN as well as the SCGE tests, due to their sensitivity, reliability, and the simplicity of use, have become widely used in piscine erythrocytes to assess the genotoxicity of many xenobiotics [22–32]. Genotoxicity in fish associated with pesticide exposure analyzed using both the MN and the SCGE bioassays in fish erythrocytes is well documented [23–31].

The aim of the present study is to characterize the acute toxicity of the Argentinean dicamba-containing auxinic herbicide commercial formulation Banvel® (57.71% dicamba) on *Cnesterodon decemmaculatus*, an endemic species with an extensive distribution in Neotropical America, exposed under laboratory conditions using a static acute experimental method. Whereas a lethal effect was used as the end point for mortality, the frequency of MNs and DNA single-strand breaks evaluated by the SCGE assay were employed as end points for genotoxicity on circulating blood cells.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Dicamba (3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid, CAS 1918-00-9) commercial-grade trade formulation Banvel® (57.71% dicamba) was kindly provided by Syngenta Agro S.A. (Buenos Aires, Argentina). Cyclophosphamide (CP; CAS 6055-19-2) and dimethyl sulfoxide (CAS 67-68-5) were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO), whereas $K_2Cr_2O_7$ [$Cr_{(VI)}$] (CAS 7778-50-9) was obtained from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). All other chemicals and solvents of analytical grade were purchased from Sigma Chemical Co.

2.2. Quality control

Determination of the concentration levels of dicamba in the test solutions was performed by QV Chem Laboratory (La Plata, Buenos Aires, Argentina) according to U.S. Geological Survey Report 01-4134 [33]. Dicamba levels were analyzed by high performance liquid chromatography using an ultraviolet detector. Active ingredient samples from test solutions (820 mg/L) correspond to values obtained immediately after preparation (0 h) and 24 h thereafter. The detection limit for dicamba was 0.5 mg/L. Concentrations assessed throughout the study represent the nominal concentrations of active ingredient present within the dicamba-based formulation Banvel®.

2.3. Test organisms

C. decemmaculatus was selected as the target organism. This species is an endemic fish member of the family Poeciliidae with an extensive distribution in Neotropical America and which attains high densities in a large variety of water bodies within the whole La Plata River and other South American basins. This is a small ovoviviparous, microomnivorous, benthic-pelagic and nonmigratory fish (maximum size, ≈ 25 mm and 45 mm for σ and ϕ , respectively), and it is often the most abundant and sometimes the only species present in small watercourses. This species is easy to handle and acclimate to laboratory conditions. Ranges of tolerance of *C. decemmaculatus* to many environmental parameters, e.g., temperature, salinity, and pH, are comparatively large, requested conditions for toxicity testing [34]. Furthermore, several reports found this species suitable as a test organism in acute and chronic toxicity bioassays [25–30,35,36]. Specimens were collected from a permanent pond away from agricultural areas, in the vicinity of La Plata city (Buenos Aires Province, Argentina). Adults were transported to the laboratory and then acclimated for at least 20 days to 16/8 h light/dark cycle in aquaria at $20 \pm 1^\circ C$ with dechlorinated tap water (pH 7.55 ± 0.1 ; dissolved oxygen, 6.3 ± 0.3 mg/L; ammonium (NH_4^+) < 0.2 mg/L; hardness, 143 ± 23.5 mg $CaCO_3/L$) with artificial aeration and an *ad libitum* daily supply of commercially available fish food (TetraMin®, TetraWerke, Melle, Germany) until the beginning of the experimental procedures.

2.4. Determination of LC_{50}

Experiments were carried out for toxicity assessment following recommendations proposed by the U.S. EPA standardized methods for acute piscine toxicity testing [37,38] with minor modifications reported previously for the species [25,27–30]. The average body weight of the specimens used throughout the experiment was 0.26 ± 0.1 g, and the mean body length was 29.5 ± 2.7 mm. Briefly, for each experimental point, 10 specimens (5 σ and 5 nongravid ϕ) were maintained in a 1 L glass container and exposed to nine different concentrations of dicamba (816, 1152, 1296, 1440, 1584, 1728, 2208, 2688, and 2880 mg/L) for 96 h. Negative (dechlorinated tap water, pH 7.55 ± 0.1 ; dissolved oxygen, 6.3 ± 0.3 mg/L; NH_4^+ < 0.2 mg/L; hardness, 143 ± 23.5 mg $CaCO_3/L$) and positive controls (21.4 mg/L $Cr_{(VI)}$ -treated fish) [26] were conducted and run simultaneously with Banvel®-exposed fish. All test solutions were prepared immediately before use and replaced every 24 h. Fish were not fed throughout the experiment. A lethal (mortality) effect was determined every 24 h in three independent experiments run simultaneously for each experimental point.

2.5. Sublethal end points

2.5.1. Behavioral changes

The behavioral changes of the fish subjected to different concentrations of dicamba (816, 1152, 1296, 1440, 1584, 1728, 2208, 2688, and 2880 mg/L) and those of healthy fish were monitored and determined every 24 h before the application of Banvel® test solutions in those fish employed for determining LC_{50} values. Optomotor responses were classified following the criteria reported elsewhere [39].

2.5.2. Micronuclei and other erythrocytic nuclear abnormalities

MN assay was performed on peripheral circulating blood erythrocytes according to the procedure described previously [25,27–30]. Experiments were performed following the same experimental design described in Section 2.4, with specimens exposed to three different concentrations of Banvel® equivalent to 25%, 50%, and 75% of the corresponding $LC_{50,96h}$ value. To achieve these concentrations, specimens were exposed to 410, 820, and 1229 mg/L of dicamba, respectively (see Section 2.4). Negative (dechlorinated tap water, see Section 2.4) and positive (10 mg/L CP) controls were conducted and run simultaneously with Banvel®-exposed fish. All test solutions were prepared immediately before each experiment. The frequency of MNs was determined in peripheral mature erythrocytes at 48 and 96 h after the initial treatment. Experiments were performed in triplicate and run simultaneously for each experimental point. Fish were killed according to American Society of Ichthyologists and Herpetologists [40] criteria. At the end of each experiment, anesthesia was induced by immersion in ice water and blood samples were obtained by sectioning behind the operculum. Peripheral blood smears were performed for each animal onto clean slides, air dried, fixed with 100% (v/v) cold methanol ($4^\circ C$) for 20 min, and then stained with 5% Giemsa solution for 12 min. Slides were coded and blind-scored by one researcher at $1000\times$ magnification. Data are expressed as the

Table 1
Lethal effects the dicamba-based herbicide Banvel® on *Cnesterodon decemmaculatus* exposed fish.

Number of individuals	Concentration (mg/L)	Mortality (number of dead individuals)			
		24 h	48 h	72 h	96 h
30	Control	1	1	1	1
30	816	3	3	3	3
30	1152	2	2	2	7
30	1296	2	3	9	12
30	1440	2	6	10	12
30	1584	5	6	10	13
30	1728	0	13	16	17
30	2208	3	9	16	18
30	2688	3	13	21	27
30	2880	15	22	24	30
30	Positive control ^a	4	8	11	14

^a Cr(VI) (21.4 mg/L) was used as positive control.

total number of MNs per 1000 cells, as suggested previously [25]. MN frequency was determined following the examination criteria reported previously [25]. Briefly, the criteria employed in identifying MNs were as follows: a diameter smaller than 1/3 of that of the main nuclei, nonrefractibility, the same staining intensity as or staining intensity lighter than that of the main nuclei, no connection or link with the main nuclei, no overlapping with the main nuclei, MN boundary distinguishable from the main nuclei boundary, and no more than four MNs associated with the nuclei.

Other erythrocytic nuclear abnormalities were blind-scored from 1000 erythrocytes per experimental point from each experiment at 1000× magnification. Examination criteria followed those established previously [41,42]. Briefly, cells with two nuclei were considered binucleated cells (BNs), whereas cells with one nucleus presenting a relatively small evagination of the nuclear membrane containing euchromatin were classified as blebbed nuclei (BLs). Nuclei with evaginations of the nuclear membrane larger than that of a BL, which could have several lobes, were considered lobed nuclei (LBs). Finally, nuclei with vacuoles and appreciable depth into a nucleus without containing nuclear material were recorded as notched nuclei (NTs).

2.5.3. Single cell gel electrophoresis assay

Specimens exposed for MN assay (see Section 2.5.1) were also employed for SCGE assay. Negative (dechlorinated tap water, see Section 2.4) and positive (10 mg/L CP) controls were conducted and run simultaneously with dicamba-based formulation Banvel®-exposed specimens. The SCGE assay was performed following the alkaline procedure described by Singh et al. [43] with minor modifications. Blood samples were diluted with 1 ml phosphate-buffered saline. An aliquot of 30 µl the diluted samples was mixed with 70 µl 0.5% low-melting-point agarose and was then layered on a slide precoated with 100 µl 0.5% normal-melting-point agarose. The slide was covered with a coverslip and placed at 4 °C for 10 min. After solidification, the coverslip was removed, and the slide was covered with a third layer of 50 µl 0.5% low-melting-point agarose. After solidification, the coverslip was removed, and slides were immersed in ice-cold freshly prepared lysis solution (1% sodium sarcosinate, 2.5 mM NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris, pH 10.0, 1% Triton X-100, 10% DMSO) and then lysed at darkness for 1 h period (4 °C). Then, slides were placed in an electrophoresis buffer (1 mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH) for 25 min at 4 °C to allow the cellular DNA to unwind, followed by electrophoresis in the same buffer and temperature for 30 min at 25 V and 250 mA (0.8 V/cm). Finally, the slides were neutralized with a solution comprising 0.4 M Tris-HCl, pH 7.5, stained with 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI; Vectashield mounting medium H1200; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Slides were examined under an Olympus BX50 fluorescence photomicroscope equipped with an appropriate filter combination. The extent of DNA damage was quantified by the length of DNA migration, which was visually determined in 100 randomly selected and nonoverlapping cells. DNA damage was classified in four classes (0–I, undamaged; II, minimum damage; III, medium damage; IV, maximum damage), as suggested previously [44]. Data are expressed as the mean number of damaged cells (sum of Classes II, III, and IV) and the mean comet score for each treatment group. The genetic damage index (GDI) was calculated for each test compound following Pitarque et al. [45] using the formula $GDI = [I (I) + 2 (II) + 3 (III) + 4 (IV)]/N (0-IV)$, where 0–IV represents the nucleoid type, and N_0-N_{IV} represents the total number of nucleoid scored.

2.6. Statistical analysis

A *t*-test was performed for comparisons in chemical analyses. Mortality data were analyzed using the U.S. EPA Probit Analysis statistical software, version 1.5 (<http://www.epa.gov/nerleerd/stat2.htm>), based on Finney's method [46]. The proportion of individuals affected per test chamber ($n=5$) was calculated for lethal and sublethal end points (mortality, behavior, MNs, BNs, BLs, LBs, NTs, damaged cells, and GDI). Each proportion was angular transformed and a one-way ANOVA with Dunnett's test was performed, whereas a one-way ANOVA with Tukey's test was performed for comparison between negative and solvent control data. ANOVA

assumptions were corroborated with Barlett's test for homogeneity of variances and a χ^2 test for normality. In cases which did not perform the assumptions of normality was made a Kruskal–Wallis test. No observed effect concentration (NOEC) and lowest observed effect concentration (LOEC) values were estimated for behavioral end points. The relationships between concentration and GDI and MN data were evaluated by simple linear regression and correlation analyses. Concentration–response (C–R) curves at 96 h were estimated with their 95% confidence limits. Regression and correlation coefficients were calculated for each C–R curve. Tests of the significance of the regressions and correlation coefficients were performed. The level of significance chosen was 0.05 unless indicated otherwise.

3. Results

Results obtained from the *t*-test between chemical analyses showed no significant changes ($P > 0.05$) in the concentration of the pure analyte in treatments during the 24 h interval renewals of the testing solutions (concentration range, $97 \pm 5\%$ recovery).

3.1. Mortality

Probit analysis of the mortality data allowed determination of the LC₅₀ values of dicamba present within the formulation Banvel® after 24, 48, 72, and 96 h of exposure. Results revealed mean values of LC_{50 24 h} = 2358 mg/L (range, 714–7812), LC_{50 48 h} = 2473 mg/L (range, 2144–3087), LC_{50 72 h} = 1941 mg/L (range, 1725–2216), and LC_{50 96 h} = 1639 mg/L (range, 1471–1808). As revealed by regression analysis, LC₅₀ values were not affected by the exposure time ($r = -0.90$, $P > 0.05$). Complete data of mortality are presented in Table 1.

3.2. Behavioral changes

The behavioral changes observed in those *C. decemmaculatus* exposed to different concentrations of dicamba present within the formulation Banvel® were gathering at the bottom of the aquarium (GBA), slowness in motion (SM), abnormal swimming (AS), and slow reaction (SR). NOEC and LOEC values for all observed changes are summarized in Table 2.

3.3. MN and other erythrocytic nuclear abnormality frequencies

Table 3 shows the results of the analysis of MNs in peripheral blood erythrocytes of *C. decemmaculatus* induced by the dicamba-based herbicide formulation Banvel®. An increased frequency of MNs was observed in fish exposed to CP (positive control) for 48 h ($P < 0.05$), but not in fish exposed for 96 h ($P > 0.05$). The results reveal that while increased frequency of MNs was observed in those fish exposed to the highest concentration (1229 mg/L) of dicamba present within the formulation Banvel® for 48 h ($P < 0.001$), no induction of MNs was observed in fish exposed to the herbicide for 96 h ($P > 0.05$), regardless of the concentration

Table 2
Behavioral effects of *Cnesterodon decemmaculatus* exposed to the dicamba-based herbicide Banvel®.^a

Exposure time (h)	Effect	NOEC ^b	LOEC ^b
24	SM ^c	1296	1440 ^{***}
	GBA ^c	1296	1440 ^{***}
	SR ^c	1296	1440 ^{**}
	AS ^c	1584	1728 ^{***}
48	SM	1152	1296 ^{**}
	GBA	1584	1728 [*]
	SR	1728	2208 ^{***}
	AS	1440	1584 [*]
72	SM	1152	1296 ^{***}
	GBA	0	1152 ^{***}
	SR	0	1152 ^{***}
	AS	0	1152 ^{***}
96	SM	1296	1440 ^{***}
	GBA	1152	1296 [*]
	SR	1296	1440 [*]
	AS	0	1152 [*]

^a Fish were exposed to 816, 1152, 1296, 1440, 1584, 1728, 2208, 2688, and 2880 mg/L of dicamba.

^b Results are expressed in mg/L.

^c SM, slowness in motion; GBA, gathering at the bottom of the aquarium; SR, slow reaction; AS, abnormal swimming.

* $P < 0.05$.

** $P < 0.01$.

*** $P < 0.001$; significant differences with respect to control values.

of herbicide assayed. When other nuclear abnormalities rather than MNs were analyzed, significant increased frequencies were observed only for treatments lasting 48 h. An increase in the frequency of NTs was observed in fish exposed to 410, 820, and 1229 mg/L dicamba present within the formulation Banvel® ($P < 0.001$, $P < 0.05$, and $P < 0.001$, respectively). In addition, only the treatment with 1229 mg/L of the herbicide showed an increased frequency of BNs ($P < 0.01$) and LBs ($P < 0.01$). On the other hand, herbicide treatments, regardless of concentration, did not modify the frequencies of BLs in regard to control values ($P > 0.05$). Finally, results revealed that, regardless of the concentration of the herbicide assayed, the frequency of other nuclear abnormalities rather than MNs in fish exposed to the herbicide for 96 h did not differ from that of negative controls ($P > 0.05$). However, a trend to an increased frequency of LBs was observed in fish exposed to 1229 mg/L of the herbicide, although not reaching statistical significance ($P > 0.05$) (Table 3).

Table 3
Frequencies (%) of MNs and other nuclear abnormalities in peripheral blood erythrocytes of *Cnesterodon decemmaculatus* exposed to the dicamba-based herbicide Banvel®.^a

Exposure time (h)	Concentration (mg/L)	No. of individuals analyzed	No. of cells analyzed	MNs ^b	Other nuclear abnormalities ^b			
					NTs	LBs	BNs	BLs
48	Control	15	22,599	0.09 ± 0.04	1.86 ± 0.34	0.04 ± 0.04	0.00 ± 0.00	1.77 ± 0.33
	Positive control ^c	15	22,632	0.44 ± 0.15 [*]	4.52 ± 0.81 [*]	0.09 ± 0.06	0.00 ± 0.00	4.07 ± 0.59
	410	15	23,032	0.09 ± 0.09	6.13 ± 0.98 ^{***}	0.18 ± 0.12	0.00 ± 0.00	3.10 ± 0.88
	820	15	23,132	0.22 ± 0.10	3.94 ± 0.92 [*]	0.17 ± 0.07	0.04 ± 0.04	3.54 ± 0.84
	1229	15	22,837	0.44 ± 0.14 [*]	8.43 ± 1.55 ^{***}	0.70 ± 0.28 ^{**}	0.35 ± 0.15 ^{**}	4.63 ± 1.30
96	Control	15	22,583	0.13 ± 0.07	2.96 ± 0.71	0.04 ± 0.04	0.00 ± 0.00	1.77 ± 0.44
	Positive control ^c	15	23,035	0.47 ± 0.16	8.24 ± 2.18	0.44 ± 0.16	0.13 ± 0.09	4.10 ± 1.09
	410	15	22,771	0.48 ± 0.22	7.00 ± 2.42	0.22 ± 0.18	0.04 ± 0.04	4.12 ± 1.21
	820	15	22,664	0.22 ± 0.08	4.35 ± 0.93	0.53 ± 0.23	0.00 ± 0.00	2.78 ± 0.77
	1229	14	22,731	0.13 ± 0.07	7.15 ± 1.87	0.81 ± 0.34	0.04 ± 0.04	3.56 ± 0.77

^a Results are expressed as mean number of abnormalities/1000 cells ± SE.

^b MNs, micronuclei; NTs, notched nuclei; LBs, lobed nuclei; BNs, binucleated nuclei; BLs, blebbed nuclei.

^c Ciclophosphamide (10 mg/L) was used as positive control.

* $P < 0.05$.

** $P < 0.01$.

*** $P < 0.001$; significant differences with respect to control values.

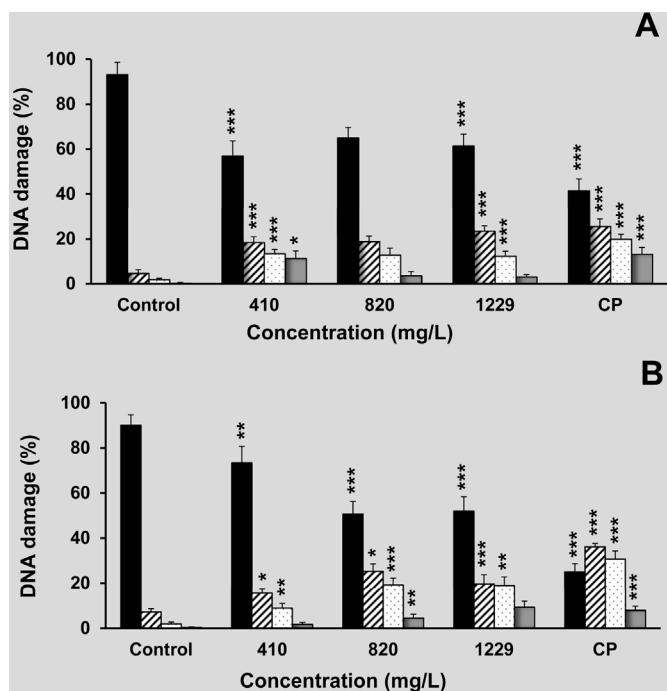


Fig. 1. The dicamba-based herbicide formulation Banvel®-induced DNA damage measured by single cell gel electrophoresis assay in circulating blood cells from *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae) exposed for 48 h (A) and 96 h (B). The frequencies of undamaged (type 0–I nucleoids; black bar), type II (stripped bar), type III (dotted bar), and type IV (gray bar) were determined by analyzing 100 nucleoids from each specimen. Results are presented as percentages of pooled data from three independent experiments. Negative (untreated fish) and positive controls (CP, 10 mg cyclophosphamide/L-treated fish) were conducted and run simultaneously with Banvel®-exposed fish. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; significant differences with respect to control values.

3.4. DNA damage

The results of the SCGE assay obtained for peripheral blood erythrocytes of *C. decemmaculatus* exposed for 48 and 96 h to the dicamba-based herbicide formulation Banvel® are presented in Table 4, and the mean frequencies of cells from each damage grade are depicted in Fig. 1. CP treatment (positive control) induced an enhancement of the GDI as well as in the frequency of damaged cells compared to negative controls in specimens exposed for

Table 4Analysis of DNA damage measured by comet assay in *Cnesterodon decemmaculatus* cells exposed to the dicamba-based herbicide Banvel®.

Chemicals	Concentration (mg/L)	Exposure time (h)	No. of individuals analyzed	No. of cells analyzed	% of damaged cells (II + III + IV)	GDI ± SE ^a
Negative control		48	13	1126	6.93	0.73 ± 0.08
		96	15	1607	9.89	0.67 ± 0.06
Banvel®	410	48	15	1531	43.04***	1.65 ± 0.15***
		96	15	1442	26.63**	1.23 ± 0.09***
	820	48	15	1631	35.07***	1.21 ± 0.14***
		96	15	1596	49.37***	1.60 ± 0.11***
	1229	48	15	1647	38.68***	1.28 ± 0.09***
		96	13	1345	48.03***	1.70 ± 0.14***
Positive control ^b	10	48	15	1528	58.57***	1.90 ± 0.12***
		96	15	1567	74.98***	2.14 ± 0.09***

^a GDI: genetic damage index.^b Cyclophosphamide (10 mg/L) was used as positive control.* $P < 0.05$.** $P < 0.01$.*** $P < 0.001$; significant differences with respect to negative control values.

both 48 and 96 h ($P < 0.001$) (Table 4, Fig. 1). In herbicide-exposed organisms, a significant increase of the GDI was observed in all treatments (410, 820, and 1229 mg/L) lasting for both 48 and 96 h ($P < 0.001$) (Table 4). In specimens exposed for 48 h, such alteration was due to an enhanced frequency of type II and III nucleoids ($P < 0.001$) and a concomitant decrease of type 0–I nucleoids ($P < 0.001$) (Fig. 1A). In addition, an increased frequency of type IV nucleoids in fish treated with 410 mg/L for 48 h was observed ($P < 0.05$) (Fig. 1A). The results demonstrate that the alteration in the GDI found in specimens treated for 96 h was due to an increase in the frequency of type II and III nucleoids within the 410–1229 mg/L concentration range ($0.05 > P < 0.001$) and a concomitant decrease of type 0–I nucleoids ($0.01 > P < 0.001$) (Fig. 1B). In addition, enhanced frequencies of type IV nucleoids ($P < 0.01$) were also observed in organisms treated with 810 and 1229 mg/L dicamba for 96 h (Fig. 1B). Overall, a regression analysis demonstrated that whereas the GDI varied as a function of the herbicide concentration assayed in fish treated for 96 h, since a significant dose-dependent increase in the GDI was observed ($r = -0.4018$, $P < 0.01$), no association was observed in specimens exposed for 48 h ($r = 0.1215$, $P > 0.05$).

4. Discussion

C. decemmaculatus (Jenyns, 1842) (Pisces, Poeciliidae), the ten spotted live-bearer fish, attains high densities in a large variety of water bodies within the whole La Plata River and other South American basins [34]. Several reports found this species suitable as a test organism in acute and chronic toxicity bioassays [26,35,36]. Recently we used *C. decemmaculatus* as a laboratory-exposed target species to evaluate the lethal and sublethal toxicity of several agrochemical commercial formulations used most widely for cereal and leguminous crop production as well as in garden control, not only in Argentina but also worldwide. Among them, two 48% chlorpyrifos-based insecticides (Lorsban 48E® and CPF Zamba®) [28], two 50% pirimicarb-based insecticides (Aficida® and Patton Flow®) [25,27], and two 48% glyphosate-based herbicides (Panzer® and Credit®) [29] were included. In all cases, whereas LC₅₀ estimation was employed as a biomarker for toxicity, induction of MNs and alterations in the erythrocyte/erythroblast frequencies were employed as biomarkers of genotoxicity and cytotoxicity, respectively. Furthermore, the induction of DNA single-strand breaks in peripheral blood cells of *C. decemmaculatus* exposed under laboratory conditions was also evaluated by the SCGE assay to further

characterize the genotoxic effects of the aforementioned pesticide technical formulations [30].

Regarding the acute lethal effects, the studied pesticide can be considered an herbicide that may cause long-term adverse effects on *C. decemmaculatus* in the aquatic environment (category IV, following the European Union directives) [47]. Furthermore, the acute lethality data of LC₅₀ values reported here for herbicide contribute new information for this type of effect for *C. decemmaculatus*. The herbicide increased the frequency of MNs in peripheral erythrocytes of fish when exposed for 48 h to the highest dose assayed (1229 mg/L). On the other hand, regardless of the concentration of the herbicide assayed, no alteration in the frequency of MNs was observed in fish exposed for 96 h. Furthermore, the herbicide was able to induce other nuclear abnormalities, i.e., BN cells and NT and LB nuclei, in fish only when exposed for 48 h. Besides, we observed that acute exposure to all dicamba concentrations within the 410–1229 mg/L range increased the frequencies of primary DNA lesions estimated by alkaline SCGE in those fish exposed both for 48 h and 96 h. Additionally, our data revealed that the SCGE assay was more sensitive than the MN test in detecting early DNA damage when the same herbicide concentrations were employed for fish exposure.

The variability in pesticide-induced toxicity to different fish species is a phenomenon known worldwide (for review, see [48] and references therein). If we compare the LC_{50 96 h} values reported here for dicamba with those from the literature for several fish species, *C. decemmaculatus* can be considered the least sensitive fish reported so far. Previous dicamba-induced fish lethality studies revealed LC_{50 96 h} values of 465 mg/L for the western mosquitofish (*Gambusia affinis*) [49], 180 mg/L for the sheepshead minnow (*Ciprinodon variegatus*) [50], 153 mg/L for the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [50], and as low as 50 mg/L for the cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*) [51]. Our results revealed a concentration of 1639 mg/L dicamba (range, 1471–1808) as the LC_{50 96 h} value for *C. decemmaculatus*. Previously reported maximum LC_{50 96 h} values for adult exposed specimens include 87.80 mg/L for ZnCl₂ [52], 21.40 mg/L for Cr(VI) [26], and 0.157 mg/L for CuSO₄ [53]. Similarly, pesticide-induced lethality analyses performed on *C. decemmaculatus* revealed LC_{50 96 h} values of 91.73 mg/L and 15.68 mg/L for the glyphosate-based herbicides Credit® and Panzer®, respectively [29]; 67.40 mg/L for the paraquat-based herbicide Osaquat® [54]; 0.03 mg/L and 0.21 mg/L for the chlorpyrifos-based insecticides Lorsban 48E® and CPF Zamba® [28], respectively; and, finally, values of 225.0 mg/L and 88.00 mg/L for the pirimicarb-based insecticides Aficida® [25] and Patton Flow® [27], respectively. Accordingly, it seems evident that

the herbicide dicamba is the least toxic emerging pollutant reported so far for *C. decemmaculatus*. Furthermore, it could be valid to suggest that the species seems to be more sensitive to pesticides belonging to the phosphoglycine, bipyridylum, organophosphate, and carbamate chemical groups than to chlorinated benzoic auxinic pesticides.

In our study, a dicamba-based herbicide containing only 57.71% of the active ingredient within the formulation, Banvel[®], was assayed, an aspect that should be considered further. It is well known that in agriculture, pesticides are usually applied in their formulated forms, where the active ingredient is combined with organic solvents and emulsifying and wetting agents, which affect the pesticide penetration and performance [55]. The additives may synergize or antagonize the toxicity of the active ingredient. Although additive compounds frequently comprise part of a commercial pesticide formulation, they are not usually included in any discussion of the effects on living organisms, and their adverse effects may exceed those of the active ingredient. Although pesticides are developed through very strict regulation processes to function with reasonable certainty and minimal impact on human health and the environment, serious concerns have been raised about health risks resulting from occupational exposure and from residues in food and drinking water [55]. Several investigations have demonstrated that the additive compounds present in pesticide commercial formulations have the ability to induce toxicity and cellular damage by themselves, separate from the active ingredient [56–59]. Hence, risk assessment must also consider additional toxic effects caused by the excipient(s). Unfortunately, the identities of the additive compounds present in the commercial herbicide formulation Banvel[®] were not made available to us by the manufacturers. It should be mentioned that according to the Argentinean administration, the excipients present in any agrochemical are not required to be listed on the agrochemical data sheet and can be kept as a “trade secret.” Years ago, the U.S. EPA [60] claimed that the acute toxicity of a technical active ingredient can differ significantly from that of the end-use formulation containing that active ingredient. Our results are in total agreement with this concept and pinpoint the necessity of further studies on *C. decemmaculatus* employing pure dicamba as test compound to reveal whether the observed jeopardizing effects we determined are specific to dicamba or result from the presence of xenobiotic(s) within the formulated technical formulation Banvel[®]. Previous reports on CHO-K1 cells *in vitro* employing, comparatively, the active ingredient dicamba as well as Banvel[®] demonstrated that although the dicamba-based commercial formulation mimics the genotoxic effect inflicted by dicamba, it contains within other xenobiotic agent(s) able to induce cytotoxicity and DNA damage by different mechanism(s) [21].

Genotoxicity in fish associated with pesticide exposure using the MN test in fish erythrocytes is well documented [23–25,27–29,31]. Furthermore, employing *C. decemmaculatus* as an experimental model, Vera-Candiotti et al. [25,27–29] demonstrated the induction of MNs after exposure to glyphosate-based herbicides and chlorpyrifos- and pirimicarb-based insecticides. Accordingly, our current results represent the first evidence of the acute genotoxic effects exerted by the dicamba-based commercial herbicide formulation Banvel[®] on *C. decemmaculatus* under laboratory conditions. The results reveal that only increased frequency of MNs was observed in those fish exposed to the highest concentration (1229 mg/L) of dicamba for 48 h but not in fish exposed to the herbicide for 96 h, regardless of the concentration of herbicide assayed. So far, we do not have any exact explanation for this finding. It could be suggested that concentrations lower than 1229 mg/L dicamba are not sufficient enough to exert genotoxic/cytotoxic damage leading to MN formation. Furthermore, the possibility of induction of a selective cell loss by herbicide-induced cell death

of the most damaged cells after treatment, leaving only a reduced proportion of undamaged cells capable of reaching the M1 status nearly after 96 h of exposure, cannot be ruled out. Whether the latter is true or not, the present results could confirm the importance of studying complete agrochemical formulations in toxicity screenings because the excipient(s) may have toxicological properties completely different from those of the active ingredients alone, and their impacts may be quite different, as demonstrated previously in different biotic matrices [57,58,61]. Finally, regardless of the aforementioned speculations, the present results highlight the genotoxic capability of the test compound under study and verify previous studies on vertebrate and plant cells when exposed to dicamba [14,19]. Finally, nuclear abnormalities other than MNs, *i.e.*, BNs and LB as well as BL nuclei, were also induced after the herbicide exposure for 48 h in those fish exposed within the 410–1229 mg/L concentration range. Previous reports demonstrated that these morphological nuclear abnormalities can be considered genetic damage indicators [22,62]. Our results agree well with these observations.

The SCGE test has become extensively valuable as a biomarker in fish to monitor contaminated areas (*in situ* assay) [63,64] as well as for screening xenobiotics after direct or indirect exposure (*in vivo* assay) [23,24,30]. We observed that, regardless of the length of treatment, dicamba acute exposure within the 410–1229 mg/L concentration range increased the frequency of primary DNA lesions estimated by alkaline SCGE, a result opposite that of the MN test. One possible explanation for this observation could be related to the different cellular status of the target cells that are included for analysis for each end point. Whereas DNA damage is estimated by SCGE in a heterogeneous circulating cell population, MNs are determined on proliferating cells with lesions that have lasted for at least one mitotic cell cycle and that probably retain their repair properties, as suggested elsewhere [42]. Furthermore, our current results represent the first *in vivo* evidence of the induction of primary DNA damage exerted by dicamba using the SCGE assay on piscine erythrocytes. Finally, our findings support the view that the SCGE assay is a highly sensitive method for the detection of DNA damage induced by environmental pollutants.

Although the *in vivo* dicamba treatments in this study covered a wide and high range of concentrations, the concentration range assayed represents a relatively high end of the threshold values of up to 13 µg/L and even 1×10^{-5} µg/L dicamba found in stream and ground waters, respectively (<http://www.chem-online.org/agrochemical/dicamba.htm>), even considering that the recommended application rates to foliage or soil range from approximately 50 to 320 g dicamba/ha [65], or as high as 1500 cm³/hl reported for Argentina [66]. Thus, the concentrations of dicamba employed in this investigation would be expected to be almost improbable in the environment, perhaps only observed when specific events or circumstances occurred (*e.g.*, direct application, in drainage ditches, or by accidental discharge). Although, we cannot rule out that piscine populations, and also occupationally exposed human workers, could be exposed accidentally to these agrochemicals at this range of concentration.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

This study was supported by grants from the National University of La Plata (Grants 11/N699 and 11/N746) and the National Council for Scientific and Technological Research (CONICET, PIP N° 0344) from Argentina.

References

- [1] M.L. Larramendy, S. Soloneski, in: M.L. Larramendy, S. Soloneski (Eds.), *Integrated Pest Management and Pest Control – Current and Future Tactics*, InTech, Rijeka, Croatia, 2012, p. 668.
- [2] WHO–FAO, *Pesticides Residues in Food*, FAO Plant Production and Protection Paper, World Health Organization and Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2009, pp. 1–426.
- [3] Y. Jiang, D. Swale, P.R. Carlier, J.A. Hartsel, M. Ma, F. Ekström, J.R. Bloomquist, Evaluation of novel carbamate insecticides for neurotoxicity to non-target species, *Pestic. Biochem. Physiol.* 106 (2013) 156–161.
- [4] B.B. Fischer, F. Pomati, R.I.L. Eggen, The toxicity of chemical pollutants in dynamic natural systems: the challenge of integrating environmental factors and biological complexity, *Sci. Total Environ.* 449 (2013) 253–259.
- [5] J.L. Garraway, R.L. Wain, The design of auxin-type herbicides, in: E.J. Ariën (Ed.), *Drug Design*, Academic Press, New York, 1976, pp. 115–164.
- [6] USEPA, *Dicamba Technical Fact Sheet*, USEPA, 1983, pp. 10–26 www.epa.gov/pesticides/about#what_pesticide
- [7] USEPA, *Reregistration Eligibility Decision for Dicamba and Associated Salts*, USEPA, 2003, www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/dicamba_red.pdf
- [8] FAO, *Integrated Pest Management (IPM)*, 2001 <http://www.fao.org/ag/agp/agpp/ipm/>
- [9] M.B. Woudneh, M. Sekela, T. Tuominen, M. Gledhill, Acidic herbicides in surface waters of Lower Fraser Valley, British Columbia, Canada, *J. Chromatogr. A* 1139 (2007) 121–129.
- [10] D.B. Donald, A.J. Cessna, E. Sverko, N.E. Glozier, Pesticides in surface drinking-water supplies of the northern Great Plains, *Environ. Health Perspect.* 115 (2007) 1183–1191.
- [11] D. Bushek, M. Heidenreich, D. Porte, The effects of several common anthropogenic contaminants on proliferation of the parasitic oyster pathogen *Perkinsus marinus*, *Mar. Environ. Res.* 64 (2007) 535–540.
- [12] P. Perocco, G. Ancora, P. Rani, A.M. Valenti, M. Mazzullo, A. Colacci, S. Grilli, Evaluation of genotoxic effects of the herbicide dicamba using *in vivo* and *in vitro* test systems, *Environ. Mol. Mutagen.* 15 (1990) 131–135.
- [13] J. Filkowski, J. Besplug, P. Burke, I. Kovalchuk, O. Kovalchuk, Genotoxicity of 2,4-d and dicamba revealed by transgenic *Arabidopsis thaliana* plants harboring recombination and point mutation markers, *Mutat. Res.* 542 (2003) 23–32.
- [14] K.B. Mohammed, T.H. Ma, *Tradescantia*-micronucleus and -stamen hair mutation assays on genotoxicity of the gaseous and liquid forms of pesticides, *Mutat. Res.* 426 (1999) 193–199.
- [15] M.J. Plewa, E.D. Wagner, G.J. Gentile, J.M. Gentile, An evaluation of the genotoxic properties of herbicides following plant and animal activation, *Mutat. Res.* 136 (1984) 233–245.
- [16] K.C. Sorensen, J.W. Stucki, R.E. Warner, E.D. Wagner, M.J. Plewa, Modulation of the genotoxicity of pesticides reacted with redox-modified smectite clay, *Environ. Mol. Mutagen.* 46 (2005) 174–181.
- [17] N.V. González, S. Soloneski, M.L. Larramendy, Genotoxicity analysis of the phenoxy herbicide dicamba in mammalian cells *in vitro*, *Toxicol. In Vitro* 20 (2006) 1481–1487.
- [18] N.V. González, S. Soloneski, M.L. Larramendy, The chlorophenoxy herbicide dicamba and its commercial formulation banvel induce genotoxicity in Chinese hamster ovary cells, *Mutat. Res.* 634 (2007) 60–68.
- [19] N.V. González, N. Nikoloff, S. Soloneski, L.M.L. A combination of the cytokinesis-block micronucleus cyto assay and centromeric identification for evaluation of the genotoxicity of dicamba, *Toxicol. Lett.* 207 (2011) 204–212.
- [20] K. Grossmann, J. Kwiatkowski, S. Tresch, Auxin herbicides induce H(2)O(2) overproduction and tissue damage in cleavers (*Galium aparine* L.), *J. Exp. Bot.* 52 (2001) 1811–1816.
- [21] N.V. González, S. Soloneski, M.L. Larramendy, Dicamba-induced genotoxicity of Chinese hamster ovary (CHO) cells is prevented by vitamin E, *J. Hazard. Mater.* 163 (2009) 337–343.
- [22] T. Cavaş, S. Ergene-Gözükara, Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents, *Aquat. Toxicol.* 74 (2005) 264–271.
- [23] D.G. Cavalcante, C.B. Martinez, S.H. Sofia, Genotoxic effects of Roundup on the fish *Prochilodus lineatus*, *Mutat. Res.* 655 (2008) 41–46.
- [24] D. Ali, N.S. Nagpure, S. Kumar, R. Kumar, B. Kushwaha, W.S. Lakra, Assessment of genotoxic and mutagenic effects of chlorpyrifos in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis, *Food Chem. Toxicol.* 47 (2009) 650–656.
- [25] J. Vera-Candioti, S. Soloneski, M.L. Larramendy, Genotoxic and cytotoxic effects of the formulated insecticide Aficida® on *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Pisces: Poeciliidae), *Mutat. Res.* 703 (2010) 180–186.
- [26] J. Vera-Candioti, S. Soloneski, M.L. Larramendy, Acute toxicity of chromium on *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces: Poeciliidae), *Theoria* 20 (2011) 85–93.
- [27] J. Vera-Candioti, S. Soloneski, M.L. Larramendy, Pirimicarb-based formulation-induced genotoxicity and cytotoxicity on the fresh water fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Pisces, Poeciliidae), *Toxicol. Ind. Health* (2013) (in press).
- [28] J. Vera-Candioti, S. Soloneski, M.L. Larramendy, Chlorpyrifos-based insecticides induced genotoxic and cytotoxic effects in the ten spotted live-bearer fish, *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842), *Environ. Toxicol.* (2013) (in press).
- [29] J. Vera-Candioti, S. Soloneski, M.L. Larramendy, Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of glyphosate-based herbicides in the ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842), *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 89 (2013) 166–173.
- [30] J. Vera-Candioti, S. Soloneski, M.L. Larramendy, Single-cell gel electrophoresis assay in the ten spotted live-bearer fish, *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842), as bioassay for agrochemical-induced genotoxicity, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 98 (2013) 368–373.
- [31] T. Cavaş, *In vivo* genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay, *Food Chem. Toxicol.* 49 (2011) 1431–1435.
- [32] T. Cavaş, *In vivo* genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: micronucleus test on acridine orange stained fish cells, *Food Chem. Toxicol.* 46 (2008) 352–358.
- [33] E.T. Furlong, B.D. Anderson, S.L. Werner, P.P. Soliven, L.J. Coffey, M.R. Burkhardt, Methods of analysis by the U.S. Geological Survey National Water Quality Laboratory – Determination of liquid chromatography/mass spectrometry U.S. Geological Survey Water Resources Investigations Report 01–4134, 2011, 73 pp.
- [34] R.C. Menni, S.E. Gómez, F. López Armengol, Subtle relationships: freshwater fishes and the chemistry of water in southern South America, *Hydrobiologia* 328 (1996) 173–197.
- [35] F.R. de la Torre, A. Salibián, L. Ferrari, Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish, *Chemosphere* 68 (2007) 1582–1590.
- [36] W.D. Di Marzio, M. Sáenz, J. Alberdi, M. Tortorelli, S. Galassi, Risk assessment of domestic and industrial effluents unloaded into a freshwater environment, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61 (2005) 380–391.
- [37] USEPA, *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*, fifth ed., USEPA, 2002, 821-R-02-012.
- [38] USEPA, *Methods for Acute Toxicity Tests with Fish, Macroinvertebrates, and Amphibians*, USEPA, 1975, pp. 62, 660/3-75-009.
- [39] R. Sarikaya, M. Yilmaz, Investigation of acute toxicity and the effect of 2,4-d (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) herbicide on the behavior of the common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758; Pisces, Cyprinidae), *Chemosphere* 52 (2003) 195–201.
- [40] ASIH, *Guidelines for Use of Live Amphibians and Reptiles in Field and Laboratory Research*, Herpetological Animal Care and Use Committee of the ASIH, Washington, DC, 2004.
- [41] I. Strunjak-Perovic, R. Coz-Rakovac, N. Topic Popovic, M. Jadan, Seasonality of nuclear abnormalities in gilthead sea bream *Sparus aurata* (L.) erythrocytes, *Fish Physiol. Biochem.* 35 (2009) 287–291.
- [42] N. Nikoloff, G.S. Natale, D. Marino, S. Soloneski, M. Larramendy, Flurochloridone-based herbicides induced genotoxicity effects on *Rhinella arenarum* tadpoles (Anura: Bufonidae), *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 100 (2014) 275–281.
- [43] N.P. Singh, Microgel electrophoresis of DNA from individual cells: principles and methodology, in: G.P. Pfeifer (Ed.), *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations*, Plenum Press, New York, 1996, pp. 3–24.
- [44] T. Cavaş, S. Könen, 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 (2007) 263–268.
- [45] M. Pitarque, A. Vaglenov, M. Nosko, A. Hirvonen, H. Norppa, A. Creus, R. Marcos, Evaluation of DNA damage by the Comet assay in shoe workers exposed to toluene and other organic solvents, *Mutat. Res.* 441 (1999) 115–127.
- [46] D.J. Finney, *Probit Analysis*, Cambridge Univ. Press, London, 1971.
- [47] P. Mazzatorta, E. Benfenati, D. Neagu, G. Gini, The importance of scaling in data mining for toxicity prediction, *J. Chem. Inf. Model.* 42 (2002) 1250–1255.
- [48] K.B. Tierney, A.P. Farrell, C.J. Brauner, *Fish Physiology. Organic Chemical Toxicology of Fishes*, Elsevier Inc., New York, 2013.
- [49] C.R. Johnson, Herbicide toxicities in the Mosquito fish, *Gambusia affinis*, *Proc. R. Soc. Queens.* 89 (1978) 25–27.
- [50] USEPA, *Pesticide Ecotoxicity Database* (Formerly: Environmental Effects Database (EEDB)), United States Environmental Protection Agency and Office of Pesticide Programs, Washington, DC, 2013.
- [51] D.F. Woodward, Acute toxicity of mixtures of range management herbicides to Cutthroat trout, *J. Range Manag.* 35 (1982) 539–540.
- [52] S. Gómez, C. Villar, C. Bonetto, Zinc toxicity in the fish *Cnesterodon decemmaculatus* in the Paraná River and Río de La Plata estuary, *Environ. Pollut.* 99 (1998) 159–165.
- [53] C.A. Villar, S.E. Gómez, C.A. Bentos, Lethal concentration of Cu in the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Cyprinodontiformes), *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 65 (2000) 465–469.
- [54] W.D. Di Marzio, J.L. Alberdi, M.E. Sáenz, M.D.C. Tortorelli, Effects of paraquat (Osaquat® formulation) on survival and total cholinesterase activity in male and female adults of *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae), *Environ. Toxicol. Water Qual.* 13 (1998) 55–59.
- [55] WHO, *Public Health Impacts of Pesticides Used in Agriculture* (WHO in Collaboration with the United Nations Environment Programme, Geneva, 1990), World Health Organization, 1990.
- [56] R.M. Mann, J.R. Bidwell, The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36 (1999) 193–199.
- [57] S. Soloneski, M.L. Larramendy, Sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells treated with insecticide pirimicarb, *J. Hazard. Mater.* 174 (2010) 410–415.

- [58] N. Nikoloff, M.L. Larramendy, S. Soloneski, Comparative evaluation of the in vitro micronucleus and comet assay for evaluation of fluorochloridone-induced genotoxicity, *Environ. Toxicol.* 29 (2014) 884–892.
- [59] G. Molinari, M. Kujawski, A. Scuto, S. Soloneski, M.L. Larramendy, DNA damage kinetics and apoptosis in ivermectin-treated Chinese hamster ovary cells, *J. Appl. Toxicol.* 33 (2013) 1260–1267.
- [60] USEPA, Pesticide Assessment Guidelines Subdivision E. Hazard Evaluation: Wildlife and Aquatic Organisms, United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, 1982, EPA-540/9-82-024.
- [61] C. Cox, M. Surgan, Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health, *Environ. Health Perspect.* 114 (2006) 1803–1806.
- [62] F.D. Gökalp Muranlı, U. Güner, Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin, *Mutat. Res.* 726 (2011) 104–108.
- [63] R.R. Otter, J. Meier, K.M. Kubach, J.M. Lazorchak, S.J. Klaine, The effects of urbanization on *Lepomis macrochirus* using the comet assay, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 84 (2012) 299–303.
- [64] J.S. Barbosa, T.M. Cabral, D.N. Ferreira, L.F. Agnez-Lima, S.R. Batistuzzo de Medeiros, Genotoxicity assessment in aquatic environment impacted by the presence of heavy metals, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73 (2010) 320–325.
- [65] PMRA – Pest Management Regulatory Agency, Electronic Dossier, Delivery, and Evaluation System (EDDE): Electronic Levels: Search and Evaluation (ELSE), 2005.
- [66] CASAFE, Guía de Productos Fitosanitarios para la Republica Argentina, 14th ed., Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes, Buenos Aires, 2011.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Ecotoxicology and Environmental Safety

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecoenv

Toxic and genotoxic effects of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-based herbicide on the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*

C. Ruiz de Arcaute^{a,b}, S. Soloneski^{a,b}, M.L. Larramendy^{a,b,*}^a Cátedra de Citología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Calle 64 N° 3, B1904AMA, La Plata, Argentina^b Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 December 2015

Received in revised form

24 February 2016

Accepted 25 February 2016

Available online 4 March 2016

Keywords:

Agrochemicals

Behavioral changes

Lethality

Micronuclei

SCGE assay

Sublethal effects

ABSTRACT

Acute toxicity and genotoxicity of the 54.8% 2,4-D-based commercial herbicide DMA[®] were assayed on *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). Whereas lethal effect was used as the end point for mortality, frequency of micronuclei (MNs), other nuclear abnormalities and primary DNA damage evaluated by the single cell gel electrophoresis (SCGE) assay were employed as end points for genotoxicity. Mortality studies demonstrated an LC_{50 96 h} value of 1008 mg/L (range, 929–1070) of 2,4-D. Behavioral changes, e.g., gathering at the bottom of the aquarium, slowness in motion, slow reaction and abnormal swimming were observed. Exposure to 2,4-D within the 252–756 mg/L range increased the frequency of MNs in fish exposed for both 48 and 96 h. Whereas blebbed nuclei were induced in treatments lasting for 48 and 96 h, notched nuclei were only induced in fish exposed for 96 h. Regardless of both concentration and exposure time, 2,4-D did not induce lobed nuclei and binucleated erythrocytes. In addition, we found that exposure to 2,4-D within the 252–756 mg/L range increased the genetic damage index in treatments lasting for either 48 and 96 h. The results represent the first experimental evidence of the lethal and several sublethal effects, including behavioral alterations and two genotoxic properties namely the induction of MNs and primary DNA strand breaks, exerted by 2,4-D on an endemic organism as *C. decemmaculatus*.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

It has been estimated that less than 0.1 percent of pesticides applied worldwide into crops reaches their specific targets, leaving large amount of toxic residues free to move into different environmental compartments (Pimentel et al., 1993; WHO, 1990, 2009). Pesticides are able to contaminate soil and air, as well as surface and ground water, affecting also non-target organisms such as aquatic biota, plants, mammals and soil microorganisms, among others (Liang et al., 2013; Meffe and de Bustamante, 2014). Living species are inevitably exposed to pesticides, including agrochemicals, and they represent both a significant ecological

Abbreviations: AS, Abnormal swimming; BL, Blebbed nuclei; BN, Binucleated erythrocyte; CP, Cyclophosphamide; GBA, Gathering at the bottom of the aquarium; GDI, Genetic damage index; LC₅₀, Lethal concentration 50; LB, Lobed nuclei; LOEC, Lowest observed effect concentration; MN, Micronucleus; NOEC, No observed effect concentration; NT, Notched nuclei; SCGE, Single cell gel electrophoresis; SM, Slowness in motion; SR, Slow reaction

* Corresponding author at: Cátedra de Citología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Calle 64 Nro. 3 (esq. 120), B1904AMA, La Plata, Argentina.

E-mail address: marcelo.larramendy@gmail.com (M.L. Larramendy).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.02.027>

0147-6513/© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

and public health concern. Furthermore, pesticides are hazardous to the environment due to their persistence, bioaccumulation and toxicity. Unfortunately, it is difficult to decrease the use of these agrochemicals without reducing crop yields (McLaughlin and Kinzelbach, 2015). In this sense, according to FAO (2006), the global agricultural production is growing and it must increase more than 70% by 2050.

2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, also commonly known as 2,4-D, is a widely employed pre- and post-emergence systemic herbicide belonging to the phenoxyalkanoic acid (or phenoxyacetic) family of herbicides. It was the first synthetic herbicide to be commercially developed and has commonly been employed worldwide for almost 70 years for the selective control of broad-leaf weeds and plants in agriculture, forestry, right-of-way (e.g., roadside, rail track, and power line), lawn/turf, and aquatic weed control (www.pan-uk.org/pestnews/Actives/24d_pn65.htm). Whereas at low concentrations the main function of 2,4-D is to mimic natural auxins to promote cell division and elongation, at high concentrations functions as a herbicide controlling broad-leaf growth. It selectively kills dicots without affecting monocots mimicking natural auxin at the molecular level (Grossmann, 2003). Physiological responses of dicots sensitive to auxinic

herbicides include abnormal growth, senescence, and plant death (Grossmann, 2003). The identification of auxin receptors, auxin transport carriers, transcription factors response to auxin, and cross-talk among phytohormones provided new insights on the molecular action mode of 2,4-D as a herbicide (Song, 2014). However, the underlying molecular mechanism of how auxinic herbicides selectively kill dicots and spare monocots is not understood yet (Song, 2014). 2,4-D has been classified, on the basis of its acute toxicity, as a class II member (moderately hazardous) by WHO (<http://www.who.int/ipcs/publications/pesticideshazard/en/>) and slightly to moderately toxic (category II–III) by U.S. EPA (1974). Furthermore, based on mechanistic studies, the International Agency for Research on Cancer (IARC) classified 2,4-D as a possibly carcinogenic agent to humans (Group 2B) (IARC, 2015).

Fish, an integral part of aquatic biota are organisms sensitive to any change in the environment. Several studies have demonstrated that these vertebrates can be used as valid indicator species for environmental monitoring (Annabi et al., 2015; Benitez et al., 2014; Greene et al., 2015; Schlenk et al., 2012). The capability of fish to efficiently metabolize and accumulate chemical pollutants is well documented (Cavalcante et al., 2008; Lazartigues et al., 2013; Zhao et al., 2014). In recent decades, fish populations have been reported to suffer a significant decline worldwide, a phenomenon in most cases committed to pollution of both natural and agricultural areas with the use of pesticides. Although environmental pollution might interfere with normal fish growth, development and susceptibility to disease, the induction of genetic damage into DNA after acute and chronic exposure to agrochemicals is ended the most relevant jeopardizing effect (Benitez et al., 2014; King et al., 2013; Ogada, 2014; Schlenk et al., 2012; Tierney et al., 2010). Furthermore, a positive correlation between the decline of fish population and the use of agrochemicals has been reported (Ogada, 2014; Tierney et al., 2010).

Fish represent important aquatic vertebrates as reliable environmental lethality, cytotoxicity, and genotoxicity bioindicator organisms due to both their role in the trophic chain and their sensitivity to low concentrations of emerging pollutants (McKenzie et al., 2007). The micronucleus (MN) as well as the single cell gel electrophoresis (SCGE) end points, due to their sensitivity, reliability, and the simplicity of use, has become widely used in piscine erythrocytes to assess the genotoxicity of many xenobiotics, including pesticides. Furthermore, genotoxicity in fish associated with pesticide exposure analyzed using both the MN and the SCGE bioassays in peripheral circulating erythrocytes is well documented (Ali et al., 2009; Cavalcante et al., 2008; Cavaş, 2011; Cavaş and Könen, 2008; Ruiz de Arcaute et al., 2014; Vera-Candiotti et al., 2010, 2011, 2013a, 2013b, 2013c, 2015).

Cnesterodon decemmaculatus (Jenyns, 1842) (Pisces, Poeciliidae) is an endemic member of the fish family Poeciliidae with an extensive distribution in Neotropical America attaining high densities in a large variety of water bodies within the whole La Plata River and other South American basins. The species is easy to handle and acclimate to laboratory conditions. Ranges of tolerance of *C. decemmaculatus* to many environmental parameters, e.g., temperature, salinity, and pH, are comparatively large, requested conditions for toxicity testing (Menni et al., 1996).

Previous studies have highlighted that *C. decemmaculatus* can be considered suitable test aquatic vertebrate model in the risk assessment of lethal and sublethal effects exerted by several agrochemicals. Among them, the insecticides pirimicarb (Vera-Candiotti et al., 2010, 2013c, 2015), endosulfan (Mugni et al., 2012b), cypermethrin (Carriquiriborde et al., 2007; Mugni et al., 2012b), chlorpyrifos (Mugni et al., 2012a, 2012b; Vera-Candiotti et al., 2013a, 2013c) and paraquat (Di Marzio et al., 1998; Di Marzio and Tortorelli, 1994) as well as the herbicides glyphosate (Carriquiriborde et al., 2007; Menendez-Helman et al., 2012; Vera-

Candiotti et al., 2013b, 2013c), and dicamba (Ruiz de Arcaute et al., 2014) are included. To the best of our knowledge, no further reports have been published analyzing the relationship between other pesticide exposure and risk assessment in the species, particularly 2,4-D exposition.

The aim of the present study is to characterize the acute toxicity of the 2,4-D-based herbicide formulation DMA[®] (54.8% 2,4-D) on the native molly *C. decemmaculatus* exposed under laboratory conditions using a static acute experimental method. A lethal effect was used as the end point for mortality, whereas frequency of MNs and other nuclear abnormalities as well as DNA single-strand breaks evaluated by the SCGE were employed as end points for genotoxicity. Our current results represent the first experimental evidence of the lethal and several sublethal effects, including behavioral alterations and two genotoxic properties namely the induction of MNs and primary DNA strand breaks, exerted by the auxinic herbicide 2,4-D on an endemic organism as *C. decemmaculatus*.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid, CAS 94-75-7) commercial-grade trade formulation DMA[®] (58.4% 2,4-D) was kindly provided by Dow AgroSciences Argentina S.A. (Buenos Aires, Argentina). K₂Cr₂O₇ [Cr_(VI)] (CAS 7778-50-9) was obtained from Merck KGaA (Darmstadt, Germany) whereas cyclophosphamide (CP, CAS 6055-19-2). All other chemicals and solvents of analytical grade were purchased from Sigma-Aldrich Co.

2.2. Quality control

Determination of the concentration levels of 2,4-D in the test solutions was performed by QV Chem Laboratory (La Plata, Buenos Aires, Argentina) according to U.S. Geological Survey Report 01-4134 (Furlong et al., 2011). 2,4-D levels were analyzed by high performance liquid chromatography using an ultraviolet detector. Active ingredient samples from test solution (100, 250 and 400 mg/L) correspond to values obtained immediately after preparation (0 h) and 24 h thereafter. The detection limit for 2,4-D was 0.5 mg/L. Concentrations assessed throughout the study represent the nominal concentrations of active ingredient present within the 2,4-D-based formulation DMA[®].

2.3. Test organisms

Specimens were collected from a permanent pond away from agricultural areas, in the vicinity of La Plata city (Buenos Aires Province, Argentina). Adults were transported to the laboratory and then acclimatized for at least 20 days to 16/8 h light/dark cycle in aquaria at 20 ± 1 °C with dechlorinated tap water (pH 7.55 ± 0.1; dissolved oxygen, 6.3 ± 0.3 mg/L; ammonium (NH₄⁺) < 0.2 mg/L; hardness, 143 ± 23.5 mg CaCO₃/L) with artificial aeration and an *ad libitum* daily supply of commercially available fish food (TetraMin[®], TetraWerke, Melle, Germany) until the beginning of the experimental procedures. Individuals were cared according to SENASA (Argentinean National Service for Sanitary and Quality of Agriculture and Food) guidelines 617/2002 for biological testing (SENASA, 2013).

2.4. Determination of LC₅₀

Bioassays were carried out for toxicity assessment following recommendations proposed by the U.S. EPA standardized methods

for acute piscine toxicity testing (IRAM, 2008; USEPA, 1975, 2002) with minor modifications reported previously (Ruiz de Arcaute et al., 2014; Vera-Candioti et al., 2013c). The average body weight of the specimens used throughout the experiments was 0.20 ± 0.1 g, and the mean body length was 25.5 ± 2.2 mm. For each experimental point, 10 randomly selected specimens were maintained in a 1 L glass container according to recommendations reported elsewhere (Mugni et al., 2016; Ruiz de Arcaute et al., 2014; Vera-Candioti et al., 2010, 2013a, 2013b, 2013c, 2015). To determine the concentrations used in the acute toxicity tests, preliminary assays were performed according to the recommendations proposed by the U.S. USEPA (2002). Then, test organisms were exposed to ten different concentrations of 2,4-D (100, 250, 400, 800, 1100, 1200, 1300, 1400, 1600 and 2200 mg/L) for 96 h. Negative (dechlorinated tap water, pH 7.55 ± 0.1 ; dissolved oxygen, 6.3 ± 0.3 mg/L; $\text{NH}_4^+ < 0.2$ mg/L; hardness, 143 ± 23.5 mg CaCO_3/L) and positive controls (21.4 mg/L $\text{Cr}_{(\text{VI})}$ -treated fish) (Vera-Candioti et al., 2013c) were conducted and run simultaneously with DMA[®]-exposed fish. All test solutions were prepared immediately before use and replaced completely every 24 h. Fish were not fed throughout the experiment. Experiments were performed in triplicate and run simultaneously for each experimental point. A lethal (mortality) effect was determined every 24 h in three independent experiments run simultaneously for each experimental point.

2.5. Sublethal end points

2.5.1. Behavioral changes

Behavioral changes of the fish subjected to various concentrations of DMA[®] and those of non-exposed fish were monitored and registered every 24 h before the application of DMA[®] test solutions in those fish employed for determining LC₅₀ values (Section 2.4). Changes were registered after gently swirling the water five times with a glass rod and observing for 1 min the swimming activity of each organism. Optomotor responses were classified following the criteria reported elsewhere (Sarıkaya and Yılmaz, 2003; Yılmaz et al., 2004). Briefly, responses were classified as slow motion (SM), when the motility of fish become extremely slow; gathering at the bottom of the aquarium (GBA), when individuals congregate in the lower part of the water column; slow reaction (SR), when the response to stimulus decay; and abnormal swimming (AS), when the swimming ability of the individuals was decreased or erratic. The prevalence of a type of abnormality was calculated by dividing the number of individuals with the particular abnormality by the number of individuals examined.

2.5.2. Micronuclei and other erythrocytic nuclear abnormalities

MN assay was performed on peripheral circulating blood erythrocytes according to the procedure described previously (Ruiz de Arcaute et al., 2014; Vera-Candioti et al., 2013c). Experiments were performed following the same experimental conditions described in Section 2.4. For each experimental point, 5 randomly selected specimens were maintained in a 1 L glass container and exposed to three different concentrations of DMA[®] equivalent to 25%, 50%, and 75% of the corresponding LC₅₀ 96 h value. To achieve these concentrations, specimens were exposed to 252, 504, and 756 mg/L of 2,4-D, respectively. Negative (dechlorinated tap water, see Section 2.4) and positive (10 mg/L CP) controls were conducted and run simultaneously with DMA[®]-exposed fish. Experiments were performed in triplicate and run simultaneously for each experimental point. All test solutions were prepared immediately before each experiment. The frequency of MNs was determined in peripheral mature erythrocytes at 48 and 96 h after the initial treatment following recommendations reported elsewhere for piscine micronuclei bioassay (Cavaş and Ergene-Gözükara, 2005;

de Lemos et al., 2008; Ruiz de Arcaute et al., 2014; Vera-Candioti et al., 2010, 2013a, 2013b). At the end of each experiment, hypothermia, a non-chemical anesthetic method was performed by immersion of fish in ice water (Ackerman et al., 2005; Summerfelt and Smith, 1990), and then, blood samples were obtained by sectioning behind the operculum according to recommendations reported elsewhere (Ruiz de Arcaute et al., 2014; Vera-Candioti et al., 2010, 2013a, 2013b, 2013c, 2015). Peripheral blood smears were performed for each animal onto clean slides, air dried, fixed with 100% (v/v) cold methanol (4 °C) for 20 min, and then stained with 5% Giemsa solution for 12 min. Slides were coded and blind-scored by one researcher at 1000× magnification. Data are expressed as the total number of MNs per 1,000 cells, as suggested previously (Vera-Candioti et al., 2010). MN frequency was determined following the examination criteria reported previously (Fenech, 2007; Vera-Candioti et al., 2010). The criteria employed in identifying MNs were as follows: a diameter smaller than 1/3 of that of the main nuclei, nonrefractibility, the same staining intensity as or staining intensity lighter than that of the main nuclei, no connection or link with the main nuclei, no overlapping with the main nuclei, MN boundary distinguishable from the main nuclei boundary, and no more than four MNs associated with the nuclei.

Other erythrocytic nuclear abnormalities were blind-scored from 1000 erythrocytes per experimental point from each experiment at 1000× magnification. Examination criteria followed those established previously (Cavaş and Ergene-Gözükara, 2003; Nikoloff et al., 2014; Strunjak-Perovic et al., 2009). Briefly, cells with two nuclei were considered binucleated cells (BNs), whereas cells with one nucleus presenting a relatively small evagination of the nuclear membrane containing euchromatin were classified as blebbed nuclei (BLs). Nuclei with evaginations of the nuclear membrane larger than that of a BL, which could have several lobes, were considered lobed nuclei (LBs). Finally, nuclei with vacuoles and appreciable depth into a nucleus without containing nuclear material were recorded as notched nuclei (NTs).

2.5.3. Single cell gel electrophoresis assay

Specimens exposed for MN assay (see Section 2.5.2) were also employed for SCGE assay. The SCGE assay was performed following the alkaline procedure described by Singh (1996) with minor modifications reported elsewhere (Nikoloff et al., 2014; Ruiz de Arcaute et al., 2014). Blood samples were diluted with 1 ml phosphate-buffered saline. An aliquot of 30 µL of the diluted samples was mixed with 70 µL 0.5% low-melting-point agarose and was then layered on a slide precoated with 100 µL 0.5% normal-melting-point agarose. The slide was covered with a coverslip and placed at 4 °C for 10 min. After solidification, the coverslip was removed, and the slide was covered with a third layer of 50 µL 0.5% low-melting-point agarose. After solidification, the coverslip was removed, and slides were immersed in ice-cold freshly prepared lysis solution (1% sodium sarcocinate, 2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris, pH 10.0, 1% Triton X-100, 10% DMSO) and then lysed at darkness for 1 h period (4 °C). Then, slides were placed in an electrophoresis buffer (1 mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH) for 25 min at 4 °C to allow the cellular DNA to unwind, followed by electrophoresis in the same buffer and temperature for 30 min at 25 V and 250 mA (0.8 V/cm). Finally, the slides were neutralized with a solution comprising 0.4 M Tris-HCl, pH 7.5, stained with 4',6-diamino-2-phenylindole (DAPI; Vectashield mounting medium H1200; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Slides were examined under an Olympus BX50 fluorescence photomicroscope equipped with an appropriate filter combination. The extent of DNA damage was quantified by the length of DNA migration, which was visually determined in 100 randomly selected and nonoverlapping nucleoids. DNA damage was

classified in five classes (0–I, undamaged; II, minimum damage; III, medium damage; IV, maximum damage), as suggested previously (Cavaş and Könen, 2007). Data are expressed as the mean number of damaged nucleoids (sum of Classes II, III, and IV) and the mean comet score for each treatment group. The genetic damage index (GDI) was calculated for each test compound following Pitarque et al. (1999) using the formula $GDI = [1(I) + 2(II) + 3(III) + 4(IV)]/N$ (0–IV), where 0–IV represents the nucleoid type, and N_0 – N_{IV} represents the total number of nucleoid scored.

2.6. Statistical analysis

A *t*-test was performed for comparisons in chemical analyses. Mortality data were analyzed using the U.S. EPA Probit Analysis statistical software, version 1.5 (<http://www.epa.gov/nerleerd/stat2.htm>), based on Finney (1971) method. The results were analyzed using the Statistica 7.0. software. The proportion of individuals affected per test chamber ($n=10$) was calculated for lethal and sublethal end points (mortality, behavior, MNs, BNs, BLs, LBs, NTs, damaged nucleoids and GDI). Each proportion was angular transformed and a one-way ANOVA with Dunnett's test was performed, whereas a one-way ANOVA with Tukey's test was performed for comparison between negative and solvent control data. ANOVA assumptions were corroborated with Barlett's test for homogeneity of variances and a χ^2 test for normality. In cases which did not perform the assumptions of normality was made a Kruskal–Wallis test. No observed effect concentration (NOEC) and lowest observed effect concentration (LOEC) values were estimated for behavioral end points. The relationships between concentration and GDI and MN data were evaluated by simple linear regression and correlation analyses. Concentration–response (C–R) curves at 96 h were estimated with their 95% confidence limits. Regression and correlation coefficients were calculated for each C–R curve. Tests of the significance of the regressions and correlation coefficients were performed. The level of significance chosen was 0.05 unless indicated otherwise.

3. Results

3.1. Chemical analysis

Results obtained from the *t*-test between chemical analyses showed no significant changes ($P > 0.05$) in the concentration of the pure analyte in treatments during the 24 h interval renewals of the testing solutions (concentration range, $97 \pm 5\%$ recovery).

3.2. Mortality

Probit analysis of the mortality data allowed determination of the LC_{50} values of 2,4-D present within the formulation DMA[®] after 24, 48, 72, and 96 h of exposure. Results revealed mean values of $LC_{50\ 24\ h} = 1647$ mg/L (range, 1556–1777), $LC_{50\ 48\ h} = 1247$ mg/L (range, 1192–1295), $LC_{50\ 72\ h} = 1081$ mg/L (range, 1007–1142), and $LC_{50\ 96\ h} = 1008$ mg/L (range, 929–1070). As revealed by regression analysis, a trend to LC_{50} values to be dependent of the exposure time was observed although not reaching statistical significance ($r = -0.94$, $P > 0.05$).

3.3. Behavioral changes

The behavioral changes observed in those *C. decemmaculatus* exposed to different concentrations of 2,4-D present within the formulation DMA[®] were GBA, SM, AS, and SR ($P < 0.01$ – $P < 0.001$). NOEC and LOEC values for all observed changes are summarized in Table 1. GBA was observed only in fish after 24 h of exposure

Table 1
Behavioral effects of *Cnesterodon decemmaculatus* exposed to the 2,4-D-based formulation DMA[®].

Exposure time (h)	Effect	NOEC		LOEC	
		No. of animals analyzed	Value	No. of animals analyzed	Value
24	GBA	30	400 mg/L	27	800 mg/L ^{**}
	SM	30	400 mg/L	27	800 mg/L ^{**}
	SR	30	400 mg/L	27	800 mg/L ^{***}
	AS	30	400 mg/L	27	800 mg/L ^{***}
48	GBA	–	–	–	–
	SM	30	400 mg/L	26	800 mg/L ^{***}
	SR	30	400 mg/L	26	800 mg/L ^{**}
	AS	30	400 mg/L	26	800 mg/L ^{***}
72	GBA	–	–	–	–
	SM	–	–	–	–
	SR	25	800 mg/L	18	1100 mg/L ^{***}
	AS	30	400 mg/L	25	800 mg/L ^{***}
96	GBA	–	–	–	–
	SM	–	–	–	–
	SR	–	–	–	–
	AS	30	400 mg/L	23	800 mg/L ^{**}

GBA, gathering at the bottom of the aquarium; SM, slow motion; SR, slow reaction; AS, abnormal swimming.

^{**} $P < 0.01$; significant differences with respect to control values.

^{***} $P < 0.001$; significant differences with respect to control values.

^a Results are expressed in mg/L.

($P < 0.01$, $F = 5.92$) with NOEC and LOEC values of 400 and 800 mg/L 2,4-D, respectively. With similar NOEC and LOEC values of 400 and 800 mg/L 2,4-D, SM was detected in fish after 24 ($P < 0.01$, $F = 4.52$) and 48 h ($P < 0.001$, $F = 11.19$) with of exposure, respectively. SR was observed in specimens exposed either during 24 ($P < 0.001$, $F = 11.84$), 48 ($P < 0.01$, $F = 5.00$) as well 72 h ($P < 0.001$, $F = 9.04$) to the herbicide. Whereas NOEC and LOEC values were 400 and 800 mg/L 2,4-D for 24 and 48 h treatments, respectively, 800 and 1100 mg/L 2,4-D were determined as the a NOEC and LOEC values for 72 h-exposed fish, respectively. Finally, the only abnormality observed throughout the experiment was AS ($P < 0.01$ – $P < 0.001$; $F = 5.63$, $F = 15.84$, $F = 11.88$, and $F = 9.29$, for 24, 48, 72, and 96 h, respectively) with NOEC and LOEC values of 400 and 800 mg/L 2,4-D for all experimental points (Table 1).

3.4. MN and other erythrocytic nuclear abnormality frequencies

Table 2 and Fig. 1 show the results of the analysis of MNs in peripheral blood erythrocytes of *C. decemmaculatus* induced by the 2,4-D-based herbicide formulation DMA[®]. Results revealed an increase in the frequency of MNs in fish exposed to CP (positive control) at 48 h ($P < 0.05$, $H = 15.69$), but not in fish exposed for 96 h ($P > 0.05$). After 48 h, a significant increase in the frequency of MNs was found in fish exposed to 252, 504 and 756 mg/L 2,4-D-treated individuals with respect to negative control values ($P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively). Additionally, a significant increase in the frequency of MNs was observed at 96 h of treatment for all tested concentrations of 2,4-D compared to negative controls ($P < 0.001$, $F = 11.5$) (Table 2). Overall, a regression analysis revealed that the increase in MN frequency was not affected by 2,4-D concentrations neither at 48 h ($r = -0.24$, $P > 0.05$) nor at 96 h of exposure ($r = -0.05$, $P > 0.05$).

When other nuclear abnormalities rather than MNs were analyzed, an increase in the frequency of NTs was observed only in individuals exposed to 504 mg/L for 96 h ($P < 0.01$). In addition, an increase in the frequency of BLs was observed after 48 h only in fish exposed to 756 mg/L 2,4-D ($P < 0.05$, $F = 3.3$) and after 96 h in fish exposed to 504 mg/L 2,4-D ($P < 0.05$, $F = 3.3$). 2,4-D

Table 2
Frequencies (%) of MNs and other nuclear abnormalities in peripheral blood erythrocytes of *Cnesterodon decemmaculatus* exposed to 2,4-D-based formulation DMA[®]^a.

Exposure time (h)	Concentration (mg/L)	No. of cells analyzed	MNs	Other Nuclear Abnormalities			
				NTs	LBs	BNs	BLs
48	Negative control	22814	0.09 ± 0.06	3.78 ± 0.95	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.01 ± 0.24
	Positive control ^b	22595	0.53 ± 0.11 [*]	4.74 ± 0.78	0.09 ± 0.06	0.00 ± 0.00	3.94 ± 0.60 ^{**}
	252	22571	0.58 ± 0.15 [*]	3.15 ± 0.71	0.09 ± 0.06	0.04 ± 0.04	0.93 ± 0.25
	504	22189	0.94 ± 0.26 ^{**}	4.55 ± 1.15	0.09 ± 0.09	0.00 ± 0.00	1.27 ± 0.38
	756	22568	1.06 ± 0.21 ^{**}	3.06 ± 0.85	0.00 ± 0.00	0.09 ± 0.08	3.77 ± 1.19 [*]
96	Negative control	22601	0.13 ± 0.07	2.12 ± 0.65	0.04 ± 0.04	0.00 ± 0.00	1.33 ± 0.42
	Positive control ^b	22921	0.43 ± 0.16	8.88 ± 2.13	0.44 ± 0.16	0.09 ± 0.08	4.29 ± 1.09 ^{**}
	252	22586	1.06 ± 0.23 ^{**}	3.54 ± 0.73	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	2.08 ± 0.49
	504	22621	1.46 ± 0.25 ^{**}	5.43 ± 0.82 ^{**}	0.66 ± 0.47	0.09 ± 0.08	3.48 ± 0.82 [*]
	756	21130	1.37 ± 0.29 ^{**}	2.94 ± 0.47	0.14 ± 0.10	0.05 ± 0.04	1.14 ± 0.34

MNs, micronuclei; NTs, notched nuclei; LBs, lobed nuclei; BNs, binucleated nuclei; BLs, blebbed nuclei.

The number of animals analyzed was 15 for all concentrations in both 48 and 96 h exposure time, but 14 in 756 mg/L 96 h concentration.

^a Results are expressed as mean number of abnormalities/1000 cells ± SE.

^b Cyclophosphamide (10 mg/L) was used as positive control.

^{*} $P < 0.05$.

^{**} $P < 0.01$.

^{**} $P < 0.001$; significant differences with respect to control values.

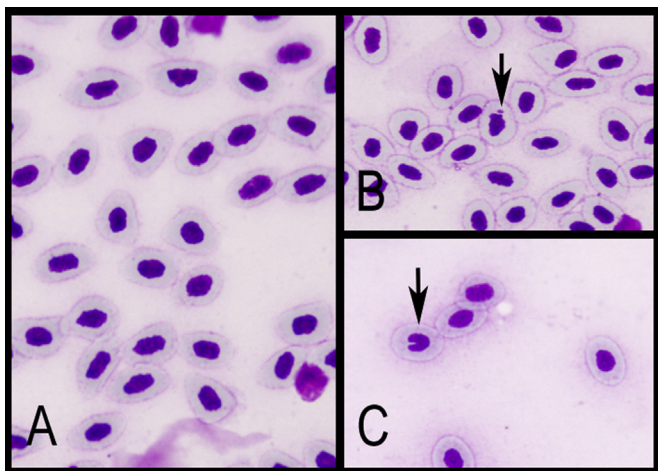


Fig. 1. Photomicrographs from blood smears of *C. decemmaculatus* showing erythrocytes with normal nucleus (A), an erythrocyte with a micronucleus (B, arrow) and an erythrocyte depicting a notched nucleus (C, arrow). Cells were stained with 5% Giemsa and viewed at 1000 times magnification. Cells are approximately 10 μm along the long axis.

treatments, regardless of both concentration and exposure time, did not modify the frequencies of LBs and BNs in regard to negative control values ($P > 0.05$) (Table 2).

3.5. DNA damage

Table 3 and Fig. 2 show the results of the SCGE assay obtained for *C. decemmaculatus* after 2,4-D DMA[®] exposure. CP treatment (positive control) induced an enhancement of the GDI and in the frequency of damaged nucleoids compared to 48 and 96 h negative controls ($P < 0.001$; $F = 45.35$ for 48 and $F = 73.74$ for 96 h, respectively) (Table 3, Fig. 2). In herbicide-exposed fish, a significant increase of the GDI was observed in all treatments (252, 504, and 756 mg/L 2,4-D) lasting for both 48 and 96 h ($P < 0.001$; $F = 55.56$ for 48 and $F = 91.56$ for 96 h, respectively) (Table 3). In specimens exposed for 48 h, such alteration was due to an enhanced frequency of type II and III nucleoids ($P < 0.001$; $F = 44.42$ for nucleoids type II and $F = 30.20$ for nucleoids type III, respectively). In addition, an increased frequency of type IV nucleoids in fish treated with 504 mg/L for 48 h was observed ($P < 0.01$; $F = 5.45$) (Fig. 2A). When the analysis was performed in fish exposed for 96 h, the alteration in the GDI was due to an increase in the frequency of type II, III and IV nucleoids for all treatments performed ($P < 0.001$; $F = 76.35$, $F = 60.83$ and $H = 24.13$ for nucleoids type II, III and IV, respectively) (Fig. 2B). Overall, a regression analysis demonstrated that the GDI varied as a dependent function of 2,4-D concentration in fish treated for 48 h ($r = -0.42$, $P < 0.01$), but not in fish exposed for 96 h ($r = 0.14$, $P > 0.05$).

Table 3
Analysis of DNA damage measured by comet assay in *Cnesterodon decemmaculatus* cells exposed to the 2,4-D-based formulation DMA[®].

Chemicals	Concentration (mg/L)	Exposure time (h)	No. of nucleoids analyzed	% of damaged nucleoids (II+III+IV)	GDI ± SE ^a
Negative control		48	1547	11.25	0.69 ± 0.09
		96	1601	6.75	0.60 ± 0.05
DMA [®]	256	48	1639	58.08 ^{**}	1.57 ± 0.08 ^{**}
		96	1575	84.70 ^{**}	2.26 ± 0.12 ^{**}
	504	48	1414	74.40 ^{**}	2.29 ± 0.09 ^{**}
		96	1704	82.22 ^{**}	2.00 ± 0.10 ^{**}
	756	48	1728	78.59 ^{**}	1.85 ± 0.10 ^{**}
		96	1584	80.30 ^{**}	2.13 ± 0.07 ^{**}
Positive control ^b	10	48	1633	58.67 ^{**}	1.83 ± 0.09 ^{**}
		96	1463	75.60 ^{**}	2.26 ± 0.08 ^{**}

Number of animals analyzed: 15 for all concentrations in both 48 and 96 h exposure time.

^a GDI: Genetic damage index.

^b Cyclophosphamide (10 mg/L) was used as positive control.

^{**} $P < 0.001$; significant differences with respect to negative control values.

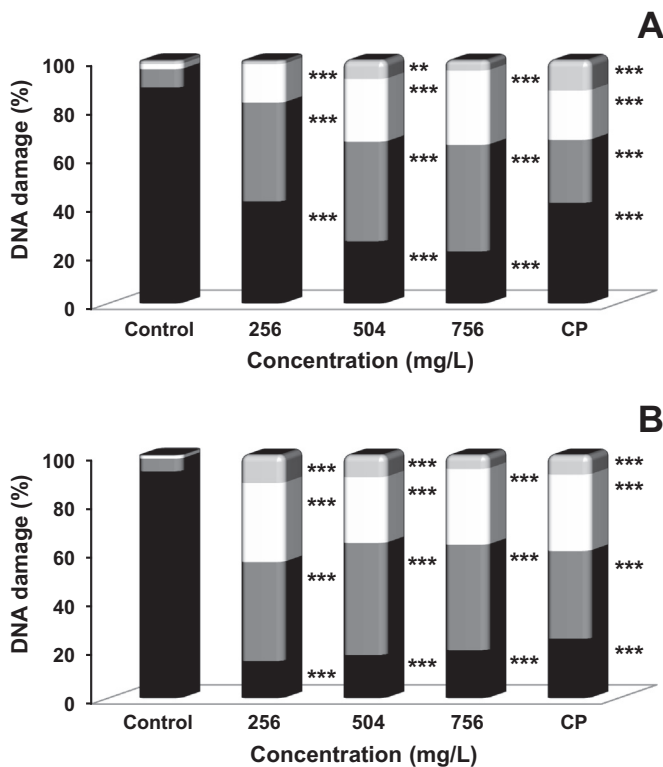


Fig. 2. The 2,4-D based herbicide formulation DMA[®]-induced DNA damage measured by single cell gel electrophoresis assay in circulating blood cells from *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae) exposed for 48 (A) and 96 h (B). The frequencies of undamaged (type 0-I nucleoids; black bar), type II (dark gray bar), type III (white bar) and type IV (light gray bar) were determined by analyzing 100 nucleoids from each specimen. Results are presented as percentages of pooled data from three independent experiments. Negative (untreated fish) and positive controls (CP, 10 mg cyclophosphamide/L-treated fish) were conducted and run simultaneously with DMA[®]-exposed fish. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; significant differences with respect to control values.

4. Discussion

Taking into account the acute lethal effect of the pesticide on the species, the 2,4-D tested herbicide could be ranked, according to the scoring used by the Office of Pollution Prevention and Toxics of the U.S. EPA (2001), as a compound with low ecotoxicity concern for the ten spotted live-bearer fish *C. decemmaculatus*. Besides, 2,4-D can be classified as harmful compounds for aquatic organisms (category III) following the classification criteria proposed by the United Nations directives (2011). Finally, 2,4-D can be considered as compound that may cause long lasting harmful effects to aquatic life, according to the hazard risk assessment categories of the European Union directives (Mazzatorta et al., 2002).

Our results reveal a concentration of 1008 mg/L 2,4-D (confidence limits, 95%, 929–1070) as the $LC_{50\ 96\ h}$ value for *C. decemmaculatus*. Among pesticides, previously maximum $LC_{50\ 96\ h}$ values reported for the species comprises 1639 mg/L for the dicamba-based herbicide formulation Banvel[®] (Ruiz de Arcaute et al., 2014), 225.5 mg/L for the pirimicarb-based insecticide formulation Aficida[®] (Vera-Candioti et al., 2010), 100 mg/L for the herbicide glyphosate (a.i.) (Carriquirborde et al., 2007), 91.73 mg/L for the glyphosate-based herbicide formulation Credit[®] (Vera-Candioti et al., 2013b), 88 mg/L for the pirimicarb-based insecticide formulation Patton Flow[®] (Vera-Candioti et al., 2015), 67.4 mg/L for the paraquat-based insecticide formulation Osaquat[®] (Di Marzio et al., 1998), 15.68 mg/L for the glyphosate-based herbicide formulation Panzer[®] (Vera-Candioti et al., 2013b) and values as low as 0.43 mg/L for the insecticide cypermethrin (a.i.)

(Carriquirborde et al., 2007), 0.21 and 0.03 mg/L mg/L for the chlorpyrifos-based insecticide formulations Chorpypirifos Zamba[®] and Lorsban*48E[®], respectively (Vera-Candioti et al., 2013a) as well as 0.005 mg/L for the endosulfan-based insecticide formulation Brometan[®] (Mugni et al., 2012b). Accordingly, this guppy is nearly 0.6 times more sensitive to 2,4-D than dicamba, the least toxic agrochemical reported so far for the species but more sensitive to any other pesticide assayed so far on the species. Finally, and in agreement with our previous observations (Ruiz de Arcaute et al., 2014), it could be suggested that auxinic herbicides (regardless whether they belong to the benzoic, e.g., dicamba, or to the phenoxyalkanoic, e.g., 2,4-D, acid groups are less toxic compounds to *C. decemmaculatus* than any other agrochemical analyzed so far. Further toxicity studies are required on the target species employing the remaining two members of the auxinic herbicide family of herbicides, i.e., quinolinecarboxylic and pyrimidinecarboxylic acids, to verify this hypothesis.

Recently, the International Agency for Research on Cancer (2015) evaluated the risk exposure of some organochlorine insecticides and some chlorophenoxy herbicides, i.e., DDT, lindane and 2,4-D. As a result, the genotoxic potential of 2,4-D has been strongly endorsed and confirmed by diverse *in vivo* and *in vitro* assays including the ability of induce chromosomal and DNA damage in different biotic matrices (for review see IARC (2015), Soloneski and Larramendy (2011), and references therein). In agreement, the results of the current study demonstrate that 2,4-D can be considered a deleterious agent with genotoxic effects at both chromosomal and DNA levels for *C. decemmaculatus*. Additionally, our observations revealed that SCGE assay was as sensitive than the MN test in detecting early DNA damage when the same 2,4-D concentrations were assayed for fish exposure. To the best of our knowledge, among them the walking catfish *Clarias batrachus* (Siluriformes, Clariidae) (Ateeq et al., 2002), the air-breathing spotted snakehead *Channa punctata* (Perciformes, Channidae) (Farah et al., 2003, 2006) and the mollie *Poecilia vivipara* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae) (Vigário and Sabóia-Morais, 2014) can be included. Finally, our current results demonstrate that other nuclear abnormalities rather than MNs were also induced after 2,4-D exposure, regardless of the exposure time. It has been previously reported that these morphological nuclear abnormalities, e.g., blebbed and notched nuclei, can be considered indicators of genetic instability (Cavaş and Ergene-Gözükara, 2005; Gökalp Muranlı and Güner, 2011). Our results accord well with this assumption since such nuclear abnormalities were only found as a consequence of exposure to 2,4-D as well as cyclophosphamide, an antineoplastic agent employed as positive control.

Very little is known in relation with 2,4-D-induced primary DNA lesions in fish cells. Positive induction of DNA breaks evaluated with the comet assay have been reported in the catfish *C. batrachus* (Ateeq et al., 2005) and in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Salmoniformes, Salmonidae) (Martínez-Tabche et al., 2004) after 2,4-D exposure. Similar results have been also observed after *in vitro* treatment of Epithelioma Papillosum Cyprini (EPC) cells, a fish-derived cell line derived from the common carp *Cyprinus carpio* (Cypriniformes, Cyprinidae) (Bokán et al., 2013). Genotoxicity associated with pesticide exposure using the SCGE test in piscine cells is well documented (Cavaş, 2011, 2013; De Castilhos Ghisi and Cestari, 2013; Gholami-Seyedkolaei et al., 2013; Mohanty et al., 2011, 2013; Ruiz de Arcaute et al., 2014; Selvi et al., 2013; Vera-Candioti et al., 2013c). Accordingly, our current results constitute the first experimental evidence of the genotoxic effect at the DNA level exerted by 2,4-D on the Neotropical fish *C. decemmaculatus* exposed under laboratory conditions.

It is known that most of the pesticides in aquatic environments exert their side effects through genotoxic and metabolically toxic

mechanisms triggering, simultaneously, genotoxic damage, disease, and even carcinogenesis (Könen and Cavaş, 2008; Ruiz de Arcaute et al., 2014; Vera-Candiotti et al., 2010, 2013a, 2013b, 2013c, 2015). 2,4-D can be introduced into the environment through effluents and spills resulting from its manufacture and transport or directly through its application as a herbicide agent. The herbicide does not bioaccumulate in aquatic or terrestrial organisms but some algae because of its rapid degradation (WHO, 2003). Residues of 2,4-D can enter ponds and streams by several manners including direct application or accidental drift, inflow of herbicide previously deposited in dry streambeds, pond bottoms or irrigation channels, runoff from soils as well as by leaching through the soil column (Norris, 1981). Groundwater contribution of 2,4-D residues into ponds and streams is dependent upon soil type, with coarse-grained sandy soils with low organic content expected to leach 2,4-D into groundwater (Ghassemi et al., 1981; Norris, 1981). Therefore, 2,4-D, whether inefficiently diluted or degraded after applied in the soil, may reach concentration levels that could pose genotoxic effects in aquatic biota. To the best of our knowledge, no data regarding to the concentration level of the herbicide in different environments have been reported for Argentina. Information on concentrations of 2,4-D in environmental compartments will be necessary to complete exposure profiles to be included in future risk assessments studies when employing a native fish as *C. decemmaculatus* as experimental model.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This study was supported by grants from the National University of La Plata (Grants 11/N699 and 11/N746) and the National Council for Scientific and Technological Research (CONICET, PIP No. 0344) from Argentina.

References

- Ackerman P.A., Morgan J.D., Iwama G.K. Anesthetics, 2005. In: Canadian Council on Animal Care (Ed.), The Care and use of Fish in Research, Teaching and Testing. Canadian Council on Animal Care, Ottawa, CA, pp. 1–22.
- Ali, D., Nagpure, N.S., Kumar, S., Kumar, R., Kushwaha, B., Lakra, W.S., 2009. Assessment of genotoxic and mutagenic effects of chlorpyrifos in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Food Chem. Toxicol.* 47, 650–656.
- Annabi, A., Said, K., Messaoudi, I., 2015. Monitoring and assessment of environmental disturbance on natural *Gambusia affinis* populations - histopathological analysis. *Environ. Monit. Assess.* 187, 318–326.
- Ateeq, B., Abul Farah, M., Ahmad, W., 2005. Detection of DNA damage by alkaline single cell gel electrophoresis in 2,4-dichlorophenoxyacetic-acid- and butachlor-exposed erythrocytes of *Clarias batrachus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 62, 348–354.
- Ateeq, B., Abul Farah, M., Niamat Ali, M., Ahmad, W., 2002. Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. *Mutat. Res.* 518, 135–144.
- Benitez, J.A., Cerón-Bretón, R.M., Cerón-Bretón, J.G., Rendón-Von-Osten, J., 2014. The environmental impact of human activities on the Mexican coast of the Gulf of Mexico: review of status and trends. *WIT Trans. Ecol. Environ.* 181, 37–50.
- Bokán, K., Syberg, K., Jensen, K., Rank, J., 2013. Genotoxic potential of two herbicides and their active ingredients assessed with comet assay on a fish cell line, epithelioma papillosum cyprini (EPC). *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 76, 1129–1137.
- Carriquiriborde, P., Díaz, J., Mugni, H., Bonetto, C., Ronco, A.E., 2007. Impact of cypermethrin on stream fish populations under field-use in biotech-soybean production. *Chemosphere.* 68, 613–621.
- Cavalcante, D.G., Martinez, C.B., Sofia, S.H., 2008. Genotoxic effects of Roundup on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutat. Res.* 655, 41–46.
- Cavaş, T., 2011. *In vivo* genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. *Food Chem. Toxicol.* 49, 1431–1435.
- Cavaş, T., 2013. *In vivo* genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. *Food Chem. Toxicol.* 49, 1431–1435.
- Cavaş, T., Ergene-Gözükara, S., 2003. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in *Oreochromis niloticus* exposed to textile mill effluent. *Mutat. Res.* 538, 81–91.
- Cavaş, T., Ergene-Gözükara, S., 2005. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents. *Aquat. Toxicol.* 74, 264–271.
- Cavaş, 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, 263–268.
- Cavaş, T., Könen, S., 2008. *In vivo* genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay. *Aquat. Toxicol.* 90, 154–159.
- De Castilhos Ghisi, N., Cestari, M.M., 2013. Genotoxic effects of the herbicide Roundup® in the fish *Corydoras paleatus* (Jenyns 1842) after short-term, environmentally low concentration exposure. *Environ. Monit. Assess.* 185, 3201–3207.
- de Lemos, C.T., França, F. d. A., de Oliveira, N.C., de Souza, G.D., Fachel, J.M., 2008. Biomonitoring of genotoxicity using micronuclei assay in native population of *Astyanax jacuhiensis* (Characiformes: Characidae) at sites under petrochemical influence. *Sci. Total Environ.* 406, 337–343.
- Di Marzio, W.D., Alberdi, J.L., Sáenz, M.E., Tortorelli, M.D.C., 1998. Effects of paraquat (Osaquat® formulation) on survival and total cholinesterase activity in male and female adults of *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). *Environ. Toxicol. Water Qual.* 13, 55–59.
- Di Marzio, W.D., Tortorelli, M.C., 1994. Effects of paraquat on survival and total cholinesterase activity in fry of *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 52, 274–278.
- FAO-WHO, 2006. Manual on development and use of FAO and WHO specifications for pesticides FAO/WHO Joint Meeting on Pesticide Specifications (JMPS).
- Farah, M.A., Ateeq, B., Ahmad, W., 2006. Antimutagenic effect of neem leaves extract in freshwater fish, *Channa punctatus* evaluated by cytogenetic tests. *Sci. Total Environ.* 364, 200–214.
- Farah, M.A., Ateeq, B., Ali, M.N., Ahmad, W., 2003. Evaluation of genotoxicity of PCP and 2,4-D by micronucleus test in freshwater fish *Channa punctatus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 25–29.
- Fenech, M., 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.* 2, 1084–1104.
- Finney, D.J., 1971. Probit Analysis. Cambridge Univ. Press, London.
- Furlong E.T., Anderson B.D., Werner S.L., Soliven P.P., Coffey L.J., Burkhardt M.R., 2011. Methods of analysis but the US Geological Survey National Water Quality Laboratory – Determination of Pesticides in Water by Graphitized Carbon-based Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. US Geological Survey Water Resources Investigations Report 01-4134. pp. 73.
- Ghassemi, M., Fargo, L., Painter, P., Quinlivan, S., Scofield, R., Takata, A., 1981. Environmental Fates and Impacts of Major Forest Use Pesticides. U.S. Environmental Protection Agency. Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington D.C.
- Gholami-Seyedkolaei, S.J., Mirvaghefi, A., Farahmand, H., Kosari, A.A., Gholami-Seyedkolaei, S.J., Gholami-Seyedkolaei, S.J., 2013. Optimization of recovery patterns in common carp exposed to roundup using response surface methodology: Evaluation of neurotoxicity and genotoxicity effects and biochemical parameters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 98, 152–161.
- Gökalp Muranlı, F.D., Güner, U., 2011. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in erythrocytes of mosquito fish (*Gambusia affinis*) following exposure to the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Mutat. Res.* 726, 104–108.
- Greene, C., Kuehne, L., Rice, C., Fresh, K., Penttila, D., 2015. Forty years of change in forage fish and jellyfish abundance across greater Puget Sound, Washington (USA): Anthropogenic and climate associations. *Mar. Ecol. Progress Ser.* 525, 153–170.
- Grossmann, K., 2003. Mediation of herbicide effects by hormone interactions. *Journal. Plant Growth Regul.* 22, 109–122.
- IARC, 2015. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Some Organochlorine Insecticides and Some Chlorophenoxy Herbicides. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- IRAM, 2008. Calidad ambiental-Calidad de agua. Determinación de la toxicidad letal aguda de sustancias en peces de agua dulce. Métodos semiestático. Instituto Argentino de Normalización y Certificación, Buenos Aires, Argentina, p. 23.
- King, K.A., Grue, C.E., Grassley, J.M., Harsey, J.W., 2013. Pesticides in urban streams and prespawning mortality of Pacific coho salmon. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 65, 546–554.
- Könen, S., Cavaş, T., 2008. Genotoxicity testing of the herbicide trifluralin and its commercial formulation Treflan using the piscine micronucleus test. *Environ. Mol. Mutagen.* 49, 434–438.
- Lazartigues, A., Thomas, M., Banas, D., Brun-Bellut, J., Cren-Olivé, C., Feidt, C., 2013. Accumulation and half-lives of 13 pesticides in muscle tissue of freshwater fishes through food exposure. *Chemosphere* 91, 530–535.
- Liang, H.C., Razaviarani, V., Buchanan, I., 2013. Pesticides and herbicides. *Water Environ. Res.* 85, 1601–1645.

- Martínez-Tabche, L., Madrigal-Bujaidar, E., Negrete, T., 2004. Genotoxicity and lipoperoxidation produced by paraquat and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mikiss*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 73, 146–152.
- Mazzatorta, P., Benfenati, E., Neagu, D., Gini, G., 2002. The importance of scaling in data mining for toxicity prediction. *J. Chem. Inf. Model.* 42, 1250–1255.
- McKenzie, D.J., Garofalo, E., Winter, M.J., Ceradini, S., Verweij, F., Day, N., Hayes, R., Van Der Oost, R., Butler, P.J., Chipman, J.K., Taylor, E.W., 2007. Complex physiological traits as biomarkers of the sub-lethal toxicological effects of pollutant exposure in fishes. *Philos. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci.* 362, 2043–2059.
- McLaughlin, D., Kinzelbach, W., 2015. Food security and sustainable resource management. *Water Resour. Res.* 51, 4966–4985.
- Meffe, R., de Bustamante, I., 2014. Emerging organic contaminants in surface water and groundwater: A first overview of the situation in Italy. *Sci. Total Environ.* 481, 280–295.
- Menendez-Helman, R.J., Ferreyro, G.V., Alfonso, M.D.S., Salibian, A., 2012. Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 88, 6–9.
- Menni, R.C., Gómez, S.E., López Armengol, F., 1996. Subtle relationships: freshwater fishes and the chemistry of water in southern South America. *Hydrobiologia* 328, 173–197.
- Mohanty, G., Mohanty, J., Garnayak, S.K., Rath, S.K., Dutta, S.K., 2013. Use of comet assay in the study of DNA break in blood and gill cells of rohu (*Labeo rohita*) after an exposure to furadan, a carbamate pesticide. *Res. J. Biotechnol.* 8, 83–89.
- Mohanty, G., Mohanty, J., Nayak, A.K., Mohanty, S., Dutta, S.K., 2011. Application of comet assay in the study of DNA damage and recovery in rohu (*Labeo rohita*) fingerlings after an exposure to phorate, an organophosphate pesticide. *Ecotoxicology* 20, 283–292.
- Mugni, H., Demetrio, P., Paracampo, A., Pardi, M., Bulus, G., Bonetto, C., 2012a. Toxicity persistence in runoff water and soil in experimental soybean plots following chlorpyrifos application. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 89, 208–212.
- Mugni, H., Paracampo, A., Demetrio, P., Scalise, A., Solís, M., Fanelli, S., Bonetto, C., 2016. Acute toxicity of endosulfan to the non-target organisms *Hyalella curvispina* and *Cnesterodon decemmaculatus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 70, 257–264.
- Mugni, H.A., Paracampo, A., Marrochi, N., Bonetto, C., 2012b. Cypermethrin, chlorpyrifos and endosulfan toxicity to two non-target freshwater organisms. *Fresenius Environ. Bull.* 21, 2085–2089.
- Nikoloff, N., Natale, G.S., Marino, D., Soloneski, S., Larramendy, M., 2014. Flurochloridone-based herbicides induced genotoxicity effects on *Rhinella arenarum* tadpoles (Anura: Bufonidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 100, 275–281.
- Norris, L.A., 1981. The movement, persistence, and fate of the phenoxy herbicides and TCDD in the forest. *Residue Rev.* 80, 65–135.
- Ogada, D.L., 2014. The power of poison: Pesticide poisoning of Africa wildlife. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1322, 1–20.
- Pimentel, D., McLaughlin, L., Zepp, A., Lakitan, B., Kraus, T., Kleinman, P., Vancini, F., Roach, W.J., Graap, E., Keeton, W.S., Selig, G., 1993. Environmental and economic effects of reducing pesticide use in agriculture. *Agric. Ecosyst. Environ.* 46, 273–288.
- Pitarque, M., Vaglenov, A., Nosko, M., Hirvonen, A., Norppa, H., Creus, A., Marcos, R., 1999. Evaluation of DNA damage by the Comet assay in shoe workers exposed to toluene and other organic solvents. *Mutat. Res.* 441, 115–127.
- Ruiz de Arcaute, C., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2014. Evaluation of the genotoxicity of a herbicide formulation containing 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (dicamba) in circulating blood cells of the tropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. *Mutat. Res.* 773, 1–8.
- Sarikaya, R., Yilmaz, M., 2003. Investigation of acute toxicity and the effect of 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) herbicide on the behavior of the common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758; Pisces, Cyprinidae). *Chemosphere* 52, 195–201.
- Schlenk, D., Lavado, R., Loyo-Rosales, J.E., Jones, W., Maryoung, L., Riar, N., Werner, I., Sedlak, D., 2012. Reconstitution studies of pesticides and surfactants exploring the cause of estrogenic activity observed in surface waters of the San Francisco Bay Delta. *Environ. Sci. Technol.* 46, 9106–9111.
- Selvi, M., Cavaş, T., Çağlan Karasu Benli, A., Koçak Memmi, B., Çinkiliç, N., Dinçel, A. S., Vatan, O., Yilmaz, D., Sarikaya, R., Zorlu, T., Erkoç, F., 2013. Sublethal toxicity of esbiothrin relationship with total antioxidant status and in vivo genotoxicity assessment in fish (*Cyprinus carpio* L., 1758) using the micronucleus test and comet assay. *Environ. Toxicol.* 28, 644–651.
- SENASA, 2013. Argentinean National Service for Sanitary and Quality of Agriculture and Food. (<http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1506&io=1812>).
- Singh, N.P., 1996. Microgel electrophoresis of DNA from individual cells: principles and methodology. In: Pfeifer, G.P. (Ed.), *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations*. Plenum Press, New York, pp. 3–24.
- Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2011. Herbicides in Argentina. Comparative evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects on mammalian cells exerted by auxinic members. In: Kortekamp, A. (Ed.), *Herbicides and Environment*. InTech Rijeka, Croatia, pp. 515–530.
- Song, Y., 2014. Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide. *J. Integr. Plant Biol.* 56, 106–113.
- Strunjak-Perovic, I., Coz-Rakovac, R., Topic Popovic, N., Jadan, M., 2009. Seasonality of nuclear abnormalities in gilthead sea bream *Sparus aurata* (L.) erythrocytes. *Fish Physiol. Biochem.* 35, 287–291.
- Summerfelt, R.C., Smith, L.S., 1990. Anaesthesia, surgery and related techniques. In: Schreck, C.B., Moyle, P.B. (Eds.), *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society, Bethesda MD, pp. 213–272.
- Tierney, K.B., Baldwin, D.H., Hara, T.J., Ross, P.S., Scholz, N.L., Kennedy, C.J., 2010. Olfactory toxicity in fishes. *Aquat. Toxicol.* 96, 2–26.
- UN, 2011. Peligros para el medio ambiente. Naciones Unidas. Parte 4, pp. 229–258.
- USEPA, 1974. United States Environmental Protection Agency. Compendium of Registered Pesticides U.S. Government Printing Office, Washington, DC.
- USEPA, 1975. Methods for Acute Toxicity Tests with Fish, Macroinvertebrates, and Amphibians. U.S. Government Printing Office, Washington, DC, p. 62.
- USEPA, 2001. United States Environmental Protection Agency Report. Environmental Hazard Assessment and Ecological Risk Assessment Methodology. U.S. Government Printing Office, Washington, DC, Appendix H.
- USEPA, 2002. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms, fifth edition. U.S. Government Printing Office, Washington, DC 821-R-02-012.
- Vera-Candiotti, J., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2010. Genotoxic and cytotoxic effects of the formulated insecticide Aficida[®] on *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Pisces: Poeciliidae). *Mutat. Res.* 703, 180–186.
- Vera-Candiotti, J., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2011. Acute toxicity of chromium on *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces: Poeciliidae). *Theoria* 20, 85–93.
- Vera-Candiotti, J., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2013a. Chlorpyrifos-based insecticides induced genotoxic and cytotoxic effects in the ten spotted live-bearer fish, *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842). *Environ. Toxicol.* 29, 1390–1398.
- Vera-Candiotti, J., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2013b. Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of glyphosate-based herbicides in the ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 89, 166–173.
- Vera-Candiotti, J., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2013c. Single-cell gel electrophoresis assay in the ten spotted live-bearer fish, *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842), as bioassay for agrochemical-induced genotoxicity. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 98, 368–373.
- Vera-Candiotti, J., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2015. Pirimicarb-based formulation-induced genotoxicity and cytotoxicity on the fresh water fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Pisces, Poeciliidae). *Toxicol. Ind. Health* 31, 1051–1060.
- Vigário, A.F., Sabóia-Morais, S.M.T., 2014. Effects of the 2,4-D herbicide on gills epithelia and liver of the fish *Poecilia vivipara*. *Braz. J. Vet. Res.* 34, 523–528.
- WHO, 1990. Public Health Impacts of Pesticides used in Agriculture (WHO in Collaboration with the United Nations Environment Programme, Geneva, 1990). World Health Organization, Geneva, Italy.
- WHO, 2003. 2,4-D in Drinking-Water. Background Document for Development of WHO Guidelines for Drinking-Water Quality. World Health Organization, Geneva.
- WHO, 2009. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard 1. World Health Organization, Geneva, Italy, pp. 1–81.
- Yilmaz, M., Gül, A., Karaköse, E., 2004. Investigation of acute toxicity and the effect of cadmium chloride (CdCl₂H₂O) metal salt on behavior of the guppy (*Poecilia reticulata*). *Chemosphere* 56, 375–380.
- Zhao, Z., Wang, Y., Zhang, L., Cai, Y., Chen, Y., 2014. Bioaccumulation and tissue distribution of organochlorine pesticides (OCPs) in freshwater fishes: a case study performed in Poyang Lake, China largest lake. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 8740–8749.



Synergism of mixtures of dicamba and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide formulations on the neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae)[☆]

C. Ruiz de Arcaute^{a, b}, S. Soloneski^{a, b}, M.L. Larramendy^{a, b, *}

^a Cátedra de Citología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Calle 64 N° 3, B1904AMA La Plata, Argentina

^b Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 June 2017

Received in revised form

26 October 2017

Accepted 17 January 2018

Keywords:

Banvel[®]

DMA[®]

Lethal effects

Equitoxic mixtures

Non-equitoxic mixtures

ABSTRACT

Dicamba (DIC) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) are two of the most applied auxinic herbicides worldwide, both individually and as part of a mixture. However, the toxicity and interactions achieved when applied as a mixture have not yet been characterised. The equitoxic and non-equitoxic acute toxicity exerted by binary mixtures of Banvel[®] (57.71% DIC) and DMA[®] (58.4% 2,4-D) on the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus* were evaluated. Results revealed mean values of 1.02 (range, 0.96–1.08) for the toxic unit (TU) that induced 50% mortality (TU_{50 96 h}) to the fish exposed to binary equitoxic mixtures of the commercial formulations Banvel[®]–DMA[®]. These results suggest that the mixture is nearly concentration additive. Furthermore, results demonstrated the occurrence of synergistic interaction when non-equitoxic combinations of Banvel[®]-or DMA[®]-formulated herbicides were assayed. In this context and regardless of their concentrations, either Banvel[®]- or DMA[®]-induced toxicity were synergised by the presence of the counterpart within mixtures. The present study represents the first evidence of the lethality exerted by mixtures of two auxinic herbicides—namely, DIC and 2,4-D—reported to date for fish and other biotic matrices. When *C. decemmaculatus* is used as the target organism, a synergistic pattern is observed following exposure to a mixture of both herbicides.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Anthropogenic activities, especially agriculture, release large amounts of pesticides daily into the soil, water and air (Ippolito et al., 2015; Liaud et al., 2016). Annually, approximately four million tons of pesticides are applied around the globe (Ippolito et al., 2015) and disseminated by drift, surface runoff, and drainage into the environment (Aparicio et al., 2013; Meffe and de Bustamante, 2014). Accordingly, a mixture of products reaches not only their target species, but also non-target ones, for example, aquatic and terrestrial biota (Liang et al., 2013; Meffe and de Bustamante, 2014).

The application of mixtures of toxicants is a commonly used strategy to control and prevent weed resistance, despite the

potential effects that the mixture could exert on non-target organisms (Ge et al., 2014). In addition to the additives that are present in the commercially available pesticide formulations, which are known to modify the toxic effects of the pure compound (Cox and Sorgan, 2006; Nikoloff et al., 2014b; Ruiz de Arcaute et al., 2014b), it is known that mixtures of different compounds can interact with each. Those interactions can cause complex changes that are different from the toxic effects exerted by individual components on a biotic matrix (LeBlanc and Wang, 2006; Silva et al., 2015; Svartz et al., 2016; Varona-Urbe et al., 2016). In general terms, a mixture of toxicants can exert complex interactions between its components, including additivity, synergism and antagonism (Calamari and Alabaster, 1980; Calabrese, 1995; Warne, 2003; Lydy et al., 2004; Brodeur et al., 2014). Therefore, it is necessary to evaluate the joint effects of mixtures, especially those with interactions between at least two components (that is, binary mixtures) (Warne, 2003).

Since they were first synthesised after World War II, auxinic herbicides have been frequently used worldwide to eliminate unwanted broadleaf dicotyledons in crops (USEPA, 2006). These

[☆] This paper has been recommended for acceptance by Dr. Harmon Sarah Michele.

* Corresponding author. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Calle 64 Nro. 3 (esq. 120), B1904AMA La Plata, Argentina.

E-mail address: marcelo.larramendy@gmail.com (M.L. Larramendy).

herbicides include quinolinecarboxylic, benzoic, phenoxyalkanoic and pyridinecarboxylic acids (Garraway and Wain, 1976). They mimic the natural phytohormone auxin, and they cause uncontrolled growth, senescence and death (Grossmann, 2003; USEPA, 2006). Among the benzoic acids, dicamba (DIC), a derivative of chlorinated benzoic acid, is frequently used for controlling weeds in cereal crops, sugar cane, soybeans, wheat, and in grazing and natural fields (USEPA, 2006; CASAFE, 2009). Information regarding the toxicity of DIC is sufficient to evaluate its potential hazards to humans and other aquatic and terrestrial organisms (USEPA, 2006). Taking into account its acute toxic effects, DIC has been ranked by the World Health Organisation (WHO) (2009) as a class II chemical (moderately hazardous) and by the U.S. Environmental Protection Agency (U.S. EPA) (2006) as a type III chemical (moderate toxic). In addition, following U.S. EPA's ecotoxicological classification for aquatic organisms (USEPA, 2008), DIC is considered to be a practically nontoxic pesticide.

2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) is an auxinic herbicide that belongs to the family of phenoxyalkanoic acids. It has been classified by the U.S. EPA as slightly to moderately toxic (category II–III) (USEPA, 1974), and by WHO as moderately hazardous (class II) (WHO, 2009). Moreover, in 2015, the International Agency for Research on Cancer (IARC) classified 2,4-D as a possibly carcinogenic agent to humans (Group 2B) based on mechanistic studies (IARC, 2015). In addition, and according to the ecotoxicological classification proposed for aquatic organisms by the USEPA (2008), 2,4-D is classified as a practically nontoxic pesticide. There are over 172 products containing 2,4-D currently on Argentina (SENASA, 2017) and it is used alone or in combination with other herbicides (for example, in combination with DIC, 4-amino-3,5,6-trichloro-2-pyridinecarboxylic acid [picloran], 3,6-dichloro-2-pyridinecarboxylic acid [clopyralid] and methylchlorophenoxypyropionic acid [MCP]) (NCBI, 2017).

Regarding the toxicity of DIC reported for different fish species, data reviewed in the literature demonstrated LC_{50 96h} values ranging from 50 mg/L for the cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*) to 465 mg/L for the Western mosquitofish (*Gambusia affinis*) (USEPA, 2017). Similarly, LC_{50 96h} concentrations of 2,4-D that range from 87 mg/L to 707 mg/L have been reported for common carp (*Cyprinus carpio*) and the rainbow trout (*O. mykiss*) (USEPA, 2017). When the acute toxicities of DIC, formulated as Banvel[®], and 2,4-D, formulated as DMA[®], were assayed, the LC_{50 96h} concentrations were determined to be 1639 mg/L and 1008 mg/L, respectively, for the ten spotted live-bearer (*Cnesterodon decemmaculatus*) (Ruiz de Arcaute et al., 2014b, 2016). Thus, it could be pinpointed that the latter represents the most resistant fish species reported so far for both DIC and 2,4-D.

DIC and 2,4-D have been found in urban, agricultural and agricultural–urban sites and in surface drinking-water reservoirs (Loos et al., 2010; Glozier et al., 2012; Félix-Cañedo et al., 2013; Tagert et al., 2014). They contaminate both surface and ground-water because they are highly mobile and adsorb poorly onto soil particles (Li et al., 2009). In the United States, DIC and 2,4-D have been detected in surface water runoff at a maximum value of 2.1 µg/L, in surface water at a maximum value of 24 µg/L (Phillips and Bode, 2004; Tagert et al., 2014) and in drinking water reservoirs at values as low as 1.04 µg/L (Donald et al., 2007). Lower environmental concentrations were reported for water in Canada, with values of 0.04 µg/L for DIC and 0.31 µg/L for 2,4-D (Woudneh et al., 2007; Tierney et al., 2011; Glozier et al., 2012). Concentrations of 2,4-D were found in surface and ground water in the range of 0.005 µg/L to 0.04 µg/L in Mexico (Félix-Cañedo et al., 2013), and at a concentration of 0.012 µg/L in European ground water (Loos et al., 2010). However, to the best of our knowledge, no data have been published on the environmental concentrations of DIC and 2,4-D in

Argentina.

It is worth mentioning that DIC and 2,4-D have extensive and overlapping applications worldwide. Specifically for Argentina, these herbicides are recommended to be applied together in several crops (for example, sugar cane, cereal, corn, sorghum and other cultivars that are of commercial importance) (CASAFE, 2015).

Cnesterodon decemmaculatus (Cyprinodontiformes, Poeciliidae) is an endemic species for Argentina with an extensive distribution in Neotropical America. This is a small ovoviviparous, micro-omnivorous, benthic-pelagic and non-migratory fish (maximum size is approximately 25 mm for males and 45 mm for females), and it is often present in high-density in watercourses. It has an extensive distribution in the La Plata River and other South American basins (for review, see (Soloneski and Larramendy, 2017)). In addition, this species is easy to handle and acclimate to laboratory conditions, and they comply to the conditions requested for toxicity testing, such as a large range of tolerance to many environmental parameters (Di Marzio et al., 2005; de la Torre et al., 2007; Ruiz de Arcaute et al., 2014b, 2016; Vera-Candiotti et al., 2015). The species has been employed as a suitable *in vivo* model to analyse pesticide-induced toxicity among aquatic vertebrates. Some of the tested chemicals include the following: chlorpyrifos-based insecticides Lorsban 48E[®] and CPF Zamba[®] (Vera-Candiotti et al., 2014), the pirimicarb-based insecticides Aficida[®] (Vera-Candiotti et al., 2010) and Patton Flow[®] (Vera-Candiotti et al., 2015), the paraquat-based herbicide Osaquat[®] (Di Marzio et al., 1998), the glyphosate-based herbicides Credit[®] and Panzer[®] (Vera-Candiotti et al., 2013), the DIC-based herbicide Banvel[®] (Ruiz de Arcaute et al., 2014b) and the 2,4-D-formulated product DMA[®] (Ruiz de Arcaute et al., 2016).

Although detailed testing has been undertaken in terms of *C. decemmaculatus* exposed to individual chemicals (as cited above), no analyses have been completed on the toxic effects exerted when *C. decemmaculatus* is exposed simultaneously to the DIC-based formulation Banvel[®] and the 2,4-D-formulated product DMA[®]. This includes possible synergistic, antagonistic or additive patterns. In the present study, we evaluated the acute toxicity and interactions of equitoxic and non-equitoxic binary mixtures of the commercial herbicide formulations Banvel[®] (57.71% DIC) and DMA[®] (58.4% 2,4-D) on *C. decemmaculatus* exposed under laboratory conditions using a semi-static acute experimental model.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

The DIC-based (3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid; CAS 1918-00-9) formulation Banvel[®] (57.7% DIC) was obtained from Syngenta Agro S.A. (Argentina). The 2,4-D-based (2,4-dichlorophenoxyacetic acid, CAS 2008-39-1) formulation DMA[®] (58.4% 2,4-D) was obtained from Dow Agrosiences Argentina S.A., Argentina. K₂Cr₂O₇ [Cr(VI); CAS 7778-50-9] was obtained from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Chemicals and solvents of analytical grade were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

2.2. Quality control

DIC and 2,4-D concentrations in test solutions were determined by QV Chem Laboratory (La Plata, Buenos Aires, Argentina) using high-performance liquid chromatography and an ultraviolet detector, following the U.S. Geological Survey Report 01-4134 (Furlong et al., 2011). Active ingredient samples from test solutions (0.25 TU for Banvel[®] and DMA[®], which is equivalent to 410 mg/L of Banvel[®] and 252 mg/L of DMA[®]) corresponded to values obtained immediately after preparation (0 h) and after 24 h. The detection limit of the active ingredients was 0.5 mg/L for both herbicide

formulations.

2.3. Test organism

C. decemmaculatus specimens were collected from a permanent pond near La Plata city (34°86'S, 58°12'W, Buenos Aires Province, Argentina). After collection, they were acclimatised for 20 days under laboratory conditions (16/8 h light/dark cycle; 20 ± 1 °C with dechlorinated tap water [pH 7.55 ± 0.1 ; dissolved oxygen, 6.3 ± 0.3 mg/L; ammonium (NH_4^+) < 0.2 mg/L; hardness, 143 ± 23.5 mg CaCO_3 /L]) following the recommendation of the USEPA (1996) and other recommendations specifically reported for the species (Menni, 2004; Somma et al., 2011). Artificial aeration and *ad libitum* fish food (TetraFin[®], TetraWerke, Melle, Germany) were provided until the beginning of the experimental protocols. The average body weight and mean body length of the specimens used throughout the experiment was 0.25 ± 0.1 g and 28.5 ± 2.3 mm, respectively. Fish were maintained following the recommendations of the Argentinean National Service for Sanitary and Quality of Agriculture and Food (SENASA) guidelines 617/2002 for biological testing (2013). Specimens were collected with the permission of the Flora and Fauna Direction from the Buenos Aires Province (Buenos Aires, Argentina) (code 22500-22339/13) and the ethical committee from the National University of La Plata (code 11/N754).

2.4. Acute toxicity of binary mixtures of DIC- and 2,4-D-based formulations

The acute toxicities of commercial formulations of DIC and 2,4-D were determined in previous experiments assayed in our laboratory (Ruiz de Arcaute et al., 2014b, 2016). The reported $\text{LC}_{50\ 96\text{h}}$ was 1639 mg/L (1,471 mg/L –1808 mg/L) for DIC and 1008 mg/L (929 mg/L –1070 mg/L) for 2,4-D (Ruiz de Arcaute et al., 2014b, 2016).

For both equitoxic and non-equitoxic herbicide mixtures, toxicity was estimated as suggested by Warne (2003). Accordingly, a toxic unit (TU) was arbitrarily assigned to the concentration of the pesticide that was able to induce 50% mortality in *C. decemmaculatus* after 96 h of exposure (that is, the $\text{LC}_{50\ 96\text{h}}$ value). The toxicity was evaluated for mixtures of DIC-based herbicide formulation Banvel[®] and 2,4-D-based formulation DMA[®]. The lethal effect was determined every 24 h in three independent experiments that were run simultaneously for each experimental point.

2.4.1. Acute toxicity of equitoxic binary mixtures of DIC- and 2,4-D-based formulations

For equitoxic mixtures, herbicide formulations were combined in equal concentrations to generate mixtures for which the sum of the TU of both components equalled 0.125, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 and 4 units, as suggested elsewhere (Warne, 2003; Brodeur et al., 2014, 2016). For example, if the test pesticide mixture had a value of 1 TU, it was comprised of 0.5 TUs of DIC-based herbicide formulation Banvel[®] (50% of the $\text{LC}_{50\ 96\text{h}}$) and 0.5 TUs of 2,4-D-based formulation DMA[®] (50% of the $\text{LC}_{50\ 96\text{h}}$). Experiments were performed according to standardised methods recommended by the USEPA (1975, 1982, 2002), with minor modifications reported previously for native species (Pérez-Iglesias et al., 2015; Vera-Candioti et al., 2015; Ruiz de Arcaute et al., 2016). For each experimental point, 10 randomly selected specimens were maintained in a 1 L glass container and exposed to the nine herbicide mixtures for 96 h. A negative control (dechlorinated tap water; pH 7.5 ± 0.1 ; hardness, 143 ± 23.5 mg CaCO_3 /L) was run simultaneously with the exposed organisms. The test solutions were prepared and replaced

every 24 h. Fish were not fed during the experiment. Mortality was registered by visual observation every 24 h. The TU response relationship was derived, and it was used to determine the TU value that caused 50% of mortality (TU_{50}) for each experimental point.

2.4.2. Acute toxicity of non-equitoxic binary mixtures of DIC- and 2,4-D-based formulations

For non-equitoxic mixtures, a series of four experimental protocols were conducted following the recommendations of Warne (2003) and Brodeur et al., (2014, 2016). Each series included five fish in the exposed group. In two of the experimental series, the concentration of DIC-based herbicide formulation Banvel[®] was remained constant at 0.33 TUs or 0.66 TUs, while the concentration of 2,4-D-based formulation DMA[®] was either 0.01, 0.05, 0.1, 1 or 2 TUs. In the other two series, the concentration of 2,4-D-based formulation DMA[®] was set at 0.33 or 0.66 TUs, while the concentration of DIC-based herbicide formulation Banvel[®] was either 0.01, 0.05, 0.1, 1 or 2 TUs. Fish were exposed to these pesticide mixtures for 96 h according to the experimental protocol described above for acute toxicity of equitoxic binary mixtures (See section 2.4.1). A negative control (dechlorinated tap water; pH 7.5 ± 0.1 ; hardness, 143 ± 23.5 mg CaCO_3 /L) was run simultaneously with the pesticide-exposed organisms. The TU response relationship was used to determine the TU value that caused 50% of mortality (TU_{50}) for each experimental point.

2.5. Statistical analyses

The concentrations of herbicides and the TU of the mixtures that caused mortality of 50% of specimens were calculated by fitting a four-parameter logistic regression equation to the survival data using the GraphPad Prism software version 6. The level of significance was 0.05 for all tests.

3. Results

3.1. Chemical analysis

No significant changes ($p > .05$) were observed in the concentration of the pure analyte in treatments during the 24 h interval renewals of the testing solutions (concentration range $97\% \pm 5\%$ recovery). Concentrations assessed throughout the experiment corresponded to the nominal concentrations of the analyte present within the DIC-based formulation Banvel[®] and 2,4-D-based formulation DMA[®].

Table 1

Lethal effects of equitoxic binary mixtures of dicamba (DIC)-based Banvel[®] and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-based DMA[®] commercial formulations on exposed *Cnesterodon decemmaculatus*.

Concentration (TUs) ^a	Number of individuals	Mortality (number of dead individuals)			
		24 h	48 h	72 h	96 h
Negative control	30	0	0	0	0
DIC 2,4-D					
0.0625 0.0625	30	0	0	0	1
0.125 0.125	30	1	1	2	3
0.25 0.25	30	1	1	2	2
0.5 0.5	30	2	4	9	14
0.75 0.75	30	4	23	28	28
1 1	30	2	27	30	30
1.25 1.25	30	12	30	30	30
1.5 1.5	30	30	30	30	30
2 2	30	30	30	30	30

^a Toxic unit (TU), concentration of individual pesticide that causes 50% mortality.

3.2. Acute toxicity of equitoxic binary mixtures of DIC- and 2,4-D-based formulations

Data of mortality are presented in Table 1. Survival of the negative control group was 100%. Mortality results allowed for the determination of TUs of the equitoxic mixtures of DIC-based formulation Banvel® and 2,4-D-based formulation DMA® that caused mortality in 50% of the exposed fish. Results revealed a mean value of 1.02 (0.96–1.08) for the $TU_{50\ 96h}$ of the binary equitoxic mixtures of the commercial formulations Banvel® and DMA® (Fig. 1).

3.3. Acute toxicity of non-equitoxic binary mixtures of DIC- and 2,4-D-based formulations

Complete data of mortality are presented in Table 2 for non-equitoxic mixtures of the formulations Banvel® and DMA®. Survival of the negative control group was 100%. Mortality results allowed for the determination of the TUs of the non-equitoxic mixtures that caused mortality in 50% of the exposed fish. The isobologram shown in Fig. 2 summarises data obtained for the series of non-equitoxic mixtures of the commercial formulations Banvel® and DMA®. The diagonal isobole linking the values of 1 TU on both the x- and y-axes correspond to the line effect of a concentration addition. The isobologram clearly demonstrates that combinations of chemicals that cause 50% mortality are below and to the left of the additivity line in the figure. Thus, results demonstrated a synergistic interaction for non-equitoxic combinations of herbicides Banvel® and DMA® (Fig. 2).

Results demonstrate that DIC-based formulation Banvel®-induced toxicity either at a concentration of 0.33 or 0.66 TUs was synergised by the presence of 2,4-D-based formulation DMA® within the mixtures (Fig. 2). Fig. 2 highlights that 0.33 TUs of DIC requires 0.19 (0.10–0.38) TUs of 2,4-D to induce the same toxic effect as when 0.66 TUs was mixed with 0.23 (0.11–0.48) TUs of 2,4-D.

In addition, 2,4-D-based formulation DMA®-induced toxicity was also synergised when mixed with DIC-based formulation Banvel® regardless of whether 0.33 or 0.66 TUs were assayed (Fig. 2). Results demonstrated that 0.33 and 0.66 TUs of 2,4-D required 0.13 (0.04–0.45) and 0.23 (0.13–0.40) TUs of DIC to reach 50% mortality.

Overall, the results also demonstrated that the toxicity exerted by 0.33 TUs of each formulation was slightly higher than the

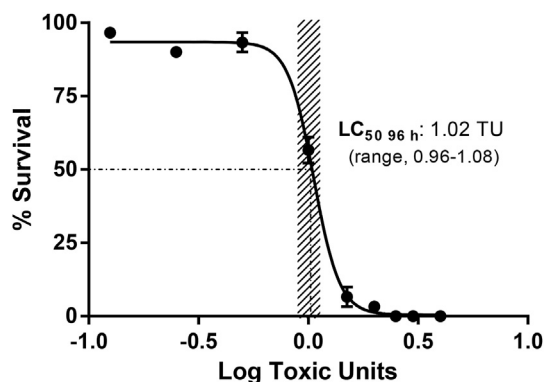


Fig. 1. Survival as a function of the sum of the toxic units (TUs) of equitoxic mixtures of dicamba-based formulation Banvel® and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-based formulation DMA® in *C. decemmaculatus* after 96 h of exposure. The TU value of the mixture that induces 50% mortality ($LC_{50\ 96h}$) is indicated with the 95% confidence in parenthesis. The striped area depicts the “Additivity Zone”.

Table 2

Lethal effects of non-equitoxic binary mixtures of dicamba (DIC)-based Banvel® and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-based DMA® on exposed *Cnesterodon decemmaculatus*.

Concentration (TUs) ^a			Number of individuals	Mortality (number of dead individuals)			
				24 h	48 h	72 h	96 h
Negative control			30	0	0	0	0
DIC	2,4-D	30					
0.33	0.01	30		0	5	6	8
0.33	0.05	30		0	1	4	8
0.33	0.1	30		1	6	7	8
0.33	0.5	30		4	10	12	16
0.33	1	30		6	15	30	30
0.33	2	30		30	30	30	30
0.66	0.01	30		1	3	6	8
0.66	0.05	30		1	4	6	8
0.66	0.1	30		1	3	5	9
0.66	0.5	30		5	9	12	15
0.66	1	30		5	14	22	22
0.66	2	30		30	30	30	30
2,4-D	DIC	30					
0.33	0.01	30		2	6	8	9
0.33	0.05	30		7	8	10	10
0.33	0.1	30		1	6	8	10
0.33	0.5	30		2	8	9	12
0.33	1	30		7	8	15	24
0.33	2	30		16	27	30	30
0.66	0.01	30		1	2	3	5
0.66	0.05	30		3	4	5	6
0.66	0.1	30		4	6	8	10
0.66	0.5	30		4	6	11	14
0.66	1	30		8	11	23	28
0.66	2	30		27	30	30	30

^a Toxic unit (TU), concentration of individual pesticide that causes 50% mortality.

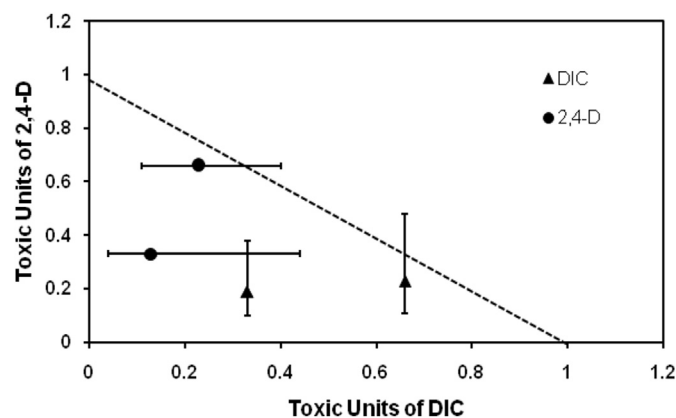


Fig. 2. Isobologram depicting the toxic units (TUs) of non-equitoxic mixtures of dicamba-based formulation Banvel® and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-based formulation DMA® that cause 50% mortality (TU_{50}) in *C. decemmaculatus* after 96 h of exposure. The error bars from each experimental value represent 95% confidence intervals. The isobole linking the 1-TU values from both axes is the line of concentration addition.

toxicity exerted by 0.66 TUs during testing within mixtures (Fig. 2).

4. Discussion

We analysed the possible toxic interactions—that is, synergy, antagonism or additivity—prevailing in equitoxic and non-equitoxic binary mixtures between two herbicide formulations, the DIC-based Banvel® and the 2,4-D-based DMA®. The target

organism, *C. decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae), was exposed under laboratory conditions using a semi-static acute experimental model for toxicity testing (USEPA, 1975, 2002; IRAM, 2008).

Years ago, we used *C. decemmaculatus* as a test species to assess the lethal toxicity of different agrochemical commercial formulations of auxinic herbicides DIC and 2,4-D (Ruiz de Arcaute et al., 2014b, 2016). In these studies, Ruiz de Arcaute (2014b, 2016) analysed the lethality and evaluated the micronuclei frequency and the induction of DNA single-strand breaks by comet assay after an acute exposure to the herbicides.

In the current study, the toxicity of the herbicide mixture was estimated following the protocol described by Warne (2003) in which the TU model was used. According to Warne (2003), a classical toxicity test when analysing equitoxic mixtures should be performed using the method as if a single toxicant is being tested (for example, determination of 50% mortality). However, the toxicity and the concentration of the test solution of the equitoxic mixture—that is, factor *S*—are expressed in terms of the TU; *S* is equivalent to the sum of the individual TU values of each toxicant in the mixture (Warne, 2003). In these type of experiments, it has been recommended that at least five different experimental treatments be performed: two treatments possessing *S* values greater than 1, one treatment having an *S* value equal to 1, and two treatments with an *S* value less than 1. Varying upon the results, whether the selected effect *S* is equal to 1, the equitoxic mixture should be considered as concentration additive. However, if *S* is less than or greater than 1, the mixture should be considered to be synergistic or antagonistic, respectively (Warne, 2003).

In current agricultural practice, the simultaneous application of a mixture of agrochemical is common worldwide. Accordingly, mixtures of agrochemicals should be considered as an additional important group of environmental contaminants. In agreement with this concept, there has been an increase in recent years in the number of published reports that evaluate joint toxic and genotoxic effects exerted by mixtures of pesticides. In this regard, a slight synergism has been reported for the toxicity to the water flea *Ceriodaphnia dubia* and the fathead minnow fish *Pimephales promelas* following exposure to glyphosate in combination with imazapir, triclopyr and a modified vegetable oil surfactant (Tatum et al., 2012). Likewise, the effects of a binary mixture of glyphosate and dimethoate were evaluated in the earthworm *Eisenia andrei*, the isopod *Porcellionides pruinosus* and in seeds of the field mustard *Brassica rapa* (Santos et al., 2011). Santos et al. (2011) reported an equivalent synergistic effect at enzymatic levels when invertebrates were exposed to 5- and 10-times the field concentration. When seeds of *B. rapa* were used as the biotic matrix for studying germination capacity, a similar synergistic pattern was observed when realistic binary mix concentration was assayed, but an antagonistic effect at 5- and 10-times the field concentration (Santos et al., 2011). Similarly, a synergistic impact has been reported in the honey bee *Apis mellifera* following exposure to imidacloprid alone and in different binary mixtures with seven other agrochemicals (Zhu et al., 2017), and joint toxicity effects have been reported in the zebrafish *Danio rerio* following exposure to chlorpyrifos and beta-cypermethrin (Zhang et al., 2017). Furthermore, we have recently demonstrated a synergistic pattern for a mixture of glyphosate- and DIC-formulations in introducing primary DNA breaks on circulating blood cells of South American common toad *Rhinella arenarum* tadpoles (Soloneski et al., 2016).

So far, this report constitutes the first study analysing the interactions exerted by a binary mixture of two auxinic herbicides—namely DIC and 2,4-D, which are two of the most used auxinic herbicides worldwide—on the Neotropical fish *C. decemmaculatus*. We observed a mean TU₅₀ value of 1.02 (0.96–1.08) for the binary equitoxic mixture of DIC-based formulation Banvel® and 2,4-D-

based formulation DMA®. Taking into account that this TU₅₀ value is close to 1, it could be suggested that the formulation we analysed exerts an additive interaction for the binary mixtures of DIC and 2,4-D.

Although the *in vivo* treatments in this study covered a wide range of concentrations, the lowest concentration of DIC and 2,4-D assayed was 0.01 TU in non-equitoxic combinations. These values correspond to 17.07 mg/L and 10.08 mg/L for DIC and 2,4-D, respectively. However, these values constitute a relatively high end of the threshold values reported in other countries—that is, 2.1 µg/L of DIC in surface runoff water and 24 µg/L of 2,4-D in surface waters in the United States (Phillips and Bode, 2004; Tagert et al., 2014), and application rates of 1500 cm³/hL for DIC and 3.5 L/ha for 2,4-D in Argentina (CASAFE, 2015). Thus, the concentrations of both herbicides used in this investigation would be expected to be almost improbable in the environment, perhaps only been observed when specific events occurred (for example, direct application or by accidental discharge). Nevertheless, we cannot rule out that piscine populations, and also occupationally exposed human workers, could be exposed accidentally to these agrochemicals at this range of concentrations.

According to the experimental design used in the present study, the determination of the TU_{50 96h} is achieved when only one equitoxic mixture is able to induce mortality of 50% in the exposed organism. However, when non-equitoxic mixtures are assayed, and in agreement with the suggestions of Warne (2003), the type of toxicological interaction prevailing in the binary mixture results from at least four independent experimental observations. Thus, it seems evident that conclusions drawn from the latter should be considered more robust and even more representative of the real situation taking place when two agrochemicals are applied together to an exposed population or organism.

When non-equitoxic combinations of the herbicides were analysed to assess the potential toxicity of the binary herbicide mixtures, our observations demonstrated the occurrence of synergistic interactions in all four non-equitoxic combinations of DIC-based formulation Banvel® and 2,4-D-based formulation DMA®. Accordingly, these results suggest that the DIC-based and 2,4-D-based formulation mixtures are more toxic when applied in non-equitoxic combinations compared to the sum of their individual toxicities.

As previously stated, the effect of mixtures of pesticides has been analysed by several studies. However, to the best of our knowledge, only two of those studies have been based on the same experimental design used by our laboratory and described by Warne (2003). Brodeur et al. (2014, 2016) assayed binary mixtures of glyphosate- and cypermethrin-based formulations in *R. arenarum* and in *C. decemmaculatus*. The results clearly demonstrated opposite effects depending upon the species employed. For *R. arenarum*, the mixture of glyphosate and cypermethrin had synergic effects; in contrast, for *C. decemmaculatus*, an antagonistic effect was achieved by inhibition of the cypermethrin toxicity by the former.

In the present study, a DIC-based herbicide containing 57.7% of the active ingredient within the formulation Banvel® and a 2,4-D-based herbicide containing 58.4% of the active ingredient within the formulation DMA® were assayed. Years ago, the USEPA (1982) claimed that the toxicity of an active ingredient can differ significantly from that of the formulation carrying that active ingredient. It is known that the additive compounds present in pesticide commercial formulations have the capability to exert toxicity and cellular damage by themselves rather than that of the active principle ingredient (Mann and Bidwell, 1999; Grisolia et al., 2004; Soloneski et al., 2007; Belden et al., 2010; Soloneski and Larramendy, 2010; Brühl et al., 2013; Nikoloff et al., 2014a; Pérez-

Iglesias et al., 2014; Ruiz de Arcaute et al., 2014a). Unfortunately, the identities of the additive compounds present in the commercial formulations Banvel® and DMA® were not made available to us by the manufacturers. It should be mentioned that according to our Argentinean administration, the excipients present in any agrochemical are not required to be listed on the agrochemical data sheet and can be kept as a “trade secret.” Accordingly, caution should be taken with the concept of the binary mixtures of the two commercial formulations we assayed. In the strictest sense, the mixtures we tested throughout the current study represent a much more complex scenario because they involved herbicide formulations, which, as we know, are mixtures of several components by themselves. Furthermore, and extending this concept, we cannot assume that the proportion of each constituent in the mixtures we used follow the same or a similar profile in an environmental aquatic system as the components of the formulations can suffer different transformation or degradation patterns in the environment. Thus, different patterns of occurrence in the water matrix could be produced diverging from that we tested. Further studies are required to reveal whether the pattern of toxicity exerted by the mixtures of Banvel® and DMA® on the *C. decemmaculatus* we observed is attributable to the active ingredients by themselves or results from the presence of xenobiotic(s) within the technical formulation assayed in our study.

Our study represents the first evidence of the lethality exerted by a mixture of two auxinic herbicides (namely, DIC and 2,4-D) reported to date, not only for the fish *C. decemmaculatus*, but also for other biotic matrices. Results of the equitoxic combinations of both herbicides could indicate that under this situation, the mixture could cause an additive interaction. However, results demonstrated the occurrence of a synergistic interaction when non-equitoxic combinations of Banvel®- or DMA®-formulated herbicides were assayed. In this context and regardless of their concentration, either DIC- or 2,4-D-induced toxicity were synergised by the presence of the counterpart within mixtures.

Taking into account the previous studies published by Brodeur et al. (2014, 2016) in which opposite results, namely antagonism or synergism, varied based on the target, further studies are required to corroborate whether the synergic effect we observed in *C. decemmaculatus* is a general effect exerted by the mixture regardless of the target organism.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors acknowledge Julie C. Brodeur, Ph.D., for statistical support to analyse the raw data. Dicamba-based grade trade formulation Banvel® and 2,4-D-based grade trade formulation DMA® were kindly provided by Syngenta Agro S.A. and Dow Agrosciences Argentina S.A., from Argentina. This study was supported by grants from the National University of La Plata (Grants 11/N746 and 11/N817), the National Council for Scientific and Technological Research (CONICET, PIP N° 0344) and the National Agency of Scientific and Technological Promotion (PICT 2015 N° 3059) in Argentina.

References

- Aparicio, V.C., De Geronimo, E., Marino, D., Primost, J., Carriguirborde, P., Costa, J.L., 2013. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere* 93, 1866–1873.
- Belden, J., McMurry, S., Smith, L., Reilley, P., 2010. Acute toxicity of fungicide formulations to amphibians at environmentally relevant concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 2477–2480.
- Brodeur, J.C., Melpel, S., Anglesio, A.B., Cristos, D., D'Andrea, M.A., Poliserpi, M.B., 2016. Toxicities of glyphosate- and cypermethrin-based pesticides are antagonistic in the tenspotted livebearer fish (*Cnesterodon decemmaculatus*). *Chemosphere* 155, 429–435.
- Brodeur, J.C., Poliserpi, M.B., D'Andrea, M.F., Sanchez, M., 2014. Synergy between glyphosate- and cypermethrin-based pesticides during acute exposures in tadpoles of the common South American Toad *Rhinella arenarum*. *Chemosphere* 112, 70–76.
- Brühl, C.A., Schmidt, T., Pieper, S., Alscher, A., 2013. Terrestrial pesticide exposure of amphibians: an underestimated cause of global decline? *Sci. Rep.* 3, 1–4.
- Calabrese, E.J., 1995. Toxicological consequences of multiple chemical interactions: a primer. *Toxicology* 105, 121–135.
- Calamari, D., Alabaster, J.S., 1980. An approach to theoretical models in evaluating the effects of mixtures of toxicants in the aquatic environment. *Chemosphere* 9, 533–538.
- CASAFE, 2009. La Argentina 2050. La revolución tecnológica del agro. Hacia el desarrollo integral de nuestra sociedad. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes, 744 pp.
- CASAFE, 2015. Guía de Productos Fitosanitarios para la República Argentina. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes, 1200 pp.
- Cox, C., Sorgan, M., 2006. Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. *Environ. Health Perspect.* 114, 1803–1806.
- de la Torre, F.R., Salibián, A., Ferrari, L., 2007. Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish. *Chemosphere* 68, 1582–1590.
- Di Marzio, W.D., Alberdi, J.L., Sáenz, M.E., Tortorelli, M.D.C., 1998. Effects of paraquat (Osaquat® formulation) on survival and total cholinesterase activity in male and female adults of (Pisces, Poeciliidae). *Environ. Toxicol. Water Qual.* 13, 55–59.
- Di Marzio, W.D., Sáenz, M., Alberdi, J., Tortorelli, M., Galassi, S., 2005. Risk assessment of domestic and industrial effluents unloaded into a freshwater environment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 380–391.
- Donald, D.B., Cessna, A.J., Sverko, E., Glozier, N.E., 2007. Pesticides in surface drinking-water supplies of the northern Great Plains. *Environ. Health Perspect.* 115.
- Félix-Cañedo, T.E., Durán-Álvarez, J.C., Jiménez-Cisneros, B., 2013. The occurrence and distribution of a group of organic micropollutants in Mexico City's water sources. *Sci. Total Environ.* 454–455, 109–118.
- Furlong, E.T., Anderson, B.D., Werner, S.L., Soliven, P.P., Coffey, L.J., Burkhardt, M.R., 2011. Methods of analysis but the US geological survey national water quality laboratory – determination of pesticides in water by graphitized carbon-based solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. US Geological Survey Water Resources Investigations Report 01–4134, 73.
- Garraway, J.L., Wain, R.L., 1976. The design of auxin-type herbicides. In: Ariën, E.J. (Ed.), *Drug Design*. Academic Press, New York, pp. 115–164.
- Ge, H., Lin, Z., Yao, Z., Gao, Z., Cong, Y., Yu, H., 2014. Balance between herbicidal activity and toxicity effect: a case study of the joint effects of triazine and phenylurea herbicides on *Selenastrum capricornutum* and *Photobacterium phosphoreum*. *Aquat. Toxicol.* 150, 165–174.
- Glozier, N.E., Struger, J., Cessna, A.J., Gledhill, M., Roundeau, M., Ernst, W.R., Sekela, M.A., Cagampan, S.J., Sverko, E., Murphi, C., Murray, J.L., Donald, D.B., 2012. Occurrence of glyphosate and acidic herbicides in select urban rivers and streams in Canada, 2007. *Environ. Sci. Pollut. Control Ser.* 19, 821–834.
- Grisolia, C.K., Bilich, M.R., Formigli, L.M., 2004. A comparative toxicologic and genotoxic study of the herbicide arsenal, its active ingredient imazapyr, and the surfactant nonylphenol ethoxylate. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59, 123–126.
- Grossmann, K., 2003. Mediation of herbicide effects by hormone interactions. *J. Plant Growth Regul.* 22, 109–122.
- IARC, 2015. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Some Organochlorine Insecticides and Some Chlorophenoxy Herbicides. International Agency for Research on Cancer, Lyon.
- Ippolito, A., Kattwinkel, M., Rasmussen, J.J., Schafer, R.B., Fornaroli, R., Liess, M., 2015. Modeling global distribution of agricultural insecticides in surface waters. *Environ. Pollut.* 198, 54–60.
- IRAM, 2008. Calidad ambiental-Calidad del agua. Determinación de la toxicidad letal aguda de sustancias de peces de agua dulce. Métodos semiestático. Instituto Argentino de Normalización y Certificación, Buenos Aires, Argentina, 23 pp.
- LeBlanc, G.A., Wang, G., 2006. Chemical mixtures: greater-than-additive effects? *Environ. Health Perspect.* 114, A517–A518.
- Li, J., Li, Y., Lu, J., 2009. Adsorption of herbicides 2,4-D and acetochlor in inorganic-organic bentonites. *Appl. Clay Sci.* 46, 314–318.
- Liang, H.C., Razaviarani, V., Buchanan, I., 2013. Pesticides and herbicides. *Water Environ. Res.* 85, 1601–1645.
- Liaud, C., Brucher, M., Schummer, C., Coscolla, C., Wolff, H., Schwartz, J., Yusa, V., Millet, M., 2016. Utilization of long duration high-volume sampling coupled to SPME-GC-MS/MS for the assessment of airborne pesticides variability in an urban area (Strasbourg, France) during agricultural applications. *J. Environ. Sci. Health* 51, 703–714.
- Loos, R., Locoro, G., Comero, S., Contini, S., Schwesig, D., Werres, F., Balsaa, P., Gans, O., Weiss, S., Blaha, L., Bolchi, M., Gawlik, B.M., 2010. Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. *Water Res.* 44, 4115–4126.
- Lydy, M., Belden, J., Wheelock, C., Hammock, B., Denton, D., 2004. Challenges in regulating pesticide mixtures. *Ecol. Soc.* 9, 1–13.

- Mann, R.M., Bidwell, J.R., 1999. The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 193–199.
- Meffe, R., de Bustamante, I., 2014. Emerging organic contaminants in surface water and groundwater: a first overview of the situation in Italy. *Sci. Total Environ.* 481, 280–295.
- Menni, R., 2004. Peces y ambientes en la Argentina continental. *Monogr. del Mus. Argent. Ciencias Nat.* 5, 1–323.
- NCBI, 2017. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=1486. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1486>. Last accessed May, 2017.
- Nikoloff, N., Larramendy, M.L., Soloneski, S., 2014a. Comparative evaluation of the *in vitro* micronucleus and comet assay for evaluation of fluorochloridone-induced genotoxicity. *Environ. Toxicol.* 29, 884–892.
- Nikoloff, N., Natale, G.S., Marino, D., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2014b. Fluorochloridone-based herbicides induced genotoxicity effects on *Rhinella arenarum* tadpoles (Anura: Bufonidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 100, 275–281.
- Pérez-Iglesias, J.M., Ruiz de Arcaute, C., Nikoloff, N., Dury, L., Soloneski, S., Natale, G.S., Larramendy, M.L., 2014. The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation Glacoxan Imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 104, 120–126.
- Pérez-Iglesias, J.M., Soloneski, S., Nikoloff, N., Natale, G.S., M L, 2015. Toxic and genotoxic effects of the imazethapyr-based herbicide formulation Pivot H[®] on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 119, 15–24.
- Phillips, P.J., Bode, R.B., 2004. Pesticides in surface water runoff in south-eastern New York State, USA: seasonal and stormflow effects on concentrations. *Pest Manag. Sci.* 60, 531–543.
- Ruiz de Arcaute, C., Pérez-Iglesias, J.M., Nikoloff, N., Natale, G.S., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2014a. Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. *Ecol. Indic.* 45, 632–639.
- Ruiz de Arcaute, C., Soloneski, S., Larramendy, M., 2014b. Evaluation of the genotoxicity of a herbicide formulation containing 3,6-dichloro-2-metoxibenzoic acid (dicamba) in circulating blood cells of the tropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. *Mutat. Res.* 773, 1–8.
- Ruiz de Arcaute, C., Soloneski, S., Larramendy, M., 2016. Toxic and genotoxic effects of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-based herbicide on the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 128, 222–229.
- Santos, M.J., Morgado, R., Ferreira, N.G., Soares, A.M., Loureiro, S., 2011. Evaluation of the joint effect of glyphosate and dimethoate using a small-scale terrestrial ecosystem. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 1994–2001.
- SENASA, 2013. Argentinean National Service for Sanitary and Quality of Agriculture and Food. <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=n&in=1506&io=18122>.
- SENASA, 2017. Argentinean National Service for Sanitary and Quality of Agriculture and Food. www.senasa.gov.ar/informacion/prod-vet-fito-y-fertilizantes/prod-fitosanitarios-y-fertili/registro-nacional-de-terapeutica-vegetal. Last accessed May, 2017.
- Silva, A.R., Cardoso, D.N., Cruz, A., Lourenco, J., Mendo, S., Soares, A.M., Loureiro, S., 2015. Ecotoxicity and genotoxicity of a binary combination of triclosan and carbendazim to *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 115, 279–290.
- Soloneski, S., González, N.V., Reigosa, M.A., Larramendy, M.L., 2007. Herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-induced cytogenetic damage in human lymphocytes *in vitro* in presence of erythrocytes. *Cell Biol. Int.* 31, 1316–1322.
- Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2010. Sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells treated with insecticide pirimicarb. *J. Hazard Mater.* 174, 410–415.
- Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2017. In: Larramendy, M.L. (Ed.), The Use of the Ten Spotted Live-bearer Fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Pisces, Poeciliidae) in the Genotoxic Evaluation of Environmental Pollutants. *Ecotoxicology and Genotoxicology - Non-traditional Aquatic Models*, Cambridge, pp. 327–344.
- Soloneski, S., Ruiz de Arcaute, C., Larramendy, M.L., 2016. Genotoxic effect of a binary mixture of dicamba- and glyphosate-based commercial herbicide formulations on *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) (Anura, Bufonidae) late-stage larvae. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 23, 17811–17821.
- Somma, A., Mastrangelo, M., Ferrari, L., 2011. Manual de producción de *Cnesterodon decemmaculatus* en laboratorio. Editorial Utopías, Buenos Aires.
- Svartz, G.V., Aronzon, C.M., Perez Coll, C.S., 2016. Combined endosulfan and cypermethrin-induced toxicity to embryo-larval development of *Rhinella arenarum*. *J. Toxicol. Environ. Health* 79, 197–209.
- Tagert, M.L.M., Massey, J.H., Shaw, D.R., 2014. Water quality survey of Mississippi's Upper Pearl river. *Sci. Total Environ.* 481, 564–573.
- Tatum, V.L., Borton, D.L., Streblov, W.R., Louch, J., Shepard, J.P., 2012. Acute toxicity of commonly used forestry herbicide mixtures to *Ceriodaphnia dubia* and *Pimephales promelas*. *Environ. Toxicol.* 27, 671–684.
- Tierney, K.B., Sekela, M.A., Cobbler, C.E., Xhabija, B., Gledhill, M., Ananvoranich, S., Zielinski, B.S., 2011. Evidence for behavioural preference toward environmental concentrations of urban-use herbicides in a model adult fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 2046–2054.
- USEPA, 1974. United States Environmental Protection Agency. Compendium of Registered Pesticides U.S. Government Printing Office, Washington, DC.
- USEPA, 1975. Methods for Acute Toxicity Tests with Fish, Macroinvertebrates, and Amphibians. U.S. Government Printing Office, Washington, DC, 660/3-75-009, 62.
- USEPA, 1982. Pesticide Assessment Guidelines Subdivision E. Hazard Evaluation: Wildlife and Aquatic Organisms. United States Environmental Protection Agency, Washington DC. EPA-540/9-82-024.
- USEPA, 1996. United States Environmental Protection Agency. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.1075. Fish Acute Toxicity Test, Freshwater and Marine.
- USEPA, 2002. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms, fifth ed. U.S. Government Printing Office, Washington, DC. 821-R-02–012.
- USEPA, 2006. Reregistration Eligibility Decision for Dicamba and Associated Salts. USEPA. www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/dicamba_red.pdf.
- USEPA, 2008. Technical Overview of Ecological Risk Assessment - Analysis Phase: Ecological Effects Characterization. United States Environmental Protection Agency, Washington DC. <https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/technical-overview-ecological-risk-assessment-0>. Last accessed September, 2017.
- USEPA, 2017. ECOTOX Knowledgebase. United States Environmental Protection Agency, Washington DC. <https://cfpub.epa.gov/ecotox/>. Last accessed September, 2017.
- Varona-Urbe, M.E., Torres-Rey, C.H., Diaz-Criollo, S., Palma-Parra, R.M., Narvaez, D.M., Carmona, S.P., Briceño, L., Idrovo, A.J., 2016. Exposure to pesticide mixtures and DNA damage among rice field workers. *Arch. Environ. Occup. Health* 71, 3–9.
- Vera-Candiotti, J., Soloneski, S., Larramendy, M., 2015. Pirimicarb-based formulation induced genotoxicity and cytotoxicity on the fresh water fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Pisces, Poeciliidae). *Toxicol. Ind. Health* 31, 1051–1060.
- Vera-Candiotti, J., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2010. Genotoxicity and cytotoxic effects of the formulated insecticide Afcida[®] on *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842). *Mutat. Res.* 703, 180–186.
- Vera-Candiotti, J., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2013. Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of glyphosate-based herbicides in the ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 89, 166–173.
- Vera-Candiotti, J., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2014. Chlorpyrifos-based insecticides induced genotoxicity effects in the ten spotted live-bearer fish, *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842). *Environ. Toxicol.* 29, 1390–1398.
- Warne, M.S.J., 2003. A review of the ecotoxicity of mixtures, approaches to, and recommendations for, their management. In: Langley, A., Gibbey, M., Kennedy, B. (Eds.), Proceedings of the Fifth National Workshop on the Assessment of Site Contamination. National Environment Protection Council Service Corporation, Adelaide, Australia.
- WHO, 2009. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification: 2009. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 81 pp.
- Woudneh, M.B., Sekela, M., Tuominen, T., Gledhill, M., 2007. Acidic herbicides in surface waters of Lower Fraser Valley, British Columbia, Canada. *J. Chromatogr. A* 1139, 121–129.
- Zhang, J., Liu, L., Ren, L., Feng, W., Lv, P., Wu, W., Yan, Y., 2017. The single and joint toxicity effects of chlorpyrifos and beta-cypermethrin in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. *J. Hazard Mater.* 334, 121–113.
- Zhu, Y.C., Yao, J., Adamczyk, J., Luttrell, R., 2017. Synergistic toxicity and physiological impact of imidacloprid alone and binary mixtures with seven representative pesticides on honey bee (*Apis mellifera*). *PLoS One* 12, e0176837.



Genotoxicity by long-term exposure to the auxinic herbicides 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and dicamba on *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces: Poeciliidae)[☆]

Celeste Ruiz de Arcaute ^{a, b}, Marcelo L. Larramendy ^{a, b}, Sonia Soloneski ^{a, b, *}

^a Cátedra de Citología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Calle 64 N° 3, B1904AMA, La Plata, Argentina

^b Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 May 2018

Received in revised form

9 August 2018

Accepted 7 September 2018

Available online 8 September 2018

Keywords:

Dicamba-based formulation Banvel[®]

Long-term assay

2,4-D-based formulation DMA[®]

Sublethal effects

SCGE assay

ABSTRACT

Long-term genotoxic effects of two auxinic herbicide formulations, namely, the 58.4% 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-based DMA[®] and the 57.7% dicamba (DIC)-based Banvel[®] were evaluated on *Cnesterodon decemmaculatus*. Primary DNA lesions were analyzed by the single-cell gel electrophoresis methodology. Two sublethal concentrations were tested for each herbicide corresponding to 2.5% and 5% of the LC50_{96h} values. Accordingly, fish were exposed to 25.2 and 50.4 mg/L or 41 and 82 mg/L for 2,4-D and DIC, respectively. Fish were continuously exposed for 28 days with replacement of test solutions every 3 days. Genotoxicity was evaluated in ten individuals from each experimental point at the beginning of the exposure period (0 day) and at 7, 14, 21 and 28 days thereafter. Results demonstrated for first time that 2,4-D-based formulation DMA[®] induced primary DNA strand breaks after 7–28 days exposure on *C. decemmaculatus* regardless its concentration. On the other hand, DIC-based formulation Banvel[®] exerted its genotoxic effect after exposure during 7–14 days and 7 days of 2.5 and 5% LC50_{96h}, respectively. The present study represents the first evidence of primary DNA lesions induced by two widely employed auxinic herbicides on *C. decemmaculatus*, namely 2,4-D and DIC, following long-term exposure.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The increase in pollution due to the complexity of anthropized environments makes the analysis of aquatic environments a continuous challenge. The presence of pesticides and their detrimental consequences on aquatic biota has been largely documented (Larramendy, 2017). According to the Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, the worldwide production of formulated pesticides has been increasing continuously since the 1950's, where the herbicides were the chemical group that expanded the most, followed by insecticides and fungicides (FAO, 2017).

Auxinic compounds were the first selective herbicides developed. They are among the most employed pesticides, either alone

[☆] This paper has been recommended for acceptance by Dr. Harmon Sarah Michele.

* Corresponding author. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Calle 64 Nro. 3 (esq. 120), B1904AMA, La Plata, Argentina.

E-mail address: ssoloneski@yahoo.com.ar (S. Soloneski).

or in combination with other active ingredients, in commercial formulations. These herbicides mimic the properties of natural phytohormones. Among them, indole-3-acetic acid constitutes the most common class of auxins (USEPA, 2006). At low concentrations, these phytochemicals stimulate cell division and growth, whereas at higher concentrations they cause several growth abnormalities such as leaf epinasty, stem curvature, growth inhibition of root and shoot, foliar senescence and chloroplast damage with progressive chloroplast chlorosis, leading, consequently, to plant death (Grossmann, 2010). In spite of continuing to be an important group of agrochemicals, their molecular mechanism is not yet well characterized. In plants, these chemicals emulate the action of auxins mainly through manipulating the plant phytohormones responses (Gleason et al., 2011). However, no such mimicking of hormonal action has been reported in other living species (Osterloh et al., 1983).

Among the synthetic plant-growth regulators, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and dicamba (DIC; 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid) are two of the most applied herbicides worldwide, falling within the top ten agrochemicals in

Argentina (CASAFE, 2017), 2,4-D belongs to the phenoxy alkanic acid group of auxinic herbicides, whereas DIC is included in the benzoic acid chemical family (USEPA, 2005, 2006).

2,4-D has been classified by the World Health Organization (WHO) as a class II member (WHO, 2009) and it has been included in the category II-III by the United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA). Furthermore, the International Agency for Research on Cancer (IARC) recently ranked 2,4-D as a Group 2B member (2017). Since large amounts of this chemical are released into the environment daily, exposure of the general population and living species may result from the presence of 2,4-D through agricultural use, food products, or through its use for control of aquatic weeds and woody vegetation. As an example, the presence of 2,4-D through conifer release in forests and site preparation has been well demonstrated (USEPA, 2005). For drinking water, the maximum contaminant level of 70 µg 2,4-D/L was established by the U.S. EPA (USEPA, 2005). However, levels of 2,4-D have been detected in surface, ground and potable water supplies, with overall concentrations ranging from 0 to 14.4 µg/L (Loos et al., 2010; Glozier et al., 2012; Félix-Cañedo et al., 2013). In Argentina, only one study reports a 2,4-D concentration of 0.99 µg/L found in El Crespo River in Buenos Aires Province (Pérez et al., 2017). In aquatic environment, 2,4-D is most commonly found as free anion (Halter, 1980). In surface waters, 2,4-D half-lives varied widely, ranging from 7 to 21 days under aerobic conditions. However, under anaerobic conditions, it can exceed 120 days (USEPA, 2005). For soil, the half-life of 2,4-D has been reported to be between 7 and 13 days and it has a residuality of 1–4 weeks; thus, it is not considered to be a persistent chemical (USEPA, 2005).

Genotoxic properties of 2,4-D have been confirmed in several biotic matrices, *in vitro* and *in vivo*, including non-mammalian systems, mammalian and human cells, as well as occupationally-exposed humans (IARC, 2017). The genotoxic effect of 2,4-D has demonstrated the ability to induce chromosomal aberrations in mouse bone marrow and spermatogonial cells, human lymphocytes and kidney cells of fish *Channa punctatus* (Amer and Aly, 2001; Garaj-Vrhovac and Zeljezic, 2002; Farah et al., 2006), sister chromatid exchanges (SCEs) in CHO cells (Madrigal-Bujaidar et al., 2001; Arias, 2007; Soloneski et al., 2007), micronuclei formation in fish such as *Clarias batrachus* and *Cnesterodon decemmaculatus* (Ateeq et al., 2002; Ruiz de Arcaute et al., 2016), DNA damage evaluated by the single-cell gel electrophoresis (SCGE) assay in CHO-K1 and SHE cells, *in vitro* human lymphocytes, epithelioma papillosum cyprini (EPC) cell line and in fish blood cells (Martínez-Tabche et al., 2004; Ateeq et al., 2005; González et al., 2005; Sandal and Yilmaz, 2011; Bokán et al., 2013). Additionally, mutagenic effects were observed when employing the dominant-lethal assay in freshwater snails *Biomphalaria glabrata* (Estevam et al., 2006). Whereas no induction of micronuclei in human lymphocytes was observed for genotoxic studies, the generation of chromosomal aberrations was reported in workers who employed 2,4-D (IARC, 2017). Additionally, in human lymphocytes from workers exposed to a pesticide mixture including 2,4-D, the induction of chromosomal aberrations, micronuclei formation, SCEs as well as DNA single strand breaks were also reported (IARC, 2017). Finally, several studies suggested a positive association between 2,4-D exposition and carcinogenesis development, including the occurrence of non-Hodgkin's lymphoma in occupational workers (IARC, 2017).

DIC is a selective herbicide classified by WHO (www.who.int/ipcs/publications/pesticides_hazard/en/), as a class II member and by U.S. EPA as a type III compound (2006). DIC is employed to eradicate broad-leaved plants growing in numerous urban and peri-urban areas including home grass, farms, golf courses, rights-of-way along roadsides and railways, among others. According to

U.S. EPA (2006) the maximum contaminant level of 200 µg DIC/L was established for drinking water. The half-life of DIC in soil is between 1 and 6 days and the herbicide has high water solubility (USEPA, 2006). It has been detected in surface waters with concentrations ranging from 0.89 ng/L to 50 µg/L (Cessna and Elliot, 2004; Donald et al., 2007; Woudneh et al., 2007; Glozier et al., 2012; Ensminger et al., 2013; Farenhorst et al., 2015), drinking-water reservoirs with concentrations ranging from to 1.04–16 ng/L (Donald et al., 2007; Ensminger et al., 2013) and in wastewater treatment plants in concentrations of 185 ng/L (Westlund and Yargeau, 2017). As far as we know, there is no information available on the environmental concentrations of DIC in Argentina.

Although DIC is considered the third-most commonly used broadleaf herbicide, with a toxicity higher than the herbicide glyphosate, knowledge about its toxicity on living species is limited (USEPA, 2006). In fact, a few positive results have been reported on the genotoxicity of DIC, such as the induction of SCEs in CHO-K1 cells and human lymphocytes (Perocco et al., 1990; González et al., 2006), high level of DNA damage evaluated by SCGE assay as well as micronuclei induction in CHO-K1 cells and in *C. decemmaculatus* (González et al., 2007; Ruiz de Arcaute et al., 2014b). To the best of our knowledge and according to U.S. EPA (2006), the genotoxicity and the carcinogenicity potential of DIC have never been studied on occupational workers. In some epidemiologic studies, neither association between exposure to DIC and childhood acute lymphoblastic leukemia nor non-Hodgkin lymphoma risk was observed in residential exposure areas (Hartge et al., 2005; Metayer et al., 2013). Similarly, in the evaluation of cancer occurrence from workers exposed to a pesticide mixture including DIC, no apparent risk for non-Hodgkin lymphoma was reported. However, a low association between DIC exposure and lung and colon cancer was observed (Samanic et al., 2006).

The alkaline SCGE assay represents a rapid and highly sensitive technique frequently used and recommended as an end point for the detection of DNA single-strand breaks (Bony et al., 2010; Ruiz de Arcaute et al., 2014b; 2016). Fish genotoxicity analyzed by the SCGE assay after pesticide exposure is extensively documented throughout the literature, including *C. decemmaculatus* (Ali et al., 2009; Cavaş, 2011; Vera-Candioti et al., 2013; Ruiz de Arcaute et al., 2014b; Rodrigues et al., 2016; Ruiz de Arcaute et al., 2016; Martins and Costa, 2017). This Neotropical small-fish species has a wide range of tolerance, and it is easy to handle and adapt to laboratory conditions, which makes it a suitable test organism in lethal and sublethal toxicity bioassays (de la Torre et al., 2007; Ruiz de Arcaute et al., 2014b; Vera-Candioti et al., 2015; Ruiz de Arcaute et al., 2016 and references therein).

We have previously analyzed the short-term effects of the 58.4% 2,4-D-based DMA[®] and the 57.7% DIC-based Banvel[®] herbicide formulations on the toxicity, as well as the genotoxic effects, in adult *C. decemmaculatus* exposed during 96 h under semi-static laboratory conditions (Ruiz de Arcaute et al., 2014b, 2016). In these studies, where LC50 estimation was used as end point for acute lethal toxicity, both the primary DNA damage induction revealed by SCGE assay and the frequency of micronuclei, as well as other nuclear abnormalities detection, were used as end points for genotoxicity. Results highlighted that both herbicides induced genomic instability by increasing both DNA single-strand breaks, as well as the micronucleus, blebbed, lobed and notched nuclei frequencies. Furthermore, other sublethal effects, such as behavioral alterations, were also reported as a consequence of both 2,4-D and DIC exposure (Ruiz de Arcaute et al., 2014b, 2016).

This study aimed to assess the long-term genotoxicity of two auxinic-based herbicidal-formulated products, DMA[®] (58.4% 2,4-D) and Banvel[®] (57.7% DIC) on *C. decemmaculatus*, exposed under controlled laboratory conditions employing a semi-static exposure

procedure lasting 28 days. The frequency of primary breaks introduced into DNA on blood cells of exposed fish was used as the genotoxicological end point after a prolonged treatment employing these auxinic herbicides.

2. Materials and methods

2.1. Experimental species

Cnesterodon decemmaculatus is an ovoviviparous teleost, a member of the Poeciliidae family, extensively distributed in Neotropical America. Adult specimens were collected from an unpolluted stream, near La Plata city (Buenos Aires Province, Argentina). After collection, fish were immediately transported to laboratory and placed in aquaria with dechlorinated tap water (pH 7.55 ± 0.1 ; dissolved oxygen, 6.3 ± 0.3 mg/L; ammonium (NH_4^+) < 0.2 mg/L; hardness, 143 ± 23.5 mg CaCO_3/L) and artificial aeration. Acclimation was carried out for at least 20 days to 16/8 h light/dark cycle, at 20 ± 1 °C. Fish were fed daily *ad libitum* with fish food flakes (TetraMin[®], TetraWerke, Melle, Germany).

2.2. Chemicals and quality control

Herbicides included 2,4-D (CAS 94-75-7) commercial-grade trade formulation DMA[®] (58.4% 2,4-D; Dow AgroSciences Argentina S.A) and DIC (CAS, 1918-00-9) commercial-grade trade formulation Banvel[®] (57.7% DIC; Syngenta Agro S.A.). All other chemicals of analytical grade were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Concentration analyses of 2,4-D and DIC in the test solutions were verified by QV Chem Laboratory (La Plata, Buenos Aires, Argentina). Active ingredient samples from test solutions correspond to values obtained immediately after preparation (0 h) and every 24 h thereafter up to the replacement. Concentrations assessed throughout the study represent the nominal concentrations of the analyte present within the formulations Banvel[®] and DMA[®].

2.3. Experimental design

Specimens of *C. decemmaculatus* (weight 0.26 ± 0.1 g, length 29.5 ± 2.7 mm) were exposed for 28 days to two different concentrations of each commercial formulation, DMA[®] and Banvel[®], equivalent to 2.5% and 5% of the $\text{LC}_{50_{96\text{h}}}$. The $\text{LC}_{50_{96\text{h}}}$ for both herbicides were reported in previous studies performed in our laboratory (Ruiz de Arcaute et al., 2014b, 2016). The test concentrations were 25.2 and 50.4 mg/L 2,4-D for DMA[®] and 41 and 82 mg/L DIC for Banvel[®] (Ruiz de Arcaute et al., 2014b, 2016). Fifty specimens for each test concentration were selected at random and maintained in 4 aquaria of 5 L with continuous aeration. Negative control (dechlorinated tap water) was conducted and run simultaneously with 2,4-D- and DIC-exposed fish. Herbicide solutions were replaced every 3 days. Fish were fed 1 h prior to pesticide replacement. Weekly, from day 0 up to 28 days thereafter, 10 individuals were randomly taken from each experimental point, i.e., herbicide- and non-herbicide (negative control)-exposed fish. Fish were anaesthetized by immersion in ice water (Summerfelt and Smith, 1990; Ackerman et al., 2005). Afterwards, blood samples were obtained for the SCGE assay following recommendations previously reported (Ruiz de Arcaute et al., 2014b, 2016). Briefly, after severing the spinal column behind the opercula, two drops of peripheral blood from each specimen were collected and processed according to the procedure described in detailed elsewhere (Ruiz de Arcaute et al., 2016).

2.4. Single-cell gel electrophoresis assay

The alkaline SCGE assay was performed following the recommendations of Singh (1996), with adjustments reported for the species elsewhere (Vera-Candiotti et al., 2013; Ruiz de Arcaute et al., 2016). Nucleoids were classified in five classes (0–I, undamaged nucleoids; II–IV, damaged nucleoids) as suggested previously (Çavaş and Könen, 2007). Data are expressed as the mean number of damaged cells (sum of nucleoid classes II, III, and IV) and the mean comet score for each treatment group. The genetic damage index (GDI) was estimated for each experimental point according to the algorithm of Pitarque et al. (1999).

2.5. Statistical analysis

The proportion of individuals affected per experimental point was calculated. Each proportion was angular-transformed and a two-way ANOVA with Tukey's test was performed (Zar, 1999). ANOVA assumptions were corroborated with Barlett's test for homogeneity of variances and a χ^2 test for normality. Cases in which an assumption of normality was not performed underwent a Kruskal-Wallis test. A simple linear regression and correlation analyses were made to evaluate relationships between concentration and GDI results. The level of significance chosen was 0.05 unless indicated otherwise.

3. Results

T-tests between chemical analyses showed no significant changes ($P > 0.05$) in the concentration of the pure analyte in treatments during the interval renewals of the testing solutions (concentration range, $97 \pm 5\%$ recovery).

3.1. DNA damage

Results of the SCGE assay obtained from individuals exposed to the 2,4-D are presented in Table 1 and in Fig. 1. Table 1 summarizes the frequency of damaged nucleoids and GDI, whereas the different categories of nucleoids found for each experimental point are depicted in Fig. 1. Overall, in treated specimens employing either 2.5% or 5% of 2,4-D, significant increases in the frequency of damaged cells were observed in exposed fish sampled at 7, 14, 21 and 28 days of treatment, irrespective of the control values ($P < 0.001$) (Table 1). After either 2.5% or 5% of 2,4-D treatments, and regardless of the exposure time, the percentage of damaged nucleoids was significantly increased with respect to control values ($P < 0.001$). For both treatments, the lowest DNA damage was observed on day 7, and there was gradual increase in damage up to day 21, where the maximum level of damage was observed (90.05% and 89.67% for 2.5% and 5%, respectively). However, DNA damage started to decline from the 21 day up to the 28 day of exposure (74.49% and 71.99% for 2.5% and 5%, respectively), although it remained significant when compared to the control values ($P < 0.001$). For both 2,4-D concentrations assayed, the DNA damage was found to be time-independent, showing a r value of -0.48 ($P > 0.05$) and -0.41 ($P > 0.05$) for 2.5% and 5%, respectively. Tukey's test demonstrated that, at 7 days 2,4-D-exposed fish, an enhanced frequency of type II, III and IV nucleoids was observed ($P < 0.001$). When fish were exposed for 14 days, an enhancement of type II and III nucleoids was registered ($P < 0.001$). In addition, an increased frequency of type IV nucleoids in individuals treated with 2.5% of 2,4-D for 14 days was achieved ($P < 0.01$) (Fig. 1). In fish exposed for 21 days, the variation in the frequency of nucleoids population was due to an increased frequency of type II, III and IV nucleoids ($P < 0.001$). Finally, when fish were analyzed at day 28, an increased

Table 1Analysis of DNA damage measured by SCGE assay in *Cnesterodon decemmaculatus* cells exposed to 2,4-D-based herbicide DMA[®] and dicamba-based herbicide Banvel[®].

Compound	Exposure dosage (mg/L)	Exposure time (days)	Number of animals observed	Number of nucleoids analyzed	% of damaged nucleoids (II + III + IV)	GDI ^a ± SE
Negative Control		7	10	1027	10.42	0.69±0.05
		14	10	1003	12.76	0.77±0.07
		21	10	1010	11.09	0.72±0.11
		28	10	1048	13.93	0.74±0.07
DMA [®]	2.5% LC50 _{96h}	7	10	1078	83.67	2.36±0.09***
		14	10	1046	88.81***	2.30±0.06***
		21	10	1256	90.05***	2.60±0.12***
		28	10	1184	74.49***	2.14±0.06***
	5% LC50 _{96h}	7	9	976	81.56***	2.39±0.10***
		14	10	1135	84.85***	2.13±0.04***
		21	10	1220	89.67***	2.61±0.11***
		28	10	989	71.99***	1.97±0.09***
Banvel [®]	2.5% LC50 _{96h}	7	10	1177	43.16***	1.38±0.11***
		14	10	1163	58.30***	1.66±0.08***
		21	10	1018	21.32	1.11±0.04*
		28	10	1112	21.04	0.99±0.09
	5% LC50 _{96h}	7	10	1013	77.20***	2.07±0.06***
		14	10	1064	30.92	1.15±0.14
		21	10	1048	20.04	0.99±0.08
		28	9	947	23.02	0.95±0.06

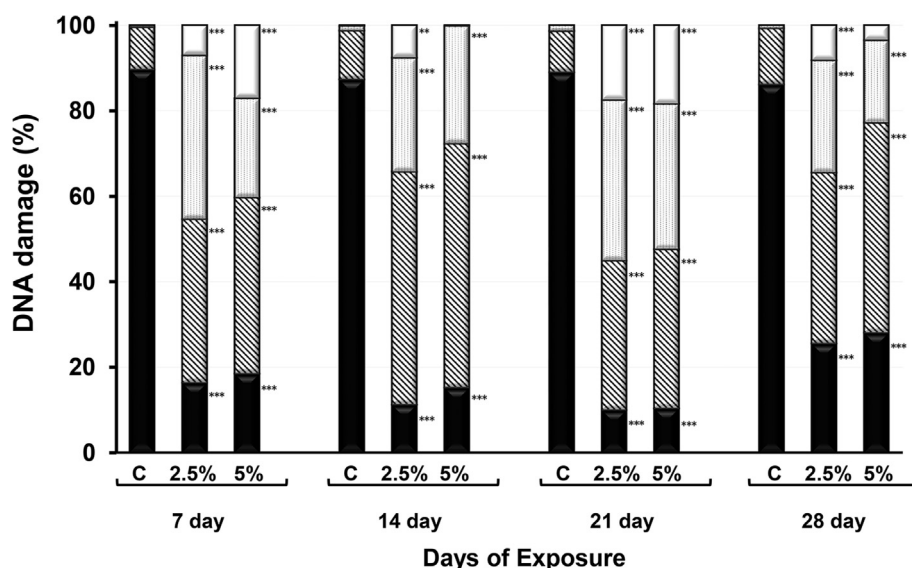
* $P < 0.05$.*** $P < 0.001$; significant differences with respect to negative control values.^a GDI: Genetic damage index.

Fig. 1. DNA damage induced by 2,4-D-based herbicide formulation DMA[®] measured by single-cell gel electrophoresis assay in circulating blood cells from *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces: Poeciliidae). The frequencies of undamaged type 0-I nucleoids (black bar), type II (striped bar), type III (dotted bar), and type IV (white bar) were determined by analysing 100 nucleoids from each specimen. Results are presented as percentages of pooled data from three independent experiments. Negative control (untreated fish) was conducted and run simultaneously with DMA[®] exposed fish. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; significant differences with respect to control values.

frequency of type II-IV and II-III nucleoids was observed in fish exposed to 2.5% and 5%, respectively ($P < 0.001$). Finally, a concomitant decrease of type 0-I nucleoids was observed in all four exposure times ($P < 0.001$) (Fig. 1). Likewise, a significant increase of GDI was observed in both 2.5% and 5% treatments for all exposure times ($P < 0.001$) (Table 1). For both 2,4-D concentrations, the maximum GDI value was at 21 days of exposure.

Results of the SCGE assay obtained from specimens exposed to the DIC are presented in Table 1 and in Fig. 2. Table 1 summarizes

the frequency of damaged nucleoids and GDI, whereas the different categories of nucleoids found for each experimental point are depicted in Fig. 2. Overall, in specimens exposed to 2.5% of DIC, significant increases in the frequency of damaged cells were observed in fish sampled at 7 and 14 days of treatment ($P < 0.001$). In specimens exposed to 5% of DIC significant increases in the frequency of damaged cells were observed only in fish sampled at 7 days of treatment ($P < 0.001$) (Table 1). The maximum induction of DNA damage was observed on day 14 (58.30%) at the lowest

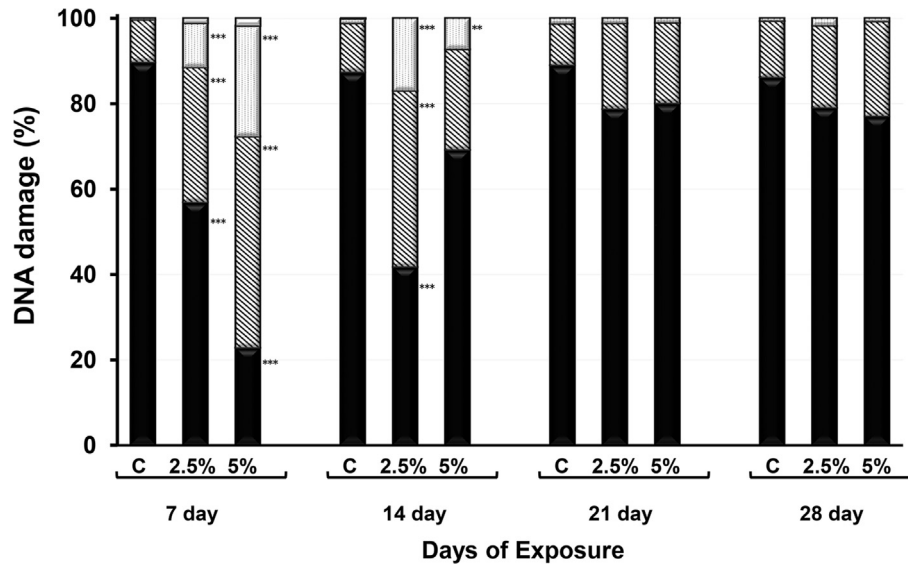


Fig. 2. DNA damage induced by DIC-based herbicide formulation Banvel[®] measured by single-cell gel electrophoresis assay in circulating blood cells from *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces: Poeciliidae). The frequencies of undamaged type 0-I nucleoids (black bar), type II (stripped bar), type III (dotted bar), and type IV (white bar) were determined by analysing 100 nucleoids from each specimen. Results are presented as percentages of pooled data from three independent experiments. Negative control (untreated fish) was conducted and run simultaneously with Banvel[®] exposed fish. **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; significant differences with respect to control values.

concentration employed (2.5% DIC), whereas the DNA induction for 5% DIC was highest on day 7 (77.20%). For both concentrations assayed, the DNA damage was found to be time-dependent, showing an r value of -0.74 ($P < 0.05$) and an r value of -0.84 ($P < 0.01$) for 2.5% and 5% DIC, respectively. For both concentrations assayed, in 7 days herbicide-exposed fish, a Tukey's test revealed an enhanced frequency of type II and III nucleoids ($P < 0.001$). When fish were exposed for 14 days, an enhancement of type III nucleoids was observed ($0.01 > P < 0.001$) (Fig. 2). In addition, an increased frequency of type II nucleoids in individuals treated with 2.5% DIC for 14 days was observed ($P < 0.001$). Finally, a concomitant decrease of type 0-I nucleoids was observed in 7 and 14 days of exposure in fish treated with 2.5% DIC, and after 7 days of treatment with concentration equivalent to 5% DIC ($P < 0.001$) (Fig. 2). In DIC-exposed specimens, a significant increase of GDI was observed in fish exposed to 2.5% DIC at 7–21 days of treatment ($0.05 > P < 0.001$) (Table 1). In addition, in fish exposed to 5% DIC, such increment was only observed at 7 days of treatment ($P < 0.001$). The maximum GDI value was achieved at day 14 for 2.5% DIC and at day 7 for 5% DIC treatment ($P < 0.001$).

4. Discussion

In the present work, long-term sublethal effects of the 2,4-D-based herbicide DMA[®] (58.4% 2,4-D) and the DIC-based herbicide formulation Banvel[®] (57.7% DIC) were analyzed on *C. decemmaculatus* exposed under laboratory conditions using a semi-static experimental model for toxicity testing.

Under the experimental design employed, results showed that exposure to concentrations of 25.2 and 50.4 mg/L 2,4-D, equivalent to 2.5% and 5% of the LC50_{96h} values reported for the species, increased the frequencies of breaks into DNA estimated by alkaline SCGE in those fish exposed at 7, 14, 21 and 28 days. However, exposure to concentrations of 41 and 82 mg/L DIC, equivalent to 2.5% and 5% of the LC50_{96h} values reported for the species, increased the frequencies of breaks into DNA only in those fish exposed at 7 and 14 days and 7 days for 2.5% and 5% DIC, respectively. These results are in agreement with previous studies performed in our laboratory, demonstrating that after an acute

exposure to 2,4-D and DIC within the 252–756 and 410–1229 mg/L concentration range lasting up to 96 h, respectively, an increased frequency of DNA single-strand breaks was achieved, regardless of the length of treatment (Ruiz de Arcaute et al., 2014b, 2016). Furthermore, in these studies, the frequency of micronucleus was employed as a another genotoxicity end point whereas the estimation of mortality and behavioral parameters were employed as lethal and other sublethal end points (Ruiz de Arcaute et al., 2014b, 2016). The results demonstrated that 2,4-D contained in the formulated product DMA[®] increased the frequency of micronucleus after exposure within the 252–756 mg/L 2,4-D concentration range (Ruiz de Arcaute et al., 2016), as well as the frequency of micronucleus on DIC-based commercial formulation Banvel[®]-exposed fish to 1229 mg/L DIC for 48 h (Ruiz de Arcaute et al., 2014b).

Nowadays, due to the extensive use of agrochemicals worldwide, the employment of biomarkers to qualitatively and quantitatively estimate the exposure of the biota to pollutants is of growing concern. Among these, the SCGE assay became one of the most employed biomarkers for detecting DNA damage, allowing an early assessment on the response in the biota, e.g., in aquatic environment (Lee and Steinert, 2003). A variety of organisms within this aquatic compartment, including fish, have been tested, and induction of DNA damage was reported after exposure to several xenobiotics, including agrochemicals (Martins and Costa, 2017 and references therein).

Additionally, in agreement with our previous observations on the lethal and sublethal effects exerted by 2,4-D and DIC when employing *C. decemmaculatus* as the test organism, acute DNA damage analyzed by the SCGE assay has been reported in the rainbow trout *Oncorhynchus mikiss* (Martínez-Tabche et al., 2004) and in the catfish *C. batrachus* (Ateeq et al., 2005). Similarly, DNA single-strand breaks were induced by 2,4-D or its commercial formulation DMA[®] in a carp cell line *in vitro* (Bokán et al., 2013). To the best of our knowledge, no other studies addressing the generation of DNA damage in fish using the herbicide DIC have been reported so far.

Long-term toxicity studies in aquatic biota are relevant in order to identify those plausible xenobiotics that could introduce DNA damage in a greater extent after prolonged exposure, increasing the

potential appearances of chronic diseases, including carcinogenesis. In this study, a significant increase in the generation of DNA single-strand breaks was detected in fish exposed for up to 28 days to two sublethal concentrations of two auxinic herbicides, 2,4-D and DIC. The frequency of damaged cells observed in *C. decemmaculatus* after long-term exposure to 2,4-D concentrations, equivalent to 2.5% and 5% of the LC50_{96h}, were significantly higher than that of non-exposed group at all sampling times (7–28 days). These findings are in concordance with previous studies reported for the herbicide. Long-term toxicity of 2,4-D has been reported in the common fruit fly *Drosophila melanogaster* by increasing the frequency of large single and total spots when the wing-spot test was employed (Kaya et al., 1999). In rats and mice, Charles et al. (1996) reported low long-term toxicity and alterations in the oncogenic pattern following chronic intake of 2,4-D. Similarly, alterations on germinal cells from rats chronically exposed to the 2,4-D-based commercial formulation, Tordon 75D[®], and testicular damage and sperm cell reduction in their offspring were observed (Oakes et al., 2002). To the best of our knowledge, no studies on 2,4-D- and DIC-long-term exposed fish have been reported so far. Thus, our study demonstrated for the first time the genotoxic effect of these two herbicides in an aquatic organism, like *C. decemmaculatus*, after exposure conditions for up to 28 days.

According to our experimental design, results revealed that a period as short as 7 days is required for the induction of breaks in DNA after both 2,4-D concentrations assayed. On the other hand, the time required for the induction of the maximum level of DNA damage was the same for both 2,4-D concentrations tested, 21 days of exposure. At 28 days of exposure, the damage decreased in relation to that observed at day 21, but never reached control values. However, the level of DNA damage observed in blood cells of *C. decemmaculatus* was not time-dependent for both 2,4-D concentrations assayed from 7 to 28 days.

Similarly, results also revealed a significant increase in the induction of DNA damage observed in *C. decemmaculatus* specimens long-term exposed to the two sublethal concentrations of DIC assayed. The frequency of damaged cells observed in *C. decemmaculatus* after exposure to concentration equivalent to 2.5% DIC LC50_{96h} values were significantly higher than that from the negative group at 7 and 14 days of treatment. On the other hand, the frequency of damaged cells was only significantly increased at 7 days of treatment in fish exposed to the concentration equivalent to 5% DIC LC50_{96h}. Likewise 2,4-D, results revealed that a period as short as 7 days is required for the induction of breaks in DNA after both DIC concentrations assayed. However, the time required for the induction of the maximum level of DNA damage varied depending upon the DIC concentration. When 5% DIC was employed, this level was observed on day 7, whereas for a concentration of 2.5% DIC, the highest level of DNA damage was found on day 14. After the maximum peak of DNA damage, the damage decreased in relation to that observed at day 14, reaching control values. Overall, for both auxinic herbicides, the frequency of DNA damage over the 28 days of exposition showed, then, a biphasic induction pattern. This observation could indicate that 2,4-D, as well DIC, would influence the blood cell turn-over. However, other plausible explanations to our observation could be suggested. The results obtained in our study could also be in agreement with those previous long-term investigations reported by others in *in vitro* and *in vivo* biotic matrices exposed to pesticides, where an adaptive mechanism of tolerance has been observed (Çavaş and Könen, 2007; Chang et al., 2009; Mezzelani et al., 2018). In the present study, the genotoxicity exerted by the herbicides on the DNA is notably evident and tends to increase after long-term exposure conditions, thus possibly indicating their potential biotransformation into genotoxic breakdown products by

C. decemmaculatus. However, this hypothesis could be ruled out since no plausible explanation for the decrease in DNA damage observed at the end of the exposure period could be suggested. Another plausible hypothesis of our findings might be an adaptive mechanism of tolerance to chemical stress in *C. decemmaculatus* haematopoietic organs, resulting in an enhancement in resistance under long-term exposure conditions. It is known that a continuous exposure to environmental xenobiotics might increase the resistance of the biota, even to lethal concentrations (Campana et al., 1999; de Lemos et al., 2001; Mezzelani et al., 2018). Some authors have demonstrated that after long-term treatments the frequency of DNA damage in fish blood cells, as well as in mussel haemocytes, declines after 15 and 60 days of exposure, respectively (Campana et al., 1999; de Lemos et al., 2001; Mezzelani et al., 2018). These differences seem to be related to the continuous cellular replacement of damaged cells in order to preserve normal physiological conditions (Mersch et al., 1996; Çavaş and Könen, 2007). Another putative explanation could be related to the perturbation of the enzymatic process toward detoxification (Kumar et al., 2012), or the gene activation of metabolizing enzymes, such as P450, in various tissues that provides a defensive mechanism against the formation of DNA damage after auxinic exposure (Espandiarri et al., 1995, 1999). Toxic compounds such as pesticides and metals are known to decrease different free-radical scavenging enzymes, e.g., glutathione reductase, catalase and glutathione peroxidases (Lobo et al., 2010). A possible explanation may be that DNA damage in blood cells decreases with elevated activity of glutathione reductase during the DNA damage declining period, which could activate the reduced glutathione toward detoxification of the herbicides. Oxidative enzyme profiles in *C. decemmaculatus* at acute and chronic exposures of the herbicide are required to address these possibilities. Finally, it is worth mentioning that the time to recover a basal level of genetic damage can vary greatly depending upon the species. Recovery periods as short as 72 h for fish (Mohanty et al., 2011), of 11–14 days for amphibians (Mouchet et al., 2015; Pérez-Iglesias et al., 2018), and up to 21 days for rats (Prado-Ochoa et al., 2016) have been reported. Our current results demonstrated that a period of 14–21 days is enough to recover the basal level of DIC-induced primary DNA damage. According to Mohanty et al. (2011), the explanation for this recovery process is associated with a selective loss of damaged cells, as previously stated, and/or the onset of the DNA repair process. In this sense, several authors have suggested that the rapid recovery from the genetic damage induced by pesticides is related to the onset of DNA repair systems by DNA repair enzymes through the process of base excision repair and/or nucleotide excision repair, acting in several aquatic organisms (Mohanty et al., 2011; Guilherme et al., 2014; Michel and Vincent-Hubert, 2015; Mouchet et al., 2015; Pérez-Iglesias et al., 2018). Further studies are required employing *C. decemmaculatus* as fish model to solve this scientific conundrum.

In plants, the auxin-like mode of action of 2,4-D has been well established by several investigations (IARC, 2017), but the mechanism by which 2,4-D induces toxicity in animals, including humans, remains poorly understood (Bukowska, 2006). Some authors have demonstrated that 2,4-D contributes to the generation of reactive oxygen species as well as the induction of oxidative damage in different organisms, including fish (Oruc et al., 2004; Tayeb et al., 2012). Genotoxic compounds have the ability to induce reactive oxygen species by imbalances of free radicals, and then interact with DNA to cause single- and double-breaks and other damage inside the DNA molecule. For DIC, it has been described as a peroxisome proliferator inducer and hepatocarcinogenesis promoter in rats (Espandiarri et al., 1995, 1999). In plants, DIC induces tissue damage and cell death in *Galium aparine* by generation of lipid peroxidation (Grossmann et al., 2001). Additionally, DIC was

suggested to cause decreases in loss of food intake and body weight and to induce abnormal and dead cells in the liver of 90-day-exposed rats (USEPA, 1984). Further toxicity studies are required on *C. decemmaculatus* to obtain comprehensive knowledge of the precise mechanism(s) involved in genotoxic process exerted by the auxinic herbicides 2,4-D and DIC.

In agroecosystems, pesticides are commonly employed as formulated products, where the active ingredient is combined with organic solvents and emulsifying and wetting agents, in order to enhance the pesticide penetration and performance (WHO, 1990). These additives may alter the toxicity of the active ingredient and their toxic effects can go beyond those of the pure compound. Several authors have proved and agree in demonstrating that the excipients present in pesticide commercial products, including herbicides, are able to induce both toxicity and cellular damage by themselves rather than the pure compound either *in vitro* or *in vivo* (Mann and Bidwell, 1999; Vera-Candiotti et al., 2010; Molinari et al., 2013; Nikoloff et al., 2014; Pérez-Iglesias et al., 2014; Ruiz de Arcaute et al., 2014a; Mansano et al., 2016, 2018). It should be mentioned that according to the Argentinean administration, the excipients present in any agrochemical are not required to be listed on the agrochemical data sheet and can be kept as a “trade secret”. Thus, unfortunately the identities of the additive compounds present in the commercial herbicide formulations DMA[®] and Banvel[®] were not made available to us. Further studies should be required to reveal whether the sublethal damage exerted by both auxinic formulations assayed in our study results from the presence of xenobiotic(s) with genotoxic properties included in the formulated products.

Xenobiotics with a significant toxicity pattern can cause undesirable chronic consequences on the biota at concentrations well below those that produce acute effects (Aronzon et al., 2011). The present investigation shows that the use of SCGE assay in blood cells could detect DNA lesions at lower auxinic herbicide concentrations after long-term conditions. Finally, the current study emphasizes that the SCGE assay is a sensitive biological biomarker for evaluating the long-term genotoxic properties of the auxinic herbicides, namely 2,4-D and DIC, especially in the aquatic freshwater biota, when employing a small fish like *C. decemmaculatus* as the experimental model.

Conflict of interest statement

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank Syngenta Agro S.A. (Buenos Aires, Argentina) for kindly providing the DIC-based commercial-grade formulation Banvel[®] and to Dow AgroSciences Argentina S.A. (Buenos Aires, Argentina) for kindly supplying the 2,4-D-based commercial-grade formulation DMA[®]. This study was supported by grants from the National University of La Plata (Grants 11/N817 and 11/N847) and the National Agency of Scientific and Technological Promotion (PICT 2015 Number 3059) from Argentina.

References

Ackerman, P.A., Morgan, J.D., Iwama, G.K., 2005. Anesthetics in: Canadian council on animal care. In: The Care and Use of Fish in Research, Teaching and Testing. Canadian Council on Animal Care, Ottawa, CA.

Ali, D., Nagpure, N.S., Kumar, S., Kumar, R., Kushwaha, B., Lakra, W.S., 2009. Assessment of genotoxic and mutagenic effects of chlorpyrifos in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Food Chem. Toxicol.* 47, 650–656.

Amer, S.M., Aly, F.A., 2001. Genotoxic effect of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid and its metabolite 2,4-dichlorophenol in mouse. *Mutat. Res.* 494, 1–12.

Arias, E., 2007. Cytogenetic effects of short- and long-term exposure of chick embryos to the phenoxyherbicide 2,4-D. *Environ. Mol. Mutagen.* 48, 462–466.

Aronzon, C.M., Sandoval, M.T., Herkovits, J., Pérez-Coll, C.S., 2011. Stage-dependent toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the embryonic development of a South American toad, *Rhinella arenarum*. *Environ. Toxicol.* 26, 373–381.

Ateeq, B., Farah, M.A., Ahmad, W., 2005. Detection of DNA damage by alkaline single cell gel electrophoresis in 2,4-dichlorophenoxyacetic-acid- and butachlor-exposed erythrocytes of *Clarias batrachus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 62, 348–354.

Ateeq, B., Farah, M.A., Ali, M.N., Ahmad, W., 2002. Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. *Mutat. Res.* 518, 135–144.

Bokán, K., Syberg, K., Jensen, K., Rank, J., 2013. Genotoxic potential of two herbicides and their active ingredients assessed with comet assay on a fish cell line, epithelioma papillosum cyprini (EPC). *J. Toxicol. Environ. Health, Part A*: 76, 1129–1137.

Bony, S., Gaillard, I., Devaux, A., 2010. Genotoxicity assessment of two vineyard pesticides in zebrafish. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 90, 421–428.

Bukowska, B., 2006. Toxicity of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid-molecular mechanisms. *Pol. J. Environ. Stud.* 15, 365–374.

Campana, M.A., Panzeri, A.M., Moreno, V.J., Dulout, F.N., 1999. Genotoxic evaluation of the pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleus test in erythrocytes of the fish *Cheirodon interruptus interruptus*. *Mutat. Res.* 438, 155–161.

CASAFE, 2017. Cámara de Sanidad agropecuaria y fertilizantes. Available at: <http://www.casafe.org/>. (Accessed 30 October 2017).

Cavaş, T., 2011. *In vivo* genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay. *Food Chem. Toxicol.* 49, 1431–1435.

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, 263–268.

Cessna, A.J., Elliot, J.A., 2004. Seasonal variation of herbicide concentrations in prairie farm dugouts. *J. Environ. Qual.* 33, 302–315.

Chang, J.K., Li, C.J., Liao, H.J., Wang, C.K., Wang, G.J., Ho, M.L., 2009. Anti-inflammatory drugs suppress proliferation and induce apoptosis through altering expressions of cell cycle regulators and pro-apoptotic factors in cultured human osteoblasts. *Toxicology* 258, 148–156.

Charles, J.M., Bond, D.M., Jeffries, T., Yano, B.L., Stott, W.T., Johnson, K.A., 1996. Chronic dietary toxicity/oncogenicity studies on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in rodents. *Fund. Appl. Toxicol.* 33, 166–172.

de la Torre, F.R., Salibián, A., Ferrari, L., 2007. Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish. *Chemosphere* 68, 1582–1590.

de Lemos, C.T., Rödel, P.M., Terra, N.R., Erdtmann, B., 2001. Evaluation of basal micronucleus frequency and hexavalent chromium effects in fish erythrocytes. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1320–1324.

Donald, D., Cessna, A., Sverko, E., Glozier, N., 2007. Pesticides in surface drinking-water supplies of the northern Great Plains. *Environ. Health Perspect.* 115, 1183–1191.

Ensminger, M., Budd, R., Kelley, K., Goh, K., 2013. Pesticide occurrence and aquatic benchmark exceedances in urban surface waters and sediments in three urban areas of California, USA, 2008–2011. *Environ. Monit. Assess.* 185, 3697–3710.

Espandiar, P., Glauert, H.P., Lee, E.Y., Robertson, L.W., 1999. Promoting activity of the herbicide dicamba (2-methoxy-3, 6-dichlorobenzoic acid) in two stage hepatocarcinogenesis. *Int. J. Oncol.* 14, 79–84.

Espandiar, P., Thomas, V.A., Glauert, H.P., O'Brien, M., Noonan, D., Robertson, L.W., 1995. The herbicide dicamba (2-methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid) is a peroxisome proliferator in rats. *Fund. Appl. Toxicol.* 26, 85–90.

Estevam, E.C., Nakano, E., Kawano, T., de Bragança Pereira, C.A., Amancio, F., de Albuquerque Melo, A.M., 2006. Dominant lethal effects of 2,4-D in *Biomphalaria glabrata*. *Mutat. Res.* 611, 83–88.

FAO, 2017. Food and agriculture organization of the United Nations. Available at: <http://www.fao.org/faostat/en/#home>. (Accessed 16 October 2017).

Farah, M.A., Ateeq, B., Ahmad, W., 2006. Antimutagenic effect of neem leaves extract in freshwater fish, *Channa punctatus* evaluated by cytogenetic tests. *Sci. Total Environ.* 364, 200–214.

Farenhorst, A., Andronak, L.A., McQuenn, R.D.A., 2015. Bulk deposition of pesticides in a Canadian City: Part 1. Glyphosate and other agricultural pesticides. *Water Air Soil Pollut.* 226, 1–11.

Félix-Cañedo, T.E., Durán-Álvarez, J.C., Jiménez-Cisneros, B., 2013. The occurrence and distribution of a group of organic micropollutants in Mexico City's water sources. *Sci. Total Environ.* 454–455, 109–118.

Garaj-Vrhovac, V., Zeljezic, D., 2002. Assessment of genome damage in a population of Croatian workers employed in pesticide production by chromosomal aberration analysis, micronucleus assay and comet assay. *J. Appl. Toxicol.* 22, 249–255.

Gleason, C., Foley, R., Singh, K., 2011. Mutant analysis in *Arabidopsis* provides insight into the molecular mode of action of the auxinic herbicide dicamba. *PLoS One* 6, 1721–1745.

Glozier, N.E., Struger, J., Cessna, A.J., Gledhill, M., Rondeau, M., Ernst, W.R., 2012. Occurrence of glyphosate and acidic herbicides in select urban rivers and streams in Canada. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 19, 821–834.

González, M., Soloneski, S., Reigosa, M.A., Larramendy, M., 2005. Genotoxicity of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and a commercial formulation, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dimethylamine salt. I. Evaluation of DNA damage and cytogenetic endpoints in Chinese Hamster ovary (CHO) cells. *Toxicol. In Vitro* 19, 289–297.

- González, N., Soloneski, S., Larramendy, M., 2006. Genotoxicity analysis of the phenoxy herbicide dicamba in mammalian cells *in vitro*. *Toxicol. In Vitro* 20, 1481–1487.
- González, N., Soloneski, S., Larramendy, M., 2007. The chlorophenoxy herbicide dicamba and its commercial formulation banvel induce genotoxicity in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* 634, 60–68.
- Grossmann, K., 2010. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. *Pest Manag. Sci.* 66, 113–120.
- Grossmann, K., Kwiatkowski, J., Tresch, S., 2001. Auxin herbicides induce H₂O₂ overproduction and tissue damage in cleavers (*Galium aparine* L.). *J. Exp. Bot.* 52, 1811–1816.
- Guilherme, S., Santos, M.A., Gaivão, I., Pacheco, M., 2014. Are DNA-damaging effects induced by herbicide formulations (Roundup® and Garlon®) in fish transient and reversible upon cessation of exposure? *Aquat. Toxicol.* 155, 213–221.
- Halter, M.T., 1980. 2,4-D in the aquatic environment. In: Shearer, R. (Ed.), *Literature Reviews of Four Selected Herbicides: 2,4-D, Dichlobenil, Diquat, and Endothal*. Municipality of Metropolitan Seattle, Seattle.
- Hartge, P., Colt, J.S., Severson, R.K., Cerhan, J.R., Cozen, W., Camann, D., Zahm, S.H., Davis, S., 2005. Residential herbicide use and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 14, 934–937.
- IARC, 2017. IARC Monographs of the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. DDT, Lindane and 2,4-D. International Agency for Research on Cancer, Lyon, p. 4.
- Kaya, B., Yanikoglu, A., Marcos, R., 1999. Genotoxicity studies on the phenoxyacetates 2,4-D and 4-CPA in the *Drosophila* wing spot test. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 19, 305–312.
- Kumar, P., Kumar, R., Nagpure, N., Nautiyal, P., Dabas, A., Kushwaha, B., Lakra, W.S., 2012. Genotoxic and mutagenic assessment of hexavalent chromium in fish following *in vivo* chronic exposure. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 18, 855–870.
- Larramendy, M.L., 2017. *Ecotoxicology and Genotoxicology: Non-traditional Aquatic Models*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 538.
- Lee, R.F., Steinert, S., 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res.* 544, 43–64.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N., 2010. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Phcog. Rev.* 4, 118–126.
- Loos, R., Locoro, G., Comero, S., Contini, S., Schwesig, D., Werres, F., 2010. Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. *Water Res.* 44, 4115–4426.
- Madrigal-Bujaidar, E., Hernández-Ceruelos, A., Chamorro, G., 2001. Induction of sister chromatid exchanges by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in somatic and germ cells of mice exposed *in vivo*. *Food Chem. Toxicol.* 39, 941–946.
- Mann, R.M., Bidwell, J.R., 1999. The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 193–199.
- Mansano, A.S., Moreira, R.A., Dornfeld, H.C., Diniz, L.G.R., Vieira, E.M., Daam, M.A., Rocha, O., Selegim, M.H.R., 2018. Acute and chronic toxicity of diuron and carbofuran to the Neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 13335–13346.
- Mansano, A.S., Moreira, R.A., Pierozzi, M., Oliveira, T.M., Vieira, E.M., Rocha, O., Regali-Selegim, M.H., 2016. Effects of diuron and carbofuran pesticides in their pure and commercial forms on *Paramecium caudatum*: the use of protozoan in ecotoxicology. *Environ. Pollut.* 213, 160–172.
- Martínez-Tabche, L., Madrigal-Bujaidar, E., Negrete, T., 2004. Genotoxicity and lipoperoxidation produced by paraquat and 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid in the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 73, 146–152.
- Martins, M., Costa, P.M., 2017. The comet assay in aquatic (Eco)genotoxicology using non-conventional model organisms: relevance, constraints and prospects. In: Larramendy, M.L. (Ed.), *Ecotoxicology and Genotoxicology: Non-traditional Aquatic Models*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, p. 29.
- Mersch, J., Beauvais, M.N., Nagel, P., 1996. Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. *Mutat. Res.* 371, 47–55.
- Metayer, C., Colt, J.C., Buffler, P.A., Reed, H., Selvin, S., Crouse, V., Ward, M.H., 2013. Exposure to herbicides in house dust and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 1, 1–8.
- Mezzelani, M., Gorbi, S., Fattorini, D., d'Errico, G., Consolandi, G., Milan, M., Bargelloni, L., Regoli, F., 2018. Long-term exposure of *Mytilus galloprovincialis* to diclofenac, ibuprofen and ketoprofen: insights into bioavailability, biomarkers and transcriptomic changes. *Chemosphere* 198, 238–248.
- Michel, C., Vincent-Hubert, F., 2015. DNA oxidation and DNA repair in gills of zebra mussels exposed to cadmium and benzo (a) pyrene. *Ecotoxicology* 24, 2009–2016.
- Mohanty, G., Mohanty, J., Nayak, A.K., Mohanty, S., Dutta, S.K., 2011. Application of comet assay in the study of DNA damage and recovery in rohu (*Labeo rohita*) fingerlings after an exposure to phorate, an organophosphate pesticide. *Ecotoxicology* 20, 283–292.
- Molinari, G., Kujawski, M., Scuto, A., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2013. DNA damage kinetics and apoptosis in ivermectin-treated Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *J. Appl. Toxicol.* 33, 1260–1267.
- Mouchet, F., Teaniniuiraitemoana, V., Baudrimont, M., Daffe, G., Gauthier, L., Gonzalez, P., 2015. Recovery capabilities of *Xenopus laevis* after exposure to cadmium and zinc. *Chemosphere* 139, 117–125.
- Nikoloff, N., Natale, G.S., Marino, D., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2014. Flurochloridone-based herbicides induced genotoxicity effects on *Rhinella arenarum* tadpoles (Anura: Bufonidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 100, 275–281.
- Oakes, D.J., Webster, W.S., Brown-Woodman, P.D., Ritchie, H.E., 2002. Testicular changes induced by chronic exposure to the herbicide formulation, Tordon 75D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid and picloram) in rats. *Reprod. Toxicol.* 16, 281–289.
- Oruc, E.O., Sevçiler, Y.U., Uner, N., 2004. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Biochem. Physiol. C* 137, 43–61.
- Osterloh, J., Lotti, M., Pond, S.M., 1983. Toxicologic studies in a fatal overdose of 2,4-D, MCPP, and chlorpyrifos. *J. Anal. Toxicol.* 7, 125–129.
- Pérez-Iglesias, J.M., Natale, G.S., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2018. Are the damaging effects induced by the imazethapyr formulation Pivot® H in *Boana pulchella* (Anura) reversible upon ceasing exposure? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 148, 1–10.
- Pérez-Iglesias, J.M., Ruiz de Arcaute, C., Nikoloff, N., Dury, L., Soloneski, S., Natale, G.S., Larramendy, M., 2014. The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation Glacoxan Imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 104, 120–126.
- Pérez, D.J., Okada, E., De Gerónimo, E., Menone, M.L., 2017. Spatial and temporal trends and flow dynamics of glyphosate and other pesticides within an agricultural watershed in Argentina. *Environ. Toxicol. Chem.* 36, 3206–3216.
- Perocco, P., Ancora, G., Rani, P., Valenti, A.M., Mazzullo, M., Colacci, A., Grilli, S., 1990. Evaluation of genotoxic effects of the herbicide dicamba using *in vivo* and *in vitro* test systems. *Environ. Mol. Mutagen.* 15, 131–135.
- Pitarque, M., Creus, A., Marcos, R., Hughes, J.A., Anderson, D., 1999. Examination of various biomarkers measuring genotoxic endpoints from Barcelona airport personnel. *Mutat. Res.* 440, 195–204.
- Prado-Ochoa, M.G., Muñoz-Guzmán, M.A., Vázquez-Valadez, V.H., Velázquez-Sánchez, A.M., Salazar, A.M., Ramírez-Noguera, P., Angeles, E., Alba-Hurtado, F., 2016. Genotoxicity and cytotoxicity assessment of new ethyl-carbamates with ioxidicidal activity. *Mutat. Res.* 807, 8–14.
- Rodrigues, S., Antunes, S.C., Correia, A.T., Nunes, B., 2016. Acute and chronic effects of erythromycin exposure on oxidative stress and genotoxicity parameters of *Oncorhynchus mykiss*. *Sci. Total Environ.* 545, 591–600.
- Ruiz de Arcaute, C., Pérez-Iglesias, J.M., Nikoloff, N., Natale, G.S., Soloneski, S., Larramendy, M., 2014a. Genotoxicity evaluation of the insecticide imidacloprid on circulating blood cells of Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae) by comet and micronucleus bioassays. *Ecol. Indic.* 45, 632–639.
- Ruiz de Arcaute, C., Soloneski, S., Larramendy, M., 2014b. Evaluation of the genotoxicity of a herbicide formulation containing 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (dicamba) in circulating blood cells of the tropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. *Mutat. Res.* 773, 1–8.
- Ruiz de Arcaute, C., Soloneski, S., Larramendy, M., 2016. Toxic and genotoxic effects of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-based herbicide on the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 128, 222–229.
- Samanic, C., Rusiecki, J., Dosemeci, M., Hou, L., Hoppin, J.A., Sandler, D.P., Lubin, J., Blair, A., Alavanja, M.C., 2006. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to dicamba in the agricultural health study. *Environ. Health Perspect.* 114, 1521–1526.
- Sandal, S., Yilmaz, B., 2011. Genotoxic effects of chlorpyrifos, cypermethrin, endosulfan and 2,4-D on human peripheral lymphocytes cultured from smokers and nonsmokers. *Environ. Toxicol.* 26, 433–442.
- Singh, N.P., 1996. Microgel electrophoresis of DNA from individual cells: principles and methodology. In: Pfeifer, G.P. (Ed.), *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations*. Plenum Press, New York, pp. 3–24.
- Soloneski, S., González, N.V., Reigosa, M.A., Larramendy, M.L., 2007. Herbicide 2,4-D dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-induced cytogenetic damage in human lymphocytes *in vitro*. *Cell Biol. Int.* 31, 1316–1322.
- Summerfelt, R.C., Smith, L.S., 1990. Anaesthesia, surgery and related techniques. In: Schreck, C.B., Moyle, P.B. (Eds.), *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society, Bethesda MD, pp. 213–272.
- Tayeb, W., Nakbi, A., Chaieb, I., Hammami, M., 2012. Oxidative stress induced by the 2,4-dichlorophenoxyacetic herbicide. In: Lushchak, V. (Ed.), *Oxidative Stress-environmental Induction and Dietary Antioxidants*. InTech, Rijeka, Croatia, pp. 115–130.
- USEPA, 1984. Office of Pesticides and Toxic Substances. Summary of Results of Studies Submitted in Support of the Registration of Dicamba. Environmental Protection Agency, Washington DC, Washington, D.C. U.S.
- USEPA, 2005. Reregistration Eligibility Decision (RED) for 2,4-D. U.S. Environmental Protection Agency, Washington DC, 738-R-05-002.
- USEPA, 2006. Reregistration Eligibility Decision for Dicamba and Associated Salts. U.S. Environmental Protection Agency, Washington DC. https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/dicamba_red.pdf.
- Vera-Candiotti, J., Soloneski, S., Larramendy, M., 2010. Genotoxic and cytotoxic effects of the formulated insecticide Aficida® on *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Pisces: Poeciliidae). *Mutat. Res.* 703, 180–186.
- Vera-Candiotti, J., Soloneski, S., Larramendy, M., 2015. Pirimicarb-based formulation-induced genotoxicity and cytotoxicity on the fresh water fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Pisces, Poeciliidae). *Toxicol. Ind. Health* 31, 1051–1060.
- Vera-Candiotti, J., Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2013. Single-cell gel electrophoresis assay in the ten spotted live-bearing fish, *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842), as bioassay for agrochemical-induced genotoxicity. *Ecotoxicol.*

- Environ. Saf. 98, 368–373.
- Westlund, P., Yargeau, V., 2017. Investigation of the presence and endocrine activities of pesticides found in wastewater effluent using yeast-based bioassays. *Sci. Total Environ.* 607, 608 744–751.
- WHO, 1990. *Public Health Impacts of Pesticides Used in Agriculture* (WHO in Collaboration with the United Nations Environment Programme, Geneva, 1990). World Health Organization, p. 128.
- WHO, 2009. *The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification: 2009*. World Health Organization, Geneva, Switzerland, p. 81.
- Woudneh, M.B., Sekela, M., Tuominen, T., Gledhill, M., 2007. Acidic herbicides in surface waters of Lower Fraser Valley. *J. Chromatogr. A* 1139, 121–129.
- Zar, J.H., 1999. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey.

**AUXINIC HERBICIDES INDUCE OXIDATIVE STRESS ON *CNESTERODON
DECEMMACULATUS***

Celeste Ruiz de Arcaute^{a,c}, Natalia A. Ossana^{b,c}, Juan Manuel Pérez-Iglesias^{a,c},
Sonia Soloneski^{a,c} and Marcelo L. Larramendy^{a,c}

- ^a Cátedra de Citología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Calle 64 N° 3, B1904AMA La Plata, Argentina
- ^b Programa de Ecofisiología Aplicada, Instituto de Ecología y Desarrollo Sustentable (PRODEA-INEDES), Universidad Nacional de Lujan, C.C. 221, Luján, Argentina
- ^c Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

Address for Correspondence: Marcelo L. Larramendy, Ph.D.
Facultad de Ciencias Naturales y Museo
Calle 64 Nro. 3 (esq. 120)
B1904AMA La Plata
Argentina
TE: +54-221-424 9049
E-mail: marcelo.larramendy@gmail.com

ABSTRACT

Pesticides might increase reactive oxygen species (ROS) production. Dicamba (DIC) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) are auxinic herbicides commonly applied in agroecosystems to control unwanted weeds. We analyzed the oxidative damage exerted on the fish *Cnesterodon decemmaculatus* by an acute exposure to DIC- and 2,4-D-based herbicides. The Endo III- and Fpg-modified alkaline comet assay was used for detecting DNA damage caused by oxidative stress, whereas enzymatic and non-enzymatic biomarkers such as the activities of catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), acetylcholinesterase (AChE) and glutathione content (GSH) were used to assess antioxidant response to these two herbicides. At DNA level, results demonstrate that both auxinic herbicides induce oxidative damage at purines but pyrimidines. An increase on CAT and GST activities were detected in 48 h- and 96 h-treated specimens with both auxinics. GSH content decreased in fish exposed to DIC during 48 h and to 2,4-D after 96 h of exposure. Additionally, a diminished AChE activity in specimens treated with DIC and 2,4-D only after 96 h. Total protein content decreased in fish exposed to both auxinics during 96 h. These results represent the first evaluation of oxidative damage related to DIC and 2,4-D exposure on a fish species as the Neotropical freshwater teleost *C. decemmaculatus*.

KEYWORDS

Endo III- and Fpg-modified comet assay; catalase; glutathione; glutathione-S-transferase; acetylcholinesterase

1. INTRODUCTION

Pesticides effectiveness together with their massive use at global scale have rendered these chemicals a major issue for inducing environmental pollution (Lazartigues et al., 2013). These xenobiotics eventually reach and pollute air, soil and water compartments, where herbicides represent an important fraction within the aquatic environmental stressors. Among the latter group are included dicamba (DIC, 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid) and 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D), auxinic chemicals extensively employed to manage pre- and post-emergent weeds (USEPA, 2017). Furthermore, these herbicides fall within the top ten agrochemicals employed in Argentina (CASAFE, 2017).

DIC is part of the benzoic acid chemical family (USEPA, 2006) and 2,4-D belongs to the phenoxy alcanoic acid family of herbicides (USEPA, 2005). Several genotoxic studies have been performed in different biotic matrices to assess the genotoxic effects induced by both DIC and 2,4-D. Among them, induction of sister chromatid exchanges (SCEs) (Arias, 2007; González et al., 2006; Madriagal-Bujaidar et al., 2001), micronuclei (MNs) (Ateeq et al., 2002; Farah et al., 2006; González et al., 2011; Ruiz de Arcaute et al., 2014) and DNA strand-breaks by the comet assay (Ateeq et al., 2005; Bokán et al., 2013; González et al., 2005, 2007; Martínez-Tabche et al., 2004; Ruiz de Arcaute et al., 2014; Sorensen et al., 2005). For 2,4-D, besides, induction of chromosomal aberrations have been demonstrated (Adhikari and Grover, 1988; Amer and Aly, 2001; Farah et al., 2006).

Environmental pollutants, including pesticides such as herbicides among others, are known to cause oxidative damage by increasing reactive oxygen species (ROS) production (Atamaniuk et al., 2013; Cadet et al., 2003).

Organisms have enzymatic and nonenzymatic mechanisms to balance the production and undesirable effects of ROS (Lushchak, 2011; van der Oost, 2003). Whether natural cellular pro-oxidants exceed the anti-oxidants cellular production, it results in oxidative stress (Cooke et al., 2006; Valko et al., 2006). Additionally, ROS could interact with macromolecules leading to lipid peroxidation, enzyme inactivation, hormone oxidation and jeopardize DNA (Cavalcante et al., 2008; Newman and Clements, 2008).

In the last decade, the usefulness of a battery of biomarkers to detect and quantify pesticide-induced deleterious effects on target and non-target species is a well-documented aspect in ecotoxicological investigations. Among them, one the most relevant methodologies adopted worldwide is the alkaline comet assay (Azqueta et al., 2017) as well as several biochemical markers such as alterations in the oxidative balance (Guilherme et al., 2012; Ossana et al., 2016).

The comet assay is a frequent and recommended test to detect DNA damage in different organisms, including fish (Bony et al., 2010; Martins and Costa, 2017). The comet assay either in its alkaline and neutral version detect several DNA lesions such as single- and double-strand breaks as well as alkaline-labile sites (Dhawan and Anderson, 2017). Nevertheless, the addition of lesion-specific endonucleases in the methodology will introduce DNA breaks at the damaged bases these restriction enzymes identify, giving information, then, about the type of lesion induced. Consequently, the modified comet assay became considered a valuable and sensitive method to estimate oxidative damage in genotoxicological evaluations (Azqueta et al., 2017; Collins and Azqueta, 2012; Pérez-Iglesias et al., 2017). Briefly, after the lysis period of the

conventional comet assay methodology, a digestion with lesion-specific endonucleases is included. Two examples of the aforementioned endonucleases commonly employed are the formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg) and endonuclease III (Endo III) (Collins, 2004; Collins et al., 1996). Fpg identifies and eliminates damaged purines from DNA, e.g., 8-oxoguanine, Fapy-Gua, Fapy-Ade, and to a lesser extent 8-oxoadenine. On the other hand, Endo III transforms oxidized pyrimidines into strand breaks.

Among the most studied enzymatic and non-enzymatic antioxidant biomarkers are included, e.g., catalase (CAT), which reduce H_2O_2 to H_2O and O_2 ; the tripeptide reduced glutathione (GSH), a non enzymatic antioxidant chemical capable to prevent damage to different cellular constituents caused by ROS. GSH may act as a cofactor for ROS-detoxifying enzymes such as glutathion-dependent peroxidases, or glutathione-S-transferases (GST). It is oxidized in the reaction that metabolizes H_2O_2 into H_2O and thus converted to its oxidized form, glutathione disulfide. Once oxidized, it can be reduced back by GSH reductase, being the relation between GSH and oxidized glutathione usefull parameter in the evaluation of oxidative stress (van der Oost, 2003). The GST catalyzes the union of GSH to toxic compounds, increasing their solubility and facilitating their excretion. Additionally, acetylcholinesterase (AChE) catalyses the breakdown of acetylcholine in cholinergic synapses. Some pesticides inhibit AChE causing over-stimulation of the post-synaptic membrane, mechanisms that could conclude in cellular death (Ferrari et al., 2007; Varó et al., 2008).

Cnesterodon decemmaculatus is a small Poecillidae fish widely found in the Neotropical region. Due to several intrinsic characteristics, such as its small

size, wide range of tolerance, facility to adjust to laboratory conditions, in addition to the fact that it is a nonmigratory species frequently present in high densities, it is commonly employed in bioassays (Soloneski and Larramendy, 2017, and references therein). Recently, it has been employed to analyze pollutants-induced toxicity among aquatic vertebrates, including herbicides as glyphosate, DIC and 2,4-D, insecticides as pirimicarb and chlorpyrifos (Soloneski and Larramendy, 2017 and references therein) as well as heavy metals such as chromium (Vera-Candiotti et al., 2011), cadmium (Baudou et al., 2017; Mastrángelo and Ferrari, 2013) and zinc (Gómez et al., 1998). The use of *C. decemmaculatus* in *in situ* studies is also well documented, mostly in relation with the salubrity of contaminated river waters (de la Torre et al., 2005; Menéndez-Helman et al., 2015; Ossana et al., 2016).

In previous studies, the alkaline comet assay revealed the induction of primary DNA damage in erythrocytes of *C. decemmaculatus* after exposure to the commercial herbicide formulations 57.7% DIC-based Banvel® and the 58.4% 2,4-D-based DMA® (Ruiz de Arcaute et al., 2014, 2016). In spite of these results, and to the best of our knowledge, oxidative stress exerted by these auxinic herbicides on *C. decemmaculatus* has not been analyzed so far.

In order to assess oxidative damage in DIC- and 2,4-D-exposed *C. decemmaculatus* fish, the modified version of comet assay using the endonucleases Endo III and Fpg, was performed for the evaluation of oxidative DNA damage. Furthermore, CAT, GST, GSH and AChE activities were also used to assess the engagement of the antioxidant response to these two xenobiotics.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Chemicals and quality control

Banvel[®] (57.71% DIC) and DMA[®] (58.4% 2,4-D) were provided by their manufacturers, Syngenta Agro S.A. (Buenos Aires, Argentina) and Dow AgroSciences Argentina S.A. (Buenos Aires, Argentina), respectively. Restriction enzymes were acquired from New England Biolabs[®] Inc. (Ipswich, MA). Hydrogen peroxide (H₂O₂) was purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany) and dimethyl sulfoxide as well as the rest of the reagents employed were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Concentration analyses of both auxinic herbicides in the test solutions were verified by QV Chem Laboratory (La Plata, Buenos Aires, Argentina). Concentrations assessed throughout the study represent the nominal concentrations of the analyte present within the formulations Banvel[®] and DMA[®].

2.2. Test species

Specimens of *C. decemmaculatus* were collected from an unpolluted stream near La Plata city (Buenos Aires Province, Argentina) and immediately transferred to the laboratory. Acclimatation was carried out in aquariums with dechlorinated tap water (25.0 ± 1°C; pH 7.5 ± 0.1; 6.4 ± 0.3 mg/L dissolved oxygen; 994 ± 8.5 µS/cm; 142 ± 21.5 mg CaCO₃/L) and artificial aeration for a minimum of 20 days to 16/8 h light/dark cycle at 20 ± 1°C. Fish were fed with commercial fish food (TetraFin[®], TetraWerke, Melle, Germany).

2.3. Experimental design

Specimens were exposed *in vivo* for 48 and 96 h to a concentration equivalent to 25% of the LC50_{96h} of each commercial formulation Banvel® and DMA®. The LC50_{96h} for both herbicides were reported previously (Ruiz de Arcaute et al., 2014, 2016). All experimental points were carried out employing ten individuals in a 1 L glass aquarium and exposed for 48 and 96 h to a concentration of 410 mg/L DIC- or 252 mg/L 2,4-D-based commercial formulations Banvel® and DMA®, respectively. During the experiments, herbicide solutions were renewed daily. No food supply was provided during the experiments. Negative (dechlorinated tap water; Section 2.2) control was performed in simultaneous with DIC- and 2,4-D-exposed fish. After 48 and 96 h of treatment, fish were anaesthetized by immersion in ice water (Ackerman et al., 2005; Summerfelt and Smith, 1990) and blood samples were obtained for the alkaline SCGE assay following recommendations previously reported (Ruiz de Arcaute et al., 2014, 2016; Vera-Candioti et al., 2013). For positive control, after solidification of the agarose layers and before lysis, slides were treated with 50 µM H₂O₂ (4°C, 5 min). Afterwards, fish were subsectioned, and the body midsections up to the anus corresponding to the visceral tissues were stored in freeze conditions (-80 °C) for antioxidant biomarker determination (Menéndez-Helman et al., 2012; Nunes et al., 2005; Varó et al., 2008). All end-points were performed in triplicate and run simultaneously.

2.4. Endonuclease-modified alkaline comet assay

The alkaline endonuclease-modified comet assay was performed as reported elsewhere (Collins et al., 1996; Guilherme et al., 2012; Soloneski et al., 2017) with adjustments previously published for other small aquatic vertebrate

species (Pérez-Iglesias et al., 2017). Following Collins (2004) and Pérez-Iglesias et al. (2017), slides were incubated at 37°C during 45 or 30 min with 50 µL of Endo III (0.5 U) or Fpg (0.13 U), respectively, immediately after the lysis period. After the endonuclease incubation period, samples were processed according to the standard comet assay method. In order to classified damage level, nucleoids were ranked into five categories (0--I, undamaged nucleoids; II--IV, damaged nucleoids) following previous suggestions (Çavaş and Könen, 2007). Results for each treatment group are expressed as the mean number of damaged nucleoids per 100 cells analyzed. The genetic damage index (GDI) was estimated as suggested by Pitarque et al. (1999).

2.5. Antioxidant biomarkers determination

Body midsection tissues from each fish employed in the comet assay experiments were homogenized with a glass/Teflon homogenizer on ice at 3000 rpm and 20 strokes. The resulting homogenate was mixed in a 1:8 w/v proportion with buffer (0.1 M NaH₂PO₄, 0.15 M KCl, 1mM EDTA, 1mM DTT and 10% v/v glycerol, pH 8) in order to obtain a post-mitochondrial supernatant (PMS). For samples committed to determination of AChE activity, PMS was prepared from a 1/20 tissue w/v at pH 8.0. PMS final homogenate was centrifuged at 10,000 xg (10 min, 4 °C). Resulting supernatant was employed for biomarker measurements.

CAT (EC1.11.1.6) activity was measured spectrophotometrically at 240 nm for 60s (25 °C) according the technique proposed by Baudhuin et al. (1964). 10-20 µL of PMS were mixed with 0.05 M NaH₂PO₄ buffer (pH 7.2) and 17.8 mM

H₂O₂ in a final volume of 1.5 mL. Results were expressed as $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ consumed/min mg protein.

GST (EC2.5.1.18) activity was measured according to the method proposed by Habig et al. (1974) at 340 nm (25 °C) during a period of 2 min. In a final volume of 1.3 mL, 10 μL PMS were mixed with 0.1 M NaH₂PO₄ buffer (pH6.5), 10 mM GSH and 20 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB). GST activity was expressed as $\mu\text{mol CDNB conjugate formed/min mg protein}$.

GSH content was determined following the methodology of Ellman (1959). PMS and 10% trichloroacetic acid (TCA) were mixed in the same proportion and then centrifuged at 10,000 xg for 10 min (4 °C). GSH estimation was carried out using 100 μL of the resulting supernatant and 1mL DTNB. Results were obtained at 412 nm for 15 min (25 °C) against a GSH standard curve. Results were express in terms of acid-solublethiols (AST) as $\mu\text{mol of soluble thiols/g of tissue}$.

AChE (E.C.3.1.1.7) determination was performed following the methodology described by Ellman et al. (1961) at 412 nm at 8 sec intervals, during 2 min. The mixture comprised 10 μL homogenate, 3 mL of 0.1M K₂HPO₄ buffer (pH8) and 100 μL of 5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) solution (10 mM DTNB) and 10-25 μL substrate (0.075 M acetylthiocholineiodide). For enzyme measurements the substrate acetylthiocholine iodide was employed with an extinction coefficient of 13.6 mM/cm. Enzyme activity was expressed as nmol of substrate hydrolyzed/ min mg protein.

Tissue protein (Pr) content was determined as described by Lowry et al. (1951) employing bovine serum albumin as a standard.

All measurements were performed in triplicate for each sample. Values were normalized, and estimations expressed as mean values \pm standard error of the mean.

2.6. Statistical analysis

For results of the modified comet assay analysis and antioxidant biomarkers, a one-way ANOVA with Dunnett's test was performed (Zar, 1999). Herbicide induced OD for each antioxidant biomarker (respect buffer enzyme), was compared with a *t*-test for the difference of means with equal variances (Zar, 1999). A Kruskal-Wallis test was employed in the cases that did not perform the assumptions of normality. The level of significance chosen was 0.05.

3. RESULTS

3.1 Endonuclease-modified alkaline SCGE assay

Concentration analyses revealed no significant variations ($P > 0.05$) of the test solutions throughout the experiments (concentration range, $98 \pm 5\%$ recovery).

Results from the modified comet assay in circulating blood cells of *C. decemmaculatus* exposed fish to 410 mg/L DIC or 252 mg/L 2,4-D are presented in Table 1 and net OD is illustrated in Fig. 1. The capability of Endo III and Fpg to recognize oxidized DNA bases within our experimental protocol was achieved by incubating nucleoids with 50 μ M H₂O₂ (Positive control). H₂O₂-nucleoid incubation induced an enhancement in the frequency of damaged nucleoids, the GDI and OD levels in enzyme buffer treated-cells exposed to Endo III and Fpg ($P < 0.001$) (Table 1; Fig.1).

In individuals exposed to DIC herbicide formulation, GDI value was enhanced 4.06 and 2.54 fold-times over negative control values in experiments lasting 48 and 96 h, respectively ($P < 0.001$; Table 1). Such differences resulted from an increase in the frequency of all categories of damaged nucleoids (types II–IV) ($0.01 > P < 0.001$) and a decrease in the frequency of undamaged nucleoids (types 0–I) ($P < 0.001$; Table 1). Post-treatment with Fpg induced an enhancement in GDI and in the net OD compared with enzyme buffer-treated cells in DIC-exposed fish during both 48 ($P < 0.01$) and 96 h ($P < 0.05$) (Table 1; Fig. 1). Alterations in DNA damage in nucleoids from fish exposed to DIC during 48 h and post-treated with Fpg were related to an enhancement in the frequency of type II, III and IV nucleoids ($0.05 < P < 0.01$). Moreover, after 96 h of exposure, an enhancement of type III nucleoids was observed ($P < 0.05$)

(Table 1). Oppositely and despite of the exposure time, the incubation with Endo III did not produce any significant variation in DNA damage, GDI and, thus, in the net OD in cells from DIC-exposed individuals when compared to enzyme buffer treated-cells ($P > 0.05$) (Table 1; Fig. 1).

When the exposure with 2,4-D herbicide formulation was assessed, GDI value was enhanced 3.84 and 5.10 fold-times over negative control values in experiments lasting 48 and 96 h, respectively ($P < 0.001$; Table 1). Such differences resulted from an increase in the frequency of all categories of damaged nucleoids (types II--IV) ($0.01 > P < 0.001$) and a decreased frequency of undamaged nucleoids (type 0--I) ($P < 0.001$; Table 1). Post-treatment with Fpg induced a significant increase in both GDI as well as in the net OD compared with enzyme buffer-treated cells from 2,4-D-exposed fish during both 48 and 96 h ($P < 0.01$) (Table 1; Fig. 1). Differences in DNA damage in 2,4-D-exposed fish post-treated with Fpg for either 48 and 96 h were due to an increased frequency of type II and IV nucleoids ($0.05 < P < 0.001$) (Table 1). On the other hand, despite the exposure time, post-treatment with Endo III did not modify DNA damage, GDI and net OD in cells from 2,4-D-exposed individuals in relation to enzyme buffer treated-cells (Table 1; Fig. 1).

3.2 Antioxidant biomarkers determination

The results of body midsection enzyme activities are presented in Table 2. The mean values of CAT activity in control fish were 12.86 ± 2.34 and 13.52 ± 2.96 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ hydrolyzed/min mg protein at 48 and 96 h, respectively ($P > 0.05$). CAT activity was significantly increased in fish exposed either to DIC ($P <$

0.001) or 2,4-D ($0.01 > P < 0.001$) commercial formulations exposed during 48 and 96 h, respectively (Table 2).

Control GST activity was 0.04 ± 0.01 μmol CDNB conjugated form/min mg protein for both times of exposure ($P > 0.05$). In fish treated with both DIC- or 2,4-D-herbicide formulations, GST activity was enhanced when compared to control values either at 48 ($0.05 > P < 0.01$) or 96 h of exposure ($P < 0.001$; Table 2).

Additionally, mean values of GSH activity in control fish were 3.17 ± 0.56 and 2.60 ± 0.16 $\mu\text{mol/g}$ ww at 48 and 96 h, respectively ($P > 0.05$). In DIC-exposed fish, GSH concentration decreased after 48 h of exposure when compared to control values ($P < 0.05$). However, such difference was not observed in 96 h-exposed fish ($P > 0.05$). For 2,4-D-exposed organisms, an opposite scenario was observed. While no significant differences were found after 48 h of exposure ($P > 0.05$), a diminished GSH activity was detected in fish exposed during 96 h ($P < 0.01$; Table 2).

Finally, control AChE activity was 384.71 ± 17.33 and 372.21 ± 37.25 nmol of substrate hydrolyzed/min mg protein for both 48 and 96 h ($P > 0.05$). A diminished AChE activity was observed in fish exposed either to DIC- or 2,4-D-based formulations during 96 h ($P < 0.01$) but not in fish analyzed after 48 h of exposure to both herbicides ($P > 0.05$; Table 2).

4. DISCUSSION

In this investigation, oxidative stress in *C. decemmaculatus* when exposed to two commercial products containing the auxinic herbicides DIC and 2,4-D was analyzed using two widely employed bioassays such as endonuclease-modified alkaline comet assay and the activity of several antioxidant biomarkers.

Recently, results of the acute lethal and sublethal effects induced by DIC and 2,4-D employing *C. decemmaculatus* as test organism were reported (Ruiz de Arcaute et al., 2014, 2016). In these studies, the alkaline comet assay demonstrated an increase of DNA damage in circulating blood cells of fish continuously exposed up to 96 h to DIC- and 2,4-D-based formulations Banvel® and DMA® within the 410--1229 and 252--756 mg/L concentration ranges, respectively. It was also observed that such effect was independent of the extent of the herbicide exposure period (Ruiz de Arcaute et al., 2014, 2016). Besides, in these studies, the estimation of mortality, behavioral alterations and the MN count were assayed as lethal and other sublethal biomarkers, respectively. Results demonstrated that DIC-based commercial formulation Banvel® induced an enhancement of the frequencies MNs and other nuclear abnormalities in mature erythrocytes, i.e., binucleated cells, lobed and notched nuclei, in fish exposed to 1229 mg/L DIC during 48 h but not in treatments lasting 96 h (Ruiz de Arcaute et al., 2014). Similarly, an enhancement in the frequency of MNs on circulating blood cells of 2,4-D formulated product DMA®-exposed *C. decemmaculatus* specimens during both 48 and 96 h was achieved within the 252--756 mg/L concentration range was also reported. In this content, the frequency of blebbed nuclei was significantly enhanced in treatments lasting

for 48 and 96 h whereas notched nuclei were only observed in fish exposed for 96 h. Contrarily, the frequencies of lobed and binucleated nuclei were not affected after 48 or 96 h of exposure (Ruiz de Arcaute et al., 2016).

Several xenobiotics, such as herbicides, can alter ROS balance via various mechanisms, such as alterations in enzymatic and non enzymatic antioxidant defenses, membrane lipid peroxidation, among others, providing mechanistic basis for their observed toxicity (Kaya and Yigit, 2012). The over production of ROS can eventually overcome the antioxidant capacity of the cells, situation that leads to oxidative stress and depletion of antioxidant defense (Lushchak, 2011; Muthulakshmi et al., 2018), causing irreversible damage in cellular macromolecules and affecting cellular function and viability (Costantini and Verhulst, 2009; Poletta et al., 2016). Lipid damage affects cells membrane structure, making them less permeable and jeopardizing their integrity, and protein oxidation alters their conformation and could, depending on their location and structure, compromise their function (Hulbert et al., 2007; Poletta et al., 2016). Ultimately, this situation could lead, then, to tissue, cellular and DNA damage as well (Hulbert et al., 2007).

It is believed that DIC and 2,4-D could mediate jeopardizing effects on organisms associated with ROS generation (Espandiari et al., 1998; Peixoto et al., 2008). For the auxinic herbicide 2,4-D, evidence of its contribution in the production of ROS has been reported (Bukowska, 2003, 2006; Oruç and Üner, 2000; Romero-Puertas et al., 2004). Specifically for fish, oxidative stress have been informed in the goldfish *Carassius auratus* (Atamaniuk et al., 2013; Kubrak et al., 2013; Matviishyn et al., 2014), the zebrafish *Danio rerio* (Li et al., 2017), the European carp *Cyprinus carpio* (Oruç et al., 2004) and the Nile tilapia

Oreochromis niloticus (Oruç et al., 2004) can be included. As far as we know, there is no information regarding oxidative stress induced by DIC on fish species.

To elucidate the potential type of lesions that DIC and 2,4-D induce into the DNA of the auxinic herbicide-exposed specimens of *C. decemmaculatus*, we employed the modified comet assay, in which a digestion with lesion-specific endonucleases was included. Our current observations reveal that post-treatment with enzyme buffer enhances by itself the level of DNA damage. These results agree well with previous observations stressing the capability of the buffer to induce damage into the nucleoid DNAs, and thus, increasing their length (Collins and Azqueta, 2012; Demir et al., 2014; Pérez-Iglesias et al., 2017; Soloneski et al., 2016, 2017). Furthermore, our results proves the efficacy of Fpg, in combination with the comet assay for detecting damaged purines in the DNA of circulating blood cells of *C. decemmaculatus* treated with the auxinic herbicides DIC and 2,4-D in their commercial formulations Banvel® and DMA®, respectively. Positive results have been also reported when employing Fpg-modified comet assay in the European eel (*Anguilla anguilla*) treated with glyphosate present in the formulation Roundup® (Guilherme et al., 2012) or in the in common bleak (*Alburnus alburnus*) when used as biotic matrix to evaluate the environmental risk of the water contamination of the Velika Morava River basin (Jovanović et al., 2018). So far, the Fpg-modified comet assay was only used by Lajmanovich et al. (2015) in mature erythrocytes of the common American toad *Rhinella arenarum* exposed to 2,4-D to assess to ability of the glycosylase to transform oxidized purines into DNA single-strand breaks. However, no induction of DNA damage was revealed by the comet assay or by

the Fpg-modified version when the 2,4-D-based commercial formulation Asi Max 50[®] (50% 2,4-D) was employed in this anuran species (Lajmanovich et al., 2015). So far we do not possess a clear answer to explain the contradictory results obtained in the common toad *R. arenarum* in regard to our current observations. However, although speculative, it could be suggested that they might be most provably be committed to the dose of 2,4-D employed since negative results were reported after employing a dose nearly 12 times lower than that employed in our experimental design (Lajmanovich et al., 2015). As far as we know, no studies employing the Fpg- and Endo III-modified alkaline SCGE assay on DIC- and 2,4-D-exposed fish have been reported so far. Thus, our study demonstrates for the first time DNA oxidative damage induced after exposure to a pollutant employing the glycosylase-modified SCGE assay in an aquatic organism like *C. decemmaculatus*.

In the present study increased activities of the enzymes CAT and GST were observed in fish exposed for 48 and 96 h to both DIC- and 2,4-D. In agreement to our observations, an enhancement in CAT activity has been previously reported in fish exposed to several herbicides. Among them, higher CAT levels in regard to non-exposed organisms have been reported in the zebra fish *D. rerio* after treatment with bipyridylum herbicide diquat (Wang et al., 2018), the three-barbeled catfish *Rhamdia quelen* (Persch et al., 2017) and the characin *Leporinus obtusidens* (Gluszczak et al., 2011) exposed to the glyphosate-based formulation Roundup[®] as well as in the climbing perch *Anabas testudineus* and the stinging catfish *Heteropneustes fossilis* as a consequence of a glyphosate-based formulation Excel Mera 71 exposure (Samanta et al., 2014). Similar observations were also reported for the streaked

prochilod *Prochilodus lineatus* exposed to atrazine (Paulino et al., 2012) and for the common carp *C. carpio* after simazine treatment (Stara et al., 2012).

As observed for CAT, GST activity was also increased after 48 and 96 h treatment with DIC- and 2,4-D-herbicide formulations. An increased activity of GST could expose disorders related to an oxidative stress situation, as has been previously confirmed in the Nile tilapia *O. niloticus* and the common carp *C. carpio* exposed to a formulated product containing 2,4-D (trade name not specified), to the azinphosmethyl-based formulation Guthion 20 EC (Oruç et al., 2004; Oruç and Uner, 2002) and to the triazine compounds terbuthylazine and metribuzin (Hostovsky et al., 2012). Besides, and in agreement with our observations, similar raised GST activity has been also reported to occur, among others, in the hybrid fish jundiara *Leiarius marmoratus* × *Pseudoplatystoma reticulatum* exposed to the glyphosate-based formulation Roundup Original® (de Moura et al., 2017) as well as in the streaked prochilod *P. lineatus* exposed to atrazine (Paulino et al., 2012). Therefore, it could be assumed that the increased CAT and GST activity could help preventing oxidative damage caused in the specimens of *C. decemmaculatus* exposed to both auxinic herbicides.

Additionally to the aforementioned altered markers for oxidative stress, a decrease of GSH was registered in specimens treated for 48 and 96 h with either DIC- or 2,4-D-herbicide formulations. GSH is part of the first defense of organisms against oxidative stress (Finkel, 2000). Xenobiotics that make contact with the cells are removed by conjugation with GSH or by means of GST, process that decreases GSH levels (Elia et al., 2003). In agreement to our results, a similar diminished GSH activity has been reported after exposure to

other herbicides in different fish species such as the Delta smelt *Hypomesus transpacificus* exposed to the fluridone-based formulation Sonar® AS and to the glyphosate-based formulated product Roundup® Custom (Jin et al., 2018) as well as the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* exposed to commercial linuron (formulation not specified) (Topal et al., 2017), among others. The diminished GSH activity reported in our results could be due to either a high intracellular demand of GSH associated with the endobiotic detoxification processes of DIC and 2,4-D or by an increased production of ROS exerted by the herbicides raising the general oxidative potential required for these processes (Mela et al., 2013; Pamela and Richard, 1994). Previous investigations have reported that GSH conjugates with environmental contaminants either by a spontaneous manner or catalyzed by GST enzyme detoxification (Elia et al., 2003). Our results agree with the pattern reported previously by Elia et al. (2003) in the black bullhead catfish *Ameiurus melas* as a consequence of mercury exposure. Authors observed an enhanced GST level and a concomitant decrease in the GSH content, similar situation as we found in *C. decemmaculatus* after both auxinic herbicide treatments reported in the current study.

Considering the diminished activity of AChE in auxinic herbicides-exposed fish we observed, enzyme inhibition could be proposed as a possible mechanism through which DIC- and 2,4-D-herbicide formulations could induce oxidative stress. Although speculative, a plausible explanation for these findings could be suggested. Accordingly, it could be considered that these auxinic herbicides reduced liver metabolism, interfering with the synthesis of these enzymes. The inhibition of AChE leads to an overstimulation of organism's nervous system, pointing out, thus, the potential neurotoxic effects of the

auxinic herbicides employed in this study as anticholinergic compounds. Several investigations confirmed that AChE is a sensitive parameter for neurotoxicity exerted by other xenobiotics such as pyrethroids and herbicides rather than that very well known neurotoxic agents such as carbamates and organophosphorus pesticides (Kumar et al., 2009). Extending this concept, it has been reported a dose-dependent decrease in the levels of AChE in the spotted snakehead *Channa punctatus* exposed to the insecticides λ -cyhalothrin-based formulation Colt[®] 25 as well as to the cypermethrin-based formulation REEVA-5, being the former more potent than the latter (Kumar et al., 2009). Specifically, similar results have been found after exposure of the characin *L. obtusidens* exposed to the herbicide glyphosate-based formulation Roundup[®] (Gluszczak et al., 2011; Salbego et al., 2010) and the Delta smelt *Hypomesus transpacificus* exposed to the fluridone-based formulation Sonar[®] AS, to the penoxsulam-based formulated product Galleon[®] SC or to Clearcast[®], an imazamox-based herbicide formulation (Jin et al., 2018). In fish, AChE activity is important in motion capacity, predation and social interactions (Rodríguez-Fuentes et al., 2015). In addition, AChE alteration could alter early development as informed by Behra et al. (2002). In agreement, we have previously observed the appearance of behavioral changes in *C. decemmaculatus* specimens after auxinic herbicide exposure to sublethal concentrations (Ruiz de Arcaute et al., 2014, 2016).

Diminished protein content was detected in exposed specimens, indicating that the auxinic herbicides employed caused alterations in the protein metabolism of exposed *C. decemmaculatus*. Pesticide-induced inhibitory effect on protein level is a very well documented aspect in toxicological studies when

fish are employed as biotic matrix (Lal et al., 2013; Naqvi et al., 2017; Samanta et al., 2014). Our results agree with several observations previously reported on several fish species exposed to a wide variety of different active ingredients of pesticides, including insecticides, e.g., fenvalerate (Tripathi and Verma, 2004b), chloropyrifos (Naqvi et al., 2017), malathion (Lal et al., 2013; Naqvi et al., 2017), α -cypermethrin (Tripathi and Singh, 2013), cypermethrin (Kumar et al., 2009; Naqvi et al., 2017; Ullah et al., 2014), λ -cyhalothrin (Kumar et al., 2009; Naqvi et al., 2017), permethrin (Sapana Devi and Gupta, 2014), σ -methrin (Sapana Devi and Gupta, 2014), fenitrothion (Katsiadaki et al., 2006; Sancho et al., 1997), diazinon (Ozcan Oruç et al., 2006), endosulfan (Tripathi and Verma, 2004a), herbicides, e.g., atrazine (Persch et al., 2017), linuron (Katsiadaki et al., 2006), benthocarb (Seshagiri et al., 1987), glyphosate (Gluszczak et al., 2011; Persch et al., 2017; Samanta et al., 2014), quinclorac (Persch et al., 2017), among others. It is worth mentioned, that similar results on total protein content were observed recently in the Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* after exposure to several commercial available products (formulations not specified) based on organophosphate and synthetic pyrethroid insecticides and herbicides (Naqvi et al., 2017). These authors proposed several alternatives to explain the diminution of protein content. Among them, a physiological response of the organism to compensate xenobiotic-induced stress, an enhanced proteolytic activity or reduced protein synthesis, hormonal imbalances affecting normal tissue protein levels, cellular necrosis and/or altered enzymatic activities due to DNA damage (Naqvi et al., 2017). So far, we do not possess clear evidence allowing us to accept or reject any of the aforementioned plausible explanations. However, our current results clearly highlight that inhibition of

protein increased in both DIC- and 2,4-D-exposed fish during 96 h as compared to 48 h and than a stronger effect was achieved in 2,4-D-exposed *C. decemmaculatus* than that exerted by DIC.

The physico-chemical properties of DIC and 2,4-D makes these herbicides highly mobile in soil and thereby often present in the aquatic environment (Glozier et al., 2012; Li et al., 2009). Previous observations indicate that these auxinics have been detected in urban, peri-urban sites as well as in agroecosystems (Félix-Cañedo et al., 2013; Glozier et al., 2012; Loos et al., 2010; Tagert et al., 2014). Environmental concentrations of these auxinic herbicides have been reported in countries such as United States, Canada and Mexico in ranges from 0.04 µg/L up to 24 µg/L. In Argentina, only one study reports a 2,4-D concentration of 0,99 µg/L found in El Crespo River in Buenos Aires Province. As far as we know, there is no information available on the environmental concentrations of DIC in Argentina. Although treatments in this study comprise one concentration of DIC (410 mg/L) and 2,4-D (252 mg/L), they represent a relatively high end of the threshold values found in the environment of both herbicides and reported so far. Thus, it could be assumed that the concentrations of the auxinic herbicides assayed in the present study would be almost improbable to be found in the biosphere, possibly only after specific incidents, such as direct application, accidental discharge and treatment of application residues, among others. Due to the aforementioned situations, we cannot discard the possibility that piscine populations of *C. decemmaculatus*, as well as others living species, could be exposed to the auxinic herbicides employed at these concentrations.

The present findings demonstrate that both auxinics DIC and 2,4-D in their formulated products Banvel® and DMA®, respectively, acts as oxidizing agents on non-target species such as the Neotropical fish *C. decemmaculatus* is. Furthermore, our results emphasize that the biomarkers assayed are valuable for evaluating contaminated aquatic environments, at least when employing the fish *C. decemmaculatus*.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare that there are no conflicts of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Syngenta Agro S.A. (Buenos Aires, Argentina) and Dow AgroSciences Argentina S.A. (Buenos Aires, Argentina) for kindly providing the formulations Banvel® and DMA®, respectively. The experiments performed in the present study were supported by grants from the National University of La Plata (Grants 11/N746 11/N817 and 11/N847) and the National Agency of Scientific and Technological Promotion (PICT 2015 Number 3059) from Argentina.

Table 1**Table 1**

Analysis of DNA damage measured by modified comet assay in *Cnesterodon decemmaculatus* cells exposed to dicamba-based formulation Banvel® and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-based formulation DMA®

Chemicals	Exposure time (h)	Treatment	No. of animals observed	No. of nucleoids analyzed	Nucleoids Categories % ± SE				% of damaged nucleoids (II+III+IV)	GDI ^a ± SE
					Type 0+I	Type II	Type III	Type IV		
Negative control	48 h	-	10	1036	92.47	7.24	0.29	0.00	7.53	0.49 ± 0.12
		Buffer Endo III	10	1045	57.51 [#]	38.76 [#]	3.73 [#]	0.00	42.49 [#]	1.46 ± 0.04 [#]
		Endo III	10	1014	54.73 [#]	43.00 [#]	2.27	0.00	45.27 [#]	1.48 ± 0.04 [#]
		Buffer Fpg	10	1056	58.90 [#]	33.52 [#]	7.58 [#]	0.00	41.10 [#]	1.48 ± 0.03 [#]
		Fpg	10	1024	51.86 [#]	42.29 [#]	5.85 [#]	0.00	48.14 [#]	1.53 ± 0.06 [#]
	96 h	-	9	946	91.86	7.72	0.42	0.00	8.14	0.48 ± 0.12
		Buffer Endo III	10	1016	59.84 [#]	36.02 [#]	4.14 [#]	0.00	40.16 [#]	1.44 ± 0.04 [#]
		Endo III	10	1036	54.63 [#]	42.08 [#]	3.29	0.00	45.37 [#]	1.48 ± 0.04 [#]
		Buffer Fpg	10	1022	61.25 [#]	34.15 [#]	4.60 [#]	0.00	38.75 [#]	1.43 ± 0.02 [#]
		Fpg	10	1070	47.29 [#]	46.64 [#]	6.07 [#]	0.00	52.71 [#]	1.58 ± 0.05 [#]
DIC	48 h	410 mg/L Buffer Endo III	10	1001	40.46 ^{***}	27.27 ^{***}	18.18 ^{***}	14.09 ^{***}	59.54 ^{***}	1.99 ± 0.16 ^{***}
		Endo III	10	1046	15.87 ^{***}	41.59	30.11 ^{***}	12.43 ^{***}	84.13 ^{***}	2.39 ± 0.13 ^{***}
		Endo III	10	1019	15.80 ^{***}	41.51	30.32 ^{***}	12.37 ^{***}	84.20 ^{***}	2.40 ± 0.06 ^{***}
		Buffer Fpg	10	1023	15.84 ^{***}	41.35	30.11 ^{***}	12.70 ^{***}	84.16 ^{***}	2.40 ± 0.13 ^{***}
		Fpg	10	1011	8.51 ^{***}	19.09 ^{***&&}	40.36 ^{***&&}	32.04 ^{***&&}	91.49 ^{***}	2.96 ± 0.06 ^{***&&}
	96 h	410 mg/L	10	1100	73.64 ^{***}	16.73 ^{**}	8.27 ^{***}	1.36	26.36 ^{***}	1.22 ± 0.11 ^{***}

		Buffer Endo								
		III	10	1011	37.88**	44.21**	16.72***	1.19***	62.12***	1.81 ± 0.03***
		Endo III	10	1008	33.33**	49.50**	14.29***	2.88***	66.67***	1.87 ± 0.03***
		Buffer Fpg	9	890	33.82**	51.01***	14.27***	0.90***	66.18***	1.82 ± 0.04***
		Fpg	10	999	23.62***	45.55**	29.43***&	1.40***	76.38***	2.09 ± 0.11***&
2,4-D	48 h	252 mg/L	10	1101	33.61***	43.51***	20.53***	2.35**	66.39***	1.88 ± 0.09***
		Buffer Endo								
		III	10	1068	12.73***	45.13	39.61***	2.53**	87.27***	2.32 ± 0.04***
		Endo III	10	1042	14.40***	43.86	30.52***	11.22**	85.60***	2.38 ± 0.03***
		Buffer Fpg	10	1032	16.76***	47.09	33.14***	3.01***	83.24***	2.22 ± 0.03***
		Fpg	10	1021	15.77***	39.18&	32.32***	12.73***&&	84.23***	2.42 ± 0.06***&&
	96 h	252 mg/L	10	1058	13.80***	37.24***	35.73***	13.23***	86.20***	2.45 ± 0.16***
		Buffer Endo								
		III	10	1048	9.35***	29.01*	39.31***	22.33***	90.65***	2.74 ± 0.05***
		Endo III	10	1007	9.04***	20.16***	45.68***	25.12***	90.96***	2.87 ± 0.06***
		Buffer Fpg	10	1048	9.26***	28.82***	40.17***	21.75***	90.74***	2.74 ± 0.05***
		Fpg	10	1021	6.37***	20.47***&	41.82***	31.34***&	93.63***	2.98 ± 0.06***&&
Positive	5 min	50 µM	10	1027	70.89*	21.52*	7.59*	0.00	29.11***	1.21 ± 0.15***
control ^b		Buffer Endo								
		III	10	1014	14.69***	45.96	34.22**	5.13**	85.31***	2.25 ± 0.14***
		Endo III	10	1117	4.85***	38.77	37.59***	18.79***	95.15***	2.72 ± 0.16***&
		Buffer Fpg	9	899	19.13***	44.38	32.26***	4.23**	80.87***	2.21 ± 0.13***
		Fpg	9	907	6.95***	26.90**	43.00***	23.15***	93.05***&&	2.84 ± 0.17***&&

^a, GDI: Genetic damage index.

^b, Hydrogen peroxide (H₂O₂, 50 µM) was used as positive control.

#, *P* < 0.001; significant differences with respect to negative control value.

*, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01; ***, *P* < 0.001; significant differences with their respective control group.

&, *P* < 0.01; significant differences with respective buffer-enzyme group.

Table 2**Table 2**

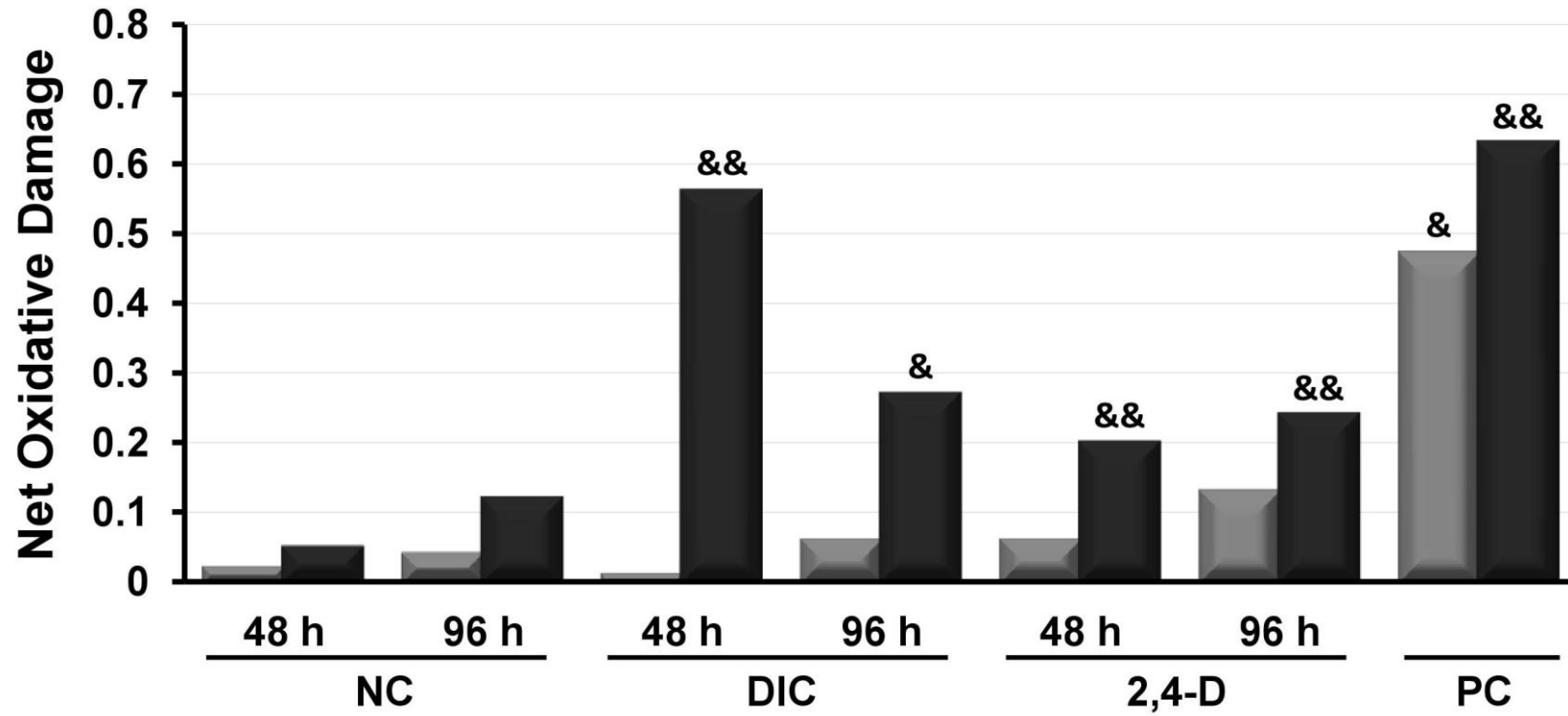
Analysis of biomarkers in *Cnesterodon decemmaculatus* cells exposed to dicamba-based formulation Banvel® and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-based formulation DMA®

Chemicals	Exposure time (h)	Biomarkers (Mean ± SE) ^a				
		Pr	CAT	GST	GSH	AChE
Negative control	48	106.82 ± 13.18	12.86 ± 2.34	0.04 ± 0.01	3.17 ± 0.56	384.71 ± 17.33
DIC		98.22 ± 7.78	51.59 ± 6.40***	0.09 ± 0.01**	1.56 ± 0.15*	343.87 ± 89.81
2,4-D		80.30 ± 8.45	68.91 ± 20.27***	0.07 ± 0.01*	2.08 ± 0.13	267.11 ± 45.79
Negative control	96	115.58 ± 16.18	13.52 ± 2.96	0.04 ± 0.01	2.60 ± 0.16	372.21 ± 37.25
DIC		81.02 ± 7.85*	30.08 ± 3.82***	0.07 ± 0.01***	2.06 ± 0.25	217.48 ± 65.07**
2,4-D		57.18 ± 4.81***	41.55 ± 6.57***	0.10 ± 0.01***	1.04 ± 0.03**	164.24 ± 34.54**

^a, Biomarkers: Pr: protein content as mg g/ww; CAT: catalase as $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ consumed/min mg protein; GST: glutathione-S-transferase as $\mu\text{mol CDNB}$ conjugated formed/min mg protein; GSH: Glutathione content as soluble acid thiols $\mu\text{mol/ g ww}$. AChE: nmol of substrate hydrolyzed/min mg protein.

*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; significant differences with the control group.

Figure 1



LEGEND FOR THE FIGURE

Figure 1. DIC- and 2,4-D-based commercial formulations induced DNA damage evaluated by the Endo III (black bars)- and Fpg (grey bars)-modified comet assay in circulating blood cells of *Cnesterodon decemmaculatus*. Net oxidative damage was expressed as the subtraction between the score obtained after incubation with the respective enzyme or with the buffer. Hydrogen peroxide (50 μm) was employed as positive control. &, $P < 0.05$; &&, $P < 0.01$; significant differences with respective buffer-enzyme.

REFERENCES

- Ackerman, P. A., Morgan, J. D., Iwama, G. K., Anesthetics. In: C. C. o. A. Care, (Ed.), The Care and use of Fish in Research, Teaching and Testing. Canadian Council on Animal Care, Ottawa, CA, 2005, pp. 1-22.
- Adhikari, N., Grover, I. S., 1988. Genotoxic effects of some systemic pesticides: *In vivo* chromosomal aberrations in bone marrow cells in rats. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 12, 235-242.
- Amer, S. M., Aly, F. A. E., 2001. Genotoxic effect of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid and its metabolite 2,4-dichlorophenol in mouse. *Mutation Research*. 494, 1-12.
- Arias, E., 2007. Cytogenetic effects of short- and long- term exposure of chick embryos to the phenoxyherbicide 2,4-D. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 48, 462-466.
- Atamaniuk, T. M., Kubrak, O. I., Storey, K. B., Lushchak, V. I., 2013. Oxidative stress as a mechanism for toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D): studies with goldfish gills. *Ecotoxicology*. 22, 1498-1508.
- Ateeq, B., Farah, M. A., Ahmad, W., 2005. Detection of DNA damage by alkaline single cell gel electrophoresis in 2,4-dichlororphenoxyacetic-acid- and butachlor-exposed erythrocytes of *Clarias batrachus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 62, 348-354.
- Ateeq, B., Farah, M. A., Ali, M. N., Ahmad, W., 2002. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. *Mutation Research*. 514, 105-113.
- Azqueta, A., Campos Costa-Amaral, I., Collins, A. R., High-throughput measurements of DNA breaks and oxidised bases with the comet assay. In: A. Dhawan, D. Anderson, (Eds.), The Comet Assay in Toxicology. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2017, pp. 67-87.
- Baudhuin, P., Beaufy, H., Rahman-Li, Y., Sellinger, O. Z., Wattiaux, R., Jacques, P., al., e., 1964. Tissue fractionation studies. 17. Intracellular distribution of monoamine oxidase, alanine aminotransferase, D-amino acid oxidase and catalase in rat liver tissue. *Biochemical Journal*. 91, 179-184.
- Baudou, F. G., Ossana, N. A., Castañé, P. M., Mastrángelo, M. M., Ferrari, L., 2017. Cadmium effects on some energy metabolism variables in *Cnesterodon decemmaculatus*. *Ecotoxicology*. 26, 1250-1258.
- Behra, M., Cousin, X., Bertrand, C., Vonesch, J. L., Biellmann, D., Chatonnet, A., Strähle, U., 2002. Acetylcholinesterase is required for neuronal and muscular development in the zebrafish embryo. *Nature Neuroscience*. 5, 111-118.
- Bokán, K., Syberg, K., Jensen, K., Rank, J., 2013. Genotoxic potential of two Herbicides and their active ingredients assessed with comet assay on a fish cell line, Epithelioma Papillosum Cyprini (EPC). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues*. 76, 1129-1137.
- Bony, S., Gaillard, I., Devaux, A., 2010. Genotoxicity assessment of two vineyard pesticides in zebrafish. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 90, 421-428.
- Bukowska, B., 2003. Effects of 2,4-D and its metabolite 2,4-dichlorophenol on antioxidant enzymes and level of glutathione in human erythrocytes *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. 135, 435-441.
- Bukowska, B., 2006. Toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-molecular mechanisms. *Polish Journal of Environmental Studies*. 15, 365-374.
- Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D., Ravanat, J. L., 2003. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutation Research*. 531, 5-23.
- CASAFE, 2017. Guía de Productos Fitosanitarios para la República Argentina. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes, 1200 pp.
- Cavalcante, D. G., Martinez, C. B., Sofia, S. H., 2008. Genotoxic effects of Roundup on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutation Research*. 655, 41-46.
- 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, 263-268.

- Collins, A. R., 2004. The comet assay for DNA damage and repair. *Molecular Biotechnology*. 26, 249-261.
- Collins, A. R., Azqueta, A., 2012. DNA repair is a biomarker in human biomonitoring studies; further applications of the comet assay. *Mutation Research*. 736, 122-129.
- Collins, A. R., Dusinká, M., Gedik, C. M., Stetina, R., 1996. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environmental Health Perspectives*. 104, 465-469.
- Cooke, M. S., Olinski, R., Evans, M. D., 2006. Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clinica Chimica Acta*. 365, 30-49.
- Costantini, D., Verhulst, S., 2009. Does high antioxidant capacity indicate low oxidative stress? *Functional Ecology*. 23, 506-509.
- de la Torre, F. R., Ferrari, L., Salibián, A., 2005. Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*) application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina. *Chemosphere*. 59, 577-583.
- de Moura, F. R., Brentegani, K. R., Gemelli, A., Sinhoro, A. P., Sinhoro, V. D. G., 2017. Oxidative stress in the hybrid fish jundiara (*Leiarius marmoratus* x *Pseudoplatystoma reticulatum*) exposed to Roundup Original®. *Chemosphere*. 185, 445-451.
- Demir, E., Akça, H., Kaya, B., Burgucu, D., Tokgün, O., Turna, F., Aksakal, S., Vales, G., Creus, A., Marcos, R., 2014. Zinc oxide nanoparticles: genotoxicity, interactions with UV-light and cell-transforming potential. *Journal of Hazardous Materials*. 264, 420-429.
- Dhawan, A., Anderson, D., 2017. The Comet assay in toxicology. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.
- Elia, A. C., Galarini, R., Taticchi, M. I., Dörr, A. J. M., Mantilacci, L., 2003. Antioxidant responses and bioaccumulation in *Ictalurus melas* under mercury exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 55, 162-167.
- Ellman, G. L., 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 82, 70-77.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andreas, V. J., Featherstone, R. M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemistry Pharmacology*. 7, 88-95.
- Espandari, P., Ludewig, G., Glauert, H. P., Robertson, L. W., 1998. Activation of hepatic NF-κB by the herbicide dicamba (2-methoxy-3,6-dichlorobenzoic acid) in female and male rats. *Journal of Biochemistry and Molecular Toxicology*. 12, 339-344.
- Farah, M. A., Ateeq, B., Ahmad, W., 2006. Antimutagenic effect of neem leaves extract in freshwater fish, *Channa punctatus* evaluated by cytogenetic tests. *Science of the Total Environment*. 364, 200-214.
- Félix-Cañedo, T. E., Durán-Álvarez, J. C., Jiménez-Cisneros, B., 2013. The occurrence and distribution of a group of organic micropollutants in Mexico City's water sources. *Science of the Total Environment*. 454-455, 109-118.
- Ferrari, A., Venturino, A., D'angelo, A. M. P., 2007. Muscular and brain cholinesterase sensitivities to azinphos methyl and carbaryl in the juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C*. 146, 308-313.
- Finkel, T. H., N J, 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of aging. *Nature*. 408, 239-247.
- Glozier, N. E., Struger, J., Cessna, A. J., Gledhill, M., Roundeau, M., Ernst, W. R., Sekela, M. A., Cagampan, S. J., Sverko, E., Murphi, C., Murray, J. L., Donald, D. B., 2012. Occurrence of glyphosate and acidic herbicides in select urban rivers and streams in Canada, 2007. *Environmental Science and Pollution Research*. 19, 821-834.
- Gluszczak, L., Loro, V. L., Pretto, A., Moraes, B. S., Raabe, A., Duarte, M. F., da Fonseca, M. B., de Menezes, C. C., Valladao, D. M. D., 2011. Acute exposure to glyphosate herbicide affects oxidative parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 61, 624-630.
- Gómez, S., Villar, C., Bonetto, C., 1998. Zinc toxicity in the fish *Cnesterodon decemmaculatus* in the Parana river and Rio de la Plata estuary. *Environmental Pollution*. 99, 159-165.
- González, M., Soloneski, S., Reigosa, M. A., Larramendy, M., 2005. Genotoxicity of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and a commercial formulation, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

- dimethylamine salt. I. Evaluation of DNA damage and cytogenetic endpoints in Chinese Hamster ovary (CHO) cells. *Toxicology in vitro*. 19, 289-297.
- González, N., Soloneski, S., Larramendy, M., 2006. Genotoxicity analysis of the phenoxy herbicide dicamba in mammalian cells *in vitro*. *Toxicology in vitro*. 20, 1481-1487.
- González, N., Soloneski, S., Larramendy, M., 2007. The chlorophenoxy herbicide dicamba and its commercial formulation banvel induce genotoxicity in Chinese hamster ovary cells. *Mutation Research*. 634, 60-68.
- González, N., Soloneski, S., Larramendy, M., 2011. A combination of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay and centromeric identification for evaluation of the genotoxicity of dicamba. *Toxicology letters*. 207, 204-212.
- Guilherme, S., Santos, M. A., Barroso, C., Gaivão, I., Pacheco, M., 2012. Differential genotoxicity of RoundUp® formulation and its constituents in blood cells of fish (*Anguilla anguilla*): considerations on chemical interactions and DNA damaging mechanisms. *Ecotoxicology*. 21, 1381-1390.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W. B., 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*. 22, 7130-7139.
- Hostovsky, M., Blahova, J., Plhalova, L., Stepanova, S., Praskova, E., Marsalek, P., Svobodova, Z., 2012. Oxidative stress parameters in early developmental stages of common carp (*Cyprinus carpio* L.) after subchronic exposure to terbuthylazine and metribuzin. *Neuro Endocrinol Lett*. 33, 124-129.
- Hulbert, A. J., Pamplona, R., Buffenstein, R., Buttemer, W. A., 2007. Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiological Reviews*. 87, 1175-1213.
- Jin, J., Kurobe, T., Ramírez-Duarte, W. F., Bolotaolo, M. B., Lam, C. H., Pandey, P. K., Hung, T.-C., Stillway, M. E., Zweig, L., Caudill, J., Lin, L., Teh, S. J., 2018. Sub-lethal effects of herbicides penoxsulam, imazamox, fluridone and glyphosate on Delta smelt (*Hypomesus transpacificus*). *Aquatic Toxicology*. 197, 79-88.
- Jovanović, J., Kolarević, S., Milošković, A., Radojković, N., Simić, V., Dojčinović, B., Kračun-Kolarević, M., Paunović, M., Kostić, J., Sunjog, K., Timiljić, J., Djordjević, J., Gačić, Z., Žegura, B., Vuković-Gačić, B., 2018. Evaluation of genotoxic potential in the Velika Morava River Basin *in vitro* and *in situ*. *Environmental Science and Pollution Research*. 621, 1289-1299.
- Katsiadaki, I., Morris, S., Squires, C., Hurst, M. R., James, J. D., Scott, A. P., 2006. Use of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) as a sensitive *in vivo* test for detection of environmental antiandrogens. *Environmental Health Perspectives*. 114, 115-121.
- Kaya, A., Yigit, E., 2012. Interactions among glutathione s-transferase, glutathione reductase activity and glutathione contents in leaves of *Vicia faba* L. subjected to flurochloridone. *Fresenius Environmental Bulletin*. 21, 1635-1640.
- Kubrak, O. I., Atamaniuk, T. M., Husak, V. V., Lushchak, V. I., 2013. Transient effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) exposure on some metabolic and free radical processes in goldfish white muscle. *Food and Chemical Toxicology*. 59, 356-361.
- Kumar, A., Rai, D. A., Sharma, B., Pandey, R. S., 2009. λ -cyhalothrin and cypermethrin induced *in vivo* alterations in the activity of acetylcholinesterase in a fresh-water fish, *Channa punctatus* (Bloch). *Pesticide Biochemical and Physiology*. 93, 96-99.
- Lajmanovich, R. C., Attademo, A. M., Simoniello, M. F., Poletta, G. L., Junges, C. M., Peltzer, P. M., Grenón, P., Cabagna-Zenkhusen, M. C., 2015. Harmful Effects of the Dermal Intake of Commercial Formulations Containing Chlorpyrifos, 2,4-D, and Glyphosate on the Common Toad *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae). *Water, Air, and Soil Pollution*. 226.
- Lal, B., Sarang, M. K., Kumar, P., 2013. Malathion exposure induces the endocrine disruption and growth retardation in the catfish, *Clarias batrachus* (Linn.). *General and Comparative Endocrinology*. 181, 139-145.
- Lazartigues, A., Thomas, M., Banas, D., Brun-Bellut, J., Cren-Olivé, C., Feidt, C., 2013. Accumulation and half-lives of 13 pesticides in muscle tissue of freshwater fish through food exposure. *Chemosphere*. 91, 530-535.

- Li, J., Li, Y., Lu, J., 2009. Adsorption of herbicides 2,4-D and acetochlor on inorganic-organic bentonites. *Applied Clay Science*. 46, 314-318.
- Li, K., Wu, J. Q., Jiang, L. L., Shen, L. Z., Li, J. Y., He, Z. H., Wei, P., Lv, Z., He, M. F., 2017. Developmental toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in zebrafish embryos. *Chemosphere*. 171, 40-48.
- Loos, R., Locoro, G., Comero, S., Contini, S., Schwesig, D., Werres, F., Balsaa, P., Gans, O., Weiss, S., Blaha, L., Bolchi, M., Gawlik, B. M., 2010. Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. *Water Research*. 44, 4115-4126.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193, 265-275.
- Lushchak, V. I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology*. 101, 13-30.
- Madriagal-Bujaidar, E., Hernández-Ceruelos, A., Chamorro, G., 2001. Induction of sister chromatid exchanges by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in somatic and germ cells of mice exposed in vivo. *Food and Chemical Toxicology*. 39, 941-946.
- Martínez-Tabche, L., Madriagal-Bujaidar, E., Negrete, T., 2004. Genotoxicity and lipoperoxidation produced by paraquat and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 73.
- Martins, M., Costa, P. M., The comet assay in aquatic (eco)genotoxicity using non-conventional model organisms: relevance, constraints and prospects. In: M. L. Larramendy, (Ed.), *Ecotoxicology and Genotoxicology: Non-traditional aquatic models*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2017, pp. 3-32.
- Mastrángelo, M. M., Ferrari, L., 2013. *Cnesterodon decemmaculatus* juveniles as test organisms in toxicity assessment: cadmium case. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 91, 49-54.
- Matviishyn, T. M., Kubrak, O. I., Husak, V. V., Storey, K. B., Lushchak, V. I., 2014. Tissue-specific induction of oxidative stress in goldfish by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid: mild in brain and moderate in liver and kidney. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 37, 861-869.
- Mela, M., Guiloski, I. C., Doria, H. B., Randi, M. A., de Oliveira Ribeiro, C. A., Pereira, L., Maraschi, A. C., Prodócimo, V., Freire, C. A., Silva de Assis, H. C., 2013. Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 93, 13-21.
- Menéndez-Helman, R. J., Ferreyroa, G. V., Dos Santos Afonso, M., Salibián, A., 2012. Glyphosate as an acetylcholinesterase inhibitor in *Cnesterodon decemmaculatus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 88, 6-9.
- Menéndez-Helman, R. J., Ferreyroa, G. V., dos Santos Afonso, M., Salibián, A., 2015. Circannual rhythms of acetylcholinesterase (AChE) activity in the freshwater fish *Cnesterodon decemmaculatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 111, 236-241.
- Muthulakshmi, S., Maharajan, K., Habibi, H. R., Kadirvelu, K., Venkataramana, M., 2018. Zearalenone induced embryo and neurotoxicity in zebrafish model (*Danio rerio*): Role of oxidative stress revealed by a multi biomarker study. *Chemosphere*. 198, 111-121.
- Naqvi, G., Shoaib, N., Ali, A. M., 2017. Pesticides impact on protein fish (*Oreochromis mossambicus*) tissues. *Indian Journal of Geo Marine Sciences*. 49, 1864-1868.
- Newman, M. C., Clements, W. H., 2008. *Ecotoxicology. A comprehensive treatment*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Nunes, B., Carvahlo, F., Guilhermino, L., 2005. Characterization and use of the total head soluble cholinesterases activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 20, 369-376.
- Oruç, E. O., Sevgiler, Y., Uner, N., 2004. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Pharmacology*. 137, 43-51.
- Oruç, E. O., Uner, N., 2002. Marker enzyme assessment in the liver of *Cyprinus carpio* (L.) exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*. 16, 182-188.

- Oruç, E. O., Üner, N., 2000. Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 127, 291-296.
- Ossana, N. A., Eissa, B. L., Baudou, F. G., Castañé, P. M., Soloneski, S., Ferrari, L., 2016. Multibiomarker response in ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) exposed to Reconquista river water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 133, 73-81.
- Ozcan Oruç, E., Uner, N., Sevgiler, Y., Usta, D., Durmaz, H., 2006. Sublethal effects of organophosphate diazinon on the brain of *Cyprinus carpio*. *Drug and Chemical Toxicology*. 29, 57-67.
- Pamela, C. C., Richard, A. H., 1994. *Biochemistry*. Lippencott - Raven Publishers, Philadelphia, Pennsylvania.
- Paulino, M. G., Souza, N. E. S., Fernandes, M. N., 2012. Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 80, 6-13.
- Peixoto, F. P., Gomes-Laranjo, J., Vicente, J. A., Madeira, V. M. C., 2008. Comparative effects of the herbicides dicamba, 2,4-D and paraquat on non-green potato tuber calli. *Journal of Plant Physiology*. 165, 1125-1133.
- Pérez-Iglesias, J. M., Ruiz de Arcaute, C., Natale, G. S., Soloneski, S., Larramendy, M. L., 2017. Evaluation of imazethapyr-induced DNA oxidative damage by alkaline Endo III- and Fpg-modified single-cell gel electrophoresis assay in *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 142, 503-508.
- Persch, T. S. P., Weimer, R. N., Freitas, B. S., Oliveira, G. T., 2017. Metabolic parameters and oxidative balance in juvenile *Rhamdia quelen* exposed to rice paddy herbicides: Roundup®, Primoleo®, and Facet®. *Chemosphere*. 174, 98-109.
- Pitarque, M., Creus, A., Marcos, R., Hughes, J. A., Anderson, D., 1999. Examination of various biomarkers measuring genotoxic endpoints from Barcelona airport personnel. *Mutation Research*. 440, 195-204.
- Poletta, G. L., Simoniello, M. F., Mudry, M. D., 2016. Biomarkers of oxidative damage and antioxidant defense capacity in *Caiman latirostris* blood. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 179, 29-36.
- Rodríguez-Fuentes, G., Rubio-Escalante, F. J., Noreña-Barroso, E., Escalante-Herrera, K. S., Schlenk, D., 2015. Impacts of oxidative stress on acetylcholinesterase transcription, and activity in embryos of zebrafish (*Danio rerio*) following chlorpyrifos exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 172-173, 19-25.
- Romero-Puertas, M. C., Rodríguez-Serrano, M., Corpas, F. J., Gómez, M., del Rio, L. A., Sandalio, L. M., 2004. Cd-induced subcellular accumulation of O₂⁻ and H₂O₂ in pea leaves. *Plant, Cell, and Environment*. 27, 1122-1134.
- Ruiz de Arcaute, C., Soloneski, S., Larramendy, M., 2014. Evaluation of the genotoxicity of a herbicide formulation containing 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid (dicamba) in circulating blood cells of the tropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. *Mutation Research*. 773, 1-8.
- Ruiz de Arcaute, C., Soloneski, S., Larramendy, M., 2016. Toxic and genotoxic effects of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-based herbicide on the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 128, 222-229.
- Salbego, J., Pretto, A., Gioda, C. R., Cavalheiro de Menezes, c., Lazzari, R., Radunz, J., Baldisseriotto, B., Loro, V. L., 2010. Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and haematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 58, 740-745.
- Samanta, P., Pal, S., Mukherjee, A. K., Ghosh, A. R., 2014. Biochemical effects of glyphosate based herbicide, Excel Mera 71 on enzyme activities of acetylcholinesterase (AChE), lipid peroxidation (LPO), catalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST) and protein content on teleostean fishes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 107, 120-125.
- Sancho, E., Ferrando, M. D., Andreu, E., 1997. Sublethal Effects of an Organophosphate Insecticide on the European eel, *Anguilla anguilla*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 36, 57-65.

- Sapana Devi, M., Gupta, A., 2014. Sublethal toxicity of commercial formulations of deltamethrin and permethrin on selected biochemical constituents and enzyme activities in liver and muscle tissues of *Anabas testudineus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 115, 48-52.
- Seshagiri, R., Sreenivasa, M. K., Reddy, K. B., Sreeramulu, C. C., 1987. Effect of benthocarb on protein metabolism of freshwater teleost *Sarotherodon mossambicus*. *Indian Journal of Environmental Health*. 29, 45-51.
- Soloneski, S., Larramendy, M. L., The use of the ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Pisces, Poeciliidae) in the genotoxic evaluation of environmental pollutants. In: M. L. Larramendy, (Ed.), *Ecotoxicology and genotoxicology - Non-traditional Aquatic Models*. The Royal Society of Chemistry, London, 2017, pp. 327-346.
- Soloneski, S., Nikoloff, N., Larramendy, M. L., 2016. Analysis of possible genotoxicity of the herbicide flurochloridone and its commercial formulations: Endo III and Fpg alkaline comet assays in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *Mutation Research*. 797, 46-52.
- Soloneski, S., Ruiz de Arcaute, C., Nikoloff, N., Larramendy, M. L., 2017. Genotoxicity of the herbicide imazethapyr in mammalian cells by oxidative DNA damage evaluation using the Endo III and Fpg alkaline comet assays. *Environmental Science and Pollution Research*. 24, 10292-10300.
- Sorensen, K. C., Stucki, J. W., Wagner, E. D., Wagner, E. D., Plewa, M. J., 2005. Modulation of the Genotoxicity of Pesticides Reacted with Redox-Modified Smectite Clay. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 46, 174-181.
- Stara, A., Machova, J., Velisek, J., 2012. Effect of chronic exposure to simazine on oxidative stress and antioxidant response in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 33, 334-343.
- Summerfelt, R. C., Smith, L. S., 1990. Anaesthesia, surgery and related techniques. In: Schreck, C.B., Moyle, P.B. (Eds.), *Methods for Fish Biology*. American Fisheries Society, Bethesda MD. 213-272.
- Tagert, M. L. M., Massey, J. H., Shaw, D. R., 2014. Water quality survey of Mississippi's Upper Pearl River. *Science of the Total Environment*. 481, 564-573.
- Topal, A., Alak, G., Altun, S., Erol, H. S., Atamanalp, M., 2017. Evaluation of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine and NFkB activation, oxidative stress response, acetylcholinesterase activity, and histopathological changes in rainbow trout brain exposed to linuron. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 49, 14-20.
- Tripathi, G., Singh, H., 2013. Impact of alphasmethrin on biochemical parameters of *Channa punctatus*. *Journal of Environmental Biology*. 34, 227-230.
- Tripathi, G., Verma, P., 2004a. Endosulfan-mediated biochemical changes in the freshwater fish *Clarias batrachus*. *Biomedical and Environmental Sciences*. 17, 47-56.
- Tripathi, G., Verma, P., 2004b. Fenvalerate-induced changes in a catfish, *Clarias batrachus*: metabolic enzymes, RNA and protein. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C, Toxicology & Pharmacology*. 138, 75-79.
- Ullah, R., Zuberi, A., Ullah, S., Ullah, I., Ullah Dawar, F., 2014. Cypermethrin induced behavioral and biochemical changes in mahseer, *Tor putitora*. *The Journal of Toxicological Sciences*. 39, 829-836.
- USEPA, 2005. Reregistration Eligibility Decision (RED) for 2,4 D. U.S. Environmental Protection Agency, Washington DC. 738-R-05-002.
- USEPA, 2006. Reregistration eligibility decision for dicamba and associated salts. U.S. Environmental Protection Agency, Washington DC. https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/pdf/dicamba_red.pdf.
- USEPA, 2017. Pesticides industry sales and usage. 2008-2012 Market estimates. U.S. Environmental Protection Agency, Washington DC. 24.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., Mazur, M., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*. 160, 1-40.
- van der Oost, R., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers of oxidative stress in aquatic organism in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 64, 178-189.

- Varó, I., Amat, F., Navarro, J. C., 2008. Acute toxicity of dichlorvos to *Aphanius iberus* (Cuvier & Valenciennes, 1846) and its anti-cholinesterase effects on this species. *Aquatic Toxicology*. 88, 53-61.
- Vera-Candioti, J., Soloneski, S., Larramendy, M. L., 2011. Acute toxicity of chromium on *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces: Poeciliidae). *Theoria*. 1, 81-88.
- Vera-Candioti, J., Soloneski, S., Larramendy, M. L., 2013. Single-cell gel electrophoresis assay in the ten spotted live-bearer fish, *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842), as bioassay for agrochemical-induced genotoxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 98, 368-373.
- Wang, X. H., Souders, C. L., Zhao, Y. H., Martyniuk, C. J., 2018. Mitochondrial bioenergetics and locomotor activity are altered in zebrafish (*Danio rerio*) after exposure to the bipyridylum herbicide diquat. *Toxicology Letters*. 283, 13-20.
- Zar, J. H., 1999. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey.