



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO

“Genotoxicidad y citotoxicidad inducida por agroquímicos en *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Pisces: Poeciliidae) en condiciones experimentales de laboratorio”

Lic. Josefina Vera Candiotti

Dr. Marcelo L. Larramendy

Dra. Sonia Soloneski

2012

A Edu

	Página
RESUMEN	8
SUMMARY	11
LISTADO DE PUBLICACIONES CIENTÍFICAS	14
ABREVIATURAS	15
1. INTRODUCCIÓN	19
1.1. Clasificación de los plaguicidas	19
1.1.1. Según el tipo de plaga sobre la que actúan	20
1.1.2. Según su modo de acción	20
1.1.3. Según su estructura química	21
1.1.4. Según el grado de riesgo que presentan	24
1.2. Herbicidas	26
1.2.1. Glifosato	27
1.2.1.1. Formulaciones comerciales de glifosato	32
1.2.1.2. Formulado comercial Panzer®	33
1.2.1.3. Formulado comercial Credit®	35
1.3. Insecticidas	36
1.3.1. Clorpirifos	37
1.3.1.1. Formulaciones comerciales de clorpirifos	41
1.3.1.2. Formulado comercial Lorsban* 48E®	42
1.3.1.3. Formulado comercial Clorpirifos Zamba®	44
1.3.2. Pirimicarb	46
1.3.2.1. Formulaciones comerciales de pirimicarb	49
1.3.2.2. Formulado comercial Aficida®	49
1.3.2.3. Formulado comercial Patton flow®	51
1.4. Los peces como modelo experimental en ensayos de toxicidad aguda	52

1.5. Hipótesis	60
1.6. Objetivos	60
1.6.1. Objetivo General	60
1.6.2. Objetivos Específicos	60
2. MATERIALES Y MÉTODOS	63
2.1. Selección de los ejemplares de estudio y determinación taxonómica	63
2.2. Captura y aclimatación de los ejemplares de estudio	64
2.3. Selección de los agroquímicos	65
2.4. Preparación de las soluciones de ensayo	66
2.5. Compuestos químicos empleados	67
2.6. Determinación de la concentración letal media (CL50)	67
2.7. Diseño experimental para la determinación de genotoxicidad y citotoxicidad	69
2.8. Cuantificación de inestabilidad genética mediante el análisis de la frecuencia de MN	70
2.9. Cuantificación de inducción de fracturas de cadena simple en el ADN de células individuales mediante el EC	71
2.10. Estimación de la citotoxicidad mediante análisis de la relación eritrocitos/eritroblastos	76
2.11. Análisis estadístico	77
3. RESULTADOS	79
3.1. Control de calidad	79
3.2. Evaluación de los efectos letales inducidos por agroquímicos en <i>C. decemmaculatus</i> mediante la determinación de las CL50	80
3.3. Evaluación del daño genotóxico y citotóxico inducido por los herbicidas Panzer® y Credit® en células sanguíneas de <i>C. decemmaculatus</i>	82
3.3.1. Ensayo de MN	82

3.3.2. Ensayo cometa	83
3.3.3. Análisis de la proporción eritrocitos/eritroblastos	86
3.3.4. Análisis comparativo de las formulaciones comerciales	86
3.4. Evaluación del daño genotóxico y citotóxico inducido por los insecticidas Lorsban* 48E® y Clorpirifos Zamba® en células sanguíneas de <i>C. decemmaculatus</i>	87
3.4.1. Ensayo de MN	87
3.4.2. Ensayo cometa	89
3.4.3. Análisis de la proporción eritrocitos/eritroblastos	90
3.4.4. Análisis comparativo de las formulaciones comerciales	92
3.5. Evaluación del daño genotóxico y citotóxico inducido por los insecticidas Aficida® y Patton flow® en células sanguíneas de <i>C. decemmaculatus</i>	93
3.5.1. Ensayo de MN	93
3.5.2. Ensayo cometa	95
3.5.3. Análisis de la proporción eritrocitos/eritroblastos	96
3.5.4. Análisis comparativo de las formulaciones comerciales	98
4. DISCUSIÓN	100
4.1. Evaluación de los efectos letales	102
4.2. Evaluación del daño genotóxico y citotóxico inducido por los herbicidas Panzer® y Credit®	115
4.3. Evaluación del daño genotóxico y citotóxico inducido por los insecticidas Lorsban* 48E® y Clorpirifos Zamba®	126
4.4. Evaluación del daño genotóxico y citotóxico inducido por los insecticidas Aficida® y Patton flow®	135
5. CONCLUSIONES	142
6. CONSIDERACIONES FINALES	146
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	149

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Marcelo Larramendy por permitirme avanzar en mi formación profesional junto a su grupo de investigación y por guiarme durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Sonia Soloneski por confiar en mí, acompañarme y alentarme durante estos años de formación, enriqueciendo mi crecimiento personal y profesional.

A mis compañeros, Gabriela, Noelia, Juan, Miguel, Norma, Celeste y Guillermo, con quienes tuve el enorme placer de compartir estos años de trabajo, por la constante, invaluable y desinteresada ayuda que me brindaron para que este trabajo sea posible.

A la Dra. Amalia Miquelarena, Jefa de la Sección Ictiología, División Zoología Vertebrados, Museo de La Plata, por su valiosa contribución en la determinación taxonómica de los ejemplares de la especie utilizada en los ensayos del presente trabajo.

A los Prof. Miguel y Paula, quienes me guiaron en el análisis de los resultados de parte de este trabajo.

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (Beca Doctoral 2008-2010).

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (Beca Doctoral 2010-2012).

A la Universidad Nacional de La Plata.

A mi mamá Zonia y mi papá Julio, quienes me acompañaron desde el inicio de mi formación académica brindándome apoyo y confianza, sin los cuales este camino no hubiese sido posible.

A mis hermanos Agustín, Emilio, Fernando y Pablo quienes me acompañaron constantemente y de innumerables formas.

Especialmente a mi hermana Lucía con quien compartí esta etapa de mi vida, por brindarme su apoyo y su paciencia cada día.

A mis amigos, por encontrar siempre la forma de alentarme.

A Eduardo, por la confianza y el apoyo incuestionable, por comprender el esfuerzo y acompañarme día a día.

A todos ellos... MUCHAS GRACIAS.

RESUMEN

Las investigaciones llevadas a cabo durante el presente trabajo de Tesis Doctoral tuvieron como objetivo principal aportar información sobre los efectos deletéreos ejercidos por diferentes plaguicidas utilizados en la agricultura argentina. Entre estos, fueron seleccionados los herbicidas Panzer® y Credit® (48% glifosato), los insecticidas Lorsban* 48E® y Clorpirifos Zamba® (48% clorpirifos) y los insecticidas Aficida® y Patton flow® (50% pirimicarb). Dichos efectos fueron evaluados mediante el empleo de ensayos de letalidad, de genotoxicidad y de citotoxicidad en ejemplares de *C. decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae) expuestos en condiciones experimentales de laboratorio. Dentro de los bioensayos utilizados, el estimador de letalidad empleado fue la determinación de la CL50. Asimismo, como estimadores de genotoxicidad se utilizaron el análisis de la frecuencia de micronúcleos (MN) en eritrocitos circulantes y el ensayo de electroforesis en células únicas o ensayo cometa (EC) en células sanguíneas y como estimador de citotoxicidad, el análisis de variaciones poblacionales de células circulantes sanguíneas estimadas mediante proporción eritrocitos/eritroblastos.

Los resultados de los estudios destinados a evaluar los efectos letales ejercidos por los herbicidas Panzer® y Credit® revelaron que el formulado que indujo la mayor mortalidad a las 96 h de exposición fue Panzer®. En otras palabras, la especie en estudio *C. decemmaculatus* resultó ser más sensible en términos de mortalidad a Panzer® que a Credit®. De manera similar, cuando se evaluaron los efectos letales de los formulados conteniendo clorpirifos en su composición, el compuesto que indujo la mayor mortalidad a las 96 h de exposición fue Lorsban* 48E® respecto de Clorpirifos Zamba®. Esto puso en

evidencia que *C. decemmaculatus* resultó ser más sensible en términos de mortalidad a Lorsban* 48E® que a Clorpirifos Zamba®. Finalmente, cuando los ensayos se realizaron con las formulaciones comerciales conteniendo pirimicarb en su composición, nuestros estudios revelaron que Patton flow® indujo una mayor mortalidad respecto de Aficida®. La especie en estudio, *C. decemmaculatus* resultó ser más sensible en términos de mortalidad a Patton flow® que a Aficida®.

Los resultados del análisis de genotoxicidad estimada mediante el ensayo de MN en eritrocitos circulantes y el daño en el ADN de células sanguíneas por el EC demostraron un marcado efecto genotóxico ejercido tanto por Panzer® como por Credit®. En los ejemplares de *C. decemmaculatus* expuestos a ambos herbicidas se observó un aumento significativo en la frecuencia de MN y en la frecuencia de células dañadas. Por el contrario, los estudios destinados a evaluar la capacidad citotóxica de estos herbicidas revelaron que ninguno de los dos compuestos fueron capaces de inducir variaciones en la proporción eritrocitos/eritroblastos.

Los efectos genotóxicos ejercidos por los insecticidas Lorsban* 48E® y Clorpirifos Zamba® mostraron un aumento significativo en la frecuencia tanto de MN como de células dañadas en el EC. Asimismo, los plaguicidas Lorsban* 48E® y Clorpirifos Zamba® promovieron el aumento significativo de la frecuencia de eritroblastos y la disminución de la frecuencia de eritrocitos poniendo de manifiesto un marcado efecto citotóxico.

Los estudios concernientes a evaluar la genotoxicidad de los insecticidas Aficida® y Patton flow® revelaron que estos formulados incrementaron significativamente tanto la frecuencia de MN como la frecuencia de cometas. De

manera similar, estos plaguicidas conteniendo pirimicarb en su composición evidenciaron una marcada capacidad citotóxica manifestada por un aumento significativo de la proporción de eritroblastos respecto de la proporción de eritrocitos.

Los resultados de las investigaciones realizados en la presente Tesis Doctoral permitieron determinar de manera concreta que los herbicidas Panzer® y Credit® y los insecticidas Lorsban* 48E®, Clorpirifos Zamba®, Aficida® y Patton flow® son claros agentes inductores de mortalidad, genotoxicidad y citotoxicidad en *C. decemmaculatus*. Por todo lo expuesto, no podría descartarse la posibilidad que las aplicaciones reiteradas de estos plaguicidas en los diferentes cultivos en nuestro país puedan ingresar a los ambientes acuáticos y ejercer efectos deletéreos no sólo sobre la especie evaluada *C. decemmaculatus* sino también sobre otros organismos acuáticos.

SUMMARY

The aim of this PhD study was to analyze the deleterious effect exerted by different agrochemicals commonly use in Argentinean agriculture. Among them, the herbicides glyphosate-based formulations Panzer® and Credit® (48% a.i.), the insecticides chlorpyrifos-containing commercial formulations Lorsban* 48E® and Clorpirifos Zamba® (48% a.i.) as well as Aficida® and Patton flow® (50% pirimicarb) insecticides have been included. Acute effects were evaluated employing different end-points for lethality, genotoxicity, and cytotoxicity in the ten spotted live-bearer *C. decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae) exposed under laboratory conditions. While LC50 estimation was employed as bioassay for lethality, micronucleus (MN) induction and single-cell gel electrophoresis assay (SCGE) were employed as end-points for genotoxicity. Finally, alterations in the erythrocytes:erythroblasts ratios were employed as cytotoxicity end-point.

Lethality studies demonstrated that the glyphosate-containing formulation Panzer® exerted a higher mortality than Credit® did. In other words, *C. decemmaculatus* was found to be more sensitive to Panzer® than to Credit®. Similarly, when the chlorpyrifos-based formulation-induced acute mortality effects were assayed, the results demonstrated that Lorsban* 48E® was more toxic than Clorpirifos Zamba®. Then, *C. decemmaculatus* was found to be less sensitive to Clorpirifos Zamba® than to Lorsban* 48E®. Finally, our results also demonstrated that Patton flow® was able to exert a higher toxic effects in terms of lethality than Aficida® did. Accordingly, the freshwater fish appeared to be more sensitive to Patton flow® than to Aficida®.

Assessment of the Panzer®- and Credit®-induced genotoxic effects were evaluated, the results demonstrated that herbicides enhanced the frequency of both MN and comets in peripheral blood cells. On the other hand, none of the formulations were able to induce alterations in the erythrocytes:erythroblasts ratios revealing the lack of cytotoxic effects.

Similarly, when the analyses were performed using the same end-points but employing the insecticides Lorsban* 48E® and Clorpirifos Zamba®, the results revealed both an increase in the frequency of MN in circulating erythrocytes and a marked induction of DNA-single strand breaks in circulating blood cells revealed by the SCGE assay. Furthermore, cytotoxic effects were also demonstrated by their capacity of altering the erythrocytes:erythroblasts ratios in *C. decemmaculatus*-exposed specimens.

When the analysis was performed employing the insecticides Aficida® y Patton flow® an enhancement in the frequency of MN as well as in the comets were induced. Furthermore, cytotoxicity was also observed by alterations in the erythrocytes:erythroblasts ratios.

Finally, our current observations found in the course of this PhD Thesis represent concrete evidences that the herbicides glyphosate-based formulations Panzer® and Credit® (48% a.i.), the insecticides chlorpyrifos-containing commercial formulations Lorsban* 48E® and Clorpirifos Zamba® (48% a.i.) as well as the insecticides pirimicarb-based formulations Aficida® and Patton flow® (50% a.i.) should be considered as clear lethal-, cytotoxic- and genotoxic-inducer agents in *C. decemmaculatus*. For these reasons, it could not rule out the possibility that

repeated applications of these pesticides in different crops in our country can enter the aquatic environment and exert deleterious effects not only on the species evaluated *C. decemmaculatus* but also on other aquatic organisms.

LISTADO DE PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

La presente Tesis Doctoral dio lugar a los siguientes trabajos publicados, los cuales se encuentran contenidos en el Anexo I y son referidos a lo largo del texto empleando sus correspondientes números romanos. Los resultados experimentales no publicados hasta el presente fueron incluidos en Figuras y Tablas del Anexo II.

- I. Josefina Vera Candiotti, Sonia Soloneski y Marcelo L. Larramendy. Genotoxic and cytotoxic effects of the formulated insecticide Aficida® on *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Pisces: Poeciliidae).

Mutation Research, 703: 180–186. 2010.

- II. Josefina Vera-Candiotti, Sonia Soloneski y Marcelo L. Larramendy. Acute toxicity of chromium on *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae).

Theoria, (En prensa)

ABREVIATURAS

A lo largo del texto del presente trabajo de Tesis Doctoral, aquellas abreviaturas correspondientes a Instituciones internacionales al igual que acrónimos internacionalmente aceptados han sido adoptadas en su idioma original y no por su traducción al español.

μl: microlitro/s

μS: microSiemens

AChE: acetilcolinesterasa

ADN: ácido desoxirribonucleico

AMPA: ácido aminometil-fosfónico

APFB: agarosa de punto de fusión bajo

APFN: agarosa de punto de fusión normal

ASTM: *American Society for Testing Materials* (Sociedad Americana para Pruebas de Materiales)

ATSDR: *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades)

c.s.p.: cantidad suficiente para

CASAFE: Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes

CASRN: *Chemical Abstract Service Registry Number*

CL50-96 h: concentración letal cincuenta en 96 horas

cm: centímetro/s

cm³: centímetro/s cúbico/s

CONICET: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

ChE: colinesterasa/s

CHO: *Chinese hamster ovary* (células de ovario de hámster chino)

DDT: dicloro-difenilo-tricloroetano

DMSO: sulfóxido de dimetilo

EC: ensayo cometa

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EROs: especies reactivas de oxígeno

FAO: *Food and Agriculture Organization* (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación)

FIFRA: *Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act* (Ley Federal Sobre Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas)

g: gramo/s

h: hora/s

ha: hectárea

IARC: *International Agency for Research on Cancer* (Agencia Internacional de Investigación em Cancer)

ICH: intercambio/s de cromátidas hermanas

IDG: índice de daño genético

INCHEM: *Chemical Safety Information from Intergovernmental Organizations* (Información sobre Seguridad Química para Organizaciones Intergubernamentales)

IP: ioduro de propidio

IPC: índice de proliferación celular

IPCS: *International Programme on Chemical Safety* (Programa Internacional para la Seguridad Química)

IRAM: Instituto Argentino de Normalización y Certificación

kg: kilogramo

L: litro/s

mA: miliamperio

mg/L: miligramos por litro

min: minuto/s

mM: milimolar

MN: micronúcleo/s

msnm: metros sobre el nivel del mar

nm: nanometro

OECD: *Organisation for Economic Co-operation and Development* (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico)

p.a.: principio activo

POEA: tallowamina polietoxilada

rpm: revoluciones por minuto

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

TCP: 3,5,6-tricloro-4-piridinol

Tn: toneladas

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)

USEPA: *United States Environmental Protection Agency* (Agencia de Protección
Ambiental de Estados Unidos)

V: voltio

WHO: *World Health Organization* (Organización Mundial de la Salud)

1. INTRODUCCIÓN

Las tecnologías agrícolas desarrolladas entre los años '60-'80, bajo el concepto de Revolución Verde, trajeron aparejadas un crecimiento sin precedentes en la producción mundial de alimentos. Su demanda mundial sostenida obliga al estudio continuo de nuevos métodos y técnicas de producción para incrementar la calidad y cantidad de los mismos. Este modelo caracterizado por el cultivo a gran escala, el monocultivo y el uso intensivo de insumos generó una gran demanda de agroquímicos, incluidos a los plaguicidas (Conway, 1997). El aumento del rendimiento y los beneficios económicos derivados de la utilización de los agroquímicos no se logra sin los riesgos potenciales que estos compuestos significan para la salud humana y el medio ambiente. Entre los mismos pueden mencionarse, la generación de resistencia en las plagas, el surgimiento de nuevas especies plaga, la contaminación ambiental, la bioacumulación, la bioconcentración así como los efectos tóxicos originados sobre distintos organismos no blanco de diferente nivel de organización y escala trófica, incluido el hombre (El Sebae, 1993; CASAFE, 2009).

1.1. Clasificación de los plaguicidas

Un plaguicida es toda sustancia o mezcla de sustancias, destinadas a controlar o destruir malezas, insectos, hongos, ácaros, moluscos, bacterias, roedores y otras formas de vida animal o vegetal que puedan resultar perjudiciales tanto para la salud pública como para la agricultura, donde estas especies son consideradas plagas durante la producción, el almacenamiento, el

transporte, distribución y elaboración de productos agrícolas y/o sus derivados (<http://www.epa.gov/pesticides/about>, s.f.e).

Los plaguicidas pueden clasificarse de acuerdo a diferentes criterios, aunque los más utilizados son el tipo de plaga sobre la que actúan, el modo de acción y su estructura química (CASAFE, 2009).

1.1.1. Según el tipo de plaga sobre la que actúan

Según el tipo de organismo blanco sobre el cual actúan los plaguicidas y de acuerdo a lo propuesto por Klaassen (2008) se definen, entre otros, de la siguiente manera:

Clasificación		Organismo blanco sobre el cual actúa
• Acaricida	→	ácaros
• Bactericida	→	bacterias
• Fungicida	→	hongos
• Herbicida	→	vegetales
• Insecticida	→	insectos y otros artrópodos
• Molusquicida	→	moluscos
• Nematicida	→	nematodos
• Rodenticida	→	roedores

El término “plaguicida” incluye además a los desinfectantes, repelentes, preservantes de la madera y reguladores de crecimiento vegetal (USEPA, 1997), así como también los curasemillas, destinados a la protección de semillas y de los vegetales en sus etapas más tempranas del desarrollo (CASAFE, 2009).

1.1.2. Según su modo de acción

Plaguicidas de contacto o no sistémicos. No penetran efectivamente en los tejidos del sistema vascular de la planta o en el cuerpo del organismo.

Plaguicidas sistémicos. Penetran efectivamente en el sistema vascular de la planta y son translocados a cualquier parte de la misma o ingresan en el cuerpo del animal y son transportados a cualquier parte del organismo (<http://www.epa.gov/pesticides/about>, s.f.e).

1.1.3. Según su estructura química

Teniendo en cuenta la estructura química se han desarrollado numerosos y variados compuestos con actividad biocida. Entre los más utilizados podemos mencionar a los derivados del arsénico, del bupiridilo, del ácido fenoxiacético, derivados cumarínicos, compuestos de cobre y de mercurio, pirazoles, derivados de la triazina y del nitrofenol, entre otros. Asimismo, entre los plaguicidas más conocidos y difundidos por su uso se incluyen a los compuestos organoclorados, organofosforados, carbamatos, y piretroides (WHO, 2009).

Organofosforados. Son compuestos derivados del ácido fosfórico que dan origen a distintos derivados según se encuentren combinados con oxígeno, carbono, azufre o nitrógeno (Klaassen, 2008). La mayoría de los organofosforados son insecticidas y ejercen su acción neurotóxica mediante la inhibición de la enzima AchE tanto en insectos como en mamíferos, incluido el ser humano (Farahat *y col.*, 2010). En las uniones musculares esqueléticas, el exceso de acetilcolina puede producir excitación, evidenciada mediante espasmos musculares, pero también puede debilitar o paralizar a la fibra muscular al despolarizar la placa terminal de la unión neuromuscular. Las concentraciones elevadas de acetilcolina pueden causar alteraciones sensoriales y conductuales,

incoordinación y depresión en la función motora (USEPA, 1998). Son altamente tóxicos, pero de baja persistencia en el ambiente ya que se destruyen rápidamente por hidrólisis (<http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm>). Los organofosforados fueron sintetizados por primera vez en Alemania en la década del '30 y dentro de este grupo se incluyen como sus representantes más importantes al diclorvos, al metil-azinfos y al clorpirifos, entre otros (Klaassen, 2008).

Organoclorados. Son compuestos sintéticos de estructura cíclica que presentan cloro en su molécula y pueden estar combinados con oxígeno y azufre en algunos casos. Fueron ampliamente utilizados en la agricultura entre las décadas del '40-'80 en el manejo de insectos plaga en general, y en programas para el control de malaria, en lo particular (Klaassen, 2008). A pesar de ello, la mayoría de estos compuestos fueron prohibidos debido a su elevada toxicidad, alta lipofilicidad y persistencia en el ambiente. El DDT, clordano, aldrín, endrín y dieldrín son algunos ejemplos de organoclorados prohibidos recientemente (Klaassen, 2008). Cabe señalar que uno de los pocos organoclorados aún vigente en nuestro país es el endosulfán, el que ha sido prohibido recientemente por nuestras instituciones reguladoras (SENASA, 2011). La resolución 511/2011 del SENASA establece la prohibición de la importación del principio activo endosulfán y sus productos formulados a partir del 1º de julio de 2012 y la prohibición de la elaboración, formulación, comercialización y uso de productos que contengan el principio activo endosulfán a partir del 1º de julio de 2013 (SENASA, 2011).

Carbamatos. Compuestos derivados del ácido *N*-metil-carbámico y de acuerdo a su composición sus derivados pueden tener propiedades insecticidas, fungicidas y herbicidas (Klaassen, 2008). Son compuestos neurotóxicos que ejercen su acción mediante la inhibición de la AchE (USEPA, 2007). Los síntomas de intoxicación por carbamatos son semejantes a los observados en una intoxicación con organofosforados (Klaassen, 2008), con la diferencia que la acción inhibitoria de la AchE por carbamatos es un proceso transitorio y reversible rápidamente (WHO-FAO, 2004; USEPA, 2007). Por esta razón, estos compuestos poseen una toxicidad menor que los organoclorados y los organofosforados (Klaassen, 2008). Gran parte de los carbamatos fueron registrados como insecticidas a principios de la década del '50 (Klaassen, 2008). Algunos de los compuestos que pertenecen a este grupo son el aldicarb, carbofurán, zineb y pirimicarb, entre otros (<http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm>).

Fenoxiacéticos. Son derivados salinos del ácido fenoxiacético que se emplean básicamente como herbicidas y muchos de ellos pueden ser considerados como compuestos auxínicos. Estos plaguicidas son extremadamente tóxicos en mamíferos debido a que afectan principalmente al sistema nervioso. En esta clase caben mencionarse, entre otros, al 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), al ácido 2,4,5 triclorofenoxiacético (2,4,5-T, agente naranja), al diclorprop (2,4-DP) y al mecoprop (MCPP) (Klaassen, 2008).

Fosfonoaminoácidos. Son herbicidas postemergentes que interfieren con la síntesis normal de aminoácidos en las plantas. Son considerados compuestos de

acción foliar y sin actividad en suelos. En este grupo, se encuentran, entre otros el glifosato y el glufosinato (Klaassen, 2008).

Piretroides. Estos compuestos se han desarrollado como una versión sintética de la piretrina, insecticida natural que se encuentra en los crisantemos (*Crysanthemum cinerariaefolium*) y que fueron modificados para aumentar su estabilidad en el medio ambiente. Algunos de ellos son compuestos neurotóxicos que provocan alteraciones en el sistema nervioso induciendo, entre otros efectos, una parálisis súbita y la posterior muerte de los insectos (<http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm>). Entre los más conocidos podemos mencionar a la permetrina, la cipermetrina y el fenvalerato, entre otros.

1.1.4. Según el grado de riesgo que presentan

Este criterio de clasificación se basa en el riesgo que presenta un plaguicida para la salud humana o el medio ambiente, entendiendo por “riesgo” la probabilidad que ocurra un efecto adverso en un organismo, sistema o población bajo circunstancias específicas por exposición a un agente (WHO, 2004). El riesgo que presenta un plaguicida para el medio ambiente se establece en función de la evaluación de la toxicidad de dicho plaguicida, en estudios de toxicidad aguda en condiciones de laboratorio en organismos acuáticos como algas verdes, microcrustáceos y peces al igual que en flora y fauna terrestre (Sprague, 1973; Wagner *y col.*, 1995; FAO, 2007). El punto final considerado para esta clasificación es la CL50 (Wagner *y col.*, 1995). De esta manera, la OECD (Mazzatorta *y col.*, 2002) y la UN (2011) (Tabla 1 y 2, respectivamente), referentes mundiales en materia de

registro, clasificación y categorización de plaguicidas, establecen las siguientes categorías:

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas de acuerdo a la toxicidad aguda según la OECD

Categoría	Valor CL50 (mg/L)
Muy tóxico	< 1
Tóxico	1 - 10
Perjudicial	10 - 100
Efectos adversos a largo plazo	> 100

Fuente: OECD (Mazzatorta y col., 2002)

Tabla 2. Clasificación de los plaguicidas de acuerdo a la toxicidad aguda según la UN

Categoría	Valor CL50 (mg/L)
Categoría 1 Muy tóxico	≤ 1
Categoría 2 Tóxico	> 1 pero ≤ 10
Categoría 3 Nocivo	> 10 pero ≤ 100

Fuente: (UN, 2011)

Los plaguicidas generalmente se utilizan como formulaciones comerciales que contienen además del principio activo, otros componentes denominados inertes o auxiliares que actúan como coadyuvantes, disolventes, emulsionantes, tensoactivos y/o conservantes (Beggel y col., 2010). En algunos casos representan más del 90% en el volumen de las formulaciones (Cox y Sorgan, 2006) y generalmente son desconocidos debido a que no es necesario su identificación en la etiqueta del producto (USEPA, 2007). Por otra parte, estos ingredientes llamados “inertes” pueden aumentar significativamente tanto la toxicidad del

formulado como su absorción, su movilidad y su persistencia ambiental (Skandrani *y col.*, 2006). En un estudio de Schmuck y colaboradores, el 95% de 273 formulaciones comerciales de diferentes tipos de herbicidas, fungicidas e insecticidas resultaron ser más tóxicas que sus respectivos principios activos para organismos acuáticos tales como los peces (Schmuck *y col.*, 1994). Por ello, los riesgos que presentan las formulaciones comerciales de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud humana no pueden ser determinados mediante la evaluación de la toxicidad de los principios activos solos ya que éstos nunca se emplean en estado puro en el ambiente (Skandrani *y col.*, 2006; Beggel *y col.*, 2010). En muchos casos, el componente “inerte” resulta más tóxico que el componente activo por sí solo poniendo de manifiesto la presencia de sustancias de efecto deletéreo incluidas en los excipientes de las formulaciones comerciales (Lin y Garry, 2000; Soloneski *y col.*, 2001, 2002, 2003, 2007, 2008; González *y col.*, 2003, 2005; Solomon y Thompson, 2003; Tsui y Chu, 2003; González *y col.*, 2006, 2007, 2009; Molinari *y col.*, 2010).

1.2. HERBICIDAS

Los herbicidas son sustancias utilizadas para manipular o controlar especies vegetales no deseadas. Su uso más frecuente está destinado a la agricultura, antes o durante la siembra, y en menor medida en el manejo forestal (Shepard *y col.*, 2004). En áreas suburbanas y urbanas, los herbicidas se aplican en jardines, parques, campos de golf y otros ambientes como cuerpos de agua para controlar, en este caso, malezas acuáticas que impiden el suministro para regadío o

interfieren con el uso del agua para fines recreativos o industriales (Folmar y col., 1979) (http://www.epa.gov/caddis/ssr_herb_int.html).

Los herbicidas pueden actuar inhibiendo la división celular, la fotosíntesis, la producción de aminoácidos o imitando a las hormonas naturales auxínicas, que regulan el crecimiento de las plantas y causan alteraciones de los tejidos meristemáticos. Son aplicados mediante pulverización sobre el follaje y de manera directa sobre los suelos o los sistemas acuáticos (Ross y Childs, 1996).

En nuestro país, el mercado de productos agroquímicos revela que aproximadamente un 70% del consumo anual está representado por los herbicidas, seguido de los insecticidas (13%), los fungicidas (11%) y en menor escala por los curasemillas y los acaricidas, entre otros productos (CASAFE, 2009). De los cuatro cultivos principales de Argentina, soja, trigo, maíz y girasol, el cultivo de soja es el que ocupa la mayor superficie sembrada con un gran crecimiento en los últimos años (MAG&P, 2011). Uno de los factores que explica dicho crecimiento es la introducción desde 1998 de variedades transgénicas de soja resistentes al herbicida de masivo uso mundial como es el glifosato (Maarten Dros, 2004).

1.2.1. Glifosato

El glifosato [N-(fosfonometil) glicina] es un herbicida de amplio espectro, no selectivo, utilizado para el control de hierbas no deseadas en agricultura, industria, ambientes urbanos, forestales y acuáticos (WHO, 1994; Cavaş y Könen, 2007). Su fórmula estructural se presenta en la Figura 1.

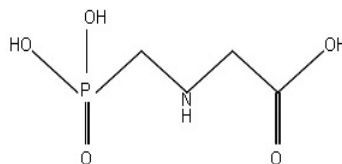


Figura 1. Fórmula estructural del glifosato (Fuente: (WHO, 1994))

El glifosato en sí mismo es un ácido, sin embargo se utiliza comúnmente como sal de isopropilamina. Se trata de un compuesto polar, muy soluble en agua que forma complejos con facilidad con iones de Ca^{2+} y Mg^{2+} (EXTOXNET, 1996; Vereecken, 2005).

Fue registrado por primera vez en el '74 por la USEPA y pertenece al grupo de compuestos ligeramente peligrosos (clase II) según la WHO (2009) y según USEPA a la categoría de compuestos que no presentan evidencia de carcinogenicidad en seres humanos (clase E) (USEPA, 2005). Desde 2009, el glifosato se encuentra en proceso de revisión para la evaluación e identificación del nivel de riesgo para la salud humana y ambiental dado el uso desmesurado de este principio activo como integrante de numerosas formulaciones comerciales (USEPA, 2009). Según los plazos establecidos para dicha revisión, se estima que este proceso culminará recién en 2015 con la decisión final para su registro (USEPA, 2009).

El principal mecanismo de acción de este herbicida es la inhibición de la síntesis de la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetasa, esencial para la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos en bacterias, hongos y plantas (Williams *y col.*, 2000; Solomon y Thompson, 2003; Evrard *y col.*, 2010), provocando en estas

últimas, alteraciones del crecimiento del vegetal, de diferenciación celular, de la elongación de los coleóptilos así como de la iniciación de ramas y raíces (Blackborun y Boutin, 2003). Debido a que esta ruta metabólica está presente sólo en microorganismos, plantas y hongos, el glifosato es considerado como relativamente no tóxico para animales, incluidos los seres humanos (Smith y Oehme, 1992; Pelfrène, 2003; Solomon y Thompson, 2003; Evrard *y col.*, 2010).

Los ambientes acuáticos pueden ser contaminados por glifosato debido a su uso directo en el control de malezas acuáticas como también por la erosión y escorrentía proveniente de aplicaciones terrestres (USEPA, 2009). El herbicida tiene la capacidad de adsorberse a partículas del suelo pudiendo persistir hasta 170 días, llegar a niveles diferentes tanto en agua como en suelo y alcanzar una vida media estimada en el ambiente de 45-60 días (EXTOXNET, 1996; Vereecken, 2005; Peruzzo *y col.*, 2008). La mayor concentración de glifosato registrada en Argentina en ambientes acuáticos fue 0,7 mg/L (Peruzzo *y col.*, 2008).

Los estudios sobre su toxicidad son extensos y muchos de ellos, inclusive, contradictorios (Williams *y col.*, 2000). Por otro lado, se ha demostrado que las formulaciones comerciales a base de glifosato son generalmente más tóxicas que el glifosato puro (Pereira *y col.*, 2009). Este hecho ha sido demostrado que puede deberse principalmente a los surfactantes presentes en la misma como es el caso específico del POEA, utilizado en la formulación comercial Roundup® (WHO, 1994; Tsui y Chu, 2003; USEPA, 2009).

En lo referente a los sistemas bacterianos, el glifosato no produce efectos mutagénicos en *Salmonella sp.* (Moriya *y col.*, 1983; Li y Long, 1988; Rank *y col.*,

1993) como tampoco en ensayos con *Escherichia coli* (Moriya y col., 1983; Li y Long, 1988). Sin embargo, el Roundup® produce un débil efecto mutagénico en el ensayo de *Salmonella* (Rank y col., 1993) pero resulta negativo para el ensayo de Ames (Kier y col., 1997).

El POEA es un coadyuvante exclusivo de la marca comercial Roundup®, destinado a aumentar su eficacia herbicida (Tsui y Chu, 2008) el que resulta tóxico para organismos acuáticos (WHO, 1994; Tsui y Chu, 2003; USEPA, 2009). En este sentido, estudios realizados en peces revelaron una mayor toxicidad del POEA que el glifosato puro (Giesy y col., 2000) y una mayor mortalidad inducida por Roundup® que su principio activo (Neskovic y col., 1996; Jiraungkoorskul y col., 2002). Algunos estudios revelaron mayor toxicidad del Roundup® en comparación con glifosato, tanto en términos de toxicidad aguda (Folmar y col., 1979) como de genotoxicidad (Bolognesi y col., 1997). Kreutz y colaboradores (2010) pusieron de manifiesto, si bien no especificando la formulación comercial empleada, el efecto inmunosupresor del glifosato en peces de la especie *Rhamdia quelen*. Asimismo, se ha demostrado que el herbicida presenta una toxicidad aguda baja en organismos acuáticos y que no es acumulable en sus tejidos (Evrard y col., 2010).

El glifosato puede afectar otros organismos acuáticos como larvas de anfibios, retrasando la metamorfosis e induciendo alteraciones gonadales (Howe y col., 2004) o alterando el ciclo celular en erizos de mar (Marc y col., 2002). Estudios realizados con Glifos® (48% glifosato) demostraron la capacidad del compuesto de inducir mortalidad y malformaciones en larvas del anfibio *Scinax nasicus* (Lajmanovich y col., 2003).

Roundup® provoca cambios en parámetros metabólicos y enzimáticos tales como la inhibición de la AchE, la peroxidación de lípidos y el catabolismo de las proteínas en *R. quelen*, evidenciando alteraciones en el tejido muscular y hepático (Gluszczak y col., 2007; Ferreira y col., 2010). Además produce alteraciones bioquímicas, fisiológicas e histológicas en *Prochilodus lineatus* (Langiano y Martinez, 2008) y efectos adversos en el metabolismo general, estrés oxidativo y alteraciones del sistema de defensa antioxidante en *Carassius auratus* (Lushchak y col., 2009). Es capaz de inducir daño en el ADN de las especies *Tilapia rendalli* (Grisolia, 2002) y *C. auratus* (Cavaş y Könen, 2007) evidenciado por la inducción de MN y en esta última especie mencionada (Cavaş y Könen, 2007) así como en *P. lineatus* (Cavalcante y col., 2008), evidenciado mediante el EC. Los efectos de otros herbicidas a base de glifosato, como Transorb®, también han sido estudiados y han puesto en evidencia una inhibición de la AchE en cerebro y músculo de *P. lineatus* (Modesto y Martinez, 2010).

En mamíferos se han demostrado inducción de efectos genotóxicos, hormonales y enzimáticos ejercidos por el glifosato (Williams y col., 2000). Se han publicado resultados que evidencian toxicidad en células de placenta humana JEG3 en concentraciones inferiores a las recomendadas para uso agrícola (Richard y col., 2005). Sin embargo, resultó ser no mutagénico en células de la línea celular CHO (Li y Long, 1988). Estudios realizados con glifosato demostraron la capacidad del compuesto de inducir un aumento de ICHs en linfocitos humanos (Bolognesi y col., 1997). Asimismo, Lioi y su grupo de investigación (1998)

publicaron un incremento en la frecuencia de ICHs y aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos y bovinos.

Respecto a los efectos carcinogénicos del glifosato en mamíferos, los mismos no fueron evidenciados cuando se realizaron estudios *in vivo* en ratones y ratas mediante exposiciones crónicas por ingestión (Williams *y col.*, 2000). De manera similar, no se observó un incremento de la frecuencia de aberraciones cromosómicas en células de médula ósea de ratas expuestas (Li y Long, 1988) ni de MN en células de médula ósea de ratones (Kier *y col.*, 1997). Finalmente, el glifosato no indujo la formación de aductos en el ADN de ratones expuestos *in vivo* (Peluso *y col.*, 1998). Contrariamente a estos resultados, Bolognesi y colaboradores (1997) observaron un incremento de la frecuencia de MN en células de médula ósea de ratones expuestos *in vivo*.

El formulado comercial Roundup® no demostró ser genotóxico cuando se evaluó la frecuencia de MN en células de médula ósea de ratones (Rank *y col.*, 1993). Sin embargo años más tarde, los resultados de Bolognesi y colaboradores (1997) revelaron la capacidad de dicho formulado de inducir un incremento en la frecuencia de MN en el mismo modelo animal. Asimismo, Peluso y colaboradores (1998) pusieron en evidencia que Roundup® produce un aumento de aductos en el ADN en ratones expuestos.

1.2.1.1. Formulaciones comerciales de glifosato

Actualmente existen en el mundo más de 400 formulaciones de glifosato registrados por la FIFRA (USEPA, 2009). La formulación comercial más conocida y comercializada es el Roundup® (Monsanto Company, St. Louis, MO) y distribuida

mundialmente desde la década del '70 (Williams *y col.*, 2000). En Argentina existen 261 marcas comerciales formuladas a base de glifosato (www.senasa.gov.ar) con diversos porcentajes del principio activo, presente como único componente o combinado con otros herbicidas tales como el 2,4-D.

1.2.1.2. Formulado comercial Panzer®

Panzer® es un herbicida no selectivo para el control postemergente de la mayoría de las malezas anuales y perennes en áreas agrícolas e industriales, caminos, vías férreas, entre otros. Para aplicaciones terrestres se recomienda un volumen de 80-120 L/ha y para aplicaciones aéreas un volumen de 15-30 L/ha. El formulado se presenta como concentrado soluble de color amarillo/anaranjado. Su composición contiene 48% de glifosato (sal isopropilamina de N-fosfometil glicina), inertes y coadyuvantes c.s.p. 100 cm³.

De acción sistémica, es absorbido por hojas y tallos tiernos de las malezas; se transloca hacia las raíces y partes subterráneas de los vegetales ocasionando la muerte de las plantas emergidas. Los efectos son lentos, sobre todo en las especies perennes; después de transcurridos 4-5 días desde la aplicación, comienza el proceso de clorosis en hojas y tallos, proceso que culmina con la muerte total de las malezas.

Panzer® se utiliza en viñedos, cultivos de yerba mate, té, cítricos y otros frutales, caña de azúcar, maní, algodón, papa, batata, soja, maíz, girasol y pasturas. Algunas de las malezas para las cuales se recomienda el uso de Panzer® son:

- Enredadera (*Ipomoea nil*)
- Chamico (*Datura ferox*)
- Chinchilla (*Tagetes minuta*)
- Quinoa (*Chenopodium spp.*)
- Verdolaga (*Portulaca oleracea*)
- Yuyo colorado (*Amaranthus spp.*)
- Pasto cuaresma (*Digitaria sanguinalis*)
- Capín arroz (*Echinochloa cruz-galli*)
- Capín (*Echinochloa colonum*)
- Cebollín (*Cyperus rotundus*)
- Gramón (*Cynodon dactylon*)
- Sorgo de Alepo (*Sorghum halepense*)

A continuación se presenta la información toxicológica y ecotoxicológica del formulado comercial Panzer® (Tablas 4 y 5, respectivamente), tomados de la hoja de seguridad del producto (Dow AgroSciences Argentina S.A.).

Tabla 4. Información toxicológica de Panzer®

Categoría toxicológica	Valor de toxicidad
Toxicidad oral aguda	DL50: 5000 mg/kg (rata)
Toxicidad dermal aguda	DL50: > 5000 mg/kg (rata)
Toxicidad inhalatoria	CL50: 1,14 mg/L (rata)

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

Tabla 5. Información ecotoxicológica de Panzer®

Categoría toxicológica	Valor de toxicidad
Toxicidad aguda para peces	CL50-96 h: 35,9 mg/L (trucha arco iris)
Toxicidad oral aguda para aves	DL50: > 2000 mg/kg (codorniz)
Toxicidad oral aguda para abejas	DL50-48 h: > 180 µg/abeja
Toxicidad aguda por contacto para abejas	DL50-48 h: > 200 µg/abeja

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

Por otro lado cabe señalar que Panzer® persiste en el suelo adsorbido por las partículas del mismo y es extremadamente resistente a la lixiviación. Su principal vía de degradación es la microbiana. La vida media es de aproximadamente 60

días, dependiendo del tipo y condiciones del suelo (Hoja de Seguridad de Producto; Dow AgroSciences Argentina S.A.).

1.2.1.3. Formulado comercial Credit®

Credit® es un herbicida no selectivo empleado para el control postemergente de malezas anuales y perennes. Las recomendaciones de uso del producto indican aplicar volúmenes terrestres de 80-120 L/ha y en aplicaciones aéreas un volumen de 15-30 L/ha. De acción sistémica, es absorbido por hojas y tallos verdes y translocado hacia las raíces y órganos vegetativos subterráneos, ocasionando la muerte total de las malezas emergidas.

La formulación comercializada por Nufarm S.A. se presenta como concentrado soluble de color ámbar. En su composición contiene 48% de glifosato (sal isopropilamina de N-fosfometil glicina), inertes y coadyuvantes c.s.p. 100 cm³. Según la información aportada por la hoja de datos de seguridad del producto, Credit® es un producto que normalmente no ofrece peligro (Hoja de datos de seguridad Credit®; Nufarm S.A.).

Credit® se aplica sobre cultivos de soja, maíz, girasol, trigo, yerba mate, té, viñedos, cítricos y otros frutales. Las principales malezas que controla este herbicida son:

- Sorgo de Alepo/Cañota (*Sorghum halepense*)
- Capín (*Echinochloa crus-galli*)
- Cebadilla criolla (*Bromus unioloides*)
- Cebollín/Tamascán (*Cyperus rotundus*)
- Yuyo sapo/Clavel amarillo (*Wedelia glauca*)
- Chamico (*Datura ferox*)
- Gramón/ Gramilla/Chepica (*Cynodon dactylon*)
- Pasto cuaresma (*Digitaria spp.*)

- Quinoa (*Chenopodium spp.*)
- Yuyo colorado/Ataco (*Amaranthus spp.*)

Las siguientes tablas presentan información toxicológica y ecotoxicológica de Credit® (Tablas 6 y 7, respectivamente) tomados de la hoja de datos de seguridad del producto.

Tabla 6. Información toxicológica de Credit®

Categoría toxicológica	Valor de toxicidad
Toxicidad oral aguda	DL50: > 3000 mg/kg (rata)
Toxicidad dermal aguda	DL50: > 4000 mg/kg (rata)
Toxicidad inhalatoria aguda	CL50-4 h: > 2 mg/L (rata)
Irritación dermal aguda	No irritante (conejo)
Sensibilización dermal aguda	No sensibilizante (cobayo)
Irritación ocular aguda	Levemente irritante (conejo)

Fuente: Hoja de datos de seguridad Credit® (Nufarm S.A.)

Tabla 7. Información ecotoxicológica de Credit®

Categoría toxicológica	Valor de toxicidad
Toxicidad aguda para peces	Ligeramente tóxico
Toxicidad para aves	Prácticamente no tóxico
Toxicidad para abejas	Virtualmente no tóxico

Fuente: Hoja de datos de seguridad Credit® (Nufarm S.A.)

Credit® no persiste en el suelo y se degrada rápidamente en el mismo (Hoja de datos de seguridad Credit®; Nufarm S.A.).

1.3. INSECTICIDAS

Los insecticidas son compuestos utilizados en el control de insectos y otros tipos de artrópodos, como por ejemplo los ácaros (Klaassen, 2008), que atacan a los

cultivos agrícolas o que afectan la salud humana y/o animal (<http://www.epa.gov/pesticides/about>, s.f.e.). Actúan sobre diferentes estadios de los organismos controlando huevos, larvas y adultos, por contacto o ingestión cuando el insecto consume la planta que ha incorporado el compuesto químico a su sistema vascular. Una vez en el organismo, puede causar alteración de procesos fisiológicos, entre ellos neurotoxicidad. Los organofosforados, carbamatos, piretroides y organoclorados actúan a través de este mecanismo. En el periodo de las décadas del '30-'50, el uso de insecticidas experimentó un gran crecimiento debido particularmente al descubrimiento de las propiedades insecticidas del DDT y su comercialización posterior para el control del tifus y la malaria (Klaassen, 2008).

1.3.1. Clorpirifos

El clorpirifos [O,O-dietil O-(3,5,6-tricloro-2-piridil) fosforotioato], es un insecticida organofosforado no sistémico, usado también como acaricida y nematicida, tanto en agricultura y ganadería como en hogares, jardines y áreas recreativas (USEPA, 2006). Su fórmula estructural se presenta en la Figura 2.

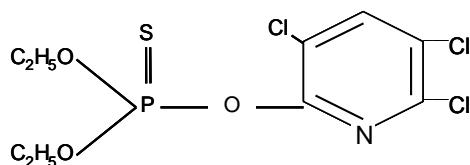


Figura 2. Fórmula estructural del clorpirifos (fuente: WHO 1975)

El clorpirifos es un sólido blanco de apariencia cristalina y aroma fuerte, poco soluble en agua, por lo que generalmente se mezcla con líquidos aceitosos antes de ser utilizado (USEPA, 2006). Su primer registro fue en el año 1965

(USEPA, 2006) y actualmente pertenece al grupo de compuestos que no presentan evidencia de carcinogenicidad en humanos (clase IV) (USEPA, 2005).

El clorpirifos posee acción neurotóxica principalmente inhibiendo la enzima AchE (Ali *y col.*, 2009). La principal vía de ingreso al ambiente es por aplicación sobre los cultivos o bien por volatilización, derrames o disposición de residuos del producto en desuso (ATSDR, 1997). Una vez en el medio ambiente puede ser degradado por la luz solar, bacterias o mediante diversos procesos químicos (ATSDR, 1997) alcanzando una vida media de menos de 60 días con poca o ninguna lixiviación (USEPA, 2006). Debido a su fuerte capacidad de adsorción a las partículas del suelo puede ingresar a los ambientes acuáticos mediante erosión y escorrentía, siendo algunas de las concentraciones registradas en aguas superficiales de 0,4 µg/L (USEPA, 2006) y 0,0108 mg/L (Marino y Ronco, 2005), perteneciendo este último registro a ambientes acuáticos de Argentina.

Es un producto moderada a altamente tóxico para organismos acuáticos, aves y abejas, pudiendo bioacumularse a lo largo de la cadena trófica (WHO, 1975, 2005; USEPA, 2006). De esta manera, el clorpirifos ha sido detectado en tejidos de peces representando una vía posible de exposición oral a través de la dieta para aves acuáticas y mamíferos que se alimentan de organismos acuáticos (USEPA, 2006).

Según la USEPA (2006), el principal metabolito del clorpirifos es el TCP. Este metabolito resulta mucho menos tóxico que el principio activo ya que no se caracteriza por inhibir las ChE y es capaz de ejercer efectos tóxicos solo en dosis mayores a aquellas que producen inhibición de las ChE por parte del clorpirifos.

Entre los efectos tóxicos del TCP se encuentran alteraciones enzimáticas en hígado y alteraciones morfológicas en hígado y riñón de humanos (USEPA, 2006). El TCP tiene mayor movilidad y persistencia en el suelo que el clorpirifos y puede llegar a permanecer en el ambiente hasta 365 días desde su aplicación (USEPA, 2006).

Los resultados de estudios de mutagenicidad en sistemas bacterianos demostraron que el clorpirifos no produce mutaciones en *S. typhimurium* (Gollapudi *y col.*, 1995) como tampoco en *E. coli* (Garrett *y col.*, 1986). Sin embargo, fue factible observar un efecto mutagénico en *Bacillus subtilis* (Wildemaue *y col.*, 1983). Cuando los ensayos se realizaron con levaduras no se registraron efectos mutagénicos (Plewa *y Gentile*, 1983) al igual que en el ensayo CHO/HGPRT. Por otro lado, no se registró actividad genotóxica cuando se realizó el ensayo CHO/HGPRT, ni una inducción de aberraciones cromosómicas en linfocitos de ratas expuestos *in vitro*, así como tampoco fue factible observar un aumento en la frecuencia de MN en células de médula ósea de ratón expuestos *in vivo* (Gollapudi *y col.*, 1995). Sin embargo, resultados positivos fueron observados en larvas de *Drosophila* (Patnaik *y Tripathy*, 1992; Gupta *y col.*, 2010), empleando estos últimos autores el EC.

En anfibios se observó una inhibición del crecimiento y un retraso en la metamorfosis en larvas de *Smilisca phaeota* expuestas a clorpirifos bajo condiciones de laboratorio (Gallo-Delgado *y col.*, 2006), alteraciones en el desarrollo embrionario de *Rhinella arenarum* (Lascano *y col.*, 2009) y efectos genotóxicos evidenciados por el ensayo de MN y el EC en larvas de *Bufo bufo gargarizans* (Yin *y col.*, 2009).

La exposición a clorpirifos indujo efectos genotóxicos en *Channa punctatus* (Porichha y col., 1998), y cambios histopatológicos en branquias de *Poecilia reticulata* (De Silva y Samayawardhena, 2002). Asimismo se ha observado que el insecticida induce daño en el ADN de células branquiales y sanguíneas de *C. punctatus* evidenciado por los ensayos de MN y EC (Ali y col., 2008b, 2009). Cuando se expusieron ejemplares de *P. reticulata* al formulado comercial Terrashield 50 TC se observaron efectos tóxicos evidenciados por una alteración en los niveles enzimáticos en cerebro, hígado y branquias (Sharbidre y col., 2011).

Estudios realizados con clorpirifos puro en células de mamíferos revelaron efectos negativos para la síntesis no programada del ADN (Gollapudi y col., 1995). Los estudios realizados por Muscarella y su grupo de trabajo (1984) pusieron en evidencia resultados negativos para el ensayo de ICH al exponer embriones de pollo y células CHO a clorpirifos y su metabolito. Estos mismos autores no observaron aberraciones cromosómicas en blastocitos de bovinos hembras cruzados con bovinos machos tratados con clorpirifos (Muscarella y col., 1984). Por otro lado, no se registró actividad genotóxica cuando se analizaron aberraciones cromosómicas en linfocitos de ratas expuestos *in vitro*, así como tampoco MN en células de médula ósea de ratón expuestos *in vivo* (Gollapudi y col., 1995).

Resultados positivos se obtuvieron con el ensayo para la cuantificación de aberraciones cromosómicas en células de mamíferos expuestas *in vitro* al clorpirifos puro (Ishidate Jr, 1987). Rahman y colaboradores (2002) revelaron la capacidad del clorpirifos de inducir daño en el ADN de leucocitos de ratón utilizando el EC. En embriones de ratón de hembras expuestas a clorpirifos puro

durante la gestación, fue factible observar un aumento en la frecuencia de MN (Tian y Yamauchi, 2003).

Numerosos estudios evidenciaron la capacidad del clorpirifos de inducir neuropatías en personas expuestas laboralmente en distintas etapas de la manufactura del compuesto o durante aplicaciones en cultivos (Albers *y col.*, 2007; Garabrant *y col.*, 2009). Asimismo, ha sido demostrada la capacidad del insecticida de inducir efectos tóxicos en personas expuestas a través del alimento o el agua de bebida contaminados con residuos de este organosfosforado (USEPA, 2006).

Cabe señalar que clorpirifos, a pesar de tener propiedades insecticidas, es capaz de inducir aberraciones cromosómicas en *Vicia faba* y *Hordeum vulgare* (Amer y Farah, 1983; Kaur y Grover, 1985) y de inducir MN de manera significativa en células meristemáticas de raíz de *Crepis capillaris* (Dimitrov y Gadeva, 1997).

1.3.1.1. Formulaciones comerciales de clorpirifos

Existen en el mundo más de 400 productos derivados del clorpirifos (USEPA, 2006). En EEUU, Lorsban® de Dow AgroSciences es el formulado más utilizado tanto para agricultura como para el hogar (USEPA, 2006).

En Argentina, el clorpirifos es el segundo insecticida más utilizado en agricultura (CASAFE, 2009). Son actualmente 143 las formulaciones comerciales a base de clorpirifos registradas por el SENASA (www.senasa.gov.ar) conteniendo diferentes porcentajes del principio activo, solo o combinado principalmente con cipermetrina o deltametrina. Entre las formulaciones de clorpirifos registradas en

nuestro país, Lorsban® es la que presenta mayor número de presentaciones comerciales (www.senasa.gov.ar).

1.3.1.2. Formulado comercial Lorsban* 48E®

Lorsban* 48E® es un insecticida organofosforado que actúa por contacto, ingestión e inhalación, recomendado para el control de insectos chupadores y masticadores. Los volúmenes de aplicación terrestre recomendados para cultivos extensivos son de 80-100 L/ha y no inferiores a 10 L/ha para aplicaciones aéreas. En frutales los volúmenes recomendados son 2000-3000 L/ha y en tratamientos de suelos, 100-150 L/ha.

La marca registrada Lorsban* 48E® es un formulado líquido de color ámbar y emulsionable en agua. En su composición se presenta 48% de clorpirifos, solvente (xileno) y emulsionantes c.s.p. 100 cm³. Este insecticida se aplica en cultivos de alfalfa, algodón, trigo, avena, cebada, centeno, girasol, maíz, soja, sorgo, ajo, cebolla, olivo, tomate, tabaco, lino, papa y en cultivos frutales. Las principales especies plaga que controla son:

- Ácaro de la yema (*Aceria sheldoni*)
- Ácaro del tostado (*Phyllocoptruta oleivora*)
- Arañuela roja común (*Tetranychus telarius*)
- Arañuela roja europea (*Panonychus ulmi*)
- Barrenador del brote (*Epinotia aporema*)
- Bicho de cesto (*Oiketicus kirbyi*)
- Cochinilla blanca del duraznero (*Pseudaulacaspis pentagona*)
- Cochinilla blanca del tronco (*Unaspis citri*)
- Cochinilla blanda (*Coccus hesperidum*)
- Cochinilla cerosa (*Ceroplastes grandis*)
- Cochinilla coma (*Mytilococcus beckii*)
- Cochinilla coma (*Lepidosaphes ulmi*)
- Cochinilla delta (*Lecanium deltae*)
- Cochinilla hache (*Saissetia oleae*)

- Cochinilla harinosa (*Pseudococcus citri*)
- Cochinilla roja australiana (*Aonidiella aurantii*)
- Cochinilla roja común (*Chrysomphalus dictyospermi*)
- Chinche rayada (*Horcya nobilellus*)
- Chinche tintórea del algodónero (*Dysdercus chaquensis*)
- Escama o piojo de San José (*Quadraspidiotus perniciosus*)
- Gata peluda norteamericana (*Spilosoma virginica*)
- Gorgojo del tomate (*Phyrdenus muriceus*)
- Gusano cogollero (*Heliothis virescens*, *Spodoptera frugiperda*)
- Gusano de la pera y de la manzana (*Carpocapsa pomonella*)
- Gusanos alambre (*Monocrepidius spp.*, *Conoderus spp.*)
- Gusanos blancos (*Diloboderus abderus*, *Discynetus spp.*)
- Insectos de suelo (*Cyclocephala signaticollis*, *Colapsis sp.*)
- Isoca bolillera (*Helicoverpa gelotopeon*)
- Isoca de la alfalfa (*Colias lesbia*)
- Isoca medidora (*Rachiplusia nu*)
- Isocas cortadoras (*Agrotis spp*, *Peridroma saucia*, *Feltia malefida*)
- Isocas militares (*Pseudaletia adultera*, *Prodenia spp.*,)
- Larvas de pulguilla (*Epitrix spp.*)
- Mosquita (*Contarinia sorghicola*)
- Oruga cuarteadora (*Mocis latipes*)
- Oruga de la hoja (*Alabama argillacea*)
- Oruga de la soja y maní (*Anticarsia gemmatalis*)
- Polilla de la papa (*Gnorimoschema operculella*)
- Polilla del brote del duraznero (*Grapholitha molesta*)
- Polilla del tomate (*Scrobipalpula absoluta*)
- Psílido del peral (*Psylla pyricola*)
- Pulgón Amarillo (*Metopolophium dirhodum*)
- Pulgón de la alfalfa (*Acyrtosiphon pisum*)
- Pulgón de la espiga (*Macrosiphum avenae*)
- Pulgón del algodónero (*Aphis gossypii*)
- Pulgón del crisantemo (*Macrosiphoniella sanborni*)
- Pulgón del haba (*Aphis fabae*)
- Pulgón del maíz (*Rhopalosiphum maidis*)
- Pulgón del repollo (*Brevicoryne brassicae*)
- Pulgón del rosal (*Macrosiphum rosae*)
- Pulgón lanífero (*Eriosoma lanigerum*)
- Pulgón verde (*Schizaphis graminum*)
- Pulgón verde del alcaucil (*Capitophorus eleagni*)
- Pulgones (*Toxoptera aurantii*, *Aphis gossypii*)
- Taladrillo del olivo (*Hylesinus oleiperda*)
- Trips de la cebolla (*Thrips tabaci*)

Fuente: Etiqueta de Lorsban* 48E® (Dow AgroSciences Argentina S.A.)

A continuación se describen los datos toxicológicos (Tabla 9) y ecotoxicológicos (Tabla 10) del insecticida Lorsban* 48E®.

Tabla 9. Información toxicológica de Lorsban* 48E®

Categoría toxicológica	Valor de toxicidad
Toxicidad oral aguda	DL50: 234 mg/kg (rata macho y hembra)
Toxicidad dermal aguda	DL50: > 2000 mg/kg (rata)
Toxicidad inhalatoria aguda	CL50-4 h: 5,29 mg/L (rata)

Fuente: hoja de seguridad de producto (Dow AgroSciences Bolivia S.A.)

Tabla 10. Información ecotoxicológica de Lorsban* 48E®

Categoría toxicológica	Valor de toxicidad
Toxicidad aguda para peces	CL50-96 h: 2,96 mg/L (pez cebra)
Toxicidad oral aguda para aves	DL50: 170 mg/kg (codorniz)
Toxicidad aguda por contacto para abejas	DL50: 0,31 µg/abeja

Fuente: hoja de seguridad de producto (Dow AgroSciences Bolivia S.A.)

De acuerdo a ello, el insecticida Lorsban* 48E® resulta moderadamente tóxico para peces, otros organismos acuáticos y para aves, mientras que es altamente tóxico para abejas. Presenta baja persistencia en el suelo, una degradación en términos de días a semanas y en condiciones aeróbicas su vida media es de 30-60 días. En el agua puede alcanzar una vida media de 3-4 semanas (Hoja de seguridad de producto Dow AgroSciences S.A.).

1.3.1.3. Formulado comercial Clorpirifos Zamba®

Clorpirifos Zamba® es un insecticida no sistémico utilizado para controlar tanto insectos como ácaros.

La formulación se presenta como concentrado emulsionable líquido de color pardo oscuro conteniendo 48% de clorpirifos en su composición y solvente c.s.p. 100 cm³.

Clorpirifos Zamba[®] se aplica en cultivos de trigo, cebada, centeno, avena, alpiste, maíz, sorgo, mijo, arroz, en praderas artificiales y campos naturales de gramíneas, alfalfa, girasol, soja, tabaco y frutales. Los volúmenes recomendados para aplicaciones terrestres no deben ser inferiores a 35-40 L/ha. Para pulverizaciones aéreas los volúmenes no deben ser inferiores a 10 L/ha y en caso de diluirse en gasoil se debe aplicar un volumen total de 3 L/ha. Algunas plagas controladas por Clorpirifos Zamba[®] son:

- Barrenador del brote (*Epinotia aporema*)
- Gusanos cogolleros (*Heliothis virescens*, *Spodoptera frugiperda*)
- Gusanos alambre (*Moncrepidius spp.*, *Conoderus spp.*)
- Gusanos blancos (*Diloboderus abderus*, *Discynetus spp.*)
- Isoca bolillera (*Helicoverpa gelotopeon*)
- Isoca de la alfalfa (*Colias lesbia*)
- Isoca medidora (*Rachiplusia nu*)
- Isocas cortadoras (*Agrotis spp*, *Peridroma saucia*, *Feltia malefida*)
- Isocas militares (*Pseudaletia adultera*, *Prodenia spp.*)
- Oruga de la hoja (*Alabama argillacea*)
- Pulgón amarillo (*Metopolophium dirhodum*)
- Pulgón de la alfalfa (*Acyrtosiphon pisum*)
- Pulgón de la espiga (*Macrosiphum avenae*)
- Pulgón del maíz (*Rhopalosiphum maidis*)

A continuación se presenta la información toxicológica de Clorpirifos Zamba[®] (Tabla 11), disponible en la hoja de datos de seguridad del formulado.

Tabla 11. Información toxicológica de Clorpirifos Zamba®

Categoría toxicológica	Valor de toxicidad
Toxicidad oral aguda	DL50: 135 mg/kg (rata macho)
Toxicidad dermal aguda	DL50: 2000 mg/kg
Toxicidad inhalatoria aguda	CL50: > 50,2 mg/L

Fuente: Hoja de datos de seguridad (Nidera S.A.)

Según la información ecotoxicológica disponible en la hoja de seguridad del formulado, Clorpirifos Zamba® es un compuesto que resulta no mutagénico para el ensayo de Ames, extremadamente tóxico para organismos acuáticos y moderadamente tóxico para aves y abejas. Por otro lado, es un producto que se descompone en el suelo (Hoja de datos de seguridad del producto, Nidera S.A.).

1.3.2. Pirimicarb

Pirimicarb (2-dimetilamino-5,6-dimetilpirimidin-4-il-dimetilcarbamato) es un insecticida carbámico del tipo *N*-metil carbamato utilizado en agricultura como acaricida específico (WHO, 1976). Se aplica en cultivos cerealeros, hortícolas, frutales y ornamentales (CASAFE, 2009). Su fórmula estructural se presenta en la Figura 3.

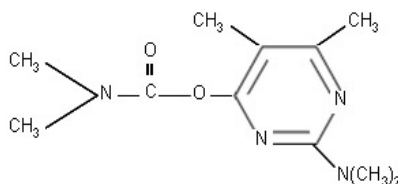


Figura 3. Fórmula estructural del pirimicarb (fuente: (WHO, 1976))

El pirimicarb presenta un aspecto sólido, blanco, de apariencia cristalina y es soluble en agua (USEPA, 1974). Se registró por primera vez en 1970 y pertenece

al grupo de compuestos con probable capacidad carcinogénica en seres humanos (clase II-III) (USEPA, 2005).

Pirimicarb es un insecticida que actúa por contacto, ingestión e inhalación, interfiriendo en la transmisión de los impulsos nerviosos por inhibición de las ChE (WHO-FAO, 2004). En el suelo es lixiviado fácilmente debido a su alta solubilidad y se degrada rápidamente con una vida media superior a las 7 semanas en condiciones aeróbicas. La tasa de degradación se ve incrementada en suelos con alto contenido de materia orgánica (WHO, 1976).

Pirimicarb y una de sus formulaciones comerciales conteniendo 50% de p.a., PirimorG, indujo efectos tóxicos en cultivos *in vitro* de células provenientes de carcinoma humano de pulmón (Skandrani *y col.*, 2006). Asimismo, diferentes autores han demostrado la toxicidad de diversas formulaciones comerciales de pirimicarb para la comunidad microbiana en sedimentos de agua dulce (Widenfalk *y col.*, 2004; Widenfalk *y col.*, 2008) para los crustáceos *Ceriodaphnia quadrangula* (Mansour y Hassan, 1993) y *Daphnia magna* (Andersen *y col.*, 2006; Syberg *y col.*, 2008), así como también para mosquitos *Culex quinquefasciatus* (Magnin *y col.*, 1988), para las especies piscícolas *P. reticulata* y *Cyprinus carpio* (OPP-EEDB, 2000) y en larvas de los anfibios *Pelophylax perezi* (Honrubia *y col.*, 1993; Alvarez *y col.*, 1995) y *Rhinella arenarum* (Vera Candiotti *y col.*, 2010).

Los estudios sobre efectos genotóxicos ejercidos por este insecticida son escasos (IARC, 1976; WHO-FAO, 2004). Básicamente, el pirimicarb es reconocido como no genotóxico en bacterias, levaduras, hongos y células de mamíferos (USEPA, 1974, 2002b) y no mutagénico en *S. typhimurium* con activación

metabólica S9 (USEPA, 1974) pero una respuesta positiva fue observada en las células L5178Y de linfoma de ratón (WHO-FAO, 2004). Sin embargo, se han comunicado resultados positivos en el sistema w/w+ del ensayo de ojo en mosaico de *D. melanogaster* Oregon-K (Aguirrezabalaga y col., 1994). Por otro lado, fue factible detectar daños en el ADN mediante la metodología del EC en linfocitos humanos tratados *in vitro* (Ündeger y Basaran, 2005). Contrariamente, no se detectaron alteraciones cromosómicas en linfocitos humanos *in vitro* con y sin activación metabólica (USEPA, 1974), como tampoco en células de médula ósea de ratas expuestas luego de la administración oral de pirimicarb (Anderson y col., 1980). Del mismo modo, Pilinskaia (1982) demostró la existencia de un incremento en la frecuencia de aberraciones cromosómicas en los linfocitos circulantes de trabajadores expuestos. Recientemente, fue posible demostrar por nuestro grupo de investigación que el pirimicarb y su formulado comercial Aficida® son capaces de inducir un incremento tanto en la frecuencia de aberraciones cromosómicas como en la frecuencia de ICH, una alteración del ciclo celular y una inhibición del índice mitótico en células CHO-K1 (Soloneski y Larramendy, 2010). Finalmente, fue factible demostrar que el formulado comercial Aficida® es capaz de inducir citotoxicidad y aumentar la frecuencia de MN en eritrocitos circulantes de larvas de *R. arenarum* expuestas bajo condiciones de laboratorio (Vera Candiotti y col., 2010).

Por último puede ser mencionado que el principio activo pirimicarb disminuye la actividad colinesterasa en hígado, sangre y cerebro de ratas preñadas

(Cambon *y col.*, 1979) e induce cambios morfofisiológicos en bazo, hígado y médula ósea de ratas expuestas en condiciones de laboratorio (Siroki *y col.*, 2001).

1.3.2.1. Formulaciones comerciales de pirimicarb

De acuerdo a la información disponible, hasta el presente existen 23 formulaciones comerciales de pirimicarb en todo el mundo (www.environmentalchemistry.com) y sólo dos han sido registradas para su comercialización en nuestro país (CASAFE, 2009).

En Argentina, es uno de los productos más utilizados para el control de áfidos en el sector hortícola y en el sector agrícola de pequeña y mediana escala. Debido a que el pirimicarb es un compuesto altamente selectivo, es considerado por el CASAFE (2009) como el primer insecticida utilizado para el control de pulgones sin afectar la fauna benéfica.

1.3.2.2. Formulado comercial Aficida®

Aficida® es un insecticida selectivo de acción rápida para el control de áfidos, incluyendo aquellos resistentes a los insecticidas organofosforados. Actúa por contacto, acción fumigante y acción translaminar.

La formulación se presenta como granulado dispersable en agua, de color verde. Aficida® contiene 50% de pirimicarb como principio activo, inertes y coadyuvantes c.s.p. 100 g. Se aplica en cultivos de alfalfa, avena, cereales, damasco, ciruela, durazno, pelón, manzana, melón, repollo, coliflor, berenjena, pimiento, lechuga, zapallo, sandía, papa, remolacha, arveja, haba, lenteja y

cultivos ornamentales. Las dosis de uso recomendadas, dependiendo del tipo de cultivo, se encuentran en el intervalo de 100-500 g/ha a 15-60 g/100 L de agua.

Las plagas que controla Aficida® son:

- Pulgón amarillo de los cereales (*Metolophium dirhodum*)
- Pulgón de la alfalfa (*Acyrtosiphon pisum*)
- Pulgón de la espiga (*Macrosiphum avenae*)
- Pulgón de la papa (*Macrosiphum solanifolii*)
- Pulgón de los citrus (*Toxoptera citricidus*)
- Pulgón de maíz (*Rhopalosiphum maidis*)
- Pulgón del crisantemo (*Macrosiphoniella sanborni*)
- Pulgón del haba (*Aphis fabae*)
- Pulgón del repollo (*Brevicoryne brassicae*)
- Pulgón del rosal (*Macrosiphum rosae*)
- Pulgón lanífero (*Eriosoma lanigerum*)
- Pulgón manchado de la alfalfa (*Therioaphis trifolii*)
- Pulgón negro del duraznero (*Anuraphis persicae niger*)
- Pulgón verde de los cereales (*Schyzaphis graminum*)
- Pulgón verde del duraznero (*Myzus persicae*)

Fuente: etiqueta de Aficida® (Syngenta Agro S.A.)

La información toxicológica y ecotoxicológica del insecticida se presenta a continuación en las Tablas 13 y 14, respectivamente.

Tabla 13. Información toxicológica de Aficida®

Categoría toxicológica	Valor de toxicidad
Toxicidad oral aguda	DL50: 87 mg/kg (ratón macho y hembra)
Toxicidad termal aguda	DL50: > 2000 mg/kg (conejo)
Toxicidad inhalatoria aguda	DL50-4 h: 1,41 mg/L (rata)
Irritación ocular aguda	levemente irritante (conejo)
Sensibilización dermal aguda	no sensibilizante

Fuente: hoja de seguridad de Aficida® (Syngenta Agro S.A.)

Tabla 14. Información ecotoxicológica de Aficida®

Categoría toxicológica	Valor de toxicidad
Toxicidad aguda para peces	Prácticamente no tóxico
Toxicidad aguda para aves	CL50: > 1805 mg/L (ligeramente tóxico)
Toxicidad aguda para abejas	DL50: 11µg/abeja (ligeramente tóxico)

Fuente: hoja de seguridad de Aficida® (Syngenta Agro S.A.)

1.3.2.3. Formulado comercial Patton flow®

Patton flow® es un insecticida selectivo indicado para el control de la mayoría de los áfidos que atacan cultivos en general. En los tratamientos aéreos con este producto se debe usar un volumen mínimo de 20 L/ha. Actúa por contacto, con acción vaporizante (fumigante) y translaminar.

Patton flow® se presenta como suspensión concentrada de color blanco/amarillento conteniendo 50% de pirimicarb como principio activo, inertes y coadyuvantes c.s.p. 100 cm³.

Este herbicida comercializado por la empresa Gleba S.A. es recomendado para su aplicación en cultivos de trigo, avena, cebada, centeno, alfalfa, lechuga, repollo, coliflor, melón, zapallo, sandía, arveja, haba, lenteja, berenjena, papa, pimiento, tomate y remolacha, florales, cítricos y frutales de carozo.

Las plagas que controla Patton flow® son:

- Pulgón amarillo (*Metolophium evansi*)
- Pulgón de la alfalfa (*Acyrtosiphon pisum*)
- Pulgón de la espiga (*Sitolobium granarium*)
- Pulgón de la papa (*Macrosiphum solanifolii*)
- Pulgón de los citrus (*Toxoptera citricidus*)
- Pulgón de las leguminosas (*Acyrtosiphon pisum*)
- Pulgón de maíz (*Rhopalosiphum maidis*)
- Pulgón del crisantemo (*Macrosiphoniella sanborni*)
- Pulgón del haba (*Aphis fabae*)
- Pulgón del repollo (*Brevicoryne brassicae*)
- Pulgón del rosal (*Macrosiphum rosae*)
- Pulgón manchado de la alfalfa (*Therioaphis trifolii*)
- Pulgón negro del duraznero (*Anuraphis persicae niger*)
- Pulgón verde (*Schyzaphis graminum*)
- Pulgón verde del duraznero (*Myzus persicae*)

Fuente: Etiqueta de Patton flow® (Gleba S.A.)

La información ecotoxicológica sobre el insecticida Patton flow® se presenta en la Tabla 15.

Tabla 15. Información ecotoxicológica de Patton flow®

Categoría toxicológica	Toxicidad
Toxicidad aguda para peces	Prácticamente no tóxico
Toxicidad aguda para aves	Moderadamente tóxico
Toxicidad aguda para abejas	Virtualmente no tóxico

Fuente: hoja de seguridad de Aficida® (Syngenta Agro S.A.)

Patton flow® presenta baja persistencia en el suelo, con una degradación en términos de días a semanas y en condiciones aeróbicas su vida media es de 30-60 días. En el agua puede alcanzar una vida media de 3-4 semanas.

1.4. LOS PECES COMO MODELO EXPERIMENTAL EN ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA

Es bien conocido que estos vertebrados constituyen modelos experimentales ampliamente utilizados en todo el mundo en ensayos de toxicidad ya que poseen una alta sensibilidad a la exposición de sustancias en el medio acuático (Al-Sabti y Metcalfe, 1995; Cavas y Ergene-Gozukara, 2005; Di Marzio *y col.*, 2005; Carriquiriborde *y col.*, 2007; de la Torre *y col.*, 2007; Ali *y col.*, 2008a; Simoniello *y col.*, 2009; Modesto y Martinez, 2010; Monteiro *y col.*, 2011; Nwani *y col.*, 2011; Pamplona *y col.*, 2011). Son capaces de manifestar una rápida respuesta frente a las bajas concentraciones de un xenobiótico presente en el agua y se encuentran en permanente exposición por contacto así como por difusión simple a través de las branquias y del tegumento (Al-Sabti y Metcalfe, 1995). Los peces

cumplen un importante rol en las comunidades bióticas (Jorge y col., 2006; Ali y col., 2008b) y por tratarse de vertebrados presentan una mayor complejidad en las respuestas biológicas a las diversas baterías de bioensayos recomendadas para su uso como modelo experimental (USEPA, 1975, 2002c, b; Espínola y col., 2004). Por otra parte, debido a que responden a los xenobióticos de manera similar que los grandes vertebrados (Jorge y col., 2006; Ali y col., 2008b) e incluso de la misma manera que algunos mamíferos (Al-Sabti y Metcalfe, 1995; Udroi, 2006), pueden ser utilizados para ensayar potenciales agentes mutagénicos, carcinogénicos y teratogénicos en humanos (USEPA, 2002a). Finalmente, una de las características más destacables es su fácil mantenimiento en laboratorio para poder ser empleados como herramienta en ensayos *in vivo*. Asimismo, cabe señalar que estos vertebrados son en general de relativamente fácil obtención tanto en sus ambientes naturales como artificiales provenientes de acuarios o criaderos (Al-Sabti y Metcalfe, 1995).

El empleo de estos vertebrados acuáticos adquiere una importancia creciente en el estudio de los efectos genotóxicos y citotóxicos de diferentes y variados xenobióticos, incluyendo a los agroquímicos. Dentro de los marcadores de genotoxicidad de reconocida sensibilidad se encuentran los llamados biomarcadores de efecto, que no sólo nos indican que existió una exposición sino que también nos revelan los posibles resultados adversos que pudo haber generado esta exposición. Dentro de éstos, los biomarcadores de genotoxicidad más utilizados caben mencionarse al análisis de la frecuencia de aberraciones cromosómicas, de ICH, de MN y el EC (Lee y Steinert, 2003; Mudry y Carballo,

2006; Cavas, 2011). Sin embargo, en los últimos años han cobrado gran relevancia por su recomendación internacional los ensayos de MN y EC (Al-Sabti y Metcalfe, 1995; Lee y Steinert, 2003; Udroui, 2006). Ambos bioensayos son métodos sensibles, rápidos y relativamente de bajo costo, capaces de detectar efectos genotóxicos de diversos xenobióticos, incluyendo contaminantes ambientales (Tucker y Preston, 1996).

Los MN representan una de las expresiones finales del daño introducido en la molécula de ADN por agentes genotóxicos. Este ensayo permite detectar macrolesiones inducidas en el ADN celular donde el material genético desprendido puede derivar de cromosomas enteros o, más frecuentemente, de fragmentos cromosómicos acéntricos que quedan excluidos de los núcleos de las nuevas células durante la anafase mitótica (Al-Sabti y Metcalfe, 1995; Fenech, 2000). Dicho material se observa como un núcleo de menor tamaño que el núcleo principal el cual recibe el nombre de MN. Por otra parte, el EC permite la detección de microlesiones inducidas en el ADN que son detectadas, dependiendo del tipo de variante empleada, como consecuencia de la aparición de rupturas de simple o doble cadena en la molécula de ADN luego de la exposición a un agente genotóxico, inclusive a niveles bajos de daño (Singh, 1996; Ali *y col.*, 2009).

Diversos estudios han demostrado que los eritrocitos de sangre periférica de peces resultan adecuados para ser empleados como células blanco en el ensayo de MN (Al-Sabti y Metcalfe, 1995; Ali *y col.*, 2008a, 2009; Cavalcante *y col.*, 2008). Por otro lado, varios autores han demostrado que cuando se emplea el EC como biomarcador de efecto, además de células circulantes sanguíneas, otros tipos

celulares tales como epiteliales, branquiales y hepáticas pueden ser igualmente utilizadas (Kim y Hyun, 2006; Caliani *y col.*, 2008; Simoniello *y col.*, 2009).

A nivel mundial, numerosas publicaciones avalan el empleo de peces como modelo experimental de toxicidad inducida por varios xenobióticos mediante el EC y el análisis de la frecuencia de MN en células sanguíneas. Una búsqueda bibliográfica en un Bancos de Datos como puede ser *Scopus* (www.scopus.com), muestra la existencia de más de 300 publicaciones evaluando diversos agentes genotóxicos mediante el EC y más de 600 trabajos en lo referente al ensayo de MN. A modo de ejemplo, podemos citar el empleo de la especie *P. lineatus* para la evaluación de la acción genotóxica del glifosato (Roundup®), la cipermetrina y el plomo (Cavalcante *y col.*, 2008; Simoniello *y col.*, 2009; Monteiro *y col.*, 2011), así como la acción del primero de estos compuestos y del herbicida atrazina en *C. auratus* (Cavaş y Könen, 2007; Cavaş, 2011). Cabe mencionar que en *C. punctatus* se evaluó la acción genotóxica de los pesticidas clorpirifos, pentaclorofenol, 2,4-D y atrazina (Farah *y col.*, 2003; Ali *y col.*, 2008b; Nwani *y col.*, 2011); en ejemplares de *C. carpio* se determinaron los efectos genotóxicos y citotóxicos del aluminio (García-Medina *y col.*, 2011); la acción del malatión y la dipirona en *R. quelen* (Jorge *y col.*, 2006; Pamplona *y col.*, 2011) y en *Oreochromis niloticus* se evaluó el efecto de distintos efluentes industriales y del plomo (Cavaş y Ergene-Gözükara, 2003, 2005; Ale *y col.*, 2004). Los resultados obtenidos en cada uno de estos estudios demostraron una sensibilidad diferencial a los mencionados compuestos por parte de las diferentes especies de peces utilizadas y remarcaron la eficacia de los

biomarcadores de efecto tales como EC y MN para la detección de genotoxinas en peces.

En lo que respecta a Argentina, numerosos estudios avalan el empleo de *C. decemmaculatus*, en particular, como modelo para la evaluación de la toxicidad tanto *in situ* como en condiciones de laboratorio, incluyendo el estudio de metales pesados, efluentes industriales, calidad de agua de ríos y ríos asociados a cultivos agrícolas y toxicidad por exposición a agroquímicos.

Respecto a los trabajos realizados para evaluar la toxicidad de metales pesados y según lo realizado por de la Torre y colaboradores (1997), *C. decemmaculatus* resultó ser una especie sensible a los efectos adversos del cadmio. Asimismo, otros estudios han demostrado la capacidad de respuesta de la especie luego de ser expuesta al zinc en muestras de agua de diferente composición química (Gómez *y col.*, 1998), al cloruro de zinc (Di Marzio, 1999), al cobre (Villar *y col.*, 2000) y al dicromato de potasio (Di Marzio, 1999) obteniendo diferentes valores de CL50 y haciendo hincapié en la influencia que pueden tener las características del agua de ensayo sobre la toxicidad de un mismo compuesto en una misma especie (Marchese *y col.*, 2008). Este pequeño poecílido ha sido utilizado también en la evaluación de la toxicidad de sustancias químicas como el amoníaco y el fenol en ensayos agudos de laboratorio (Di Marzio, 1999).

En lo que respecta al uso de *C. decemmaculatus* como modelo para la evaluación de la calidad de agua de ríos y la calidad de efluentes industriales, Di Marzio y su grupo de colaboradores (2005) realizaron una evaluación de la calidad del agua del río Luján de la provincia de Buenos Aires en diferentes organismos

nativos, entre ellos *C. decemmaculatus*. Estos estudios incluyeron la caracterización de agua de superficie, efluentes líquidos y sedimento en distintos puntos del río antes mencionado. Los resultados por ellos obtenidos, si bien no evidenciaron mortalidad, permitieron postular la existencia de un posible proceso de bioacumulación de compuestos orgánicos por parte de las especies evaluadas (Di Marzio *y col.*, 2005). Castro Scarone y colaboradores (2002) y Espínola y colaboradores (2004) evaluaron mortalidad mediante ensayos agudos de laboratorio a partir de distintos efluentes industriales, caracterizando la toxicidad de los mismos. Las investigaciones sobre la calidad de cuerpos de agua utilizando *C. decemmaculatus* como organismo prueba incluyen los ensayos que señalan cambios en la actividad de la AChE cerebral (de la Torre *y col.*, 2002), en la actividad enzimática y contenido proteico de otros tejidos, incluyendo branquias e hígado, índice somático del hígado y condición física de los ejemplares. Los resultados obtenidos por estos investigadores permitieron distinguir sitios con distinto grado de contaminación (de la Torre *y col.*, 2005). Por otro lado, se ha demostrado que las alteraciones enzimáticas en branquias e hígado de ejemplares provenientes de sitios contaminados, pueden recuperar valores basales cuando son trasladados a un medio limpio (de la Torre *y col.*, 2007).

En nuestro país los trabajos acerca de la toxicidad que pueden ocasionar los agroquímicos en peces, incluyen las investigaciones de Di Marzio y Tortorelli (1994) y Di Marzio y colaboradores (1994, 1998) quienes evaluaron los efectos del paraquat en la supervivencia y actividad de la AChE de *C. decemmaculatus*. Di Marzio (1999) demostró una sensibilidad diferencial frente a distintos

agroquímicos expresados como la CL50-96 h frente a una variedad de compuestos incluyendo paraquat, metamidofos, ciflutrina, cipermetrina y glifosato. Por otro lado, Parma de Croux y colaboradores (2002) evaluaron la mortalidad de *C. decemmaculatus* expuesto a cipermetrina en ensayos de laboratorio durante 96 h de exposición. Finalmente, Carriquiriborde y colaboradores (2007) evaluaron la toxicidad de la cipermetrina en peces expuestos tanto bajo condiciones de campo en el río Arrecifes en la provincia de Buenos Aires como bajo condiciones de laboratorio, incluyendo en estos estudios bioensayos agudos con agua de red, agua de río filtrada y sin filtrar. Si bien la cipermetrina resultó ser altamente tóxica para *C. decemmaculatus* en condiciones de laboratorio, no se observó mortalidad de estos peces en condiciones de campo, aún cuando las LC50-96 obtenidas en ambos sistemas resultaron ser equivalentes (Carriquiriborde y col., 2007).

En lo que respecta a estudios de genotoxicidad no existen antecedentes previos en el empleo de *C. decemmaculatus* en este tipo de bioensayos. Hasta el presente, las especies piscícolas locales utilizadas como organismos prueba para evaluar genotoxicidad de agroquímicos fueron *Cheirodon interruptus interruptus* (Campana y col., 1999), *R. quelen* (Jorge y col., 2006) y *P. lineatus* (Simoniello y col., 2009). Campana y colaboradores (1999) evaluaron el efecto genotóxico del piretroide lambda-cialotrina en eritrocitos de *C. i. interruptus* mediante el ensayo de MN. Jorge y su grupo de colaboradores (2006) evaluaron la acción genotóxica del malatión en *R. quelen* mediante el ensayo de MN empleando eritrocitos circulantes. Por su parte, Simoniello y colaboradores (2009) evaluaron el efecto

genotóxico de la cipermetrina en *P. lineatus* a través del EC utilizando para ello células sanguíneas.

Si bien los estudios de toxicidad ejercida por plaguicidas en peces se han visto incrementados durante los últimos años, tanto a nivel mundial en lo general como en Argentina en lo particular, es más que fragmentario lo conocido acerca del potencial citotóxico y genotóxico que los agroquímicos pueden inducir en especies de peces nativas como lo es *C. decemmaculatus*.

1.5. HIPÓTESIS

Los plaguicidas de uso masivo en zonas agropecuarias argentinas producen efectos letales, citotóxicos y genotóxicos sobre *Cnesterodon decemmaculatus* bajo condiciones experimentales de laboratorio.


1.6. OBJETIVOS


1.6.1. Objetivo General


Evaluar los efectos letales, citotóxicos y genotóxicos de diferentes formulaciones comerciales de plaguicidas, de uso masivo en zonas agropecuarias argentinas, sobre *Cnesterodon decemmaculatus* bajo condiciones experimentales de laboratorio.


1.6.2. Objetivos específicos


En relación al objetivo general, se proponen los siguientes objetivos específicos:


 Determinar mortalidad inducida por el herbicida glifosato como parte integrante de las formulaciones comerciales Panzer® y Credit® (48% glifosato) en *C. decemmaculatus*.

 Determinar mortalidad inducida por el insecticida clorpirifos como parte integrante de las formulaciones comerciales Lorsban* 48E® y Clorpirifos Zamba® (48% clorpirifos) en *C. decemmaculatus*.

 Determinar mortalidad inducida por el insecticida pirimicarb como parte integrante de las formulaciones comerciales Aficida® y Patton flow® (50% pirimicarb) en *C. decemmaculatus*.

 Evaluar el potencial genotóxico inducido por el herbicida glifosato como parte integrante de las formulaciones comerciales Panzer® y Credit®, por el insecticida clorpirifos como parte integrante de las formulaciones comerciales Lorsban* 48E® y Clorpirifos Zamba® y el insecticida pirimicarb como parte integrante de las formulaciones comerciales Aficida® y Patton flow® en eritrocitos circulantes de *C. decemmaculatus* mediante los ensayos de MN y EC.

 Evaluar el potencial citotóxico inducido por el herbicida glifosato como parte integrante de las formulaciones comerciales Panzer® y Credit®, por el insecticida clorpirifos como parte integrante de las formulaciones comerciales Lorsban* 48E® y Clorpirifos Zamba® y por el insecticida pirimicarb como parte integrante de las formulaciones comerciales Aficida® y Patton flow® en células sanguíneas de *C. decemmaculatus* mediante variaciones en las poblaciones celulares circulantes del linaje eritrocítico.

 Determinar sensibilidad diferencial de *C. decemmaculatus* al herbicida glifosato como parte integrante de las formulaciones comerciales Panzer® y Credit®, al insecticida clorpirifos como parte integrante de las formulaciones

comerciales Lorsban* 48E[®] y Clorpirifos Zamba[®] y al insecticida pirimicarb como parte integrante de las formulaciones comerciales Aficida[®] y Patton flow[®] mediante los ensayos de mortalidad, genotoxicidad y citotoxicidad.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Selección de los ejemplares de estudio y determinación taxonómica

La especie seleccionada para los bioensayos del presente trabajo de Tesis Doctoral fue *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842) (Pisces: Poeciliidae), organismo endémico y de amplia distribución en América Neotropical (Gómez y col., 1998), habitante de una gran variedad de cuencas de América del Sur, entre ellas, el sistema del Río de la Plata (Menni y col., 1996) (Figura 1). Es una especie representativa de la fauna ictícola de la región denominada Pampa Húmeda, accesible durante todo el año y de fácil mantenimiento bajo condiciones de laboratorio (Menni y col., 1996).

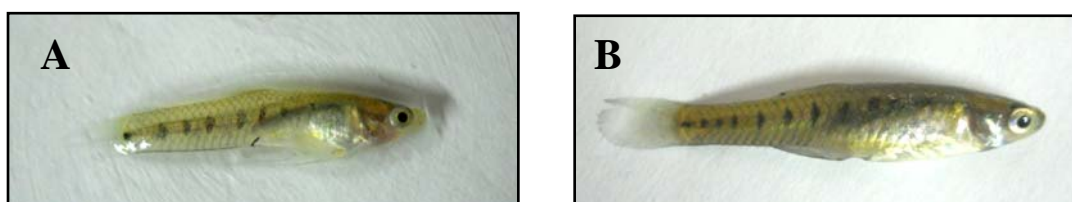


Figura 1. Ejemplares de *C. decemmaculatus*. Macho (A) y hembra (B).

La determinación taxonómica de ejemplares tomados al azar de las muestras capturadas fue realizada por la Dra. Amalia Miquelarena, Jefe de la Sección Ictiología, División Zoología Vertebrados de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata. Los ejemplares determinados fueron depositados en la Colección del Museo de La Plata con el número de registro MLP 10121.

2.2. Captura y aclimatación de los ejemplares de estudio

Los ejemplares utilizados en los experimentos fueron colectados en ambientes lóticos poco profundos del Parque Provincial Pereyra Iraola (Reserva de la Biosfera UNESCO; Latitud: 34° 51' 32,28" (S) Longitud: 58° 0,7' 29,36" (O); Elevación: 15 msnm, Partido de Berazategui, Provincia de Buenos Aires, Argentina (Figura 2). Los ejemplares fueron capturados con un copo de mano y transportados al laboratorio en un contenedor plástico de 50 L de capacidad con agua de la misma charca del sitio de colecta.



Figura 2. Sitio de captura de los ejemplares de *C. decemmaculatus*.

En el laboratorio, los individuos fueron colocados en peceras de vidrio de 40 L de capacidad y mantenidos al menos durante 15 días para su aclimatación

antes de su empleo experimental, según lo recomendado por Gómez y colaboradores (1998), Di Marzio (1999), Villar y colaboradores (2000) y la Norma IRAM 29112 (2008). Durante la fase de aclimatación los ejemplares fueron mantenidos bajo ciclos de 16:8 h luz/oscuridad, temperatura de 21 ± 1 °C, con agua de red previamente declorinada mediante burbujeo continuo durante 48 h (pH 7,6 a 8,3; dureza 143 mg CaCO₃/L). Los ejemplares fueron alimentados diariamente *ad libitum* (TetraMin®, TetraWerke, Alemania) hasta 24 h previas al comienzo de cada experimento. Las peceras se mantuvieron con aireación artificial permanente.

El peso medio de los ejemplares utilizados en los experimentos fue $0,26 \pm 0,1$ g, mientras que el valor promedio de longitud total fue $29,5 \pm 2,7$ mm.

2.3. Selección de los agroquímicos

Los formulados comerciales de los agroquímicos utilizados en el presente trabajo (Tabla 1), constituyen marcas registradas para nuestro país y de uso actual en la agricultura argentina (www.senasa.gov.ar). Las concentraciones evaluadas durante el estudio representaron la concentración nominal de principio activo de la formulación comercial y fueron expresadas a lo largo de todo el trabajo como mg de principio activo/L. Es importante señalar que las concentraciones evaluadas de Aficida® en la Publicación I representaron la concentración nominal del formulado comercial y fueron expresadas a lo largo de dicho trabajo como mg de Aficida®/L. Para poder comparar los resultados presentados en dicha Publicación con los resultados inéditos obtenidos en la presente Tesis Doctoral, las

concentraciones de Aficida® fueron expresadas a lo largo de todo el presente trabajo como mg de principio activo/L.

Tabla 1. Marcas comerciales utilizadas en el presente trabajo

Formulado comercial	Principio activo y concentración	Empresa productora	F	CT
Panzer®	glifosato 48%	Dow Agrosiences Argentina S.A.	SL	IV
Credit®	glifosato 48%	Nufarm S.A.	SL	IV
Lorsban* 48E®	clorpirifos 48%	Dow Agrosiences Bolivia S.A.	EC	II
Clorpirifos Zamba®	clorpirifos 48%	Nidera S.A.	EC	II
Aficida®	pirimicarb 50%	Syngenta Agro S.A.	WP	II
Patton flow®	pirimicarb 50%	Gleba S.A.	SL	II

Fuente: modificado de CASAFE 2009

F (formulación): WP, polvo humectable; SL, líquido soluble; EC, concentrado emulsionable
CT: categoría toxicológica según WHO

2.4. Preparación de las soluciones de ensayo

Las soluciones de ensayo se prepararon añadiendo cantidades determinadas de la solución madre de cada agroquímico a evaluar al agua de dilución, antes de su transferencia a los recipientes de ensayo. La solución madre de cada agroquímico se preparó mediante la dilución de una cantidad determinada del mismo en agua de dilución. En simultáneo, se prepararon las soluciones para los tratamientos control. La solución para el control negativo consistió en agua de dilución libre de agroquímicos y la solución para el control positivo consistió en agua de dilución conteniendo el tóxico de referencia, preparada también a partir de una solución madre. Todas las soluciones mencionadas, se prepararon inmediatamente antes del inicio de cada experimento y diariamente antes de la renovación de las soluciones.

2.5. Compuestos químicos empleados

En la Tabla 2 se detallan los compuestos químicos empleados para el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Tabla 2. Compuestos químicos empleados en el presente trabajo

Compuesto	CASRN / Número de catálogo	Origen
Aceite de inmersión	HX08819102	Merck KgaA (Darmstad, Alemania)
APFB	A9414	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.)
APFN	A9539	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.)
Ciclofosfamida	6055-19-2	Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EE.UU.)
Cloruro de potasio	7447-40-7	Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EE.UU.)
Cloruro de sodio	7647-14-5	Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EE.UU.)
Dicromato de potasio	7778-50-9	Merck KgaA (Darmstad, Alemania)
DMSO	67-68-5	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.)
Giemsa	HX933732	Merck KgaA (Darmstad, Alemania)
Hidróxido de sodio	B0002198	Merck KgaA (Darmstad, Alemania)
Medio de montaje con yoduro de propidio	F5932	Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EE.UU.)
Metanol	K39504909	Merck KgaA (Darmstad, Alemania)
Na ₂ EDTA	6381-92-6	Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EE.UU.)
Tris Ph 7,5	T1378	Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EE.UU.)
Trizma [®] (HCl)	T3253	Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EE.UU.)
Triton X-100	9002-93-1	Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, EE.UU.)

2.6. Determinación de la concentración letal media (CL50)

Los ensayos de toxicidad aguda fueron realizados según los métodos estandarizados para organismos acuáticos de acuerdo a lo propuesto por la USEPA (1975, 2002b), el IRAM (2008) y las recomendaciones aportadas por Di Marzio (1999) y descritas en detalle en la Publicación I.

Cada experimento consistió en exponer 10 ejemplares a 10 concentraciones diferentes de los compuestos en estudio durante 96 h en un volumen final de 1 L

de agua de clorinada. Junto a los ensayos con plaguicidas, se llevaron a cabo en simultáneo, controles negativos con agua de red de clorinada (pH 7,6 a 8,3; 143 mg CaCO₃/L), y controles positivos con dicromato de potasio (21,4 mgCr(VI)/L) según lo descrito en la Publicación II. Las mediciones de cromo en las soluciones de ensayo se llevaron a cabo por Espectrofotometría de Absorción Atómica mediante aspiración directa en llama aire-acetileno (Método 3111 B) (APHA y col., 1998). El fotoperiodo en todos los ensayos fue de 16:8 h luz/oscuridad y la temperatura de 21 ± 1 °C bajo condiciones controladas mediante una fuente de calor artificial. Las soluciones de ensayo fueron preparadas inmediatamente antes de su uso y renovadas cada 24 h. Los peces no fueron alimentados durante todo el tiempo requerido por el diseño experimental. Para evaluar la mortalidad, los ejemplares fueron examinados visualmente cada 24 h y considerados muertos tanto en ausencia de movimientos respiratorios como en ausencia de movimientos natatorios en respuesta a toques suaves con una varilla plástica. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

Se determinaron los valores de CL50 para las 24, 48, 72 y 96 h de exposición para cada formulado, a fin de obtener un rango de concentraciones subletales para poder realizar posteriormente los ensayos agudos y permitir evaluar genotoxicidad y citotoxicidad.

El cálculo de las CL50 se realizó mediante el empleo del programa de análisis Probit versión 1.5 (www.epa.gov).

2.7. Diseño experimental para la determinación de genotoxicidad y citotoxicidad

En cada experimento se expusieron 10 ejemplares en un volumen final de 1 L de agua declorinada a 3 concentraciones diferentes de los agroquímicos en estudio durante 96 h de exposición continua, según lo propuesto por Ali y colaboradores (2008b, 2009) y publicado en detalle por nosotros en la Publicación I.

Las concentraciones de los agroquímicos empleados en el presente trabajo de Tesis Doctoral para los ensayos de inducción de MN en células sanguíneas y variaciones en la frecuencia de eritrocitos/eritroblastos circulantes corresponden al 25%, 50% y 75% del valor de CL50-96 h obtenida experimentalmente según lo recomendado por Ali y colaboradores (2008b) (Ver sección 2.8. y 2.10.). Cabe mencionar que en el caso particular de Aficida® las concentraciones empleadas fueron correspondientes al 22%, 33%, 44% y 70% del valor de CL50-96 h obtenida experimentalmente según lo detallado en la Publicación I. En el caso de la cuantificación de lesiones de cadena simple en el ADN de células sanguíneas mediante el EC, los ejemplares fueron expuestos a la menor dosis con capacidad de inducir un incremento significativo en la frecuencia de MN (Ver sección 2.9.).

De manera simultánea, se ensayaron controles negativos utilizando agua de red declorinada (pH 7,6 a 8,3; 143 mg CaCO₃/L) y controles positivos empleando ciclofosfamida (5 mg/L para los ensayos de inducción de MN al igual que para las variaciones en la frecuencia de eritrocitos/eritroblastos y 10 mg/L para el EC). Las soluciones de ensayo fueron preparadas inmediatamente antes de su uso y

renovadas cada 24 h. Los peces no se alimentaron durante el tiempo de exposición. Para evaluar la inducción de daño a través de los ensayos de genotoxicidad y citotoxicidad, los ejemplares fueron procesados a las 48 y 96 h de tratamiento. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

2.8. Cuantificación de inestabilidad genética mediante el análisis de la frecuencia de MN

Se realizaron los extendidos de sangre periférica de *C. decemmaculatus* de acuerdo a la metodología propuesta por Cavaş y Ergene-Gözükara (2005) y descrito en detalle por nosotros en la Publicación I. Previo al sacrificio, los ejemplares fueron adormecidos por inmersión en agua a 2-4 °C. Una muestra de sangre de aproximadamente 2-3 µl fue obtenida de cada ejemplar por decapitación mediante corte transversal realizado a nivel del opérculo. Se realizaron dos extendidos celulares sobre portaobjetos por ejemplar y los mismos fueron secados a temperatura ambiente durante 18-24 h siguiendo la técnica citogenética convencional de secado al aire. Posteriormente, los preparados fueron fijados en metanol (100%v/v, temperatura ambiente) durante 20 min y coloreados posteriormente con solución acuosa de Giemsa al 5% durante 13 min (Ergene y col., 2007). Para la identificación de los MN, las preparaciones fueron examinadas a ciego empleando un fotomicroscopio Olympus BX50 (Olympus, Japón) usando una magnificación de 1000X. El reconocimiento de MN se realizó siguiendo el criterio propuesto por Countryman y Heddle (1976), Heddle y colaboradores (1978) y Fenech (2000, 2007). Brevemente, estos autores indican que un MN, para

ser considerado como tal, debe reunir las siguientes características: presentar una coloración similar o menos intensa que el núcleo principal, no estar en contacto con el núcleo principal, presentar un diámetro menor a 1/3 del correspondiente núcleo principal, ser no refringente y no presentar más de 4 MN asociados a un núcleo principal (Figura 3).

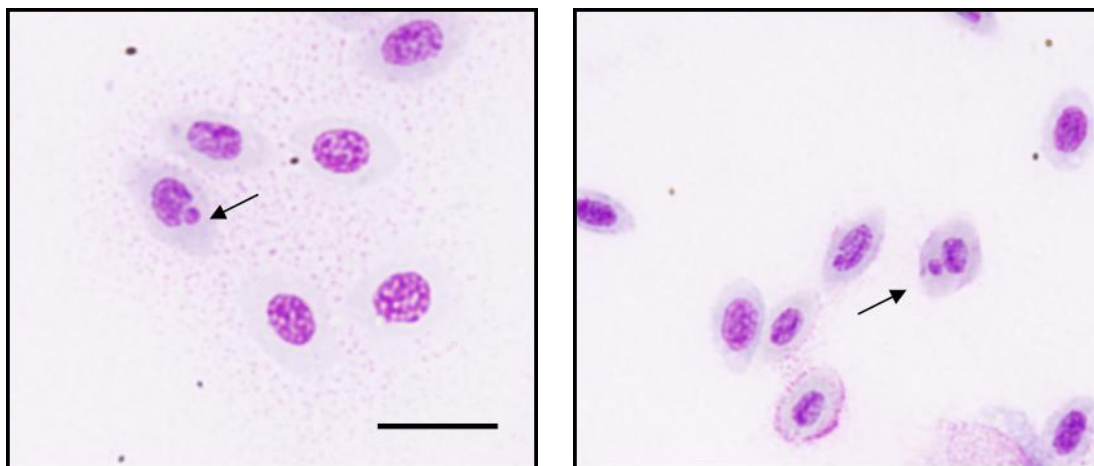


Figura 3. Eritrocitos de sangre periférica de *C. decemmaculatus* presentando MN. Escala de la barra, 10 μ m.

La frecuencia de MN se determinó por evaluación de 1500 eritrocitos circulantes por cada individuo según lo detallado en la Publicación I. Los resultados obtenidos fueron expresados como frecuencia de MN/1000 células en el total de los ejemplares analizados por punto experimental.

2.9. Cuantificación de inducción de fracturas de cadena simple en el ADN de células individuales mediante el EC

Se desarrolló la metodología de electroforesis en gel de células individuales o EC en su variante alcalina siguiendo lo propuesto por Singh y colaboradores

(1988) con modificaciones menores de acuerdo a lo propuesto por nuestro grupo de investigación (Soloneski *y col.*, 2002; González *y col.*, 2003; González *y col.*, 2007; Molinari *y col.*, 2010).

Se aplicó la metodología de tres capas de microgeles de agarosa sobre portaobjetos según lo propuesto por Srám (1998). Básicamente para la realización de las preparaciones citogenéticas se procedió con los pasos siguientes:

- Preparación de dos soluciones de ABPF y APFN al 0,5%, en una solución de fosfatos libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} .
- Extensión de 100 μl de APFN sobre portaobjetos y solidificación (37 °C, 20 min).
- Colocación de los ejemplares en estudio en agua a 2-4 °C para su adormecimiento.
- Extracción de una muestra de sangre de aproximadamente 2-3 μl obtenida por decapitación mediante un corte transversal realizado a nivel del opérculo de cada ejemplar y resuspensión de la misma en 1 ml de PBS en microtubos.
- Centrifugación de las muestras a 2000 rpm durante 8 min a temperatura ambiente.
- Descarte del sobrenadante, resuspensión de la muestra celular en 70 μl de ABPF (37 °C) para confección inmediata de la segunda capa de agarosa de las preparaciones.
- Solidificación de las preparaciones (4 °C, 10 min).

- Adición de una tercera capa de ABPF (100 μ l, 37 °C) y posterior solidificación de las preparaciones (4 °C, 10 min).
- Colocación de los preparados en una solución de lisis (1% sarcocinato de Na, 2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris pH 10, 1% Triton X-100, 10% DMSO) (4° C, 60 min) protegidos de la luz ambiente.
- Traslado de los preparados a una cuba de electroforesis horizontal con una solución buffer de electroforesis preparada en el momento (1 mM Na₂EDTA, 300 mM NaOH) para permitir el desenrollamiento del ADN (4 °C, 15 min).
- Realización de la electroforesis en el mismo buffer en un campo eléctrico de 25 V y 250 mA (0,8 V/cm) durante 10 min.
- Lavado de los preparados con una solución de neutralización (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5; 3 x 5 min) y posterior enjuague con H₂O destilada.
- Coloración de los preparados con IP.

El objetivo de esta técnica es lisar las células y obtener un ADN separado del resto de los componentes nucleares, principalmente de su membrana nuclear, observándose de esta manera una estructura en forma de “nucleoide”. El análisis de los “nucleoides”, fue realizado utilizando un fotomicroscopio de fluorescencia (Olympus BX50 equipado con un filtro de excitación de 510-550 nm y un filtro de barrera de 590 nm), con una magnificación de 1000X. Se analizaron 100 nucleoides seleccionados al azar por cada ejemplar por punto experimental. El daño en el ADN se cuantificó mediante la clasificación visual de los nucleoides en 5

categorías de daño según la relación diámetro de la cabeza/largo de la cola siguiendo los criterios propuestos por Pitarque y colaboradores (1999) y Poletta y colaboradores (2008) De acuerdo a los mismos, los nucleoides fueron clasificados como:

- a. clase 0: cabeza visible sin espículas alrededor y sin cola (Figura 4A);
- b. clase I: cabeza visible con espículas alrededor y sin cola (Figura 4B);
- c. clase II: cabeza visible y cola de largo menor al diámetro de la cabeza (Figura 4C);
- d. clase III: cabeza visible y cola de largo hasta dos veces el diámetro de la cabeza (Figura 4D);
- e. clase IV: cabeza visible y cola de largo mayor a dos veces el diámetro de la cabeza (Figura 4E).

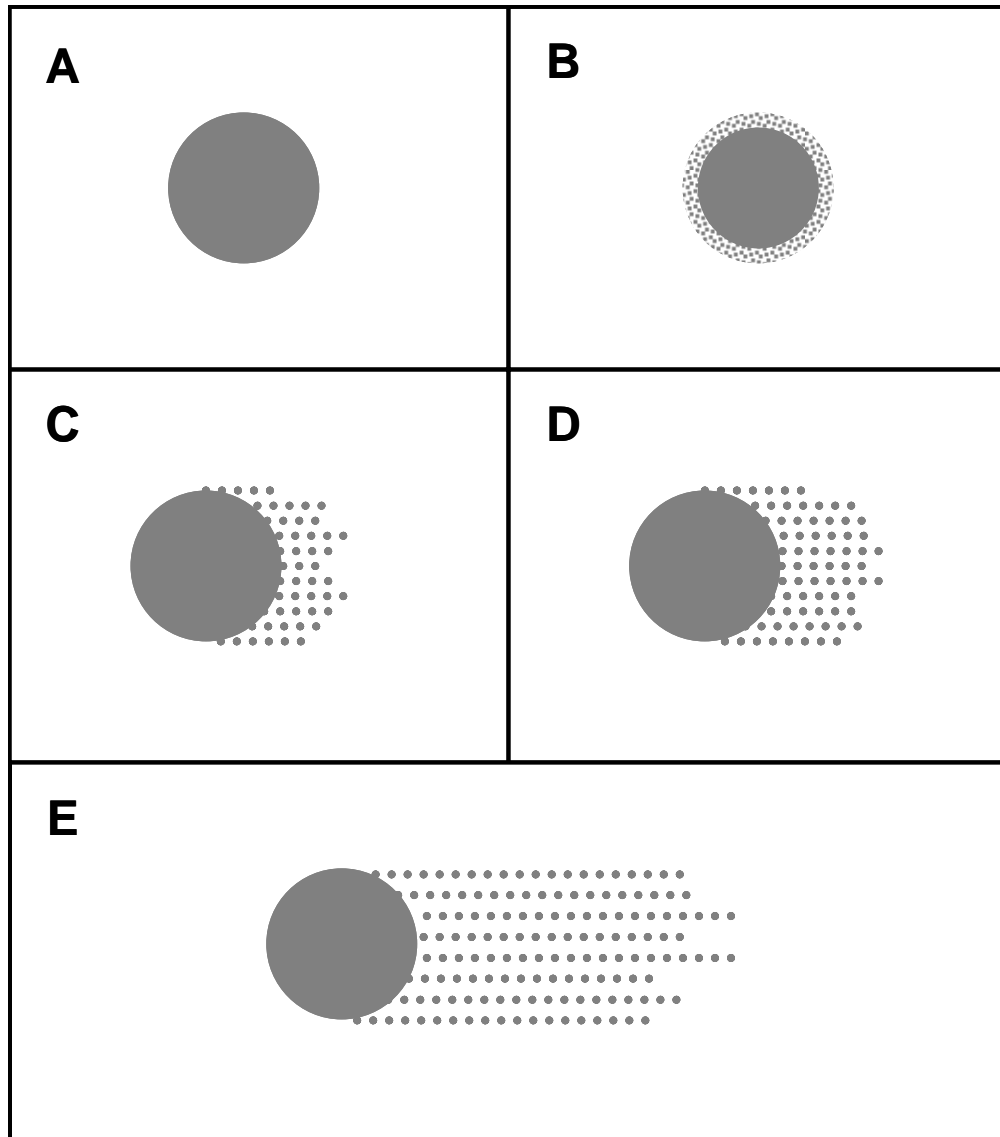


Figura 4. Clasificación de los nucleoides en categorías de daño según la relación diámetro de la cabeza/largo de la cola. (A) Clase 0; (B) clase I; (C) clase II; (D) clase III; (E) clase IV.

Los resultados obtenidos fueron expresados como porcentaje medio de nucleoides sin daño (nucleoides tipo 0 y I) y con daño leve, intermedio y alto en su ADN, nucleoides clase II, III y IV, respectivamente (Palus *y col.*, 1999).

Asimismo se calculó el IDG por cada punto experimental según lo recomendado por Pitarque y colaboradores (1999) mediante la siguiente fórmula:

$$\text{IDG} = (\text{clase I} + 2 \times \text{clase II} + 3 \times \text{clase III} + 4 \times \text{clase IV}) / (\text{clase I} + \text{II} + \text{III} + \text{IV}).$$

Las células visualizadas como “nubes de ADN con restos de cabeza visible” fueron identificadas como cometas apoptóticos (Figura 5A) y las “nubes de ADN sin cabeza visible” como cometas necróticos (Figura 5B) de acuerdo a lo propuesto por Fairbairn y colaboradores (1995). Los cometas apoptóticos y necróticos no fueron incluidos en el análisis.

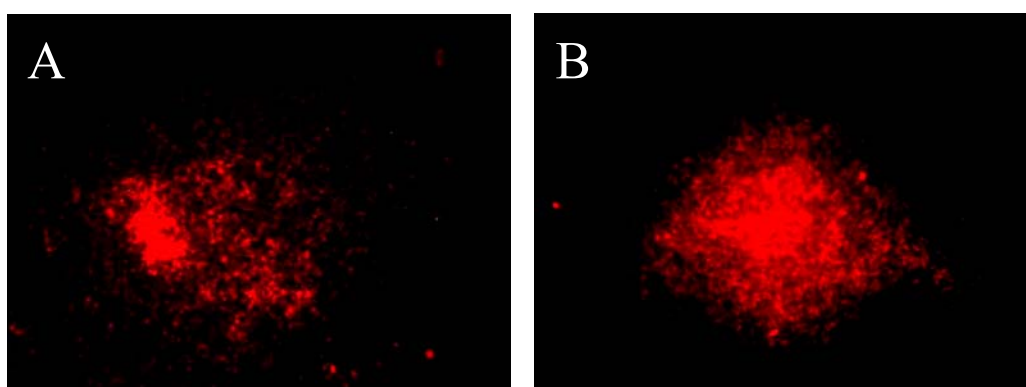


Figura 5. Nucleoide apoptótico (A); nucleoide necrótico (B).

2.10. Estimación de la citotoxicidad mediante análisis de la relación eritrocitos/eritroblastos

La evaluación de la citotoxicidad se realizó a través de la cuantificación de las variaciones en la relación de eritrocitos y eritroblastos circulantes sobre los mismos extendidos utilizados para el análisis de la frecuencia de MN. La proporción de eritrocitos y eritroblastos se determinó mediante el análisis de 1500 células por cada ejemplar por punto experimental. Para el reconocimiento de los patrones morfológicos de células del linaje eritrocítico se siguieron los criterios

propuestos por Peters y Schwarzer (1985), Rey Vázquez y Guerrero (2007) y Claver y Quaglia (2009). De acuerdo a estos autores, tales criterios establecen que un eritrocito es una célula ovalada con núcleo oval a redondeado (Claver y Quaglia, 2009) y cromatina compacta que se tiñe de lila en preparaciones coloreadas con solución acuosa de Giemsa (Rey Vázquez y Guerrero, 2007). Por otra parte, un eritroblasto es una célula circular o ligeramente ovoide con citoplasma basófilo y núcleo redondo a ligeramente ovoide, que contiene una cromatina difusa de densidad variable la que representa el 40-60% del volumen celular (Peters y Schwarzer, 1985) (Figura 6).

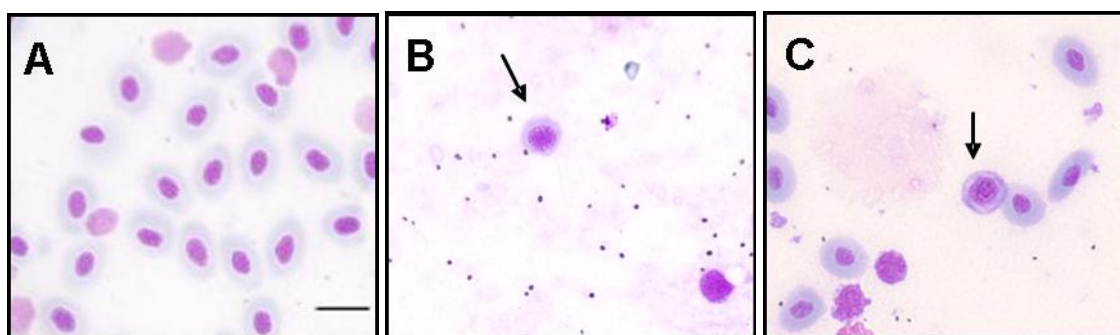


Figura 6. Eritrocitos (A) y eritroblastos (B-C) en extendidos de sangre periférica de *C. decemmaculatus*. Escala de la barra, 10 µm.

Los resultados obtenidos fueron expresados como frecuencia media de eritrocitos eritroblastos por 1000 células en el total de los ejemplares analizados por punto experimental.

2.11. Análisis estadístico

Las comparaciones estadísticas de los resultados obtenidos de los análisis de MN, EC y proporción eritrocitos/eritroblastos entre grupos controles y los

grupos tratados se realizó mediante un análisis de varianza simple (ANOVA) seguido por la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para comparación de medias. La homogeneidad de varianzas entre grupos se evaluó mediante la prueba de Levene. En aquellos casos en que fue necesario utilizar pruebas no paramétricas se empleó la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación de medianas de más de dos grupos y la prueba W de Mann-Whitney (Wilcoxon) para la comparación de medianas de dos muestras a una cola. La descripción de las relaciones entre mortalidad, CL50, frecuencia de MN, frecuencia de células dañadas, IDG y frecuencia de eritrocitos, tanto con las concentraciones de agroquímicos empleadas como con el tiempo de exposición, fue realizada mediante un análisis de regresión simple.

El nivel de significancia elegido fue del 0,05 en todos los casos, de no indicarse lo contrario.

3. RESULTADOS

En el presente capítulo de esta Tesis Doctoral, tanto las Figuras como las Tablas referidas en cada uno de los apartados se presentan en el Anexo II. Asimismo, aquellas Figuras y Tablas incluidas en las Publicaciones originales son mencionadas en el texto de la Tesis Doctoral con la denominación correspondiente tal cual fueron publicadas.

3.1. Control de calidad

Los parámetros físicos y químicos del agua de red declorinada mediante aireación permanente (48 h) utilizada en los ensayos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros físicos y químicos del agua de red utilizada durante las fases de mantenimiento, aclimatación y experimentación.

Parámetro	Resultado
pH	7,55 ± 0,1
Conductividad (µS/cm)	994 ± 8,5
Alcalinidad (mg CaCO ₃ /L)	259 ± 4,0
Dureza (mg CaCO ₃ /L)	143 ± 23,5
Cadmio (mg/L)	<0,002
Cromo (mg/L)	<0,01
Cobre (mg/L)	<0,005
Plomo (mg/L)	0,03
Zinc (mg/L)	0,008
Hierro (mg/L)	0,1
Temperatura (°C)	21 ± 1

La concentración de amonio (NH₄⁺) en las soluciones de ensayo para las 0 y 24 h de exposición fue < 0,2 mg/L. Estas concentraciones fueron determinadas mediante el Test Amonio NH₄⁺ Aquamerck® de Merck KgaA (Darmstad,

Alemania). Las concentraciones de oxígeno disuelto en las soluciones de ensayo al tiempo 0 y a las 24 h de exposición fueron $7,4 \pm 0,6$ y $5,3 \pm 0,1$ mg/L, respectivamente. Dicha concentración fue determinada con el medidor multi-paramétrico HI 9828 de Hanna Instruments.

3.2. Evaluación de los efectos letales inducidos por agroquímicos en *C. decemmaculatus* mediante la determinación de las CL50

Los valores de CL50 y sus respectivos intervalos de confianza al 95% luego de 24, 48, 72 y 96 h de exposición a los distintos compuestos evaluados en el presente trabajo de Tesis Doctoral se muestran en la Tabla 1 (Anexo II).

Los valores de CL50 obtenidos para Panzer® revelaron concentraciones de 17; 16; 16 y 16 mg/L para las 24, 48, 72 y 96 h, respectivamente. Cuando los ejemplares de *C. decemmaculatus* fueron expuestos al formulado Credit® dichas concentraciones mostraron valores de 98; 94; 92 y 92 para las 24, 48, 72 y 96 h, respectivamente.

Tras la exposición a Lorsban* 48E®, las CL50-24, 48, 72 y 96 h representaron valores de 0,13; 0,05; 0,04 y 0,03 mg/L, respectivamente. Con Clorpirifos Zamba® valores de 0,40; 0,32; 0,25 y 0,21 mg/L fueron determinados para la CL50-24, 48, 72 y 96 h, respectivamente.

Para el caso del formulado Aficida® se obtuvieron valores de CL50 de 172; 139; 122 y 113 mg/L para las 24, 48, 72 y 96 h de exposición, respectivamente (Publicación I). Con la exposición de *C. decemmaculatus* a Patton flow® dichas

concentraciones alcanzaron valores de CL50 equivalentes a 119; 114; 88 y 88 mg/L, para las 24, 48, 72 y 96 h, respectivamente.

Un análisis de regresión reveló que los valores de CL50 inducidos por los compuestos Panzer® ($r=-0,96$; $P<0,05$), Clorpirifos Zamba® ($r=-0,99$; $P<0,01$) y Aficida® ($r=-0,96$; $P<0,001$; Publicación I) disminuyeron en función del tiempo de exposición durante el periodo de 0 a 96 h (Tabla 2, Anexo II), pero no para los formulados Credit® ($r=-0,90$; $P>0,05$), Lorsban* 48E® ($r=-0,87$; $P>0,05$) y Patton flow® ($r=-0,92$; $P>0,05$) (Tabla 2, Anexo II).

Por otro lado, la mortalidad aumentó en función de las concentraciones de los agroquímicos ensayados en los ejemplares tratados con Panzer® ($r=0,76$; $P<0,01$), Credit® ($r=0,92$; $P<0,001$), Clorpirifos Zamba® ($r=0,81$; $P<0,01$), Aficida® ($r=0,94$; $P<0,001$) y Patton flow® ($r=0,98$; $P<0,001$) (Tabla 3, Anexo II). Dicho efecto no se observó para Lorsban* 48E® ($r=0,43$; $P>0,05$) (Tabla 3, Anexo II).

Asimismo, el análisis de la mortalidad en función del tiempo de exposición mostró una disminución significativa en los individuos expuestos sólo al insecticida Aficida® ($r=-0,99$; $P<0,01$) (Tabla 3, Anexo II). Opuestamente, se registró una disminución de la mortalidad pero no en una manera tiempo dependiente en ejemplares expuestos a Panzer® ($r=-0,77$; $P>0,05$), Credit® ($r=-0,83$; $P>0,05$), Lorsban* 48E® ($r=-0,84$; $P>0,05$), Clorpirifos Zamba® ($r=-0,78$; $P>0,05$), y Patton flow® ($r=-0,79$; $P>0,05$) (Tabla 3, Anexo II).

En el control positivo en aquellos individuos de *C. decemmaculatus*, los valores de CL50 obtenidos para Cr(VI) revelaron concentraciones de 35,1; 27,5; 24,0

y 21,4 mg/L luego de 24, 48, 72 y 96 h de exposición, respectivamente (Publicación II).

3.3. Evaluación del daño genotóxico y citotóxico inducido por los herbicidas Panzer® y Credit® en células sanguíneas de *C. decemmaculatus*

3.3.1. Ensayo de MN

Los resultados de genotoxicidad evaluada mediante el ensayo de MN en eritrocitos circulantes de *C. decemmaculatus* expuestos a 3,9; 7,8 y 11,8 mg/L de Panzer® y a 22,9; 45,9 y 68,8 mg/L de Credit® se presentan en las Figuras 1 y 2, respectivamente (Anexo II).

El análisis de la frecuencia de MN mostró un aumento significativo en los ejemplares expuestos a Panzer® sólo a las concentraciones de 3,9 y 7,8 mg/L respecto de los controles, tanto a las 48 h como a las 96 h de tratamiento ($P < 0,05$) (Figura 1, Anexo II).

Un análisis de correlación puso en evidencia que los peces expuestos a Panzer® mostraron un aumento significativo en la frecuencia de MN no dependiente de las concentraciones tanto a las 48 ($r = -0,02$; $P > 0,05$) como a las 96 h de exposición ($r = -0,23$; $P > 0,05$).

Por otro lado, una comparación entre la frecuencia total de MN inducidos por el formulado, independientemente de las concentraciones empleadas, evidenció una disminución leve y estadísticamente significativa de la frecuencia

de MN a las 96 h con respecto a los valores alcanzados a las 48 h de exposición ($r=-0,21$; $P<0,05$).

La frecuencia de MN en eritrocitos circulantes de sangre periférica de ejemplares expuestos a 5,0 mg/L de ciclofosfamida (control positivo) se vio incrementada estadísticamente sobre valores controles tanto a las 48 ($P<0,05$) como a las 96 h de exposición continua ($P<0,01$) (Figura 1, Anexo II).

En el caso de Credit® la frecuencia de MN se vio incrementada de manera significativa sólo luego de 96 h de exposición para las concentraciones de 22,9 ($P<0,01$), 45,9 mg/L ($P<0,01$) y 68,8 mg/L ($P<0,05$) (Figura 2, Anexo II).

Un análisis de correlación puso en evidencia que la frecuencia de MN inducida por Credit® a las 96 h de exposición no fue dependiente de las concentraciones empleadas ($r=0,02$; $P>0,05$).

La frecuencia de MN en eritrocitos circulantes de sangre periférica de ejemplares expuestos a 5,0 mg/L de ciclofosfamida se vio incrementada estadísticamente sobre valores controles tanto a las 48 ($P<0,01$) como a las 96 h de exposición continua ($P<0,01$) (Figura 2, Anexo II).

3.3.2. Ensayo cometa

El daño inducido en el ADN de células sanguíneas circulantes de *C. decemmaculatus* expuestos a 3,9 mg/L de Panzer® y 22,9 mg/L de Credit® y evidenciado mediante el EC se grafica en la Figura 3 (Anexo II).

En la Figura 1 se observan nucleoides con distintas categorías de daño obtenidos a partir de células sanguíneas de *C. decemmaculatus*.

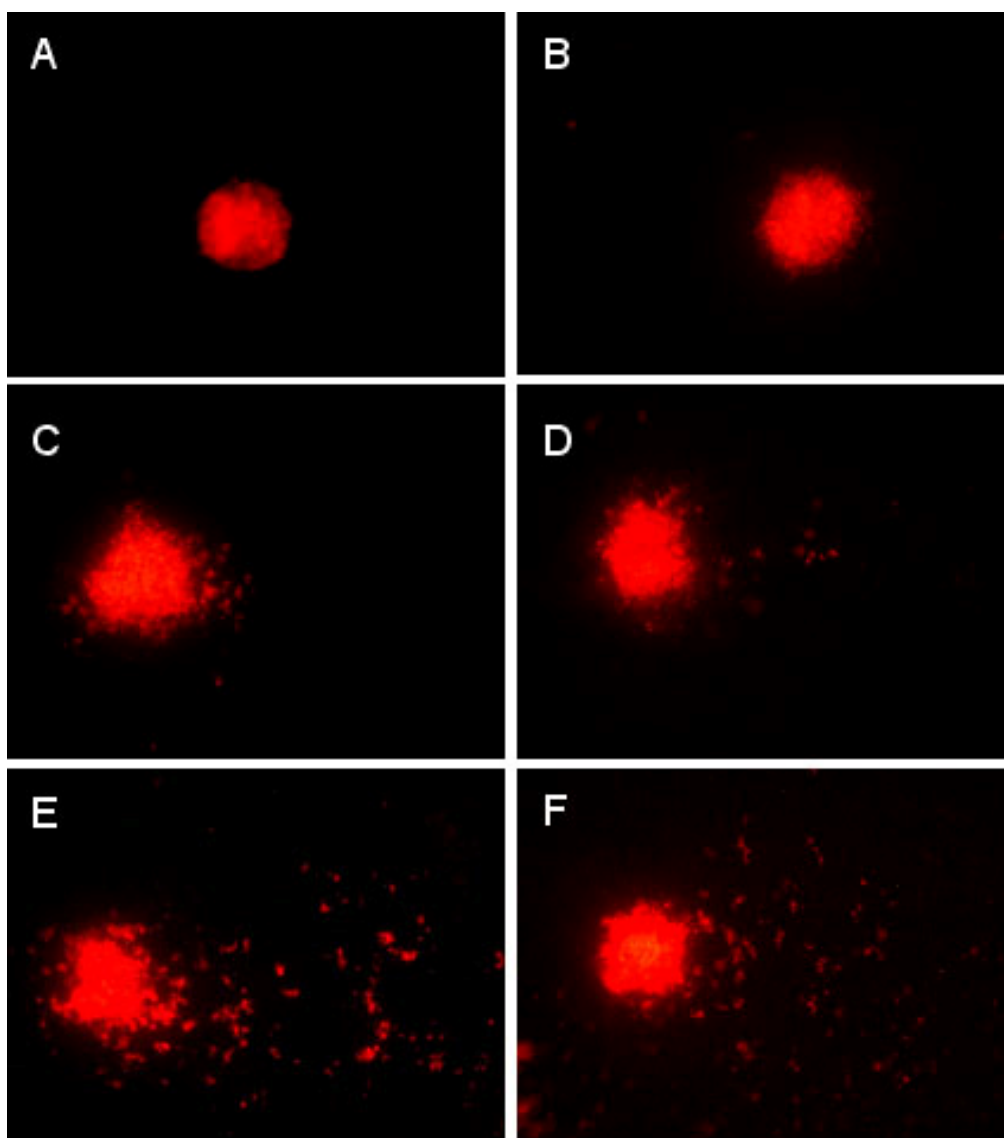


Figura 1. Clasificación de los nucleoides de células sanguíneas de *C. decemmaculatus*. (A) Clase 0; (B) clase I; (C) clase II; (D) clase III; (E-F) clase IV.

En aquellos ejemplares expuestos a Panzer® se observó una disminución de las células no dañadas ($P < 0,001$) y un aumento concomitante en la frecuencia de células dañadas ($P < 0,001$) tanto en los peces analizados a las 48 como a las 96 h de exposición en relación a los controles negativos (Figura 3, Anexo II). Dicho aumento en la frecuencia de células dañadas fue determinado por un incremento en la frecuencia de cometas clase II, III y IV para ambos tiempos de exposición

(Tabla 4, Anexo II). Asimismo, se observó un aumento en el IDG tanto en los peces analizados a las 48 ($P<0,001$) como a las 96 h de exposición ($P<0,001$) en relación a los valores de IDG de los controles negativos (Figura 3 y Tabla 7, Anexo II).

Un análisis de regresión permitió observar que la disminución del porcentaje de células dañadas en los ejemplares expuestos a Panzer® durante 48 y 96 h no fue afectada por el tiempo de tratamiento ($r=-0,33$; $P>0,05$). Finalmente, el IDG no se correlacionó con el tiempo de exposición en los peces expuestos al herbicida ($r=-0,03$; $P>0,05$).

En aquellos ejemplares expuestos a Credit® se evidenció una disminución de las células no dañadas ($P<0,001$) y un aumento concomitante en la frecuencia de células dañadas ($P<0,001$) tanto en los ejemplares tratados durante 48 y 96 h en relación a los controles negativos (Figura 3, Anexo II). Dicho incremento en la frecuencia de células dañadas fue determinado por un aumento en la frecuencia de cometas clase II, III y IV para ambos tiempos de exposición (Tabla 4, Anexo II). El IDG de los peces tratados con Credit® evidenció un aumento significativo estadísticamente respecto de los peces del control negativo a las 48 ($P<0,001$) y 96 h de tratamiento ($P<0,001$) (Figura 3 y Tabla 7, Anexo II).

Asimismo, un análisis de regresión permitió observar un incremento significativo de células dañadas al cabo de 96 h de tratamiento continuo a Credit® ($r=0,57$; $P<0,01$). Del mismo modo, dicho análisis permitió determinar que el IDG se incrementó en función del tiempo de tratamiento ($r=0,65$; $P<0,001$).

La frecuencia de células dañadas en eritrocitos circulantes de sangre periférica de ejemplares expuestos a 10,0 mg/L de ciclofosfamida se vio

incrementada estadísticamente sobre valores controles tanto a las 48 ($P < 0,001$) como a las 96 h de exposición continua ($P < 0,001$) (Figura 3, Anexo II).

3.3.3. Análisis de la proporción eritrocitos/eritroblastos

Los resultados de citotoxicidad medida como variaciones en la relación eritrocitos/eritroblastos de *C. decemmaculatus* expuestos a 3,9; 7,8 y 11,8 mg/L de Panzer® y a 22,9; 45,9 y 68,8 mg/L de Credit® se presentan en las Figuras 4 y 5 (Anexo II), respectivamente.

En aquellos ejemplares expuestos a Panzer® tanto a las 48 h como a las 96 h de tratamiento no se observaron variaciones en la relación eritrocitos/eritroblastos con respecto a valores controles negativos en ninguna de las concentraciones empleadas ($P > 0,05$) (Figura 4, Anexo II). Resultados similares fueron observados en aquellos ejemplares tratados con Credit® independientemente de la concentración y del tiempo de exposición ($P > 0,05$) (Figura 5, Anexo II).

Por otra parte, cuando los peces fueron tratados con 5,0 mg/L de ciclofosfamida fue factible observar un aumento en la frecuencia de eritroblastos y una disminución consecuente de la frecuencia de eritrocitos circulantes tanto en aquellos *C. decemmaculatus* analizados a las 48 h ($P < 0,01$) como a las 96 h de tratamiento continuo ($P < 0,001$) (Figuras 4 y 5, Anexo II).

3.3.4. Análisis comparativo de las formulaciones comerciales

Los resultados obtenidos mediante los ensayos de mortalidad, genotoxicidad y citotoxicidad realizados en ejemplares de *C. decemmaculatus*

expuestos a los herbicidas comerciales conteniendo 48% del principio activo glifosato en su composición, demostrarían una respuesta diferencial a los efectos adversos de ambas formulaciones por parte de la especie evaluada.

El formulado que indujo la mayor mortalidad a las 96 h de exposición fue Panzer®. En otras palabras, la especie en estudio *C. decemmaculatus* resultó ser más sensible en términos de mortalidad a Panzer® que a Credit®. Por otro lado, la formulación comercial capaz de ejercer un mayor daño genotóxico sería Credit® evidenciado por un mayor incremento tanto en la frecuencia de daño clastogénico/aneugénico (medido como frecuencia de MN inducidos) como a nivel del ADN celular (medido como microlesiones en la hebra de ADN mediante el EC). En cuanto a la capacidad citotóxica, ambos herbicidas se comportaron de manera similar, sin provocar modificaciones en las subpoblaciones del linaje eritrocítico circulante en los individuos expuestos..

3.4. Evaluación del daño genotóxico y citotóxico inducido por los insecticidas

Lorsban* 48E® y Clorpirifos Zamba® en células sanguíneas de *C. decemmaculatus*

3.4.1. Ensayo de MN

Las Figuras 6 y 7 (Anexo II) presentan los resultados de genotoxicidad evaluada mediante el ensayo de MN en eritrocitos circulantes de *C. decemmaculatus* expuestos a 0,008; 0,017 y 0,025 mg/L de Lorsban* 48E® y a 0,052; 0,104 y 0,155 mg/L de Clorpirifos Zamba®, respectivamente.

Luego del tratamiento con Lorsban* 48E®, un aumento significativo en la frecuencia de MN se observó en los individuos expuestos a las concentraciones de 0,008 (P<0,001), 0,017 (P<0,001) y 0,025 (P<0,001) mg/L para los dos tiempos de exposición ensayados, 48 y 96 h (Figura 6, Anexo II).

Un análisis de regresión puso en evidencia que el aumento en la frecuencia de MN observado en los peces expuestos a Lorsban* 48E® para ambos tiempos de tratamiento, 48 y 96 h, no resultó concentración dependiente ($r=-0,14$; $P>0,05$ y $r=0,12$; $P>0,05$). Por el contrario, dicho aumento se vio afectado por el tiempo de exposición ($r=0,23$; $P<0,05$).

La frecuencia de MN en eritrocitos circulantes de ejemplares expuestos a 5,0 mg/L de ciclofosfamida aumentó estadísticamente sobre valores controles tanto a las 48 (P<0,01) como a las 96 h de tratamiento (P<0,01) (Figura 6, Anexo II).

Cuando *C. decemmaculatus* fue expuesto a Clorpirifos Zamba® se observó un incremento significativo en la frecuencia de MN luego de 48 h de tratamiento con concentraciones de 0,052 (P<0,05), 0,104 (P<0,01) y 0,155 mg/L (P<0,01), así como también a las 96 h con las concentraciones de 0,052 (P<0,01), 0,104 (P<0,001) y 0,155 mg/L (P<0,001) (Figura 7, Anexo II).

Un análisis de regresión permitió observar que el aumento en la frecuencia de MN inducido por Clorpirifos Zamba® no fue afectado por las concentraciones evaluadas ($r=0,11$; $P>0,05$ y $r=0,21$; $P>0,05$, para las 48 y 96 h de tratamiento, respectivamente), como tampoco por el tiempo de exposición ($r=0,15$; $P>0,05$).

La frecuencia de MN en eritrocitos circulantes de sangre periférica de ejemplares expuestos a 5,0 mg ciclofosfamida/L se vio incrementada

estadísticamente tanto a las 48 ($P < 0,05$) como a las 96 h de exposición continua ($P < 0,05$) (Figura 7, Anexo II).

3.4.2. Ensayo cometa

La Figura 8 (Anexo II) presenta los resultados de genotoxicidad evaluada mediante el EC en células sanguíneas de *C. decemmaculatus* expuesto a 0,008 mg/L de Lorsban* 48E® y a 0,052 mg/L de Clorpirifos Zamba®.

El insecticida Lorsban* 48E® indujo daño en el ADN evidenciado mediante el EC por un incremento en la proporción de células dañadas ($P < 0,001$) y una disminución de células no dañadas ($P < 0,001$) respecto de los valores controles para ambos tiempos de exposición (Figura 8, Anexo II). El incremento en la frecuencia de cometas clase II, III y IV determinó dicho aumento en la frecuencia de células dañadas para ambos tiempos de exposición (Tabla 5, Anexo II). Por otra parte, los resultados evidenciaron un incremento significativo en el IDG de aquellos peces tratados con Lorsban* 48E® respecto de sus controles correspondientes tanto en aquellos ejemplares sacrificados a las 48 ($P < 0,001$) como a las 96 h del tratamiento inicial ($P < 0,001$) (Figura 8 y Tabla 7, Anexo II).

Al comparar la inducción de células dañadas en función del tiempo de exposición se observó una relación moderadamente fuerte y estadísticamente significativa entre las variables en estudio en los individuos expuestos a Lorsban* 48E®. Dicha asociación estuvo dada por una disminución de la población de células dañadas en los ejemplares analizados a las 96 h en relación a los estudiados

a las 48 h ($r=-0,53$; $P<0,01$). Asimismo, el IDG disminuyó significativamente con el incremento del tiempo ($r=-0,43$; $P<0,05$).

En ejemplares expuestos a Clorpirifos Zamba® se registró un marcado efecto genotóxico evidenciado mediante el EC por un incremento en la proporción de células dañadas ($P<0,001$) y una disminución de células no dañadas ($P<0,001$) en ambos tiempos de exposición (Figura 8, Anexo II). El incremento en la frecuencia de células dañadas para ambos tiempos de exposición fue determinado por el aumento de los cometas clase II, III y IV (Tabla 5, Anexo II). El IDG manifestó un incremento significativo en ejemplares expuestos a Clorpirifos Zamba® comparado con los valores de IDG de los valores control a las 48 ($P<0,001$) y 96 h de exposición ($P<0,001$) (Figura 8 y Tabla 7, Anexo II).

Tras un análisis de regresión se puso de manifiesto que el aumento en la frecuencia de células dañadas inducidas por Clorpirifos Zamba® no fue afectada por el tiempo de exposición ($r=0,06$; $P>0,05$). El IDG resultó ser una variable no dependiente del tiempo de tratamiento ($r=0,19$; $P>0,05$).

Los ejemplares expuestos a 10,0 mg/L de ciclofosfamida evidenciaron un incremento significativo de la frecuencia de células dañadas en eritrocitos circulantes de sangre periférica sobre valores controles tanto a las 48 ($P<0,001$) como a las 96 h de exposición continua ($P<0,001$) (Figura 8, Anexo II).

3.4.3. Análisis de la proporción eritrocitos/eritroblastos

Los resultados del análisis de las variaciones en la relación eritrocitos/eritroblastos de *C. decemmaculatus* expuestos a 0,008; 0,017 y 0,025

mg/L de Lorsban* 48E® y a 0,052; 0,104 y 0,155 mg/L de Clorpirifos Zamba®, se presentan en las Figuras 9 y 10 (Anexo II), respectivamente.

Cuando los ejemplares fueron expuestos a Lorsban* 48E® durante 48 h, se observó una disminución significativa de la frecuencia de eritrocitos y un aumento significativo en la de eritroblastos de los ejemplares expuestos a las concentraciones de 0,017 (P<0,05) y 0,025 mg/L (P<0,05). Cuando el ensayo se extendió hasta las 96 h de tratamiento, la disminución de eritrocitos y el aumento consecuente de eritroblastos fue observado a las concentraciones de 0,008 mg/L (P<0,05) y 0,017 mg/L (P<0,01) (Figura 9, Anexo II).

Un análisis de regresión evidenció que las variaciones en la relación eritrocitos/eritroblastos no fueron dependientes de las concentraciones ensayadas con Lorsban* 48E® para ambos tiempos de exposición ($r=-0,24$; $P>0,05$ y $r=0,04$; $P>0,05$, para las 48 y 96 h, respectivamente). Por el contrario, cuando esta variación se evaluó en función del tiempo de exposición e independientemente de las concentraciones ensayadas, se registró un aumento en la frecuencia de eritrocitos ($r=0,30$; $P<0,01$) y una disminución en la frecuencia de eritroblastos ($r=-0,30$; $P<0,01$) dependiente del tiempo de exposición.

Los resultados de los tratamientos con Clorpirifos Zamba® mostraron una disminución en la frecuencia de eritrocitos y un aumento en la frecuencia de eritroblastos para las tres concentraciones ensayadas 0,052 (P<0,001), 0,104 (P<0,001) y 0,155 (P<0,001) mg/L tras 48 h de tratamiento. Luego de 96 h de exposición la disminución en la frecuencia de eritrocitos y el aumento en la

frecuencia de eritroblastos fue significativo para 0,052 ($P < 0,05$), 0,104 ($P < 0,01$) y 0,155 mg/L ($P < 0,05$) (Figura 10, Anexo II).

Un análisis de regresión entre las variaciones en la proporción eritrocitos/eritroblastos y las concentraciones ensayadas de Clorpirifos Zamba® demostró una ausencia de asociación estadística tanto a las 48 como a las 96 h de exposición ($P > 0,05$). Sin embargo, cuando dicha variación se analizó en función del tiempo se evidenció un aumento progresivo de células eritrocíticas ($r = 0,47$; $P < 0,001$) y una disminución de células eritroblásticas ($r = -0,47$; $P < 0,001$) en ejemplares analizados a las 96 h respecto de aquellos analizados a las 48 h.

Por otra parte, cuando los peces fueron tratados con 5,0 mg/L de ciclofosfamida fue factible observar un aumento en la frecuencia de eritroblastos y una disminución consecuente de la frecuencia de eritrocitos circulantes tanto en aquellos *C. decemmaculatus* analizados a las 48 h ($P < 0,01$) como a las 96 h de tratamiento continuo ($P < 0,001$) (Figuras 9 y 10, Anexo II).

3.4.4. Análisis comparativo de las formulaciones comerciales

Los resultados obtenidos mediante los ensayos de mortalidad, genotoxicidad y citotoxicidad realizados en ejemplares de *C. decemmaculatus* expuestos a los insecticidas comerciales conteniendo 48% del principio activo clorpirifos en su composición, demostrarían una respuesta diferencial a los efectos adversos de ambas formulaciones ensayadas por parte de la “madrecita de agua”.

Los resultados ponen de manifiesto que el formulado que indujo la mayor mortalidad a las 96 h de exposición fue Lorsban* 48E®, por lo cual se podría

afirmar que *C. decemmaculatus* resultó ser más sensible en términos de mortalidad a Lorsban* 48E® que a Clorpirifos Zamba®. De manera semejante, el insecticida Lorsban* 48E® resultó ser también el compuesto más genotóxico evidenciado por un mayor incremento tanto en la frecuencia de daño clastogénico/aneugénico (medido como frecuencia de MN inducidos) como a nivel del ADN celular (medido como rupturas en la hebra de ADN mediante el EC) que aquel mostrado por Clorpirifos Zamba®. Finalmente, el formulado que indujo un mayor efecto citotóxico por su capacidad de alterar la relación eritrocitos/eritroblastos circulantes en los individuos expuestos fue Lorsban* 48E®.

3.5. Evaluación del daño genotóxico y citotóxico de Aficida® y Patton flow® en células sanguíneas de *C. decemmaculatus*

3.5.1. Ensayo de MN

Los resultados de genotoxicidad evaluada mediante el ensayo de MN en eritrocitos circulantes de *C. decemmaculatus* expuestos a 25,0; 37,5; 50,0 y 78,5 mg/L de Aficida® y a 22,0; 43,9 y 65,9 mg/L de Patton flow® se presentan en las Figuras 11 y 12 (Anexo II), respectivamente.

En los peces tratados con Aficida® luego de 48 h de exposición se observó un aumento significativo en la frecuencia de MN cuando los ejemplares fueron expuestos a las concentraciones de 25,0 ($P < 0,001$), 37,5 ($P < 0,001$) y 78,5 mg/L ($P < 0,05$) comparado con sus respectivos valores controles (Figura 1A, Publicación I; Figura 11, Anexo II). En los peces expuestos a 50,0 mg/L no se registró un

aumento en la frecuencia de MN ($P > 0,05$). A las 96 h de tratamiento, las concentraciones de 25,0, 37,5 y 50,0 mg/L indujeron un aumento significativo de la frecuencia de MN comparado con los valores controles ($P < 0,01$, $P < 0,05$ y $P < 0,001$, respectivamente) (Figura 1B, Publicación I; Figura 11, Anexo II).

Un análisis de correlación puso en evidencia que los peces expuestos a Aficida® mostraron una disminución significativa en la frecuencia de MN en función de las concentraciones a las 48 h de exposición ($r = -0,76$; $P < 0,01$) pero no transcurridas 96 h de ensayo ($r = 0,51$; $P > 0,05$).

Los peces expuestos a 5,0 mg/L de ciclofosfamida evidenciaron un aumento significativo en la frecuencia de MN sobre valores controles tanto a las 48 ($P < 0,01$) como a las 96 h de exposición continua ($P < 0,05$) (Figuras 1A y 1B, Publicación I; Figura 11, Anexo II).

Cuando los ensayos se realizaron con Patton flow® luego de 48 h de exposición se observó un aumento significativo de la frecuencia de MN en los individuos expuestos solamente a la máxima concentración de 65,9 mg/L ($P < 0,05$). Transcurridas las 96 h de tratamiento se observó un aumento significativo de la frecuencia de MN para las tres concentraciones evaluadas de 22,0 ($P < 0,01$), 43,9 ($P < 0,001$) y 65,9 mg/L ($P < 0,001$) (Figura 12, Anexo II).

La inducción de MN ejercida por Patton flow® no se vio afectada por las concentraciones ensayadas luego de 48 h de tratamiento ($r = 0,19$; $P > 0,05$). Opuestamente, luego de 96 h de exposición se registró un aumento en la frecuencia de MN en una manera concentración dependiente ($r = 0,44$; $P < 0,001$). Cuando se evaluó la inducción de MN en función del tiempo de tratamiento e

independientemente de las concentraciones ensayadas del insecticida, se observó que dicho aumento fue afectado por el tiempo ($r=0,20$; $P<0,01$).

La inducción de MN en *C. decemmaculatus* expuestos a 5,0 mg/L de ciclofosfamida se vio incrementada estadísticamente sobre valores controles tanto a las 48 ($P<0,05$) como a las 96 h de exposición continua ($P<0,05$) (Figura 12, Anexo II).

3.5.2. Ensayo cometa

El daño inducido en el ADN de células sanguíneas de *C. decemmaculatus* expuestos a 25,0 mg/L de Aficida® y a 22,0 mg/L de Patton flow® evidenciado por el EC se grafica en la Figura 13 (Anexo II).

En los ejemplares expuestos a Aficida® se observó una disminución de células no dañadas ($P<0,001$) y un aumento de células dañadas ($P<0,001$) tanto a las 48 como a las 96 h de exposición en relación a los valores controles (Figura 13, Anexo II). El incremento de las células dañadas fue determinado por un aumento en cometas clase II, III y IV para ambos tiempos de exposición (Tabla 6, Anexo II). Del mismo modo, el IDG inducido por Aficida® experimentó un aumento significativo en ambos tiempos de exposición ($P<0,001$) (Figura 13 y Tabla 7, Anexo II).

Los tratamientos realizados con Aficida® indujeron una marcada y significativa disminución en la frecuencia de células dañadas en función del tiempo de exposición ($r=-0,73$; $P<0,001$). Un análisis de regresión reveló que el IDG fue tiempo dependiente ($r=-0,61$; $P<0,01$).

En ejemplares expuestos a Patton flow[®], el EC reveló un claro y significativo efecto genotóxico dado por un incremento en la proporción de células dañadas ($P < 0,001$), determinado por un aumento de cometas clase II, III y IV (Tabla 6, Anexo II) y una disminución en la proporción de células no dañadas ($P < 0,001$) respecto de los valores controles (Figura 13, Anexo II) tanto a las 48 como a las 96 h de tratamiento. El aumento del IDG en ejemplares tratados con Patton flow[®] respecto de ejemplares control fue significativo estadísticamente a las 48 ($P < 0,001$) y 96 h de tratamiento ($P < 0,001$) (Figura 13 y Tabla 7, Anexo II).

Un análisis de regresión reveló que el aumento en la frecuencia de células dañadas inducido por Patton flow[®] no fue dependiente del tiempo de exposición ($r = 0,31$; $P > 0,05$). De manera contraria, el IDG resultó tiempo dependiente ($r = 0,39$; $P < 0,05$).

Los ejemplares tratados con 10,0 mg/L de ciclofosfamida evidenciaron un incremento significativo en la frecuencia de células dañadas a las 48 ($P < 0,001$) y 96 h de exposición ($P < 0,001$) (Figura 13, Anexo II).

3.5.3. Análisis de la proporción eritrocitos/eritroblastos

Los resultados del análisis de la variación en la relación eritrocitos/eritroblastos en ejemplares expuestos a 25,0; 37,5; 50,0 y 78,5 mg/L de Aficida[®] y a 22,0; 43,9 y 65,9 mg/L de Patton flow[®] durante 48 y 96 h de exposición se observan en la Figura 2 (Publicación I) y en la Figura 14 (Anexo II), respectivamente.

Cuando *C. decemmaculatus* fue expuesto a Aficida® se observó una disminución significativa en la frecuencia de eritrocitos y un aumento relacionado de eritroblastos en el rango de concentraciones de 25,0 a 78,5 mg/L luego de 48 h de exposición (25,0; 37,5 y 78,5 mg/L; $P < 0,05$ y 50,0 mg/L; $P < 0,001$). Cuando el análisis se realizó a las 96 h de tratamiento se observó una alteración significativa en la relación eritrocitos/eritroblastos sólo en las mayores concentraciones evaluadas de 50,0 y 78,5 mg/L ($P < 0,01$) (Figura 2, Publicación I).

Un análisis de regresión reveló que la disminución en la frecuencia de eritrocitos seguida de un aumento en la frecuencia de eritroblastos varió en función de las concentraciones del insecticida empleadas tanto en los peces expuestos a las 48 ($r = 0,86$; $P < 0,05$) como en aquellos luego de 96 h de exposición ($r = 0,85$; $P < 0,05$) (Figura 2, Publicación I).

Por otra parte, cuando los peces fueron tratados con 5,0 mg/L de ciclofosfamida fue factible observar un aumento en la frecuencia de eritroblastos y una disminución consecuente de la frecuencia de eritrocitos circulantes tanto en aquellos *C. decemmaculatus* analizados a las 48 h ($P < 0,05$) como a las 96 h de tratamiento continuo ($P < 0,001$) (Figura 2, Publicación I).

La exposición continua de peces a Patton flow® indujo un efecto citotóxico evidenciado por una disminución de células eritrocíticas y un concomitante aumento en la frecuencia de células eritroblásticas a las 48 h para las concentraciones de 22,0 ($P < 0,001$), 43,9 ($P < 0,05$) y 65,9 mg/L ($P < 0,01$). Resultados similares fueron observados cuando el análisis se llevo a cabo luego de 96 h de

exposición para las dosis de 22,0 (P<0,01), 43,9 (P<0,01) y 65,9 mg/L (P<0,001) (Figura 14, Anexo II).

Un análisis de regresión reveló que el efecto citotóxico ejercido por Patton flow® no fue dependiente de las concentraciones de ensayo a las 48 como tampoco a las 96 h de tratamiento (P>0,05). Asimismo, dicho efecto tampoco fue dependiente del tiempo de exposición (r=-0,09; P>0,05).

Por otra parte, cuando los peces fueron tratados con 5,0 mg/L de ciclofosfamida fue factible observar un aumento en la frecuencia de eritroblastos y una disminución consecuente de la frecuencia de eritrocitos circulantes tanto en aquellos *C. decemmaculatus* analizados a las 48 h (P<0,01) como a las 96 h de tratamiento continuo (P<0,001) (Figura 14, Anexo II).

3.5.4. Análisis comparativo de las formulaciones comerciales

Los resultados obtenidos mediante los ensayos de mortalidad, genotoxicidad y citotoxicidad realizados en ejemplares de *C. decemmaculatus* expuestos a los insecticidas comerciales conteniendo 50% del principio activo pirimicarb en su composición, demostrarían una respuesta diferencial a los efectos adversos de ambas formulaciones por parte del pequeño poecílido.

Patton flow® resultó ser el formulado que produjo la mayor mortalidad luego de los ensayos de toxicidad aguda a las 96 h de exposición. De esta manera, *C. decemmaculatus* sería más sensible en términos de mortalidad a Patton flow® que a Aficida®. De manera contraria, el insecticida Aficida® sería el formulado comercial capaz de inducir mayor daño genotóxico evidenciado por un mayor

incremento en la frecuencia de daño clastogénico/aneugénico medido como frecuencia de MN inducidos. Cuando se evaluó la capacidad genotóxica como microlesiones en la hebra de ADN mediante el EC, Patton flow® resultó ser más efectivo que Aficida®. Opuestamente, Aficida® podría ejercer un efecto citotóxico mayor que Patton flow® debido a su mayor capacidad de alterar significativamente la relación eritrocitos/eritroblastos en los ejemplares expuestos.

4. DISCUSIÓN

Las investigaciones llevadas a cabo durante el desarrollo de la presente Tesis Doctoral aportan información sobre los efectos deletéreos ejercidos por diferentes plaguicidas utilizados en la agricultura argentina, como son los herbicidas a base de glifosato Panzer® y Credit®, los insecticidas conteniendo clorpirifos en su composición Lorsban* 48E® y Clorpirifos Zamba® y los insecticidas a base de pirimicarb Aficida® y Patton flow®. Dichos efectos fueron evaluados mediante ensayos de letalidad, de genotoxicidad y de citotoxicidad en ejemplares de *C. decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae) expuestos en condiciones experimentales de laboratorio. Dentro de los bioensayos utilizados, el estimador de letalidad empleado fue la determinación de la CL50. Asimismo, como estimadores de genotoxicidad se utilizaron el análisis de la frecuencia de MN en eritrocitos circulantes y el ensayo de electroforesis en células únicas o EC en células sanguíneas. Como estimador de citotoxicidad se empleó el análisis de variaciones poblacionales de células circulantes sanguíneas estimadas mediante proporción eritrocitos/eritroblastos.

Los resultados de los estudios destinados a evaluar los efectos letales ejercidos por los herbicidas Panzer® y Credit® mediante la estimación de la CL50 revelaron que el formulado que indujo la mayor mortalidad a las 96 h de exposición fue Panzer®. En otras palabras, la especie en estudio *C. decemmaculatus* resultó ser más sensible en términos de mortalidad a Panzer® que a Credit®. De manera similar, cuando se evaluaron los efectos letales de los formulados conteniendo clorpirifos en su composición, el compuesto que indujo la mayor

mortalidad a las 96 h de exposición, demostrado por el menor valor de CL50-96 h estimado, fue Lorsban* 48E® respecto de Clorpirifos Zamba®. Esto pone en evidencia que *C. decemmaculatus* resultó ser más sensible en términos de mortalidad a Lorsban* 48E® que a Clorpirifos Zamba®. Finalmente, cuando los ensayos se realizaron con las formulaciones comerciales conteniendo pirimicarb en su composición, nuestros estudios revelaron que Patton flow® indujo una mayor mortalidad que Aficida® evidenciada por el menor valor de CL50-96 h estimado. La especie en estudio, *C. decemmaculatus* resultó ser más sensible en términos de mortalidad a Patton flow® que a Aficida®.

Los resultados del análisis de genotoxicidad estimada mediante el ensayo de MN en eritrocitos circulantes y el daño en el ADN de células sanguíneas estimado por el EC demostraron un marcado efecto genotóxico ejercido tanto por Panzer® como por Credit®. En los ejemplares de *C. decemmaculatus* expuestos a ambos herbicidas se observó un aumento significativo en la frecuencia de MN y de la frecuencia de células dañadas respecto de los valores controles. Por el contrario, los estudios destinados a evaluar la capacidad citotóxica de estos herbicidas revelaron que ninguno de los dos compuestos fueron capaces de inducir variaciones en la proporción eritrocitos/eritroblastos respecto de los valores controles.

Los efectos genotóxicos ejercidos por los insecticidas Lorsban* 48E® y Clorpirifos Zamba® evaluados mediante los ensayos de MN y el EC mostraron un aumento significativo en la frecuencia tanto de MN como de células dañadas comparados con los valores controles. Asimismo, los efectos citotóxicos ejercidos

por los plaguicidas Lorsban* 48E® y Clorpirifos Zamba®, cuantificados mediante el análisis de la variación de la proporción eritrocitos/eritroblastos pusieron de manifiesto que ambos formulados comerciales ejercieron un marcado efecto citotóxico reflejado en el aumento significativo de la frecuencia de eritroblastos y la disminución de la frecuencia de eritrocitos respecto de los valores controles.

Los estudios concernientes a evaluar la genotoxicidad de los insecticidas Aficida® y Patton flow® demostraron que estos formulados incrementaron significativamente tanto la frecuencia de MN como el número de células dañadas respecto de los valores controles. De manera similar, estos plaguicidas conteniendo pirimicarb en su composición revelaron una marcada capacidad citotóxica manifestada por un aumento significativo de la proporción de eritroblastos respecto de la proporción de eritrocitos en relación a los valores controles.

4.1. Evaluación de los efectos letales

Es ampliamente conocido que un ensayo de toxicidad aguda tiene por objetivo proporcionar información acerca de los efectos a corto plazo sobre organismos prueba expuestos a un compuesto, e identificar y comparar la sensibilidad diferencial entre especies (USEPA, 1975; ASTM, 1996; Klaassen, 2008) al igual que proporcionar antecedentes que faciliten el diseño y selección de la/s dosis de un compuesto a ser empleadas en estudios posteriores (Klaassen, 2008). Los resultados de las pruebas de toxicidad aguda son una consideración importante en la evaluación de los riesgos potenciales que los organismos pueden

presentar frente a la exposición a un determinado agente (ASTM, 1996). En términos generales, un ensayo de toxicidad aguda consiste en exponer un grupo de individuos a diversas concentraciones de un xenobiótico donde la variable más comúnmente evaluada es la mortalidad, aunque algunos efectos subletales pueden ser también estimados (ASTM, 1996; Klaassen, 2008). La mortalidad puede ser expresada como la CL50, concentración de una sustancia en el aire o el agua que produce la muerte del 50% de la población bajo ensayo (USEPA, 1975; ASTM, 1996; Ali y col., 2008b; Klaassen, 2008; Kreutz y col., 2008).

Como lo hemos mencionado anteriormente, los efectos letales ejercidos por los herbicidas Panzer® y Credit® permitieron determinar que Panzer® fue más tóxico que Credit®. Nuestros resultados permitieron determinar valores de 15,7 y 91,7 mg/L como las CL50-96 h para Panzer® y Credit®, respectivamente. De esta forma, cuando se expusieron ejemplares de la especie en estudio durante 96 h de tratamiento al herbicida Panzer® fue suficiente una concentración casi 6 veces menor que la empleada con Credit® para lograr el mismo efecto letal. Cuando el objetivo fue identificar y comparar la sensibilidad de la especie en estudio frente a ambos formulados según lo propuesto por otros autores (USEPA, 1975; ASTM, 1996; Klaassen, 2008), se pudo demostrar que *C. decemmaculatus* resultó ser más sensible en términos de mortalidad a Panzer® que a Credit®. Si bien las formulaciones comerciales evaluadas poseen el mismo porcentaje de principio activo en su composición (48% glifosato), los resultados de los ensayos de mortalidad permitieron identificar una mayor toxicidad de Panzer® en comparación con Credit®.

Es conocido que las formulaciones comerciales de los plaguicidas contienen además del principio activo otros componentes que actúan como coadyuvantes, disolventes, emulsionantes, tensoactivos y/o conservantes (Beggel *y col.*, 2010) y que generalmente son de naturaleza desconocida para el consumidor (USEPA, 2007). Mas que numerosos son los estudios que demuestran que los excipientes presentes en las formulaciones comerciales pueden aumentar la toxicidad del formulado (Soloneski *y col.*, 2001, 2008; Skandrani *y col.*, 2006; Zeljezic *y col.*, 2006; González *y col.*, 2007;; Pereira *y col.*, 2009; Beggel *y col.*, 2010; Molinari *y col.*, 2010; Soloneski y Larramendy, 2010). Asimismo, se conoce que dichos componentes presentes en las formulaciones comerciales pueden ejercer un efecto aditivo o un efecto sinérgico con el principio activo (Klaassen, 2008). Cabe aclarar que el efecto aditivo es el que ocurre con mayor frecuencia entre dos compuestos químicos y sucede cuando el efecto combinado de dos compuestos es igual a la suma de los efectos que ambos compuestos producirían por separado. Por otro lado, un efecto sinérgico ocurre cuando el efecto combinado de dos compuestos resulta mucho mayor que la suma de los efectos que cada uno podría ejercer por sí solo (Klaassen, 2008).

En función de lo previamente expuesto, no podríamos descartar la posibilidad de que la mayor toxicidad ejercida por Panzer® pudiera deberse a los componentes inertes y/o coadyuvantes presentes en la formulación comercial. Otros autores han visto aumentada la toxicidad intrínseca del principio activo glifosato en las formulaciones comerciales donde este está presente (WHO, 1994; Tsui y Chu, 2003; Pereira *y col.*, 2009; USEPA, 2009) o bien, causando efectos

tóxicos por sí mismos como es el caso del surfactante POEA presente en la formulación Roundup® (Giesy y col., 2000; Tsui y Chu, 2003). Así como se ha demostrado que el POEA posee una mayor toxicidad que el glifosato puro en peces (Folmar y col., 1979; Giesy y col., 2000), no se podría descartar la posibilidad de que los excipientes, teóricamente inertes, presentes en Panzer® estuvieran ejerciendo un efecto tóxico por sí mismos en *C. decemmaculatus*, o bien, que mostrarán un efecto aditivo o sinérgico con el principio activo glifosato, haciendo de Panzer® una formulación con mayor toxicidad que Credit®.

Considerando los valores de CL50-96 h obtenidos para Panzer® y Credit® en el presente trabajo de Tesis Doctoral y de acuerdo a las categorías de toxicidad propuestas por organismos reguladores como la OECD y la UN, ambos formulados podrían considerarse compuestos “perjudiciales” (Mazzatorta y col., 2002) y “categoría 3” de riesgo (UN, 2011) para *C. decemmaculatus*.

La bibliografía existente sobre los valores de CL50-96 h para diferentes especies de peces expuestos a glifosato puro y a distintas formulaciones comerciales se resume en la Tabla 1.

Tabla 1. Toxicidad aguda (CL50-96 h; mg/L) para diferentes especies de peces expuestos a glifosato puro y a distintas formulaciones comerciales conteniendo glifosato

Especie	CL50-96 h (mg/L)	Referencias
<i>R. quelen</i>	7,3 (glifosato)	(Kreutz y col., 2008)
<i>O. mykiss</i>	74,9 (glifosato)	(USEPA, 2004)
<i>C. decemmaculatus</i>	107,9 (glifosato)	(Di Marzio, 1999)
<i>O. mykiss</i>	140-240 (glifosato)	(Giesy y col., 2000)
<i>O. bonariensis</i>	147,5 (glifosato)	(Carriquiriborde y Ronco, 2006)
<i>C. carpio</i>	315,5 (glifosato)	(Orme y Kegley, 2004)
<i>C. carpio</i>	620 (glifosato)	(Neskovic y col., 1996)
<i>C. decemmaculatus</i>	0,8 (Roundup® SE)	(Di Marzio, 1999)
<i>C. decemmaculatus</i>	5,4 (Potro® SE)	(Di Marzio, 1999)
<i>O. mykiss</i>	8,2-27 (Roundup® SE)	(Giesy y col., 2000)
<i>P. lineatus</i>	13,7 (Roundup®; 41% p.a.)	(Langiano y Martinez, 2008)
<i>C. decemmaculatus</i>	15,7 (Panzer®; 48% p.a.)	Presente trabajo
<i>O. niloticus</i>	16,8 (Roundup®)	(Jiraungkoorskul y col., 2002)
<i>Gambusia yucatanana</i>	17,79 (Rival®; 74% p.a.)	(Rendón-von Osten y col., 2005)
<i>O. mykiss</i>	28 (Roundup® SE)	(Servizi y col., 1987)
<i>Salmo salar</i>	42 (Roundup® SE)	(Servizi y col., 1987)
<i>C. decemmaculatus</i>	91,7 (Credit®; 48% p. a.)	Presente trabajo

SE: sin especificar nombre del formulado y/o % de p.a.

Al comparar los valores de CL50-96 h obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral para *C. decemmaculatus* expuesto a Panzer® y Credit®, con el valor de CL50-96 h para la misma especie expuesta a glifosato puro obtenida por Di Marzio (1999) en su trabajo inédito de Tesis Doctoral sería factible observar que ambos formulados ejercieron un efecto letal mayor que el ejercido por el principio activo puro, coincidiendo con lo publicado por otros autores para otras especies de peces (Folmar y col., 1979; Neskovic y col., 1996; Jiraungkoorskul y col., 2002; Cavas, 2011).

Cuando se compararon los valores de CL50-96 h obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral para *C. decemmaculatus* expuestos a Panzer® con el valor obtenido de CL50-96 h para otras especies de peces expuestas a glifosato puro, fue factible observar que este herbicida ejerció una toxicidad mayor sobre *C. decemmaculatus* que el principio activo sobre las especies *O. mykiss* (Giesy y col., 2000; USEPA, 2004), *O. bonariensis* (Carrquiriborde y Ronco, 2006) y *C. carpio* (Neskovic y col., 1996; Orme y Kegley, 2004) pero no cuando se expusieron ejemplares de *R. quelen* (Kreutz y col., 2008). Asimismo, al comparar los valores de CL50-96 h obtenidos con Credit®, se demostró que este herbicida ejerció una toxicidad mayor sobre *C. decemmaculatus* que el principio activo sobre las especies *O. mykiss* (Giesy y col., 2000), *O. bonariensis* (Carrquiriborde y Ronco, 2006) y *C. carpio* (Neskovic y col., 1996; Orme y Kegley, 2004) pero no cuando se expusieron ejemplares de *R. quelen* (Kreutz y col., 2008) y *O. mykiss* (USEPA, 2004)

Al comparar los valores de CL50-96 h obtenidos en nuestro trabajo de Tesis Doctoral en *C. decemmaculatus* expuestos a Panzer® y Credit® con aquellos obtenidos por Di Marzio (1999) para la misma especie expuesta a las formulaciones Roundup® y Potro®, se podría afirmar que los formulados que indujeron la mayor mortalidad a las 96 h de exposición fueron Roundup® y Potro® debido a los valores menores de CL50-96 h registrados para la especie en estudio. En otras palabras, *C. decemmaculatus* resultó ser más sensible en términos de mortalidad a Roundup® (CL50-96 h: 0,8 mg/L) y Potro® (CL50-96 h: 5,4 mg/L) que a Panzer® (CL50-96 h: 15,7 mg/L) y Credit® (CL50-96 h: 91,7 mg/L).

Por otro lado, al comparar los valores de CL50-96 h obtenidos para otras especies de peces expuestas a diferentes formulaciones herbicidas conteniendo glifosato en su composición y las obtenidas en el presente trabajo para *C. decemmaculatus* expuestos a Panzer[®], este pequeño poecílido podría considerarse una especie con una sensibilidad media ubicándose por encima de la especie más sensible, *O. mykiss* con una CL50-96 h mínima de 8,2 mg/L para Roundup[®] (Giesy y col., 2000). No obstante, si se compara la CL50-96 h obtenida con Credit[®] y las presentes en la bibliografía, *C. decemmaculatus* podría considerarse la especie menos sensible (o más tolerante) a los formulados comerciales conteniendo glifosato estudiados hasta el momento, con un valor de 91,73 mg/L. En síntesis, Panzer[®] estaría ejerciendo un efecto tóxico similar a otras formulaciones comerciales conteniendo glifosato en su composición, mientras que Credit[®], estaría ejerciendo un efecto tóxico en términos de mortalidad, mucho menor a todas aquellas conocidas hasta el presente para otras formulaciones comerciales a base de glifosato, como por ejemplo Roundup[®].

Los resultados de los ensayos destinados a evaluar los efectos letales de los insecticidas Lorsban* 48E[®] y Clorpirifos Zamba[®] mostraron que, en términos generales, Lorsban* 48E[®] fue más tóxico para *C. decemmaculatus* que Clorpirifos Zamba[®] debido a que valores de 0,03 y 0,21 mg/L fueron determinados para dichas formulaciones, respectivamente. De esta manera, cuando se expusieron ejemplares de la especie en estudio durante 96 h de tratamiento al insecticida Lorsban* 48E[®] fue suficiente una concentración 7 veces menor que la empleada con Clorpirifos Zamba[®] para lograr la misma letalidad. Si bien ambas

formulaciones comerciales poseen el mismo porcentaje de principio activo en su composición (48% clorpirifos), los resultados de los ensayos de mortalidad permitieron identificar un mayor efecto tóxico de Lorsban* 48E[®] respecto de Clorpirifos Zamba[®]. En función de lo expuesto en párrafos anteriores y en coincidencia con otros autores (Skandrani *y col.*, 2006), no podría descartarse la posibilidad de que la mayor mortalidad ejercida por Lorsban* 48E[®] sobre *C. decemmaculatus* pudiera deberse al solvente y/o a los emulsionantes presentes en dicha formulación. En este sentido, el solvente xileno -parte integrante del formulado Lorsban* 48E[®]- podría estar ejerciendo un efecto tóxico por sí mismo o bien, un efecto aditivo o sinérgico con el principio activo clorpirifos, resultando un formulado más tóxico que Clorpirifos Zamba[®].

Teniendo en cuenta los valores de CL50-96 h obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral para las formulaciones comerciales Lorsban* 48E[®] y Clorpirifos Zamba[®], ambos insecticidas serían compuestos considerados “muy tóxicos” según la OECD (Mazzatorta *y col.*, 2002) y “categoría 1” según la UN (2011) para *C. decemmaculatus*.

Los resultados presentes en la bibliografía sobre los valores de CL50-96 h para diferentes especies de peces expuestos a clorpirifos puro y a distintas formulaciones comerciales se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Toxicidad aguda (CL50-96 h; mg/L) para diferentes especies de peces expuestos a clorpirifos puro y a distintas formulaciones comerciales conteniendo clorpirifos

Especie	CL50-96 h (mg/L)	Referencias
<i>L. macrochirus</i>	0,002 (clorpirifos)	(USEPA, 2006)
<i>C. decemmaculatus</i>	0,004 (clorpirifos)	(Di Marzio, 1999)
<i>C. carpio</i>	0,16 (clorpirifos)	(Ramesh y David, 2009)
<i>G. affinis</i>	0,59 (clorpirifos)	(USEPA, 2006)
<i>P. reticulata</i>	1,79 (clorpirifos metil)	(Selvi y col., 2005)
<i>C. decemmaculatus</i>	0,003 (Formulado 15% p.a.)	(Di Marzio, 1999)
<i>G. yucatanana</i>	0,01 (Lorsban 480EM; 48% p.a.)	(Rendón-von Osten y col., 2005)
<i>O. mykiss</i>	0,01 (Formulado SE)	(USEPA, 2000)
<i>C. decemmaculatus</i>	0,03 (Lorsban* 48E®; 48% p.a.)	Presente trabajo
<i>P. reticulata</i>	0,18 (Terrashield 50 TC SE)	(Sharbidre y col., 2011)
<i>C. decemmaculatus</i>	0,21 (Clorpirifos Zamba®; 48% p.a.)	Presente trabajo
<i>C. punctatus</i>	0,81 (Tricel®; 20% p.a.)	(Ali y col., 2008b)
<i>L. macrochirus</i>	0,88 (Formulado SE)	(USEPA, 2000)

SE: sin especificar nombre del formulado y/o % de p.a.

Al comparar los valores de CL50-96 h obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral para *C. decemmaculatus* expuesto a Lorsban* 48E® y Clorpirifos Zamba®, con el valor de CL50-96 h para la misma especie expuesta a clorpirifos puro hallada por Di Marzio (1999) en su trabajo de Tesis Doctoral, sería factible observar que ambos formulados ejercieron una menor mortalidad que la provocada por el principio activo puro. Resultados similares fueron observados cuando se compararon los valores de CL50-96 h obtenidos para las formulaciones comerciales en nuestro trabajo de Tesis Doctoral con el valor obtenido por Di Marzio (1999) para *C. decemmaculatus* expuesta a una formulación comercial de clorpirifos (15% p.a.).

En este sentido, se podría afirmar que el formulado evaluado por Di Marzio (1999) indujo una mayor mortalidad a las 96 h de exposición respecto del mismo efecto observado con Lorsban* 48E® y Clorpirifos Zamba®, debido al menor valor de CL50-96 h registrado por dicho autor.

Al comparar los valores de CL50-96 h obtenidos en nuestras investigaciones para *C. decemmaculatus* expuesto a Lorsban* 48E® con el valor de CL50-96 h para otras especies de peces expuestas a clorpirifos puro, fue factible observar que la formulación comercial del insecticida ejerció una toxicidad mayor sobre *C. decemmaculatus* que el principio activo sobre las especies *C. carpio* (Ramesh y David, 2009), *G. affinis* (USEPA, 2006) y *P. reticulata* (Selvi y col., 2005) pero no cuando el ensayo se realizó con la especie *L. macrochirus* (USEPA, 2006). Asimismo, al comparar los valores de CL50-96 h obtenidos con Clorpirifos Zamba®, se demostró que este insecticida ejerció una toxicidad mayor sobre *C. decemmaculatus* que el principio activo clorpirifos sobre las especies *G. affinis* (USEPA, 2006) y *P. reticulata* (Selvi y col., 2005) pero no cuando el ensayo se realizó con *L. macrochirus* (USEPA, 2006) y *C. carpio* (Ramesh y David, 2009).

Cabe mencionar que al comparar los valores de CL50-96 h obtenidos para otras especies de peces expuestas a diferentes formulaciones insecticidas conteniendo clorpirifos en su composición y las obtenidas en el presente trabajo de Tesis Doctoral para *C. decemmaculatus* expuestos a Lorsban* 48E®, esta especie podría considerarse con una sensibilidad media ubicándose por encima de *G. yucatanana* y *O. mykiss*, especies caracterizadas por presentar una CL50-96 h menor, registrando valores de 0,01 mg/L (USEPA, 2000; Rendón-von Osten y col., 2005).

Por otro lado, según los valores obtenidos con Clorpirifos Zamba®, la especie estudiada podría considerarse una especie más tolerante que las especies antes mencionadas así como también más tolerante que *P. reticulata* (Sharbidre y col., 2011). Asimismo, si se comparan las CL50-96 h obtenidas con Lorsban* 48E® y aquellas publicada en la bibliografía, *C. decemmaculatus* podría considerarse una especie menos tolerante a los formulados comerciales conteniendo clorpirifos estudiados en especies como *P. reticulata* (Sharbidre y col., 2011), *C. punctatus* (Ali y col., 2008b) y *L. macrochirus* (USEPA, 2006). Mientras que según los resultados de mortalidad obtenidos con Clorpirifos Zamba®, la “madrecita de agua” sería menos sensible que *C. punctatus* (Ali y col., 2008b) y *L. macrochirus* (USEPA, 2006).

En síntesis, tanto Lorsban* 48E® como Clorpirifos Zamba®, aún con marcadas diferencias de toxicidad, estarían ejerciendo un efecto tóxico en peces intermedio respecto de otras formulaciones comerciales conteniendo clorpirifos como principio activo en su composición, entre las cuales podrían mencionarse Lorsban 480EM (Rendón-von Osten y col., 2005), Tricel® (Ali y col., 2008b) y Terrashield 50TC (Sharbidre y col., 2011), formulaciones con mayor, menor e intermedia capacidad de ejercer efectos letales, respectivamente.

Los estudios realizados para evaluar mortalidad de las formulaciones comerciales conteniendo pirimicarb en su composición presentados en este trabajo de Tesis Doctoral, mostraron que Patton flow® fue más tóxico que Aficida®. Dicha toxicidad fue expresada mediante valores de CL50-96 h de 87,83 y 112,76 mg/L, respectivamente. De esta manera, cuando se expusieron ejemplares de *C. decemmaculatus* durante 96 h de tratamiento al insecticida Patton flow® fue

suficiente una concentración casi 1,5 veces menor que la empleada con Aficida® para lograr el mismo efecto letal en esta especie. Cuando se identificó y comparó la sensibilidad de la especie estudiada frente a ambos formulados, se puso en evidencia que la misma fue más sensible a Patton flow® que a Aficida®. En este caso, si bien ambas formulaciones comerciales poseen el mismo porcentaje de principio activo en su composición (50% pirimicarb), los resultados de los ensayos de letalidad pusieron de manifiesto una mayor mortalidad de Patton flow® respecto de Aficida®. Estudios previos realizados por Skandrani y colaboradores (2006) luego de analizar comparativamente al principio activo pirimicarb y la formulación comercial PirimorG, sugirieron que no se podría descartar la posibilidad de la existencia entre los mismos de elementos inertes y/o coadyuvantes con capacidad deletérea. Nuestros resultados podrían corroborar lo planteado por estos autores y de esta forma no podría ser descartada la presencia de xenobiótico/s en la formulación Patton flow® que estén ejerciendo un efecto tóxico en sí mismos o bien, un efecto aditivo y/o sinérgico con el principio activo, aumentando su toxicidad respecto del formulado Aficida®.

De acuerdo a la CL50-96 h obtenida en la presente Tesis Doctoral para Aficida®, este insecticida sería capaz de ejercer “efectos adversos a largo plazo” en *C. decemmaculatus* y sería “categoría 3” de peligro, según la OECD (Mazzatorta y col., 2002) y la UN (2011), respectivamente. El insecticida Patton flow®, sería un compuesto “perjudicial” y “categoría 3” de peligro, según la OECD (Mazzatorta y col., 2002) y la UN (2011), respectivamente.

Los valores de CL50-96 h hallados en la bibliografía para diferentes especies de peces expuestos a pirimicarb puro y a distintas formulaciones comerciales se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Toxicidad aguda (CL50-96 h; mg/L) para diferentes especies de peces expuestos a pirimicarb puro y a distintas formulaciones comerciales conteniendo pirimicarb

Especie	CL50-96 h (mg/L)	Referencias
<i>O. mykiss</i>	29-129 (pirimicarb)	(OPP-EEDB, 2000)
<i>C. carpio</i>	410 (pirimicarb)	(Svobodova, 1980)
<i>L. macrochirus</i>	0,05 (Formulado SE)	(USEPA, 2000)
<i>L. macrochirus</i>	0,08 (Formulado SE)	(USEPA, 2000)
<i>O. mykiss</i>	0,03 (Formulado SE)	(USEPA, 2000)
<i>O. mykiss</i>	0,13 (Formulado SE)	(USEPA, 2000)
<i>C. decemmaculatus</i>	87,83 (Patton flow®; 50% p.a.)	Presente trabajo
<i>C. decemmaculatus</i>	112,76 (Aficida®; 50% p.a.)	Presente trabajo

SE: sin especificar nombre del formulado y/o % de p.a.

Cuando se compararon los valores de CL50-96 h obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral para *C. decemmaculatus* expuestos a Aficida® y Patton flow® con el valor obtenido de CL50-96 h para otras especies de peces expuestas a pirimicarb puro, fue factible observar que ambos insecticidas ejercieron una toxicidad dentro del intervalo de toxicidad del principio activo sobre la especie *O. mykiss* (OPP-EEDB, 2000) pero mayor que aquella ejercida por pirimicarb sobre *C. carpio* (Svobodova, 1980).

Al comparar los valores de CL50-96 h obtenidos en el presente trabajo para *C. decemmaculatus* expuesto a Aficida® y Patton flow®, con el valor de CL50-96 h

para otras especies de peces expuestas a diferentes formulaciones comerciales del mismo insecticida fue factible observar que tanto Aficida® como Patton flow® ejercieron un efecto letal sobre *C. decemmaculatus* marcadamente menor que aquella ejercida por otras formulaciones sobre especies tales como *L. macrochirus* (USEPA, 2000) y *O. mykiss* (USEPA, 2000). Dicho de otra manera, tanto Aficida® como Patton flow® estarían ejerciendo un efecto tóxico en términos de mortalidad mucho menor que otras formulaciones comerciales que contienen pirimicarb en su composición.

4.2. Evaluación del daño genotóxico y citotóxico inducido por los herbicidas Panzer® y Credit®

El ensayo de MN constituye uno de los ensayos más ampliamente utilizados en las últimas décadas y recomendado como estimador de daño inducido por agentes químicos o físicos en genética toxicológica humana y ambiental (Fenech, 2006; Mudry y Carballo, 2006; Udrouiu, 2006). Este ensayo permite detectar macrolesiones inducidas en el ADN celular donde el material genético desprendido puede derivar de cromosomas enteros o, más frecuentemente, de fragmentos cromosómicos acéntricos que quedan excluidos de los núcleos de las nuevas células durante la anafase mitótica (Al-Sabti y Metcalfe, 1995; Fenech, 2000). Por consiguiente, la evaluación del daño inducido debe realizarse en una población celular interfásica pero que haya realizado, al menos, un ciclo celular (Udrouiu, 2006).

Numerosos estudios avalan que el ensayo de MN es una herramienta eficaz para la evaluación de los efectos genotóxicos ocasionados por diferentes

xenobióticos en organismos acuáticos, entre ellos, los peces (Al-Sabti y Metcalfe, 1995; Campana y col., 1999, 2003; Hagger y col., 2005; Jha y col., 2005; Udroiou, 2006; Villela y col., 2006; Mouchet y col., 2007; Ali y col., 2008a; Poletta y col., 2008, 2009; Vera Candiotti y col., 2010; Cavas, 2011; Pamplona y col., 2011; Polard y col., 2011).

Cuando se realizaron los ensayos para evaluar genotoxicidad estimada mediante el ensayo de MN en eritrocitos circulantes de *C. decemmaculatus* expuestos al herbicida Panzer®, se observó un aumento significativo en la frecuencia de MN en las menores concentraciones empleadas tanto a las 48 como a las 96 h de exposición. Contrariamente, con la mayor concentración evaluada, no fue significativa la inducción de MN e inclusive pudo registrarse una disminución de dicha frecuencia en los ejemplares expuestos durante 96 h de tratamiento respecto a aquellos expuestos por 48 h. Asimismo, la inducción total de MN registrados en los peces tratados con Panzer® evidenció una leve disminución tiempo-dependiente.

Resultados similares han sido comunicados previamente por otros autores en otras especies de peces expuestos a distintos xenobióticos. Entre los mismos, cabrían mencionarse especies tales como *C. carpio* expuesta a mercurio (Nepomuceno y col., 1997), *C. i. interruptus* expuesta al insecticida lambda-cialotrina (Campana y col., 1999), *Astyanax bimaculatus* tratada con ciclofosfamida (Matsumoto y Cólus, 2000), *O. niloticus* expuesta a efluentes textiles (Cavaş y Ergene-Gözükara, 2003), *Salmo trutta*, *Anguilla anguilla* y *Phoxinus phoxinus* a ciclofosfamida, colchicina y cadmio (Rodríguez-Cea y col., 2003) y *C. punctatus* expuesta a clorpirifos (Ali y col., 2008b), entre otras. Los estudios realizados en

todas estas especies revelaron valores máximos de MN en las menores concentraciones ensayadas y luego una disminución en la frecuencia de MN con el aumento de las concentraciones. Asimismo, los autores sugieren que esta disminución en la frecuencia de MN podría deberse a un efecto tóxico y/o inhibitorio ejercido por las máximas concentraciones de los compuestos ensayados, las que estarían afectando la división celular provocando un retraso del ciclo celular y la consecuente alteración en la tasa de renovación de los eritrocitos circulantes (Nepomuceno *y col.*, 1997; Matsumoto y Cólus, 2000; Cavaş y Ergene-Gözükara, 2003; Rodríguez-Cea *y col.*, 2003). Nuestras observaciones en *C. decemmaculatus* expuestos a Panzer® resultarían, por consiguiente, concordantes con estos hallazgos previamente mencionados y podrían avalar lo sugerido por los mismos autores.

Sin embargo, otra posible explicación para nuestros hallazgos podría ser sugerida. Se conoce que en peces, el riñón es el principal órgano hematopoyético (Udroiu, 2006; Ali *y col.*, 2008a). En este sentido, la hematopoyesis jugaría un papel muy importante en el ensayo de MN cuando el mismo utiliza células sanguíneas como blanco de estudio (Udroiu, 2006).

Es conocido que algunos xenobióticos a determinadas concentraciones pueden alterar el proceso de eritropoyesis, disminuyendo tanto la producción de eritrocitos como la de eritrocitos micronucleados. De manera contraria, si se estimula la eritropoyesis el resultado es un aumento desmesurado de eritrocitos en sangre circulante con la consecuente dilución de los eritrocitos formados portando MN y una disminución de su frecuencia relativa (Udroiu, 2006).

El bazo es el órgano hemocaterético en los peces (Rabello-Gay, 1991; Ali y col., 2008a). Cuando estos organismos acuáticos son expuestos a un xenobiótico, los eritrocitos defectuosos pasan del riñón a la sangre y de allí son removidos por el bazo (Rabello-Gay, 1991; Ali y col., 2008a). En ensayos citogenéticos que requieren de la división celular para la expresión del punto final evaluado como por ejemplo los MN, no todas las células dañadas son observadas debido a que, como es conocido, algunas entran en apoptosis o necrosis en lugar de completar su ciclo celular (Fenech, 1997) y son consecuentemente, eliminadas del organismo (Ali y col., 2008a).

En función de lo previamente expuesto no podría descartarse la posibilidad que la menor frecuencia de MN, observada en los tratamientos con la mayor concentración evaluada de Panzer[®], pueda deberse a un efecto tóxico e inhibitorio ejercido por la formulación comercial sobre las células sanguíneas (Nepomuceno y col., 1997; Matsumoto y Cólus, 2000; Cavaş y Ergene-Gözükara, 2003; Rodríguez-Cea y col., 2003). Por otro lado, este efecto también podría explicarse en función de una estimulación de la actividad hemocaterética del bazo capaz de eliminar los eritrocitos defectuosos del organismo según lo propuesto por estudios anteriores (Rabello-Gay, 1991; Udrouiu, 2006; Ali y col., 2008a). Para ambos supuestos, estas células micronucleadas no estarían siendo detectadas en el análisis de los ejemplares expuestos a la mayor concentración empleada tanto a las 48 como a las 96 h de tratamiento. Finalmente, no podría descartarse tampoco la posibilidad de una estimulación de la actividad eritropoyética del riñón. De esta manera, se estaría aumentando la proporción de eritrocitos en sangre circulante, de acuerdo a

lo sugerido por Udroiú (2006), con la consecuente dilución de los eritrocitos portadores de MN en sangre periférica y una disminución concomitante en su frecuencia en los ejemplares expuestos a la mayor concentración del herbicida. Finalmente, la posibilidad del efecto combinado de estas causales para explicar nuestras observaciones en este trabajo de Tesis Doctoral no podría ser descartada.

Las investigaciones sobre los efectos deletéreos ejercidos por Credit® mediante el análisis de la frecuencia de MN revelaron un incremento significativo en la frecuencia de los mismos y no dependiente de la concentración, sólo en aquellos ejemplares analizados a las 96 h de tratamiento.

Resultados similares han sido publicados previamente por otros autores para *A. anguilla* expuesta a ciclofosfamida (Pacheco y Santos, 1997) y para *P. lineatus* (Cavalcante y col., 2008), *T. rendalli* (Grisolia, 2002) y *C. auratus* (Cavaş y Könen, 2007) expuestas a Roundup®. Estos autores informaron sobre la ausencia de un aumento significativo en la frecuencia de MN luego de 48 h de tratamiento cuando realizaron el ensayo de MN en eritrocitos circulantes de las especies estudiadas (Pacheco y Santos, 1997; Grisolia, 2002; Cavaş y Könen, 2007; Cavalcante y col., 2008). Los mismos sugirieron que el efecto observado podría deberse a un rápido catabolismo de los eritrocitos dañados, a un lento remplazo de los mismos y en consecuencia, un retraso en la aparición de eritrocitos circulantes micronucleados (Pacheco y Santos, 1997; Cavalcante y col., 2008). Asimismo, Cavalcante y colaboradores (2008) postularon la posibilidad de que el tiempo de exposición de *P. lineatus* expuestos al formulado de glifosato pueda haber sido insuficiente para permitir que ocurriera un ciclo celular completo y en

consecuencia permitir la aparición de eritrocitos micronucleados en el momento del análisis.

Al-Sabti y Metcalfe (1995) demostraron que la máxima inducción de MN en peces normalmente ocurre entre el primero y el quinto día luego de iniciada la exposición a un xenobiótico, aunque en la mayoría de las especies de peces tendría lugar luego del segundo o tercer día (Udroiu, 2006). Cabe mencionarse que cuando se evaluó el efecto del herbicida Roundup® en *T. rendalli* (Grisolia, 2002) y en *C. auratus* (Cavaş y Könen, 2007) se registró un aumento significativo en la frecuencia de MN luego de 4 días de exposición al igual que recién a los 6 días de tratamiento con ciclofosfamida para el caso de *A. anguilla* (Pacheco y Santos, 1997).

Asimismo, se ha sugerido que no es posible emplear un tiempo predeterminado de análisis de la frecuencia de células portadoras de MN en ejemplares expuestos debido a que la formación de los mismos depende de variables propias de cada especie. Entre las mismas, cabe mencionar la duración del ciclo celular, el tipo de tejido analizado, el tiempo de recambio celular durante la hematopoyesis y ciertas condiciones de diseño experimental incluyendo temperatura (Al-Sabti y Metcalfe, 1995; Palhares y Grisolia, 2002; Udroiu, 2006) así como también el tipo de xenobiótico involucrado (Palhares y Grisolia, 2002; Bolognesi y col., 2006; Ali y col., 2008a). Teniendo en cuenta este concepto, se requiere al menos un lapso de 96 h de exposición para detectar un aumento significativo de la frecuencia de MN en *C. decemmaculatus* expuesto al herbicida Credit®.

Por lo expuesto anteriormente, la no inducción de MN observada en *C. decemmaculatus* expuesto al herbicida Credit® durante 48 h de tratamiento, podría explicarse en función de lo propuesto por Pacheco y Santos (1997). En este sentido, las menores concentraciones ensayadas del herbicida podrían estimular un rápido catabolismo de eritrocitos dañados seguido de un lento remplazo de los mismos, y por ende, un retraso en su aparición y cuantificación a las 48 h de estudio. Por otra parte, el tiempo de análisis podría resultar insuficiente para que ocurra un ciclo celular completo en las células sanguíneas expuestas a Credit® como consecuencia de un alargamiento del ciclo celular. Finalmente, el tiempo de exposición podría no ser suficiente para que el efecto genotóxico ejercido por Credit® sea detectado mediante el ensayo de MN siguiendo lo postulado por Ali y colaboradores (2008a), quienes afirman que la formación de MN depende entre otras variables del xenobiótico evaluado.

Es bien conocido que el EC en su variante alcalina permite detectar daño en el ADN como lesiones de cadena simple al igual que otro tipo de lesiones como sitios sensibles al álcali y uniones cruzadas en el ADN (Fenech, 2000). La ventaja que presenta este ensayo sobre otras técnicas empleadas en citogenética como aquellas para detectar aberraciones cromosómicas, ICH o MN, es que para el EC las células no deben atravesar un ciclo celular para manifestar el daño ejercido (Lee y Steinert, 2003; Ali *y col.*, 2009). Ha sido ampliamente utilizado en la evaluación del efecto de contaminantes ambientales en organismos acuáticos, entre ellos los peces (Lee y Steinert, 2003; Hagger *y col.*, 2005; Jha *y col.*, 2005; Villela *y col.*, 2006; Mouchet *y col.*, 2007; Ali *y col.*, 2008b; Poletta *y col.*, 2008, 2009;

Lacaze y col., 2010; Cavas, 2011; Monteiro y col., 2011; Pamplona y col., 2011; Polard y col., 2011; Poletta y col., 2011).

El daño inducido en el ADN de células sanguíneas circulantes de *C. decemmaculatus* expuestos a 3,9 mg/L de Panzer® y 22,9 mg/L de Credit® evidenciado por el EC puso de manifiesto el potencial genotóxico de ambos herbicidas. En aquellos ejemplares expuestos tanto a Panzer® como a Credit® se observó un aumento en la frecuencia de células dañadas y una disminución de las células no dañadas, tanto en los peces analizados a las 48 como a las 96 h de exposición. Asimismo, se observó un aumento en el IDG ejercido por ambos compuestos tanto para los ejemplares analizados a las 48 como a las 96 h de exposición. Cabe mencionar que el porcentaje de células dañadas indica la frecuencia de células que han sufrido daño en su ADN. El IDG representa además de la frecuencia de células dañadas, la magnitud de dicho daño, evidenciado por el aumento de cometas de clase IV o células altamente dañadas. Resultados similares fueron obtenidos por Cavaş y Könen (2007) empleando ejemplares de *C. auratus* expuestos a Roundup® y por Cavalcante y su grupo de investigación (2008) cuando evaluaron los efectos genotóxicos del mismo herbicida en *P. lineatus*. Finalmente, estudios recientes demostraron la capacidad de Roundup® de inducir daño en la molécula de ADN de eritrocitos de *A. anguilla* evaluado mediante el EC (Guilherme y col., 2009).

En el caso particular del herbicida Panzer®, un análisis de regresión permitió observar una disminución aunque no significativa del porcentaje de células dañadas entre los ejemplares sacrificados a las 96 h respecto de aquellos

sacrificados a las 48 h de exposición continua. Esta disminución del porcentaje de células dañadas luego de 96 h de tratamiento podría estar indicando una reparación del ADN dañado o la eliminación de aquellas células dañadas, o ambos eventos a la vez, como lo avalan resultados previos (Saleha Banu *y col.*, 2001; Lee y Steinert, 2003; Ali *y col.*, 2009). Otras hipótesis podrían ser propuestas para explicar los resultados obtenidos con Panzer®. Entre las mismas se incluyen la capacidad de activación del sistema citocromo P450 que constituye un sistema de defensa celular ampliamente conocido frente a contaminantes ambientales (Blasiak *y col.*, 1999; Saleha Banu *y col.*, 2001; Wong *y col.*, 2001). Por otra parte, Cavalcante y su grupo de investigación (2008), sugirieron además, analizando el daño ejercido en *P. lineatus* por el formulado Roundup®, un retraso en la aparición de eritrocitos en circulación debido a una rápida eliminación de aquellos dañados y una lenta reposición de los mismos en el torrente sanguíneo. Nuestras observaciones son concordantes con los hallazgos postulados por los autores antes mencionados. Sin embargo, no se cuenta con evidencias experimentales que permitan dilucidar cuál(es) de los posibles mecanismos son los causantes de los resultados obtenidos.

Los resultados en ejemplares expuestos a 22,9 mg/L de Credit® demostraron la inducción de un incremento tiempo dependiente de las células dañadas evaluadas mediante el EC. Resultados similares fueron registrados por Cavaş y Könen (2007). Estos autores mediante el empleo del EC postularon que el daño inducido por el formulado Roundup® en *C. auratus* podría deberse a un aumento de células dañadas o bien a una disminución de la capacidad de

reparación del daño inducido en el ADN por el glifosato en los eritrocitos circulantes incluidos en el estudio (Cavaş y Könen, 2007).

Como un posible mecanismo de acción ejercido por el herbicida glifosato Modesto y Martinez (2010) en un trabajo reciente realizado en ejemplares de *P. lineatus* comunicaron la capacidad del formulado comercial Transorb®, conteniendo 48% glifosato, de inhibir el complejo enzimático glutatión-S-transferasa. Esta alteración podría conducir a la producción de peroxidación en lípidos que a su vez, podrían derivar en la formación de EROs (Saleha Banu *y col.*, 2001). Es ampliamente conocido que la generación de EROs es capaz de provocar daño en la molécula de ADN (Emerit y Cerutti, 1981; Emerit *y col.*, 1982; Larramendy y Reigosa, 1986; Larramendy *y col.*, 1987, 1989a, 1989b; Lee y Steinert, 2003). Por lo expuesto, no podría descartarse que el daño inducido en el ADN de células sanguíneas de *C. decemmaculatus* ejercido por las formulaciones comerciales Panzer® y Credit® haya sido mediado por la producción de EROs entre otros mecanismos posibles.

La capacidad genotóxica del glifosato evidenciada mediante el ensayo de MN y el EC en los resultados de esta Tesis Doctoral son concordantes con lo observado por otros grupos de investigación empleando diferentes modelos experimentales tanto *in vivo*, *in vitro* al igual que *in ovo*. Estudios realizados con glifosato puro pusieron de manifiesto un efecto genotóxico del principio activo en células Hep-2 evaluado mediante el EC (Mañas *y col.*, 2009b). Del mismo modo, resultados positivos fueron comunicados para este principio activo en células de médula ósea de ratón mediante el EC (Bolognesi *y col.*, 1997) como con el ensayo

de MN (Bolognesi *y col.*, 1997; Mañas *y col.*, 2009b). Asimismo, cabe destacarse que tanto el EC como el MN evidenciaron la capacidad genotóxica de la formulación comercial Roundup® en embriones del yacaré *C. latirostris* expuestos *in ovo* (Poletta *y col.*, 2009), al igual que en larvas del anuro *Rana catesbeiana* (Clements *y col.*, 1997) y en células de médula ósea de ratón (Bolognesi *y col.*, 1997). Finalmente, cabe señalarse que estudios realizados empleando tanto células Hep-2 como células de médula ósea de ratones, demostraron la capacidad genotóxica del principal metabolito del glifosato, el AMPA, mediante los ensayos de EC y MN, respectivamente (Mañas *y col.*, 2009a).

En lo que respecta a los estudios de citotoxicidad realizados en nuestro trabajo de Tesis Doctoral, los resultados de las variaciones en la relación eritrocitos/eritroblastos en ejemplares de *C. decemmaculatus* expuestos a Panzer® y a Credit® no evidenciaron la inducción de efectos citotóxicos de estos formulados, al menos dentro del rango de concentraciones empleadas. En este sentido, luego de 48 y 96 h de tratamiento continuo con ambos herbicidas, no fue factible observar alteraciones ni en la frecuencia de eritroblastos ni en la frecuencia de eritrocitos. Este efecto podría ser explicado de manera directa por la ausencia de capacidad citotóxica por parte de las formulaciones comerciales evaluadas o bien, siguiendo lo propuesto por Udriou (2006). Este autor sostiene que algunos xenobióticos poseen la capacidad de estimular la eritropoyesis en especies piscícolas con un consecuente aumento de eritrocitos en circulación y una dilución de aquellos eritrocitos dañados en el caso de que los hubiera. Asimismo, en el caso que la población de eritroblastos en sangre periférica pudiera verse incrementada

por un efecto citotóxico, el aumento en la frecuencia de eritrocitos en circulación por una eritropoyesis aumentada, disminuiría la frecuencia de eritroblastos, dando lugar a un resultado de tipo falso negativo (Udroiu, 2006).

Por todo lo expuesto hasta el momento en el presente trabajo de Tesis Doctoral, los herbicidas conteniendo 48% de glifosato como principio activo tales como Panzer® y Credit®, son capaces de inducir daño en el ADN de *C. decemmaculatus* evaluado y cuantificado mediante el ensayo de MN y el EC. Asimismo, no se puede descartar que el daño en el ADN ejercido por ambas plaguicidas se deba en parte a los componentes inertes y coadyuvantes presentes en dichas formulaciones comerciales, al principio activo glifosato, a su principal metabolito AMPA o a la formulación comercial en su totalidad.

4.3. Evaluación del daño genotóxico y citotóxico inducido por los insecticidas Lorsban* 48E® y Clorpirifos Zamba®

Cuando se realizaron los ensayos para evaluar genotoxicidad estimada mediante el ensayo de MN en eritrocitos circulantes de *C. decemmaculatus* expuestos al insecticida Lorsban* 48E® se observó un aumento significativo en la frecuencia de MN en los ejemplares expuestos a las tres concentraciones empleadas tanto a las 48 como a las 96 h de tratamiento. Cabe señalar, que nuestros resultados demostraron que el aumento en la frecuencia de MN fue tiempo dependiente.

Los resultados obtenidos son coincidentes con los publicados por otros autores en especies como *C. punctatus* expuesta a clorpirifos (Ali y col., 2009). De

manera similar, cabe mencionarse otros hallazgos similares tales como los obtenidos en otras especies piscícolas como *C. auratus* (Cavaş y Könen, 2007) expuesta tanto a Roundup® como a mercurio y plomo (Cavas, 2008), *Scophthalmus maximus* expuesto a diferentes xenobióticos (Bolognesi y col., 2006) y *O. niloticus* expuesto a efluentes textiles (Cavaş y Ergene-Gözükara, 2003) y al ácido domoico (Cavaş y Könen, 2008), entre otras. Estos estudios revelaron un incremento en la frecuencia de MN en las especies antes mencionadas tanto a las 48 como a las 96 h de tratamiento ejercido por distintos compuestos. Los autores sugieren que este incremento en la frecuencia de MN podría deberse a una acumulación de eritrocitos micronucleados y/o a una deficiente actividad hemocaterética por parte del bazo para eliminar a los eritrocitos dañados (Cavaş y Könen, 2007, 2008; Cavas, 2008; Ali y col., 2009). Por otro lado, este efecto podría explicarse, como hemos mencionado anteriormente, en función de lo propuesto por Udriou (2006) quien sugirió que el efecto observado podría deberse a una deficiente actividad eritropoyética que remplace los eritrocitos dañados por eritrocitos no dañados en la circulación periférica. Dicho efecto deletéreo podría estar acompañado de un efecto inhibitorio tanto de la eritropoyesis como de la eritrocateresis permitiendo, de esta manera, una acumulación y consecuente cuantificación de eritrocitos portadores de MN en los ejemplares de *C. decemmaculatus* expuestos por 48 y 96 h de tratamiento. Finalmente, como se mencionara en párrafos anteriores, no podría ser descartada la posibilidad del efecto combinado de estas causales para explicar el efecto tóxico de Lorsban* 48E® observado en este trabajo de Tesis Doctoral.

Las investigaciones sobre los efectos deletéreos ejercidos por Clorpirifos Zamba® mediante el análisis de la frecuencia de MN revelaron un incremento significativo en la frecuencia de MN tanto a las 48 como a las 96 h de tratamiento en las tres concentraciones ensayadas. Cabe señalar, que para este formulado conteniendo clorpirifos, el daño genotóxico no fue concentración ni tiempo dependiente.

Los resultados obtenidos para Clorpirifos Zamba® fueron similares a los obtenidos en esta Tesis Doctoral para el insecticida Lorsban* 48E®. En función de lo expuesto en párrafos anteriores y de la posible explicación de la inducción de MN observada en *C. decemmaculatus* expuesto al insecticida Lorsban* 48E®, la inducción de MN observada en ejemplares de la “madrecita de agua” expuestos a Clorpirifos Zamba® podría explicarse por un efecto inhibitorio de la eritropoyesis, de la eritrocateresis o de ambos fenómenos a la vez, según lo propuesto por los autores antes mencionados (Cavaş y Könen, 2007, 2008; Cavas, 2008; Ali y col., 2009).

Cabe señalar que el tiempo de exposición y las concentraciones empleadas para la determinación del efecto genotóxico evidenciado por el ensayo de MN en *C. decemmaculatus* expuesto tanto a Lorsban* 48E® como a Clorpirifos Zamba®, fueron suficientes para poder demostrar la inducción de MN en eritrocitos circulantes. Estas observaciones concuerdan con lo previamente sugerido por otros autores y mencionado en párrafos anteriores (Al-Sabti y Metcalfe, 1995). Si bien ambos insecticidas conteniendo clorpirifos en su composición indujeron un aumento significativo de MN en *C. decemmaculatus* tanto a las 48 como a las 96 h

de tratamiento, la máxima frecuencia observada ocurrió en los ejemplares analizados tras cuatro días de exposición. Estos resultados avalarían lo planteado por Al-Sabti y Metcalfe (1995).

El daño inducido en el ADN de células sanguíneas circulantes de *C. decemmaculatus* expuestos a 0,008 mg/L de Lorsban* 48E® y 0,052 mg/L de Clorpirifos Zamba® medido a través del EC, también permitió poner en evidencia el potencial genotóxico de ambos insecticidas. En aquellos ejemplares expuestos tanto a Lorsban* 48E® como a Clorpirifos Zamba® se observó un aumento en la frecuencia de células dañadas y una disminución de las células no dañadas, con un aumento concomitante del IDG, tanto en los peces analizados a las 48 como a las 96 h de exposición. Resultados similares fueron observados en otras especies como *C. punctatus* cuando ejemplares de la misma fueron expuestos a clorpirifos (Ali y col., 2008b, 2009).

Hasta el presente, el posible mecanismo responsable de la inducción de daño en la molécula de ADN por exposición a clorpirifos es poco conocido (Ali y col., 2009). Sin embargo, la información disponible permitiría afirmar que los insecticidas organofosforados son agentes químicos de propiedades alquilantes y fosforilantes (Wild, 1975; Klaassen, 2008). Por este motivo, varios autores sugirieron un posible efecto de fosforilación y/o alquilación por parte del clorpirifos en la molécula de ADN (Wild, 1975; Saleha Banu y col., 2001; Lee y Steinert, 2003; Klaassen, 2008; Ali y col., 2009). Sin embargo, otros posibles mecanismos de acción también podrían ser propuestos para explicar los resultados obtenidos con ambas formulaciones comerciales estudiadas. Entre las mismas se

incluye la inducción de EROs, capaces de ejercer rupturas de simple y doble cadena en el ADN, según lo propuesto por otros autores (Saleha Banu *y col.*, 2001; Ali *y col.*, 2009) y avalado recientemente por los estudios de Gupta (2010). Estos autores pusieron de manifiesto la capacidad del clorpirifos de inducir daño en el ADN de larvas de *Drosophila melanogaster* y sugirieron que dicho efecto se debería a la producción de EROs (Gupta *y col.*, 2010). Sin embargo, hasta el presente no hemos realizado ningún ensayo experimental para comprobar/rechazar lo sugerido por estos últimos autores.

Los resultados de la presente Tesis Doctoral demostraron una disminución de la población de células dañadas en función del tiempo en los ejemplares tratados con Lorsban* 48E®. Este efecto podría estar indicando una reparación del ADN dañado o la eliminación de aquellas células dañadas de circulación, con lo cual no estarían siendo detectadas en el análisis, o ambos eventos a la vez. Estos resultados estarían avalando lo propuesto por otros grupos de investigación y mencionado previamente en la presente Tesis Doctoral (Saleha Banu *y col.*, 2001; Lee *y Steinert*, 2003; Ateeq *y col.*, 2005; Cavaş *y Könen*, 2008; Ali *y col.*, 2009).

Los resultados de los experimentos con ejemplares expuestos a Clorpirifos Zamba® pusieron de manifiesto un incremento de células dañadas no dependiente del tiempo. Este efecto podría explicarse en función de lo propuesto previamente en esta Tesis Doctoral (Cavaş *y Könen*, 2007). En este sentido, el daño inducido por Clorpirifos Zamba® podría deberse a un aumento de células dañadas, a una disminución de la capacidad de reparación del daño inducido en el ADN por el

clorpirifos en las células sanguíneas de la “madrecita de agua”, o a la combinación de ambos sucesos (Cavaş y Könen, 2007).

La capacidad genotóxica del clorpirifos evidenciada mediante el ensayo de MN y el EC observada a lo largo de esta Tesis Doctoral son concordantes con lo observado por otros grupos de investigación empleando diferentes modelos experimentales tanto *in vivo* como *in vitro*. Estudios realizados con el principio activo clorpirifos pusieron de manifiesto la capacidad del compuesto de inducir daño en el ADN en larvas de *D. melanogaster* expuestas, estimado mediante el empleo del EC (Gupta y col., 2010). Asimismo, cuando se evaluó el efecto de una formulación comercial conteniendo 40% de clorpirifos como principio activo fue factible observar un efecto genotóxico evidenciado por el ensayo de MN y el EC en larvas del anfibio *B. b. gargarizans* (Yin y col., 2009). Del mismo modo, se hallaron resultados positivos para este principio activo en leucocitos de ratón utilizando el EC (Rahman y col., 2002) y un aumento en la frecuencia de MN en embriones de ratones hembras expuestas a clorpirifos puro durante la etapa de gestación (Tian y Yamauchi, 2003). Asimismo, cabe destacarse que el ensayo de MN evidenció la capacidad genotóxica de la formulación comercial Dursban en células meristemáticas de raíz de *Crepis capillaris* (Dimitrov y Gadeva, 1997).

En lo que respecta a los estudios de citotoxicidad realizados en este trabajo de Tesis Doctoral, los resultados de las variaciones en la relación eritrocitos/eritroblastos en ejemplares de *C. decemmaculatus* expuestos a Lorsban* 48E® y a Clorpirifos Zamba® evidenciaron que ambos insecticidas poseen una evidente capacidad citotóxica. En este sentido, luego de 48 y 96 h de tratamiento

continuo con ambos formulados, fue factible observar un aumento en la frecuencia de eritroblastos con una concomitante disminución en la frecuencia de eritrocitos en sangre periférica de los ejemplares expuestos.

Resultados similares han sido comunicados previamente por otros autores en diferentes especies expuestas a variados xenobióticos con efecto citotóxico. Entre los mismos, pueden mencionarse especies de vertebrados tales como *R. arenarum* expuesto al insecticida pirimicarb (Vera Candiotti *y col.*, 2010), *C. a. auratus* expuesta a mercurio y plomo (Cavas, 2008), y *Dicentrarchus labrax* expuesta a formaldehído y oxitetraciclina (Jerbi *y col.*, 2011), entre otras.

La evaluación de la toxicidad en la eritropoyesis constituye un componente importante en la evaluación del riesgo que puede ocasionar un químico ambiental y la cuantificación de los eritrocitos inmaduros en sangre periférica es un método adecuado como estimador de citotoxicidad (Suzuki *y col.*, 1989). En este sentido, Ueda y su grupo de investigación (2001) cuando estudiaron los aspectos morfológicos de células sanguíneas de la especie *O. niloticus* demostraron que los eritrocitos son el tipo celular más abundante entre las distintas formas celulares y que la presencia de formas inmaduras podría deberse a una aceleración del proceso de eritropoyesis. Los estudios de Jerbi y su grupo de colaboradores (2011), determinaron la frecuencia de eritrocitos maduros y eritrocitos inmaduros en sangre de *D. labrax* poniendo de manifiesto la capacidad citotóxica del formaldehído y la oxitetraciclina sobre la especie evaluada. Asimismo, Cavaş (2008) demostró la capacidad citotóxica del mercurio y del plomo sobre *C. a. auratus* mediante la evaluación de la proporción eritrocitos inmaduros/eritrocitos

maduros. Este efecto podría ser explicado según dicho autor, por una alteración en la actividad eritropoyética provocando principalmente la inhibición de la renovación de eritrocitos en la circulación periférica (Cavas, 2008). Finalmente, nuestro grupo de investigación analizando el efecto de la formulación comercial Aficida® del insecticida pirimicarb, pudo demostrar que las alteraciones de la frecuencia de eritrocitos/eritroblastos de larvas del anfibio *R. arenarum* es un estimador válido de citotoxicidad experimental (Vera Candiotti *et al.*, 2010).

De acuerdo a la información disponible en la bibliografía no existen antecedentes sobre la evaluación de la proporción eritrocitos/eritroblastos como indicador de citotoxicidad por exposición a xenobióticos en *C. decemmaculatus*, especie por nosotros evaluada en el presente trabajo de Tesis Doctoral.

Por lo expuesto anteriormente, la citotoxicidad observada en *C. decemmaculatus* expuesto a Lorsban* 48E® y a Clorpirifos Zamba® podría explicarse en función de lo comunicado previamente por otros autores (Suzuki *et al.*, 1989; Ueda *et al.*, 2001; Cavas, 2008; Jerbi *et al.*, 2011). De esta manera, los insecticidas evaluados estarían provocando una alteración de la actividad eritropoyética con la consecuente disminución de la formación y liberación de eritrocitos al sistema circulatorio, siendo remplazados por formas inmaduras como son los eritroblastos (Peters y Schwarzer, 1985). Asimismo, dicho efecto podría verse potenciado por una alteración en la hemocateresis según lo propuesto por Udrouiu (2006). En este sentido, una disminución de la actividad del bazo se vería reflejada en una disminución de la remoción de células dañadas y la consecuente acumulación de las mismas en sangre, como en este caso los eritroblastos.

Un análisis de regresión evidenció un leve aumento en la frecuencia de eritrocitos en ejemplares expuestos durante 96 h respecto de aquellos expuestos por 48 h tanto a Lorsban* 48E® como a Clorpirifos Zamba®. Este leve aumento de la población de eritrocitos en sangre circulante de *C. decemmaculatus* podría estar indicando una recuperación del daño inducido por clorpirifos en las células sanguíneas al cabo de 96 h. De acuerdo a lo sugerido por los autores mencionados en párrafos anteriores en la presente Tesis Doctoral (Saleha Banu *y col.*, 2001; Ateeq *y col.*, 2005; Cavaş y Könen, 2008; Ali *y col.*, 2009), no podría descartarse la posibilidad de que este fenómeno se deba a un efecto de recuperación de la actividad eritropoyética con la consecuente formación y liberación de eritrocitos a la circulación sanguínea, o bien, un recupero de la actividad hemocaterética con la consecuente remoción de células dañadas del organismo, entre ellas los eritroblastos. Finalmente cabría señalar, no podríamos descartar la posibilidad de que ambos fenómenos acontecieran de manera simultánea.

Por lo expuesto hasta el momento en el presente trabajo de Tesis Doctoral, los insecticidas comerciales conteniendo 48% de clorpirifos como principio activo tales como Lorsban* 48E® y Clorpirifos Zamba®, son capaces de inducir daño en el ADN de *C. decemmaculatus* evaluado y cuantificado mediante el ensayo de MN y el EC, así como también un efecto citotóxico evidenciado por la alteración de las poblaciones del linaje eritrocítico, la eritrocítica y la eritroblástica. Asimismo, no se puede descartar que el daño en el ADN ejercido por ambos plaguicidas se deba en parte a los componentes inertes y coadyuvantes presentes en dichas formulaciones comerciales, como es el xileno en la formulación comercial Lorsban*

48E[®], al principio activo clorpirifos, a su principal metabolito TCP (USEPA, 2006) o a la formulación comercial en su totalidad. Si bien, nuestras observaciones pueden calificar a ambas formulaciones comerciales conteniendo clorpirifos como citotóxicas y genotóxicas, nuestro diseño experimental no ha contemplado determinar cuál(es) de estos enunciados es el efecto causal de las propiedades tóxicas de estos compuestos.

4.4. Evaluación del daño genotóxico y citotóxico inducido por los insecticidas

Aficida[®] y Patton flow[®]

Cuando se evaluó la genotoxicidad en eritrocitos circulantes de *C. decemmaculatus* tratados con Aficida[®] luego de 48 h de exposición mediante el ensayo de MN se observó un aumento significativo en la frecuencia de MN al igual que en aquellos ejemplares sacrificados 48 h después sobre los valores controles (Publicación I). Un análisis de correlación puso en evidencia para ambos tiempos de sacrificio que dicho incremento mostró una asociación negativa en función de la concentración empleada.

Cabe señalar que la inducción no significativa en la frecuencia de MN en una de las concentraciones ensayadas de Aficida[®] (50,0 mg/L, Publicación I), al cabo de 48 h de exposición, podría ser explicada en función de las diferencias individuales que pueden presentar los organismos de ensayo de un mismo grupo experimental. Es conocido que diferentes organismos presentan una sensibilidad diferencial frente a un mismo xenobiótico que podría ser explicada en relación a sus sistemas de defensa y reparación del daño inducido (Mudry y Carballo, 2006;

Poletta y col., 2009). Por otro lado, la inducción no significativa de MN registrada en los ejemplares analizados a las 96 h de tratamiento expuestos a la mayor concentración de Aficida® podría ser explicada en función de un efecto tóxico e inhibitorio ejercido por la formulación comercial sobre las células sanguíneas tal como fuera explicado previamente en esta Tesis Doctoral y de acuerdo a lo sugerido por otros autores (Nepomuceno y col., 1997; Matsumoto y Cólus, 2000; Cavaş y Ergene-Gözükara, 2003; Rodríguez-Cea y col., 2003). Brevemente, nuestras observaciones revelan que la mayor concentración de Aficida® ensayada ejerció un efecto citotóxico que podría ser explicado debido a un efecto de retraso en el ciclo celular y/o a una alteración en la tasa de renovación de los eritrocitos circulantes. Por otro lado, es factible agregar como posible explicación de la no inducción de MN en la mayor concentración evaluada, una estimulación de la eritropoyesis que llevaría al aumento de la proporción de eritrocitos en sangre circulante o bien, a una estimulación de la hemocateresis eliminando células dañadas (Rabello-Gay, 1991; Udroi, 2006; Ali y col., 2008a), o a la combinación de ambos eventos.

Cuando se realizaron los ensayos para evaluar genotoxicidad estimada mediante el ensayo de MN en eritrocitos circulantes de *C. decemmaculatus* expuestos durante 48 h al insecticida Patton flow® se observó un aumento significativo en la frecuencia de MN en los individuos expuestos únicamente a la máxima concentración ensayada. Contrariamente, cuando el ensayo se prolongó hasta las 96 h de exposición, se observó un aumento significativo de la frecuencia de MN para todas las concentraciones evaluadas. Esta inducción de MN ejercida por Patton flow® fue tiempo y concentración dependiente. Resultados similares

fueron obtenidos en peces por otros autores y mencionados anteriormente en la presente Tesis Doctoral, para *A. anguilla*, *P. lineatus*, *T. rendalli* y *C. auratus* expuestas a ciclofosfamida y Roundup® (Pacheco y Santos, 1997; Grisolia, 2002; Cavaş y Könen, 2007; Cavalcante *y col.*, 2008). Por lo expuesto anteriormente, la ausencia de inducción de MN observada en *C. decemmaculatus* expuestos a las dos menores concentraciones del insecticida Patton flow® durante 48 h de tratamiento podría explicarse en función de lo propuesto por Pacheco y Santos (1997). En este sentido, las dos menores concentraciones ensayadas del insecticida podrían estimular un rápido catabolismo de eritrocitos dañados seguido de un lento remplazo de los mismos, y por ende, un retraso en su aparición y su no inclusión en la cuantificación (Pacheco y Santos, 1997; Cavalcante *y col.*, 2008). Por otra parte, el tiempo de análisis pudiera resultar insuficiente para que ocurra un ciclo celular completo en las células sanguíneas expuestas a Patton flow® como consecuencia de un alargamiento del ciclo celular. Finalmente, el tiempo de exposición podría no ser suficiente para que el efecto genotóxico ejercido por Patton flow® sea detectado mediante el ensayo de MN y en concordancia con lo previamente sugerido por Ali y colaboradores (2008a). Sin embargo, todas estas posibilidades podrían ser descartadas dado el hecho que, a mayores concentraciones fue factible evidenciar un aumento significativo de la frecuencia de MN. De esta forma, casi con seguridad la no inducción de MN a concentraciones menores se debería únicamente a que las mismas serían insuficientes para inducir MN en células expuestas durante 48 h. Dicho de otra manera, se requeriría un tiempo mayor para que dicho daño sea detectado. En

concordancia con este postulado, fueron requeridas 96 h de exposición para detectar un aumento significativo de la frecuencia de MN en *C. decemmaculatus* expuesto a las dos menores concentraciones ensayadas de Patton flow®.

El daño inducido en el ADN de células sanguíneas circulantes de *C. decemmaculatus* expuestos a 25,0 mg/L de Aficida® y 22,0 mg/L de Patton flow®, evidenciado por el EC puso de manifiesto, asimismo, el potencial genotóxico de ambos insecticidas. En aquellos ejemplares expuestos tanto a Aficida® como a Patton flow® se observó un aumento en la frecuencia de células dañadas y una disminución de las células no dañadas así como un aumento en el IDG en los peces analizados tanto a las 48 como a las 96 h de tratamiento.

En el caso particular de Aficida® un análisis de regresión permitió observar una disminución significativa del porcentaje de células dañadas y del IDG entre los ejemplares sacrificados a las 96 h respecto de aquellos sacrificados a las 48 h de exposición continua. Resultados previos de otros grupos de investigación avalan los resultados obtenidos en el presente trabajo para el caso particular del insecticida Aficida®. La disminución del porcentaje de células dañadas luego de 96 h de tratamiento podría estar indicando una reparación del ADN dañado o la eliminación de aquellas células dañadas, o ambos eventos acontecidos al mismo tiempo (Saleha Banu *y col.*, 2001; Lee y Steinert, 2003; Ateeq *y col.*, 2005; Cavaş y Könen, 2008; Ali *y col.*, 2009).

De manera contraria, en las “madrecitas de agua” expuestas a Patton flow® se observó un aumento de células dañadas a lo largo del ensayo, aunque el mismo no se correlacionó con el tiempo. Sin embargo, el IDG aumentó en función del

tiempo. De esta manera, no podría sugerirse la existencia de reparación del ADN dañado o la eliminación de células dañadas, como en el caso de Aficida[®], sino que dicho efecto podría ser atribuido a lo planteado en párrafos anteriores por otros autores (Udroiu, 2006; Cavaş y Könen, 2007, 2008; Cavas, 2008; Ali y col., 2009). En este sentido, Patton flow[®] podría estar ejerciendo un efecto inhibitorio de la eritropoyesis y/o de la eritrocateresis, con la consecuente acumulación de células dañadas en sangre cuantificadas a las 96 h de exposición mediante el EC. Finalmente, nuestros resultados revelaron que Patton flow[®] tiene la capacidad no sólo de aumentar la frecuencia de células dañadas sino también, de incrementar la magnitud del daño celular a medida que aumenta el tiempo de exposición, evidenciado por el aumento del IDG.

Los estudios sobre efectos genotóxicos ejercidos por este insecticida son escasos (IARC, 1976; WHO-FAO, 2004). La capacidad genotóxica del pirimicarb evidenciada mediante el ensayo de MN y el EC observada a lo largo de esta Tesis Doctoral, son concordantes con lo evaluado por otros autores empleando diferentes modelos experimentales tanto *in vitro* como *in vivo*. Estudios realizados con pirimicarb puro pusieron de manifiesto un efecto genotóxico del principio activo en linfocitos humanos tratados *in vitro* mediante la metodología del EC (Ündeger y Basaran, 2005). En nuestro laboratorio, hemos podido demostrar que el formulado comercial Aficida[®] es capaz de aumentar la frecuencia de MN en eritrocitos circulantes de larvas de *R. arenarum* (Vera Candiotti y col., 2010).

Los resultados de los estudios realizados para evaluar citotoxicidad en este trabajo de Tesis Doctoral en ejemplares de *C. decemmaculatus* expuestos a Aficida[®]

y a Patton flow® evidenciaron la capacidad citotóxica de ambas insecticidas. En este sentido, luego de 48 y 96 h de tratamiento continuo con ambos formulados, fue factible observar un aumento en la frecuencia de eritroblastos y una concomitante disminución en la frecuencia de eritrocitos. Resultados similares han sido comunicados previamente para especies tales como *R. arenarum*, *C. a. auratus* y *D. labrax* expuestas al insecticida pirimicarb, a mercurio, plomo y a los compuestos tales como formaldehído y oxitetraciclina (Cavas, 2008; Vera Candiotti y col., 2010; Jerbi y col., 2011), entre otras.


El aumento en la frecuencia de eritroblastos en ejemplares de *C. decemmaculatus* expuestos a Aficida® resultó concentración dependiente para ambos tiempos de exposición, no así en aquellos ejemplares expuestos a Patton flow®. El efecto citotóxico inducido por ambas insecticidas sobre *C. decemmaculatus* podría deberse a una alteración de la función eritropoyética con un aumento de eritroblastos y una reposición deficiente de eritrocitos en circulación, como además, a una disminución en la remoción de células dañadas como los eritrocitos por parte del bazo, con la consecuente acumulación de los eritroblastos en el torrente sanguíneo (Udroiu, 2006; Cavaş y Könen, 2007).


Por todo lo expuesto hasta el momento en el presente trabajo de Tesis Doctoral los insecticidas conteniendo 50% de pirimicarb como principio activo, tales como Aficida® y Patton flow®, son capaces de inducir daño genotóxico en el ADN de *C. decemmaculatus* evaluado y cuantificado mediante el ensayo de MN y el EC al igual que un efecto citotóxico en las subpoblaciones celulares sanguíneas. Asimismo, no se puede descartar que el daño en el ADN ejercido por ambos


plaguicidas se deba en parte a los componentes inertes y coadyuvantes presentes en dichas formulaciones comerciales, al principio activo pirimicarb o a la formulación comercial en su totalidad.


5. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los objetivos planteados y los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral se concluye que:


 Los herbicidas Panzer® y Credit® fueron capaces de ejercer efectos letales en *C. decemmaculatus*. Asimismo, mostraron un efecto genotóxico dado por un incremento de la frecuencia de MN y rupturas en la hebra de ADN de células sanguíneas evaluado y cuantificado mediante el ensayo de MN y el EC, respectivamente.


 Por otro lado, tanto Panzer® como Credit® no fueron capaces de ejercer un efecto citotóxico, al menos en subpoblaciones celulares sanguíneas estudiadas de *C. decemmaculatus* y evaluado mediante el análisis de la variación eritrocitos/eritroblastos.


 La especie de agua dulce estudiada resultó ser más sensible en términos de mortalidad a Panzer® que a Credit®. Además, sería más sensible a los efectos genotóxicos inducidos por Credit® que por Panzer®. Finalmente, ambos compuestos ejercerían efectos similares sobre “la madrecita de agua” en relación a citotoxicidad.

 Los insecticidas Lorsban* 48E® y Clorpirifos Zamba® produjeron efectos letales en la especie piscícola evaluada. Ambas formulaciones comerciales


además, promovieron un marcado efecto genotóxico debido a la inducción de MN y de rupturas en la hebra de ADN de células sanguíneas de *C. decemmaculatus*. Asimismo, tanto Lorsban* 48E® como Clorpirifos Zamba® mostraron capacidad para alterar la relación eritrocitos/eritroblastos circulantes, produciendo un incremento en la frecuencia de eritroblastos y una disminución de la frecuencia de eritrocitos circulantes.


 La especie *C. decemmaculatus* resultó ser más sensible en términos de mortalidad a Lorsban* 48E® que a Clorpirifos Zamba®. De la misma manera, la especie evaluada fue más sensible en términos de genotoxicidad y citotoxicidad a Lorsban* 48E® que a Clorpirifos Zamba®.

 Los insecticidas Aficida® y Patton flow® produjeron efectos letales en *C. decemmaculatus*. Ambos insecticidas fueron agentes capaces de inducir daño genotóxico en el pequeño poecílido mediante un aumento en la frecuencia de MN y de rupturas en la hebra de ADN. Estos compuestos presentaron capacidad de alterar la relación eritrocitos/eritroblastos provocando un aumento en la frecuencia de eritroblastos respecto de la frecuencia de eritrocitos, poniendo en evidencia su capacidad citotóxica.


 La especie evaluada *C. decemmaculatus* resultó ser más sensible a los efectos letales de Patton flow® que de Aficida®. De manera contraria, cuando se evaluó la inducción de MN, Aficida® resultó ser más genotóxico que Patton flow®;

mientras que este último fue más efectivo en la capacidad de inducir rupturas de cadena simple en la molécula de ADN, evidenciando que ambas formulaciones pueden provocar alteraciones en el material genético. En términos de citotoxicidad, el poecílido estudiado fue más sensible a Aficida® que a Patton flow®.

 Los resultados obtenidos en la evaluación de los efectos letales, citotóxicos y genotóxicos ejercidos por Panzer® y Credit®, Lorsban* 48E® y Clorpirifos Zamba® y Aficida® y Patton flow® en ejemplares de *C. decemmaculatus* en el presente trabajo de Tesis Doctoral nos permiten concluir que la respuesta diferencial observada en la especie frente a los compuestos conteniendo el mismo porcentaje de los principios activos en su composición, no podría ser atribuida únicamente a la presencia del mismo como constituyente de cada formulado sino que, dichas diferencias podrían ser debidas en parte a los componentes inertes y coadyuvantes presentes en cada una de las formulaciones de los plaguicidas ensayados que teóricamente son inertes.

 De acuerdo a la clasificación de riesgo que presentan los plaguicidas para *C. decemmaculatus*, evaluados mediante estudios de toxicidad aguda, el insecticida Aficida® (50% pirimicarb) debería ser considerado como un compuesto nocivo o capaz de ejercer efectos adversos a largo plazo. Por otro lado, las formulaciones comerciales de los herbicidas Panzer® y Credit®, ambos conteniendo 48% de glifosato y el insecticida Patton flow® (50% pirimicarb) como

compuestos perjudiciales o nocivos. Finalmente, Clorpirifos Zamba® (48% clorpirifos) y Lorsban* 48E® (48% clorpirifos), deberían ser considerados como compuestos muy tóxicos para la especie evaluada.

 Los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral constituyen los primeros antecedentes en Argentina del uso de *C. decemmaculatus* para la evaluación de efectos genotóxicos y citotóxicos en bioensayos de laboratorio. Los resultados obtenidos indican que *C. decemmaculatus* podría considerarse un organismo blanco válido cuando se utilizan estimadores de genotoxicidad y citotoxicidad como el ensayo de MN, el EC y el análisis de la variación en la proporción eritrocitos/eritroblastos para la evaluación de los potenciales efectos de agentes químicos ambientales como son los agroquímicos.

6. CONSIDERACIONES FINALES

Los plaguicidas pueden ingresar a los ambientes acuáticos de manera directa durante su aplicación en los ambientes terrestres, o cuando son aplicados directamente en los cuerpos de agua para el control de malezas o plagas acuáticas (USEPA, 2009). Además de la vía directa, estos compuestos pueden alcanzar los cursos de agua por erosión, escorrentía y/o lixiviación proveniente de aplicaciones terrestres (USEPA, 2006, 2009). La mayor concentración de glifosato registrada en Argentina en muestras de agua provenientes de ambientes acuáticos de la región de la Pampa Húmeda fue 0,7 mg/L (Peruzzo y col., 2008). Esta concentración estaría por debajo de las menores concentraciones ensayadas con los formulados comerciales de glifosato, Panzer® y Credit® (3,9 y 22,9 mg/L, respectivamente), capaces de provocar daño genotóxico en *C. decemmaculatus*. Por otro lado, la mayor concentración de clorpirifos registrada en muestras de agua provenientes de ambientes acuáticos de la región de la Pampa Húmeda fue 0,0108 mg/L (Marino y Ronco, 2005). En este caso, dicha concentración superaría la menor concentración ensayada del formulado comercial Lorsban* 48E® (0,008 mg/L) capaz de inducir efecto genotóxico y citotóxico en ejemplares de *C. decemmaculatus*. En lo que respecta al insecticida pirimicarb, hasta el momento no existen registros de concentraciones de este compuesto en ambientes acuáticos en nuestro país.

El efecto tóxico que puedan ejercer los agroquímicos sobre organismos acuáticos dependerá además de la(s) vía(s) de ingreso, del tiempo y forma de exposición y/o de la concentración que alcance finalmente en el cuerpo de agua

(Mudry y Carballo, 2006). Las características físico-químicas de cada plaguicida como su solubilidad en agua, su capacidad de adsorción a las partículas del suelo (EXTOXNET, 1996; ATSDR, 1997; USEPA, 2006), las vías de degradación (ATSDR, 1997) y su capacidad de bioacumulación en la cadena trófica (WHO, 1975, 2005; USEPA, 2006) así como también el tipo y condiciones del suelo y del agua (USEPA, 2006) entre otras, determinarán la concentración final del compuesto en el ecosistema acuático.

Un ensayo de toxicidad aguda no reproduce las mismas condiciones que el medio natural como tampoco las complejas interacciones que ocurren en el mismo (Mudry y Carballo, 2006). Una limitación que presentan estos ensayos es la dificultad existente para extrapolar los resultados obtenidos en laboratorio hacia los posibles efectos que puedan ocasionar los compuestos evaluados bajo condiciones naturales (Mudry y Carballo, 2006).

Si bien los ensayos realizados en la presente Tesis Doctoral no reprodujeron las verdaderas condiciones en las que *C. decemmaculatus* se vería expuesto a los plaguicidas en su medio natural, los resultados de nuestras investigaciones permitieron determinar de manera concreta que los herbicidas Panzer® y Credit® y los insecticidas Lorsban* 48E®, Clorpirifos Zamba®, Aficida® y Patton flow®, constituyen claros agentes inductores de mortalidad, genotoxicidad y citotoxicidad en exposiciones agudas en *C. decemmaculatus* en condiciones de laboratorio. Por todo lo expuesto, no podría descartarse la posibilidad que las aplicaciones reiteradas de estos plaguicidas en los diferentes cultivos en nuestro país pueden ingresar a los ambientes acuáticos y ejercer efectos deletéreos no sólo

sobre la especie evaluada *C. decemmaculatus*, sino también sobre otros organismos acuáticos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirrezabalaga, I., Santamaría, I., Comendador, M.A., 1994. The w/w+ SMART is a useful tool for the evaluation of pesticides. *Mutagenesis* 9, 341–346.
- Al-Sabti, K., Metcalfe, C.D., 1995. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. *Mutation Research* 343, 121-135.
- Albers, J.W., Garabrant, D.H., Mattsson, J.L., Burns, C.J., Cohen, S.S., Sima, C., Garrison, R.P., Richardson, R.J., Berent, S., 2007. Dose-effect analyses of occupational chlorpyrifos exposure and peripheral nerve electrophysiology. *Toxicological Sciences* 97, 196-204.
- Ale, E., Fenocchio, A.S., Pastori, M.C., Ribeiro, C.O., Cestari, M.M., C, Z., 2004. Evaluation of the effects of (NO₃)₂Pb on *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) by means of cytogenetic techniques. *Japan Mendel Society* 54, 23-27.
- Ali, D., El-Shehawi, A.M., Seehy, M.A., 2008a. 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., 2008b. Genotoxicity assessment of acute exposure of chlorpyrifos to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. *Chemosphere* 71, 1823-1831.
- 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 and Chemical Toxicology* 47, 650-656.
- Alvarez, R., Honrubia, M.P., Herráez, M.P., 1995. Skeletal malformations induced by the insecticides ZZ-Aphox and Folidol during larval development of *Rana perezi*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 28, 349-356.
- Amer, S.M., Farah, O.R., 1983. Cytological effects of pesticides. XII. Effects of the phosphorothioate insecticide dursban on the mitosis of *Vicia faba*. *Cytologia* 48, 27-33.
- Andersen, T.H., Tjørnhøj, R., Wollenberger, L., Slothuus, T., Baun, A., 2006. Acute and chronic effects of pulse exposure of *Daphnia magna* to dimethoate and pirimicarb. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 1187-1195.

- Anderson, D., Richardson, C.R., Howard, C.A., Bradbrook, C., Salt, M.J., 1980. Pirimicarb: a cytogenetic study in the rat. *World Health Organization, Rome*.
- APHA, AWWA, WEF, 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. *APHA, Washington DC* 20th Edition.
- ASTM, 1996. Standard guide for conducting acute toxicity tests on test materials with fishes, macroinvertebrates, and amphibians. *ASTM Guidelines*.
- 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*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62, 348-354.
- ATSDR, 1997. Clorpirifos (Chlorpyrifos). *Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, U.S.A.*
- Beggel, S., Werner, I., Connon, R.E., Geist, J.P., 2010. Sublethal toxicity of commercial insecticide formulations and their active ingredients to larval fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Science of the Total Environment* 408, 3169–3175.
- Blackborun, L.G., Boutin, C., 2003. Subtle effects of herbicide use in the context of genetically modified crops: a case study with glyphosate (Roundup®). *Ecotoxicology* 12, 271-285.
- Blasiak, J., Jaloszynski, P., Trzeciak, A., Szyfter, K., 1999. *In vitro* studies on the genotoxicity of the organophosphorus insecticide malathion and its two analogues. *Mutation Research* 445, 275-283.
- Bolognesi, C., Bonatti, S., Degan, P., Gallerani, E., Peluso, M., Rabboni, R., Roggieri, P., Abbondandolo, A., 1997. Genotoxic activity of glyphosate and its commercial formulation Roundup. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 1957-1962.
- Bolognesi, C., Perrone, E., Roggieri, P., Pampanin, D.M., Sciutto, A., 2006. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. *Aquatic Toxicology* 78S, S93-S98.
- Caliani, I., Porcelloni, S., Mori, G., Frenzilli, G., Ferraro, M., Marsili, L., Casini, S., Fossi, M.C., 2008. Genotoxic effects of produced waters in mosquito fish (*Gambusia affinis*). *Ecotoxicology* 18, 75-80.
- Cambon, C., Declume, C., Derache, R., 1979. Effect of the insecticidal carbamate derivatives (carbofuran, pirimicarb, aldicarb) on the activity of acetylcholinesterase

- in tissues from pregnant rats and fetuses. *Toxicology and Applied Pharmacology* 40, 203-208.
- 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*. *Mutation Research* 438, 155-161.
- Campana, M., Panzeri, A., Moreno, V., Dulout, F., 2003. Micronuclei induction in *Rana catesbeiana* tadpoles by the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Genetics and Molecular Biology* 26, 99-103
- Carrquiriborde, 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.
- Carrquiriborde, P., Ronco, A., 2006. Ecotoxicological studies on the pejerrey (*Odontesthes bonariensis*, Pisces Atherinopsidae). *Biocell* 30, 97-109.
- CASAFE, 2009. La Argentina 2050. La revolución tecnológica del agro. Hacia el desarrollo integral de nuestra sociedad. *Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes*, 744.
- Castro Scarone, S., Espínola Moltedo, J.C., Míguez Caramés, D., Viana Maturro, F., 2002. Los bioensayos como herramienta de evaluación de la toxicidad de los efluentes industriales en Uruguay. *Informe final. Dirección Nacional de Medio Ambiente (DINAMA) y Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LUT)*. Montevideo, Uruguay, 45.
- Cavalcante, D.G.S.M., Martinez, C.B.R., Sofia, S.H., 2008. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. *Mutation Research* 655 41-46.
- Cavas, 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.
- Cavas, 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.
- 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. *Mutation Research* 538, 81-91.

- Cavas, T., Ergene-Gozukara, 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.
- 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. *Aquatic Toxicology* 90, 154-159.
- Claver, J.A., Quaglia, A.I.E., 2009. Comparative morphology, development, and function of blood cells in nonmammalian vertebrates. *Journal of Exotic Pet Medicine* 18, 87-97.
- Clements, C., Ralph, S., Petras, M., 1997. Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 29, 277-288.
- Conway, G., 1997. *The doubly green revolution: food for all in the twenty-first century*. Penguin Books, Nueva York.
- Countryman, P.I., Heddle, J.A., 1976. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Research* 41, 321-332.
- Cox, C., Sorgan, M., 2006. Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. *Environmental Health Perspectives* 114, 1803-1806.
- de la Torre, F.R., Demichelis, S.O., Ferrari, L., Salibián, A., 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., Salibián, A., 2002. Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 131, 271-280.
- 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 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 Silva, P.M.C.S., Samayawardhena, L.A., 2002. Low concentrations of Lorsban in water result in far reaching behavioral and histological effects in early life stages in guppy. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53, 248-254.
- Di Marzio, W.D., 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.
- 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). *Environmental Toxicology and Water Quality* 13, 55-59.
- Di Marzio, W.D., 1999. Estudio de los efectos de sustancias contaminantes sobre peces de agua dulce. *Trabajo de Tesis Doctoral*, 272.
- 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. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61, 380-391.
- Dimitrov, B., Gadeva, P., 1997. Genotoxicity studies on the insecticide dursban in root meristem cells of *Crepis capillaris* L. *Environmental and Experimental Botany* 3, 199-209.
- El Sebae, A.H., 1993. Special problems experienced with pesticide use in developing countries. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 17, 287-291.
- Emerit, I., Cerutti, P., 1981. The tumor promoter phorbol-12-myristate-13-acetate induces chromosomal damage and polyploidization in human lymphocytes. *Nature* 293, 144-146.
- Emerit, I., Keck, M., Levy, A., Feigold, J., Michelson, A.M., 1982. Activated oxygen species at the origin of chromosome breakage and sister-chromatid exchanges. *Mutation Research* 140, 27-31.
- Ergene, S., Cavas, T., Celik, A., Koleli, N., Kaya, F., 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* 16, 385-391.

- Espínola, J., Lorenzo, F., Martínez López, W., Méndez Acuña, L., 2004. Evaluación de la toxicidad aguda y genotoxicidad de efluentes industriales vertidos en las principales cuencas hídricas del municipio de Montevideo, Uruguay. *Intendencia Municipal de Montevideo (IMM) y Ministerio de Educación y Cultura (MEC)*, 45.
- Evrard, E., Marchand, J., Theron, M., Pichavant-Rafini, K., Durand, G., Quiniou, L., Laroche, J., 2010. Impacts of mixtures of herbicides on molecular and physiological responses of the European flounder *Platichthys flesus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 152, 321-331.
- EXTOXNET, 1996. Extension Toxicology Network Pesticide Information Profiles. <http://ace.ace.orst.edu/info/extoxnet>
- Fairbairn, D.W., Olive, P.L., O'Neill, K.L., 1995. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research* 339, 17-59.
- FAO, 2007. International code of conduct on the distribution and use of pesticides. The implementation of the Globally Harmonized System (GHS) of classification and labelling of chemicals. *Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome*, 5.
- Farah, M.A., Bushra-Ateeq, M., Niamat-Ali, M., 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.
- Farahat, F.M., Fenske, R.A., Olson, J.R., Galvin, K., Bonner, M.R., Rohlman, D.S., Farahat, T.M., Lein, P.J., Anger, W.K., 2010. Chlorpyrifos exposures in Egyptian cotton field workers. *Neurotoxicology* 31, 297-304.
- Fenech, M., 1997. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutation Research* 392, 11-18.
- Fenech, M., 2000. The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research* 455, 81-95.
- Fenech, M., 2006. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research* 600, 58-66.
- Fenech, M., 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 2, 1084-1104.
- Ferreira, D., Costa da Motta, A., Kreutz, L.C., Toni, C., Loro, V.L., Gil Barcellos, L.J., 2010. Assessment of oxidative stress in *Rhamdia quelen* exposed to agrichemicals. *Chemosphere* 79, 914-921.

- Folmar, L.C., Sanders, H.O., Julin, A.M., 1979. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 8, 269-278.
- Gallo-Delgado, S.M., Palacio-Baena, J.A., Gutiérrez-C, D.A., 2006. Efecto del insecticida clorpirifos sobre la tasa de crecimiento y la metamorfosis de *Smilisca phaeota* (Cope, 1862) (Anura: Hylidae). *Actualidades Biológicas* 28, 51-58.
- Garabrant, D.H., Aylward, L.L., Berent, S., Chen, Q., Timchalk, C., Burns, C.J., Hays, S.M., Albers, J.W., 2009. Cholinesterase inhibition in chlorpyrifos workers: characterization of biomarkers of exposure and response in relation to urinary TCPy. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology* 19, 634-642.
- García-Medina, S., Razo-Estrada, C., Galar-Martinez, M., Cortéz-Barberena, E., Gómez-Oliván, L.M., Álvarez-González, I., Madrigal-Bujaidar, E., 2011. Genotoxic and cytotoxic effects induced by aluminum in the lymphocytes of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 153, 113-118.
- Garrett, N.E., Stack, H.F., Waters, M.D., 1986. Evaluation of the genetic activity profiles of 65 pesticides. *Mutation Research* 168, 301-325.
- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R., 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 167, 35-120.
- Gluszczak, L., dos Santos Miron, D., Silveira Moraes, B., Rodrigues Simões, R., Chitolina Schetinger, M.R., Maria Morsch, V., Loro, V.L., 2007. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 146, 519-524.
- Gollapudi, B.B., Mendrala, A.L., Linscombe, V.A., 1995. Evaluation of the genetic toxicity of the organophosphate insecticide chlorpyrifos. *Mutation Research* 342, 25-36.
- Gómez, S., Villar, C., 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., Larramendy, M.L., 2003. Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation Azzurro®. IV.

- DNA damage and repair kinetic assessed by single cell gel electrophoresis (SCGE) assay on Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Mutation Research* 534, 145-154.
- González, M., Soloneski, S., Reigosa, M.A., Larramendy, M.L., 2005. Effect of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and its derivative 2,4-D dichlorophenoxyacetic acid dimethylamine salt (2,4-D DMA). I. Genotoxic evaluation on Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicology in Vitro* 19, 289-297.
- González, N.V., Soloneski, S., 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., 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., Larramendy, M.L., 2009. Dicamba-induced genotoxicity of Chinese hamster ovary (CHO) cells is prevented by vitamin E. *Journal of Hazardous Materials* 163, 337-343.
- Grisolia, C.K., 2002. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. *Mutation Research* 518, 145-150.
- Guilherme, S., Gaivao, I., Santos, M.A., Pacheco, M., 2009. Tissue specific DNA damage in the European eel (*Anguilla anguilla*) following a short-term exposure to a glyphosate-based herbicide. *Toxicology Letters/ Abstracts* 189S, S57-S273.
- Gupta, S.C., Mishra, M., Sharma, A., Deepak Balaji, T.G.R., Kumar, R., Mishra, R.K., Chowdhuri, D.K., 2010. Chlorpyrifos induces apoptosis and DNA damage in *Drosophila* through generation of reactive oxygen species. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73.
- Hagger, J.A., Depledge, M.H., Galloway, T.S., 2005. Toxicity of tributyltin in the marine mollusc *Mytilus edulis*. *Marine Pollutant Bulletin* 51, 811-816.
- Heddle, J.A., Benz, R.D., Countryman, P.I., 1978. Measurement of chromosomal breakage in cultured cells by the micronucleus technique. En: Evans, H. J. y Lloyd, D. C. Mutagen-induced chromosome damage in man. *Edinburgh: Edinburgh University Press*, 191-199.
- Honrubia, P.M., Paz Herráez, M., Alvarez, R., 1993. The carbamate insecticide ZZaphox induced structural changes of gills, liver, gall-bladder, heart, and notochord of *Rana*

- perezi tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 25, 184-191.
- Howe, C.M., Berrill, M., Pauli, B.D., Helbing, C.C., Werry, K., Veldhoen, N., 2004. Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1928-1938.
- IARC, 1976. Some Carbamates, Thiocarbamates and Carbazides. *International Agency for Research on Cancer, Lyon*.
- IRAM, 2008. Calidad ambiental - Calidad del agua. Determinación de la toxicidad letal aguda de sustancias en peces de agua dulce. Método semiestático. *Instituto Argentino de Normalización y Certificación Norma 29112*, 23 pp.
- Ishidate Jr, M., 1987. *Data book of chromosomal aberration test in vitro*. Elsevier Tokyo.
- Jerbi, M.A., Ouanes, Z., Besbes, R., Achour, L., Kacem, A., 2011. Single and combined genotoxic and cytotoxic effects of two xenobiotics widely used in intensive aquaculture. *Mutation Research* 724, 22– 27.
- Jha, A.N., Dogra, Y., Turner, A., Millward, G.E., 2005. Impact of low doses of tritium on the marine mussel, *Mytilus edulis*: genotoxic effects and tissue-specific bioconcentration. *Mutation Research* 586, 47-57.
- Jiraungkoorskul, W., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Sahaphong, S., Vichasri Grams, S., Pokethitiyook, P., 2002. Histopathological effects of Roundup[®], a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Science Asia* 28, 121-127.
- Jorge, L.C., Casuso, J.A., Cowper Coles, F., Figueroa, F.F., Sánchez, S., 2006. Análisis preliminares de los efectos genotóxicos del malatión. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad Nacional del Nordeste*. V-016, 2.
- Kaur, P., Grover, I.S., 1985. Cytological effects of some organophosphorus pesticides. Part 2. Meiotic effects. *Cytologia* 50, 199-211.
- Kier, L.D., Stegeman, S.D., Dudek, S., McAdams, J.G., Flowers, F.J., Huffman, M.B., Heydens, W.F., 1997. Genotoxicity studies of glyphosate, alachlor and butachlor herbicide formulations. *Fundamental and Applied Toxicology* 36, 305 pp.
- Kim, I.Y., Hyun, C.K., 2006. Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, 288-297.
- Klaassen, C.D., 2008. *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*. McGraw-Hill.

- Kreutz, L.C., Barcellos, L.J.G., Silva, T.O., Anziliero, D., Martins, D., Lorenson, M., 2008. Acute toxicity test of agricultural pesticides on silver catfish (*Rhamdia quelen*) fingerlings. *Ciencia Rural* 38.
- Kreutz, L.C., Gil Barcellos, L.J., Marteninghe, A., dos Santos, E.D., Zanatta, R., 2010. Exposure to sublethal concentration of glyphosate or atrazine-based herbicides alters the phagocytic function and increases the susceptibility of silver catfish fingerlings (*Rhamdia quelen*) to *Aeromonas hydrophila* challenge. *Fish & Shellfish Immunology* 29, 694-697.
- Lacaze, E., Geffard, O., Bonya, S., Devaux, A., 2010. Genotoxicity assessment in the amphipod *Gammarus fossarum* by use of the alkaline Comet assay. *Mutation Research* 700, 32-38.
- Lajmanovich, R.C., Sandoval, M.T., Peltzer, P.M., 2003. Induction of mortality and malformation in *Scinax nasicus* tadpoles exposed to glyphosate formulations. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 70, 612-618.
- Langiano, V.C., Martinez, C.B.R., 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 147, 222-231.
- Larramendy, M.L., Reigosa, M.A., 1986. Variation in sister chromatid exchange frequencies between human and pig whole blood, plasma leukocyte, and mononuclear leukocyte cultures. *Environmental Mutagenesis* 8, 543-554.
- Larramendy, M.L., Mello-Filho, A., Leme-Martins, E., Meneghini, R., 1987. Iron mediated induction of sister chromatid exchanges by hydrogen peroxide and superoxide anion. *Mutation Research* 178, 57-63.
- Larramendy, M.L., Bianchi, M.S., Padrón, J., 1989a. Correlation between the anti-oxidant enzyme activities of blood fractions and the yield of bleomycin-induced chromosome damage. *Mutation Research* 214, 129-136.
- Larramendy, M.L., López-Larraza, D., Vidal-Rioja, L., Bianchi, N.O., 1989b. The effect of the metal chelating agent *o*-phenanthroline on the DNA and chromosome damage induced by bleomycin in Chinese hamster ovary cells. *Cancer Research* 49, 6583-6586.
- Lascano, C.I., Sotomayor, V., Ferrari, A., Venturino, A., 2009. Alteraciones del desarrollo embrionario, poliaminas y estrés oxidativo inducidos por plaguicidas organofosforados en *Rhinella arenarum*. *Acta Toxicológica Argentina* 17, 8-19.

- 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. Review. *Mutation Research* 544, 43–64.
- Li, A.P., Long, T.J., 1988. An evaluation of the genotoxic potential of glyphosate. *Fundamental and Applied Toxicology* 10, 537-546.
- Lin, N., Garry, V.F., 2000. *In vitro* studies of cellular and molecular developmental toxicity of adjuvants, herbicides, and fungicides commonly used in Red River Valley, Minnesota. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 60, 423-439.
- Lioi, M.B., Scarfi, M.R., Santoro, A., Barbieri, R., Zeni, O., Di Bernardino, D., Ursini, M.V., 1998. Genotoxicity and oxidative stress induced by pesticide exposure in bovine lymphocyte cultures *in vitro*. *Mutation Research* 403, 13-20.
- Lushchak, O.V., Kubrak, O.I., Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchak, V.I., 2009. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. *Chemosphere* 76, 932-937.
- Maarten Dros, J., 2004. AID Environment, Amsterdam. *World Wildlife Fund*.
- MAG&P, 2011. Ministerio de Agricultura, Pesca y Ganadería. <http://www.minagri.gob.ar>.
- Magnin, M., Marboutin, E., Pasteur, N., 1988. Insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in West Africa. *Journal of Medical Entomology* 25, 99-104.
- Mansour, S.A., Hassan, T.M., 1993. Pesticides and Daphnia. 3. An analytical bioassay method, using *Ceriodaphnia quadrangula*, for measuring extremely low concentrations of insecticides in waters. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health* 2, 34-39.
- Mañas, F., Peralta, L., Raviolo, J., García Ovando, H., Weyers, A., Ugnia, L., González Cid, M., Larripa, I., Gorla, N., 2009a. Genotoxicity of AMPA, the environmental metabolite of glyphosate, assessed by the comet assay and cytogenetic tests. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 834-837.
- Mañas, F., Peralta, L., Raviolo, J., García Ovando, H., Weyers, A., Ugnia, L., Gonzalez Cid, M., Larripa, M., Gorla, N., 2009b. Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 28, 37-41.

- Marc, J., Mulner-Lorillon, O., Boulben, S., Hureau, D., Durand, G., Belle, R., 2002. Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK 1/Cyclin B activation. *Chemistry Research in Toxicology* 15, 326-331.
- Marchese, M., Gagneten, A.M., Parma, M.J., Pave, P.J., 2008. Accumulation and elimination of chromium by freshwater species exposed to spiked sediments. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 55, 603-609.
- Marino, D., Ronco, A.E., 2005. Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the Pampa Ondulada, Argentina. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 75, 820–826.
- Matsumoto, F.E., Cólus, I.M.S., 2000. Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. *Genetics and Molecular Biology* 23, 489-492.
- Mazzatorta, P., Benfenati, E., Neagu, D., Gini, G., 2002. The importance of scaling in data mining for toxicity prediction. *Journal of Chemical Information and Modeling* 42, 1250-1255.
- Menni, R.C., Gómez, S.E., López Armengol, F., 1996. Subtle relationships: freshwater fishes and the water chemistry in Southern South America. *Hydrobiologia* 328, 173-197.
- Modesto, K.A., Martinez, C.B.R., 2010. Effects of Roundup Transorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere* 81, 781-787.
- Molinari, G., Soloneski, S., Reigosa, M.A., Larramendy, M.L., 2010. Genotoxic and cytotoxic in vitro evaluation of ivermectin and its formulation Ivomec® on *Aedes albopictus* larvae (CLL-126TM) cells. *Toxicological & Environmental Chemistry* 92, 1577-1593.
- Monteiro, V., Cavalcante, D.G.S.M., Viléla, M.B.F.A., Sofia, S.H., Martinez, C.B.R., 2011. *In vivo* and *in vitro* exposures for the evaluation of the genotoxic effects of lead on the Neotropical freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Aquatic Toxicology* 104, 291-298.
- Moriya, M., Ohta, T., Watanabe, K., Miyazawa, T., Kato, K., Shirasu, Y., 1983. Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay systems. *Mutation Research* 116, 185-216.
- Mouchet, F., Gauthier, L., Baudrimont, M., Gonzalez, P., Mailhes, C., Ferrier, V., Devaux, A., 2007. Comparative evaluation of the toxicity and genotoxicity of cadmium in

- amphibian larvae (*Xenopus laevis* and *Pleurodeles waltl*) using the comet assay and the micronucleus test. *Environmental Toxicology* 4, 422-435.
- Mudry, M.D., Carballo, M.A., 2006. *Genética toxicológica*. De los cuatro vientos, Buenos Aires, Argentina.
- Muscarella, D.E., Keown, J.F., Bloom, S.E., 1984. Evaluation of the genotoxic potential of chloropyrifos and its metabolites *in vivo* and *in vitro*. *Environmental Mutagenesis* 6, 13-23.
- Nepomuceno, J.C., Ferrari, I., Spanó, M.A., Centeno, A.J., 1997. Detection of micronuclei in peripheral erythrocytes of *Cyprinus carpio* exposed to metallic mercury. *Environmental Molecular and Mutagenesis* 30, 293-297.
- Neskovic, N.K., Poleksic, V., Elezovic, I., Karan, V., Budimir, M., 1996. Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp (*Cyprinus carpio*). *Bulletin of Environmental and Contamination Toxicology* 56, 295-302.
- Nwani, C.D., Nagpure, N.S., Kumar, R., Kushwaha, B., Kumar, P., 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.
- OPP-EEDB, 2000. Office of Pesticide Programs Pesticide Ecotoxicity Database (Formerly: Environmental Effects Database (EEDB)). *Environmental Fate and Effects Division. US Government Printing Office, Washington, DC*.
- Orme, S., Kegley, S., 2004. PAN Pesticide Database, Pesticide Action Network, North America (San Francisco, CA. 2004), URL: <http://www.pesticideinfo.org>.
- Pacheco, M., Santos, M.A., 1997. Induction of EROD activity and genotoxic effects by polycyclic aromatic hydrocarbons and resin acids on the juvenile eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 38, 252-259.
- Palhares, D., Grisolia, C.K., 2002. Comparison between the micronucleus frequencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment. *Genetics and Molecular Biology* 25, 281-284.
- Palus, J., Dziubaltowska, E., Rydzynski, K., 1999. DNA damage detected by the comet assay in the white blood cells of workers in a wooden furniture plant. *Mutation Research* 444, 61-74.
- Pamplona, J.H., Oba, E.T., da Silva, T.A., Ramos, L.P., Ramsdorf, W.A., Cestari, M.M., Oliveira Ribeiro, C.A., Zampronio, A.R., Silva de Assis, H.C., 2011. Subchronic

- effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 342-349.
- Parma de Croux, M.J., Loteste, A., Campana, M., 2002. Toxicidad aguda del piretroide cipermetrina en *Poecilia reticulata* y *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae). *Revista FABICIB* 6, 69-74.
- Patnaik, K., Tripathy, N.K., 1992. Farm grade chloropyrifos (Durmet) is genotoxic in somatic and germ-line cells of *Drosophila*. *Mutation Research* 279, 15–20.
- Pelfrène, A., 2003. Glyphosate: toxicologie et évaluation du risque pour l'homme. *Environmental Risques Santé* 6, 323–334.
- Peluso, M., Munnia, A., Bolognesi, C., Parodi, S., 1998. P-postlabeling detection of DNA adducts in mice treated with the herbicide Roundup. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 31, 55-59.
- Pereira, J.L., Antunes, S.C., Castro, B.B., Marques, C.R., Gonçalves, A.M.M., Gonçalves, F., Pereira, R., 2009. Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. *Ecotoxicology* 18, 455-463.
- Peruzzo, P.J., Porta, A.A., Ronco, A.E., 2008. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. *Environmental pollution* 156, 61-66.
- Peters, G., Schwarzer, R., 1985. Changes in hemopoietic rainbow trout tissue under stress. *Diseases of Aquatic Organisms* 1, 1-10.
- Pilinskaia, M.A., 1982. Cytogenetic effect of the pesticide pirimor in a lymphocyte culture of human peripheral blood *in vivo* and *in vitro*. *Tsitologiia i Genetika* 16, 38-42.
- 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.
- Plewa, M.J., Gentile, J.M., 1983. The detection of mutagenic properties of pesticides used in commercial corn production, project summary. *Health Effects Research Laboratory, Research Triangle Park, NC* US EPA-600/S1-83-006.
- Polard, T., Jean, S., L, G., Laplanche, C., Merlina, G., Sánchez-Pérez, J.M., Pinelli, E., 2011. Mutagenic impact on fish of runoff events in agricultural areas in south-west France. *Aquatic Toxicology* 101, 126-134.

- Poletta, G.L., Larriera, A., Kleinsorge, E., Mudry, M.D., 2008. *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: basal values determination of micronucleus and comet assay. *Mutation Research* 650, 202-209.
- Poletta, G.L., Larriera, A., Kleinsorge, E., Mudry, M.D., 2009. Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. *Mutation Research* 672, 95-102.
- Poletta, G.L., Kleinsorge, E., Paonessa, A., Mudry, M.D., Larriera, A., Siroski, P.A., 2011. Genetic, enzymatic and developmental alterations observed in *Caiman latirostris* exposed *in ovo* to pesticide formulations and mixtures in an experiment simulating environmental exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 852-859.
- Porichha, S.K., Sarangi, P.K., Prasad, R., 1998. Genotoxic effect of chlorpyrifos in *Channa punctatus*. *Perspectives in Cytology and Genetics* 9, 631-638.
- Rabello-Gay, M.N., 1991. Teste do micronúcleo em medula óssea. In: Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e Critérios de Avaliação. *Sociedade Brasileira de Genética*, 83-90.
- Rahman, M.F., Mahboob, M., Danadevi, K., Saleha Banu, B., Grover, P., 2002. Assessment of genotoxic effects of chlorpyrifos and acephate by the comet assay in mice leucocytes. *Mutation Research* 516, 139-147.
- Ramesh, H., David, M., 2009. Respiratory performance and behavioral responses of the freshwater fish, *Cyprinus carpio* (Linnaeus) under sublethal chlorpyrifos exposure. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology* 20, 127-139.
- Rank, J., Jensen, A.-G., Skov, B., Pedersen, L.H., Jensen, K., 1993. Genotoxicity testing of the herbicide Roundup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, Salmonella mutagenicity test, and allium anaphase-telophase test. *Mutation Research* 300, 29-36.
- Rendón-von Osten, J., Ortíz-Arana, A., Guilhermino, L., Soares, A.M.V.M., 2005. *In vivo* evaluation of three biomarkers in the mosquitofish (*Gambusia yucatana*) exposed to pesticides. *Chemosphere* 58, 627-636.
- Rey Vázquez, G., Guerrero, G.A., 2007. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). *Tissue and Cell* 39, 151-160.

- Richard, S., Moslemi, S., Sipahutar, H., Benachour, N., Seralini, G.E., 2005. Differential effects of glyphosate and Roundup on human placental cells and aromatase. *Environmental Health and Perspective* 113, 716–720.
- Rodriguez-Cea, A., Ayllon, F., Garcia-Vazquez, E., 2003. Micronucleus test in freshwater fish species: an evaluation of its sensitivity for application in field surveys. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 442-448.
- Ross, M.A., Childs, D.J., 1996. Herbicide mode-of-action summary. *Purdue University, Department of Botany: Plant Pathology, West Lafayette IN. Report No. WS-23-W.*, 23.
- Saleha Banu, B., Danadevi, K., Rahman, M.F., Ahuja, Y.R., Kaiser, J., 2001. Genotoxic effect of monocrotophos to sentinel species using comet assay. *Food and Chemical Toxicology* 39, 361-366.
- Schmuck, R., Pflüger, W., Grau, R., Hollihn, U., Fischer, R., 1994. Comparison of short-term aquatic toxicity: formulation vs active ingredients of pesticides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 26, 240–250.
- Selvi, M., Sarikaya, R., Erkoç, F., Koçak, O., 2005. Investigation of acute toxicity of chlorpyrifos-methyl on guppy *Poecilia reticulata*. *Chemosphere* 60, 93-96.
- SENASA, 2011. Prohibición del principio activo endosulfán y sus productos formulados. *Resolución 511/2011*, 3 pp.
- Servizi, J.A., Gordon, R.W., Martens, D.W., 1987. Acute toxicity of Garlon 4 and Roundup herbicides to salmon and trout. *Bulletin of Environmental and Contamination Toxicology* 39, 15-22.
- Sharbidre, A.A., Metkari, V., Patode, P., 2011. Effect of methyl parathion and chlorpyrifos on certain biomarkers in various tissues of guppy fish, *Poecilia reticulata*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 101, 132-141.
- Shepard, J.P., Creighton, J., Duzan, H., 2004. Forestry herbicides in the United States: an overview. *Wildlife Society Bulletin* 32, 1020-1027.
- Simoniello, M.F., Gigena, F., Poletta, G., Loteste, A., Kleinsorge, E., Campana, M., Scagnetti, J., 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., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research* 175, 184-191.
- Singh, N.P., 1996. 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*, 3-24.
- Siroki, O., Undeger, U., Institóris, L., Nehéz, M., Basaran, N., Nagymajtényi, L., Dés, i.I., 2001. A study on geno- and immunotoxicological effects of subacute propoxur and pirimicarb exposure in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 50, 76-81.
- Skandrani, D., Gaubin, Y., Vincent, C., Beau, B., Murat, J.C., Soleilhavoup, J.P., Croute, F., 2006. Relationship between toxicity of selected insecticides and expression of stress proteins (HSP, GRP) in cultured human cells: Effects of commercial formulations versus pure active molecules. *Biochimica et Biophysica Acta* 1760, 95-103.
- Smith, E.A., Oehme, F.W., 1992. The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review. *Veterinary and Human Toxicology* 34, 531-543.
- Solomon, K.R., Thompson, D.G., 2003. Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. *Journal of Toxicology and Environmental Health B* 6, 289-324.
- Soloneski, S., González, M., Piaggio, E., Apezteguía, M., Reigosa, M.A., Larramendy, M.L., 2001. Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation Azzurro[®]. I. Genotoxic evaluation on cultured human lymphocytes exposed *in vitro*. *Mutagenesis* 16, 487-493.
- Soloneski, S., Reigosa, M.A., Larramendy, M.L., 2002. Effect of dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation Azzurro[®]. II. Clastogenesis on immunophenotyped human lymphocytes assessed by the micronucleus test. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 40, 57-62.
- Soloneski, S., Reigosa, M.A., Larramendy, M.L., 2003. Vitamin E prevents ethylene bis(dithiocarbamate) pesticide zineb-induced sister chromatid exchange in Chinese hamster ovary cells. *Mutagenesis* 18, 505-510.
- 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 Biology International* 31, 1316-1322.

- Soloneski, S., Reigosa, M.A., Molinari, G., González, N.V., Larramendy, M.L., 2008. Genotoxic and cytotoxic effects of carbofuran and Furadan® on Chinese hamster ovary (CHOK1) cells. *Mutation Research* 656, 68-73.
- Soloneski, S., Larramendy, M.L., 2010. Sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells treated with the insecticide pirimicarb. *Journal of Hazardous Materials* 174, 410-415.
- Sprague, J.B., 1973. The ABC's of pollutions bioassay using fish. Biological methods for the assessment of water quality. *American Society for Testing and Materials* 528, 6-30.
- Srám, R.J., 1998. Effect of glutathione S-transferase M1 polymorphisms on biomarkers of exposure and effects. *Environmental Health Perspectives* 106, 231-239.
- Suzuki, Y., Nagae, Y., Li, J., Sabaka, H., Mazowa, K., Takahashi, A., Shimuzu, H., 1989. The micronucleus test and erythropoiesis: effects of erythropoietin and a mutagen on the ratio of polychromatic to normochromatic erythrocytes (P/N ratio). *Mutagenesis* 4, 420-424.
- Svobodova, Z., 1980. Acute toxicity of pesticides to fish (Akutni Toxicita Pesticidu pro Ryby). *Agrochemia* 20, 328-332.
- Syberg, K., Elleby, A., Pedersen, H., Cedergreen, N., Forbes, V.E., 2008. Mixture toxicity of three toxicants with similar and dissimilar modes of action to *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69, 428-436.
- Tian, Y., Yamauchi, T., 2003. Micronucleus formation in 3-day mouse embryos associated with maternal exposure to chlorpyrifos during the early preimplantation period. *Reproductive Toxicology* 17, 401-405.
- Tsui, M.T.K., Chu, L.M., 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52, 1189-1197.
- Tsui, M.T.K., Chu, L.M., 2008. Environmental fate and non-target impact of glyphosate-based herbicide (Roundup®) in a subtropical wetland. *Chemosphere* 71, 439-446.
- Tucker, J.D., Preston, R.J., 1996. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutation Research* 365, 147-159.
- Udroiu, I., 2006. The micronucleus test in piscine erythrocytes. *Aquatic Toxicology* 79, 201-204.

- Ueda, I.K., Egami, M.I., Sasso, W.S., Matushima, E.R., 2001. Cytochemical aspects of the peripheral blood cells of *Oreochromis* (Tilapia) *niloticus*. (Linnaeus, 1758) (Cichlidae, Teleostei) - Part II. *Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science* 38, 273-277.
- UN, 2011. Peligros para el medio ambiente. *Naciones Unidas* Parte 4, 229 - 258.
- Ündeger, Ü., Basaran, N., 2005. Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes in vitro: induction of DNA damage. *Archives of Toxicology* 79, 169-176.
- USEPA, 1974. Pesticide fact sheet: Pirimicarb. *U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC*, 1-18.
- USEPA, 1975. Methods for acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates, and amphibians. *U.S. Environmental Protection Agency, Corvallis, Oregon* EPA-660/3-75-009, 67.
- USEPA, 1997. Pesticides industry sales and usage. *U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC* EPA, 733-R-97-002, 40.
- USEPA, 1998. Insecticidas carbamatos de N-metilo. *U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC* Capítulo 5, 55-62.
- USEPA, 2000. Pesticide Ecotoxicity Database (Formerly: Environmental Effects Database (EEDB)). *U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC* 344.
- USEPA, 2002a. Guidance on cumulative risk assessment of pesticide chemicals that have a common mechanism of toxicity. *U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC*, 90.
- USEPA, 2002b. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. Fifth edition. *U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC* EPA-821-R-02-012, 275.
- USEPA, 2002c. Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. Fourth edition. *U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC* EPA-821-R-02-013, 350.
- USEPA, 2004. ECOTOX: Ecotoxicology Database. *U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC*.
- USEPA, 2005. Chemicals evaluated for carcinogenic potential. *U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC*, 1-33.

- USEPA, 2006. Reregistration Eligibility Decision (RED) for Chlorpyrifos. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC EPA-HQ-OPP-2006-0618, 1-259.
- USEPA, 2007. Revised N-methyl carbamate cumulative risk assessment. Technical executive summary. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 277.
- USEPA, 2009. Registration review document for glyphosate. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC EPA-HQ-OPP-2009-0361, 1-16.
- Vera Candiotti, J., Natale, G., Soloneski, S., Ronco, A.E., 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.
- Vereecken, H., 2005. Mobility and leaching of glyphosate: a review. *Pest Management Science* 61, 1139-1151.
- Villar, C.A., Gómez, S.E., 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.
- Villela, I.V., de Oliveira, I.M., da Silva, J., Henriques, J.A.P., 2006. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. *Mutation Research* 605, 78–86.
- Wagner, P.M., Nabholz, J.V., Kent, R.J., 1995. The new chemicals process at the Environmental Protection Agency (EPA): structure-activity relationships for hazard identification and risk assessment. *Toxicology letters* 79, 67-73.
- WHO-FAO, 2004. Pesticides residues in food, FAO plant production and protection paper *World Health Organization and Food and Agriculture Organization, Rome*, 154-161.
- WHO, 1975. Data sheets Chlorpyrifos. IPCS. *World Health Organization, Geneva, Switzerland* 18.
- WHO, 1976. Pirimicarb. IPCS. *World Health Organization, Geneva, Switzerland*, 1-51.
- WHO, 1994. Environmental Health Criteria N° 159, Glyphosate. *World Health Organization, Geneva, Switzerland*.
- WHO, 2004. IPCS Harmonization Project. Risk assessment terminology. *World Health Organization, Geneva, Switzerland.*, 122 pp.

- WHO, 2005. Data sheets Chlorpyrifos. ICSC. *World Health Organization, Geneva, Switzerland*.
- WHO, 2009. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2009. *World Health Organization, Geneva, Switzerland*, 81 pp.
- Widenfalk, A., Svensson, J.M., Goedkoop, W., 2004. Effects of the pesticides captan, deltamethrin, isoproturon, and pirimicarb on the microbial community of a freshwater sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1920-1927.
- Widenfalk, A., Bertilsson, S., Sundh, I., Goedkoop, W., 2008. Effects of pesticides on community composition and activity of sediment microbes e responses at various levels of microbial community organization. *Environmental Pollution* 152, 576-584.
- Wild, D., 1975. Mutagenicity studies on organophosphorus insecticides. *Mutation Research* 32, 133-150.
- Wildemaue, C., Lontie, J.P., Schoofs, L., Van Lavebeke, N., 1983. The mutagenicity in procaryotes of insecticides, acaricides and nematicides. *Residue Revisison* 89, 129–178.
- Williams, G.M., Kroes, R., Munro, I.C., 2000. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and Its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 31, 117-165.
- Wong, C.K.C., Yeung, H.Y., Woo, P.S., Wong, M.H., 2001. Specific expression of cytochrome P4501A1 gene in gill, intestine and liver of Tilapia exposed to coastal sediments. *Aquatic Toxicology* 54, 69-80.
- www.senasa.gov.ar. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria.
- Yin, X.H., Zhu, G.N., Li, X.B., Liu, S.Y., 2009. Genotoxicity evaluation of chlorpyrifos to amphibian Chinese toad (Amphibian: Anura) by Comet assay and Micronucleus test. *Mutation Research* 680, 2-6.
- Zeljezic, D., Garaj-Vrhovac, V., Perkovic, P., 2006. Evaluation of DNA damage induced by atrazine and atrazine-based herbicide in human lymphocytes *in vitro* using a comet and DNA diffusion assay. *Toxicology In Vitro* 20, 923-935.