



Evaluación de los efectos genotóxicos del 2,4-D en *Piaractus mesopotamicus* mediante el test de aberraciones cromosómicas

Cowper-Coles, F.^{1*} ; Jorge, M.J.² ; Jorge, L.C.¹

¹Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Nordeste. Sargent Cabral N° 2139 - Corrientes, Corrientes, Argentina. ²Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura de la Universidad Nacional del Nordeste. 9 de Julio 1449 -Corrientes, Corrientes, Argentina.

frangenetica.vet@comunidad.unne.edu.ar

Resumen

El impacto del herbicida 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D) en los ecosistemas acuáticos y, particularmente, en la biología de los peces, ha sido escasamente documentado. En este estudio se evaluó el potencial efecto genotóxico del 2,4-D en *Piaractus mesopotamicus* mediante el análisis de aberraciones cromosómicas en células renales. Se realizaron dos ensayos con 2,4-D: en uno se utilizó el producto puro (P) y en el otro una formulación comercial, 2,4-D Amina Sumagro® (FC). En ambos ensayos, los peces se distribuyeron en un grupo control (C) y cinco grupos tratados (T1 = 1 ppm; T2 = 1,8 ppm; T3 = 3,2 ppm; T4 = 5,6 ppm y T5 = 10 ppm). Tras un período de exposición de 70 días, los ejemplares fueron sacrificados mediante sobredosis de clorhidrato de lidocaina, y se analizaron un total de 1.100 metafases mitóticas. Las aberraciones cromosómicas observadas incluyeron gaps y quiebras cromosómicas, adhesividad, endomitosis y pulverización. No se registraron diferencias significativas entre los grupos tratados y los controles. Sin embargo, al considerar conjuntamente las concentraciones equivalentes de las formulaciones pura y comercial, se observó una diferencia estadísticamente significativa a 10 ppm en comparación con los controles. Estos resultados sugieren que la exposición crónica a concentraciones subletrales de 2,4-D podría inducir alteraciones genotóxicas en *P. mesopotamicus*, especialmente a concentraciones elevadas. En consecuencia, se destaca la necesidad de fortalecer la vigilancia ambiental y la regulación del uso de herbicidas en sistemas agrícolas, con el fin de prevenir impactos adversos sobre la biota acuática.

Palabras clave: peces, pacú, ácido 2,4-diclorofenoxyacético, mutagenicidad, alteraciones cromosómicas.

Evaluation of the genotoxic effects of 2,4-D in *Piaractus mesopotamicus* using the chromosomal aberration test

Abstract. The impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on aquatic ecosystems and, particularly, on fish biology has been poorly documented. This study evaluated the potential genotoxic effect of 2,4-D on *Piaractus mesopotamicus* by analysing chromosomal aberrations in kidney cells. Two tests were conducted with 2,4-D: one using the pure product (P) and the other using a commercial formulation, 2,4-D Amina Sumagro® (FC). In both tests, the fish were divided into a control group (C) and five treated groups (T1 = 1 ppm; T2 = 1.8 ppm; T3 = 3.2 ppm; T4 = 5.6 ppm and T5 = 10 ppm). After a 70-day exposure period, the specimens were sacrificed by overdose of lidocaine hydrochloride, and a total of 1100 mitotic metaphases were analysed. The chromosomal aberrations observed included gaps and breaks, adhesivity, endomitosis and pulverisation. No significant differences were recorded between the treated groups and the controls. However, when considering the equivalent concentrations of the pure and commercial formulations together, a statistically significant difference was observed at 10 ppm compared to the controls. These results suggest that chronic exposure to sublethal concentrations of 2,4-D could induce genotoxic alterations in *P. mesopotamicus*, especially at high concentrations. Consequently, there is a need to strengthen environmental monitoring and regulation of herbicide use in agricultural systems in order to prevent adverse impacts on aquatic biota.

Key words: fish, pacu, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, mutagenicity, chromosomal alterations.

INTRODUCCIÓN

La intensificación de la agricultura ha incrementado la vulnerabilidad de los cultivos frente a las plagas. Prácticas como los cultivos múltiples por temporada, la reducción del barbecho y el establecimiento de monocultivos han favorecido la aparición y propagación de plagas, al reducir las barreras naturales que limitan su expansión (Reyes-Palomino y Cano Ccoa 2022). Como consecuencia, el ecosistema se ve inevitablemente afectado por el uso de plaguicidas, dada su toxicidad, persistencia y capacidad de bioacumulación.

El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es uno de los herbicidas sintéticos más antiguos, introducido en el mercado en la década de 1940. Actualmente, se encuentra entre los agroquímicos más utilizados a nivel mundial (Freisthler et al. 2022). Perteneció al grupo de los herbicidas fenoxi o fenoxiacéticos, también conocidos como clorofenólicos y se clasifica como “herbicida hormonal”, ya que actúa de forma análoga a la auxina natural ácido indol-3-acético (AIA) (Magnoli et al. 2020). Las concentraciones más elevadas de 2,4-D suelen detectarse en el suelo, el aire y las aguas superficiales cercanas a las áreas agrícolas, lo que genera la presencia de residuos relativamente altos y potencialmente peligrosos en el ambiente (Islam et al. 2018).

En Argentina, el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), mediante las resoluciones N.º 466/2019 y 875/2019, dispuso la baja automática, a partir del 25 de julio de 2021 de los productos formulados con 2,4-D en base a ésteres butílicos e isobutílicos del Registro Nacional de Terapéutica Vegetal. Asimismo, se prohibió su importación desde diciembre de 2019 y su producción y fraccionamiento local desde julio de 2020. Esta medida respondió a la alta volatilidad de dichas formulaciones, capaces de provocar daños por deriva en cultivos no objetivos, con consecuencias económicas y riesgos potenciales para la salud humana y el ambiente. Cabe señalar que la disposición no incluyó al 2,4-D en su formulación como sal dimetilamina, de menor volatilidad y, por tanto, menos propensa a generar efectos adversos (SENASA 2019).

Los organismos acuáticos son particularmente sensibles a la exposición a plaguicidas, y numerosos estudios han documentado su toxicidad tanto en exposiciones agudas como crónicas (Soto et al. 2020). Entre ellos, los peces han sido ampliamente utilizados como bioindicadores debido a su sensibilidad ante alteraciones ambientales, las cuales pueden manifestarse a distintos niveles biológicos, desde cambios celulares y enzimáticos hasta efectos poblacionales, generando posibles disfunciones fisiológicas que afecten la reproducción y, en consecuencia, la estructura trófica de la comunidad (Tagliaferro 2020).

Asimismo, órganos como las branquias, los riñones, el hígado y la piel son considerados blancos útiles para la evaluación de la contaminación ambiental, y su análisis resulta valioso como biomarcador de exposición (Palma Leotta 2022). Estudios experimentales en peces han demostrado que diversas sustancias pueden inducir daño genético (Paravani et al. 2024), mientras que otras no presentan efectos genotóxicos detectables (Belpaeme et al. 1996).

Debido a su sensibilidad y confiabilidad, la técnica de aberraciones cromosómicas se emplea como herramienta útil para detectar la presencia de xenobióticos en ambientes acuáticos. En este contexto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el posible efecto genotóxico del 2,4-D en juveniles de pacú (*Piaractus mesopotamicus*), mediante el análisis de la frecuencia de aberraciones cromosómicas en células renales. Para alcanzar dicho objetivo, se utilizaron dos formulaciones del herbicida: una pura (P) y otra comercial, 2,4-D Amina Sumagro®.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales. Ejemplares juveniles de *P. mesopotamicus* con $20 \pm 3,2$ g y $8 \pm 1,8$ cm (media \pm DE; n = 24) fueron proporcionados por el Instituto de Ictiología del Nordeste (INICNE, Corrientes, Argentina). Antes de iniciar los ensayos de exposición, los peces fueron aclimatados durante 30 días en estanques de 300 L con agua de pozo artesiano, a una temperatura de 20 °C, pH 7,0 y un fotoperíodo controlado de 12 h luz: 12 h oscuridad. Durante el período de aclimatación, los especímenes fueron alimentados cada 48 h y se realizaron controles periódicos de su estado sanitario y comportamiento.

Producto químico. Se emplearon dos formulaciones del herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D; $C_8H_6Cl_2O_3$): una formulación pura (P) y una formulación comercial, 2,4-D Amina Sumagro® (contenido: 58,4 g de sal amina del ácido 2,4-diclorofenoxiacético y compuestos inertes en cantidad suficiente para 100 cm³).

Ensayo de exposición *in vivo*. En los dos ensayos con 2,4-D, tanto en su forma pura (P) como con la formulación comercial (FC), los peces se dividieron en un grupo control (C; mantenido en agua de pozo artesiano) y cinco grupos tratados: T1 = 1 ppm, T2 = 1,8 ppm, T3 = 3,2 ppm, T4 = 5,6 ppm y T5 = 10 ppm. Cada experimento se desarrolló en seis acuarios de 20 L, con dos ejemplares por acuario. El volumen de agua se calculó considerando una relación de 1 L por cada centímetro de longitud corporal del pez, a fin de mantener condiciones adecuadas de bienestar y equilibrio ambiental.

Durante los períodos experimentales (70 días), se registraron las siguientes condiciones del agua: temperatura = $24,4 \pm 0,4$ °C; pH = $6,73 \pm 0,02$; oxígeno disuelto = 5 mg L⁻¹ y conductividad = 51 $\mu S\text{ cm}^{-1}$. Se observaron dos muertes atribuidas al canibalismo en los distintos tratamientos; sin embargo, el resto de los ejemplares mantuvo un comportamiento normal durante todo el ensayo.

Sacrificio y muestreo tisular. Finalizado el período de exposición, los peces fueron sacrificados mediante sobredosis de clorhidrato de lidocaína (100 ppm). Para el análisis citogenético se extrajeron las porciones anterior y posterior del riñón de cada ejemplar.

Los procedimientos metodológicos utilizados en este estudio se adecuaron a los criterios sugeridos por el Comité de Ética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Noroeste, protocolo N°: 0033.

Preparación cromosómica. La obtención de cromosomas mitóticos se realizó siguiendo la metodología de Foresti et al. (1993). Las aberraciones cromosómicas se identificaron de acuerdo con los criterios descriptivos propuestos por Savage (2004). Fueron analizados un total de 50 metafases por individuo.

Análisis estadístico. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, con un nivel de significancia de $\alpha = 0,05$. Los análisis se efectuaron utilizando el software InfoStat, versión 2020 (Di Rienzo et al. 2020).

RESULTADOS

Los ejemplares de *P. mesopotamicus* se distribuyeron en grupos control (C) y tratados (T), analizándose un total

de 1.100 metafases mitóticas para determinar la frecuencia de aberraciones cromosómicas (AC).

En el ensayo con 2,4-D puro (P) se evaluaron 100 metafases del grupo control y 450 del grupo tratado. En el control, el 96% de las metafases no presentó AC, mientras que el 4% mostró algún tipo de alteración cromosómica. En los grupos tratados, 399 metafases (89%) fueron normales y 51 (11%) presentaron AC.

En el ensayo con la formulación comercial 2,4-D Amina Sumagro® (FC) se analizaron 100 metafases en el grupo control y 450 en el tratado. En el control, el 97% de las metafases no presentó AC y el 3% evidenció alteraciones. En el grupo tratado, 396 metafases (88%) fueron normales y 54 (12%) mostraron aberraciones cromosómicas.

Las aberraciones observadas incluyeron *gaps*, fracturas, adhesividad cromosómica, endomitosis y pulverización (Figura 1).

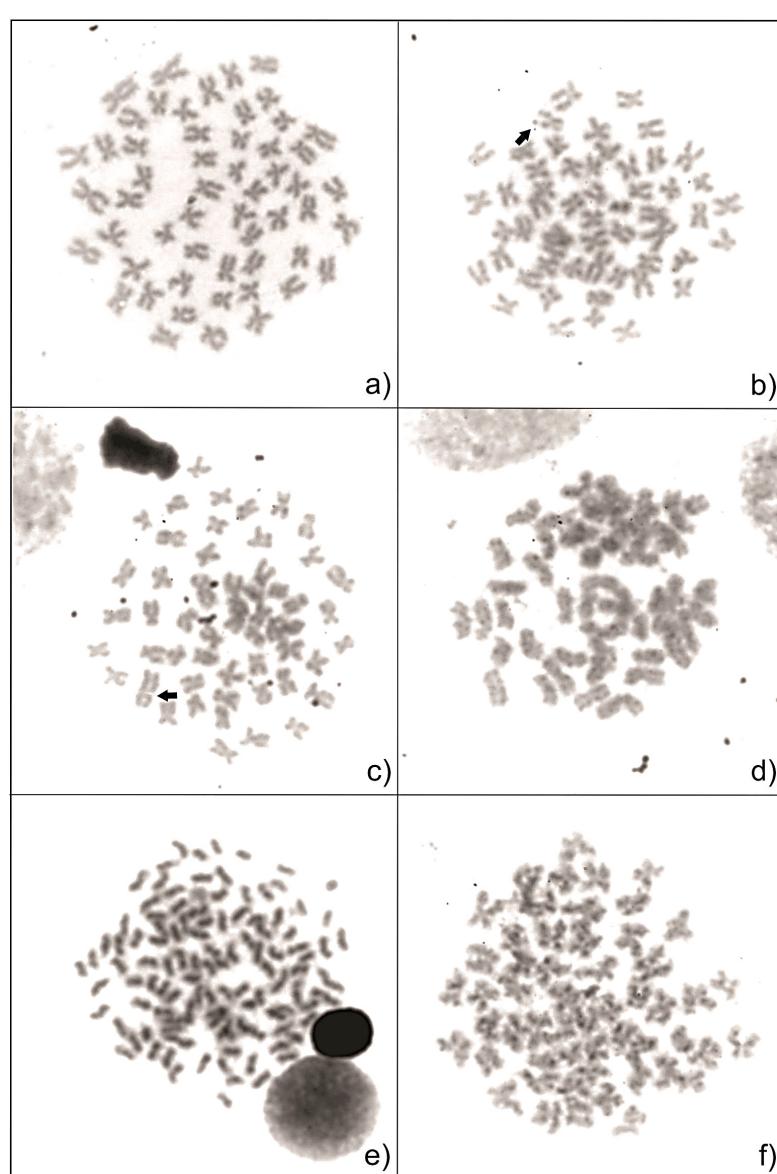


Figura 1. Micrografías de células mitóticas del riñón de *Piaractus mesopotamicus*. a) Metafase normal con cromosomas bien definidos. b) Gap cromosómico (indicado por flecha), observado como una discontinuidad sin separación completa. c) Quiebra cromosómica (flecha), con ruptura evidente en el brazo de un cromosoma. d) Adhesividad cromosómica, con cromosomas agrupados y sin individualización clara. e) Endomitosis: células con núcleos aumentados o con múltiples juegos cromosómicos. f) Pulverización cromosómica, con desorganización total de la estructura mitótica.

Al comparar cada concentración de 2,4-D con su respectivo control, tanto para la formulación pura como para la comercial, no se registraron diferencias

significativas entre los tratamientos individuales (Figuras 2 y 3). Asimismo, no se observaron diferencias entre las formulaciones P y FC (Figura 4).

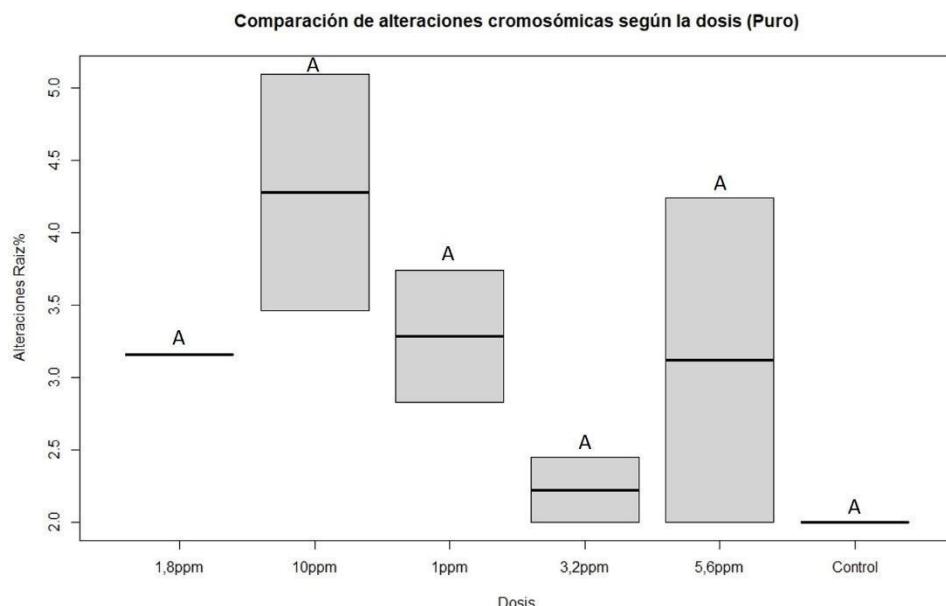


Figura 2. Frecuencia de alteraciones cromosómicas con 2,4-D puro. Las letras iguales representan semejanza estadística. Las letras diferentes evidencian diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$).

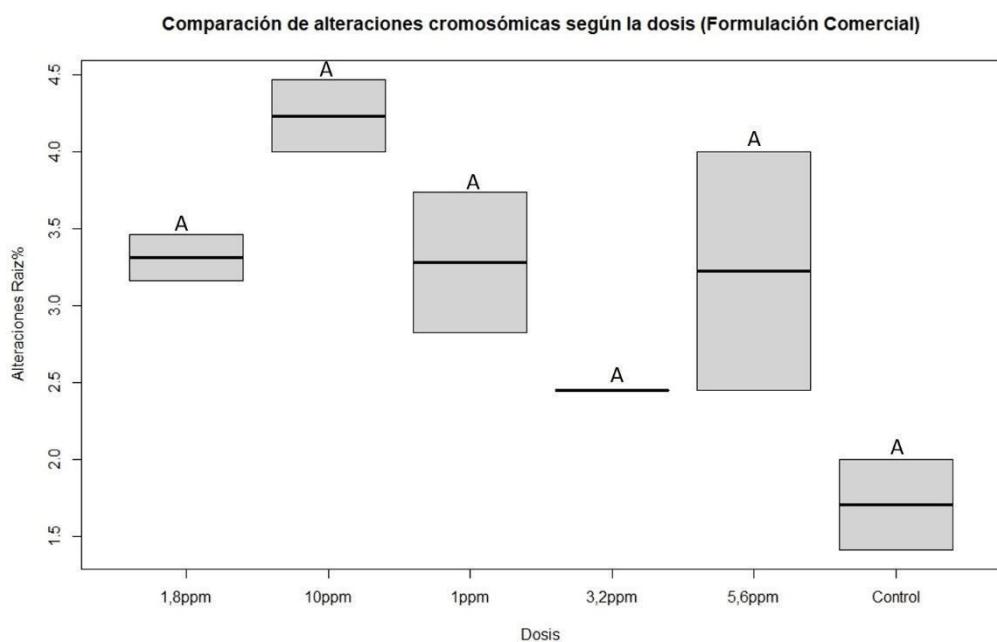


Figura 3. Frecuencia de alteraciones cromosómicas con 2,4-D en su formulación comercial. Las letras iguales representan semejanza estadística. Las letras diferentes evidencian diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$).

Sin embargo, al agrupar las concentraciones equivalentes de ambos ensayos, se determinó que las concentraciones de 1 ppm, 1,8 ppm, 3,2 ppm y 5,6 ppm no difirieron significativamente del control, mientras que la concentración de 10 ppm mostró una diferencia

estadísticamente significativa (Figura 5). Este resultado sugiere una posible relación dosis-dependiente entre la exposición al 2,4-D y la aparición de alteraciones cromosómicas en *P. mesopotamicus*.

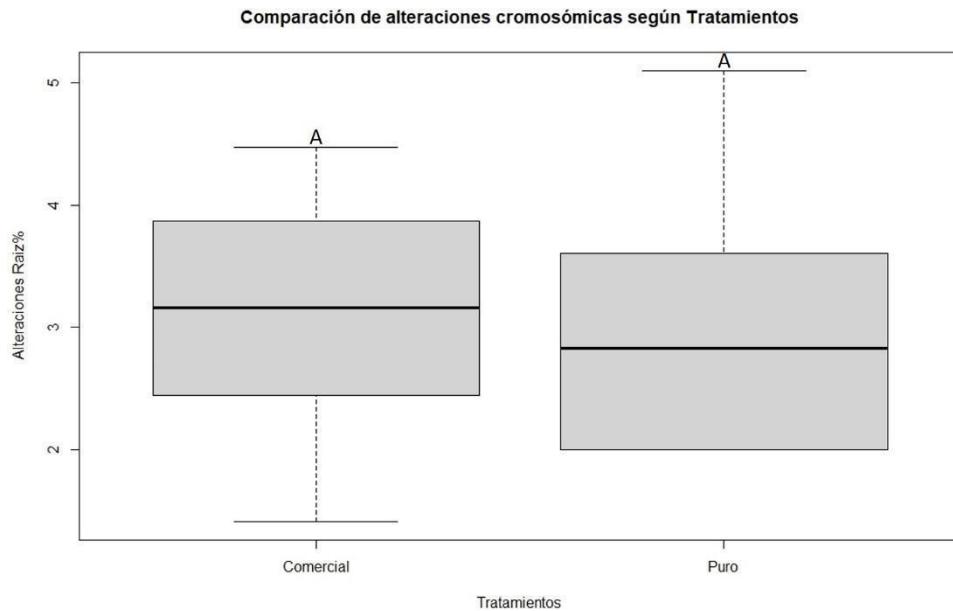


Figura 4. Frecuencia de alteraciones cromosómicas entre los tratamientos puro y formulación comercial. Las letras iguales representan semejanza estadística. Las letras diferentes evidencian diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$).

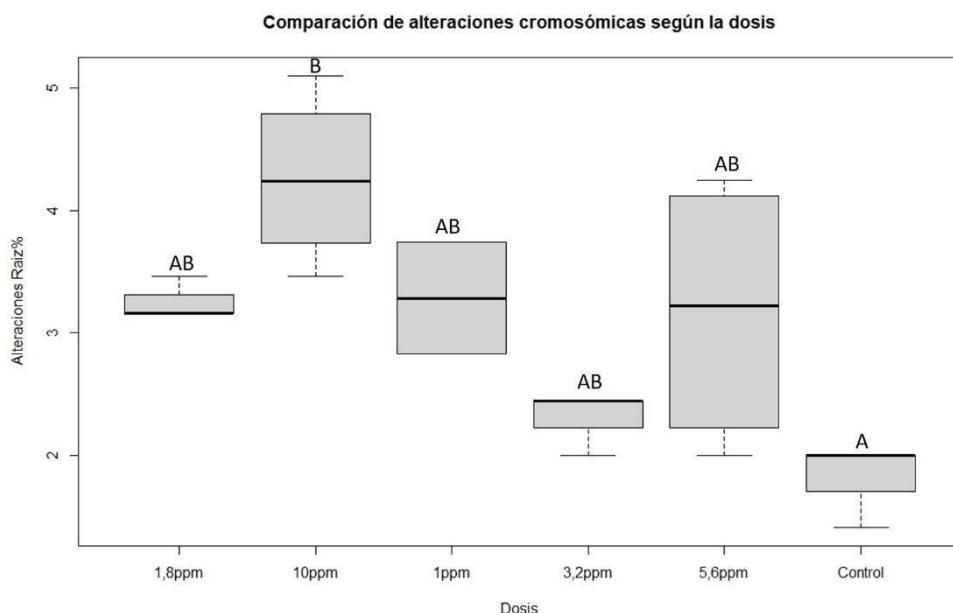


Figura 5. Frecuencia de alteraciones cromosómicas de los tratamientos puro y formulación comercial agrupados según las dosis empleadas. Las letras iguales representan semejanza estadística. Las letras diferentes evidencian diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$).

DISCUSIÓN

Considerando el impacto inmediato del herbicida 2,4-D sobre las especies acuáticas, resulta pertinente analizar su clasificación toxicológica según los organismos reguladores. De acuerdo con la Oficina del Programa de Pesticidas de la EPA, el 2,4-D se considera un compuesto de baja ecotoxicidad para peces (Borges et al. 2004). Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud lo clasifica como moderadamente peligroso (categoría II) (WHO 2019).

El 2,4-D es un herbicida de amplia utilización agrícola y de creciente relevancia ambiental, que ha demostrado efectos tóxicos tanto *in vitro* como *in vivo* (Laborde 2024). Estudios en larvas de pez cebra (*Danio rerio*) evidenciaron su capacidad para alterar la expresión génica y comprometer la integridad del ADN (Gaaied et al. 2022), destacando la necesidad de evaluar no solo los efectos agudos, sino también las posibles consecuencias genotóxicas a largo plazo en los ecosistemas acuáticos.

Los resultados del presente estudio mostraron que los ensayos con 2,4-D puro y con la formulación comercial (Sumagro®) presentaron frecuencias similares de aberraciones cromosómicas, sin diferencias significativas entre tratamientos. Las alteraciones observadas (gaps, fracturas, adhesividad, endomitosis y pulverización) coinciden con las reportadas en bioensayos con otros plaguicidas en distintas especies de peces. Rishi y Grewal (1995) reportaron en *Channa punctatus* expuestos a diclorvos la presencia de gaps, fracturas y adhesividad; Das y John (1999) observaron efectos similares en *Etroplus suratensis* tratados con metilparatión y fosfamidón; y Chandra y Khuda-Bukhsh (2004) describieron fracturas cromosómicas en *Oreochromis mossambicus* tras exposición a azadiractina. De manera análoga, Ramadan (2007) y Caramello et al. (2017) hallaron en *O. niloticus* y *Prochilodus lineatus*, respectivamente, un incremento significativo de alteraciones cromosómicas luego de la exposición a distintos herbicidas.

En cuanto a estudios específicos con 2,4-D en peces, la información disponible es escasa. Farah et al. (2006) fueron los primeros en evidenciar el potencial genotóxico del 2,4-D mediante el ensayo de aberraciones cromosómicas, observando fracturas y pulverización en *Channa punctatus* expuestos a 75 ppm del herbicida durante 48-96 h. A diferencia de dichos autores, en el presente trabajo sólo se registraron diferencias significativas a la dosis de 10 ppm cuando se agruparon los ensayos de 2,4-D puro y comercial, probablemente debido a las diferencias en dosis y tiempo de exposición.

Resultados similares fueron reportados por Zafra-Lemos et al. (2021) en *Astyanax lacustris*, quienes hallaron aberraciones cromosómicas significativas a concentraciones de 10-40 mg L⁻¹. La discrepancia entre los resultados de esos autores y los obtenidos en *Piaractus mesopotamicus* podría explicarse por la mayor duración de la exposición en el presente estudio, lo que permitiría mecanismos de reparación del ADN.

Según Valbuena et al. (2020), los plaguicidas pueden inducir lesiones en el ADN cuya naturaleza depende del tipo de compuesto, su concentración y el tiempo de exposición. Sin embargo, los estudios que cuantifican el tipo y frecuencia de aberraciones cromosómicas en peces expuestos a plaguicidas siguen siendo escasos. Aldana-Salazar et al. (2024) destacan que, además del estrés oxidativo y las alteraciones epigenéticas, polimorfismos genéticos en genes asociados con la reparación del ADN, el metabolismo de xenobióticos y el control del ciclo celular podrían influir en la susceptibilidad diferencial de las especies a estos compuestos.

Carriquiriborde (2021) señala que el daño genético inducido por sustancias genotóxicas resulta de su interacción directa con la molécula de ADN, generando lesiones como rupturas, fusiones, delecciones, amplificaciones o errores en la segregación cromosómica. En el caso del 2,4-D, si bien los mecanismos de acción aún no están completamente dilucidados, se ha propuesto que su efecto genotóxico podría estar asociado al estrés oxidativo derivado de la formación de radicales libres electrofílicos capaces de interactuar con el ADN (Farah et al. 2006, Mesnage et al. 2021).

En conclusión, los resultados obtenidos sugieren una posible relación dosis-respuesta entre la concentración del herbicida y la estabilidad cromosómica al considerar conjuntamente los tratamientos con 2,4-D puro y comercial. La ausencia de diferencias significativas entre tratamientos individuales podría deberse a variaciones en las concentraciones empleadas, el tiempo de exposición o una baja sensibilidad de *P. mesopotamicus* al 2,4-D.

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses relacionados con la realización de este estudio.

Contribución de los autores. CCF: realizó los experimentos, procesó los datos experimentales, realizó el análisis y redactó el artículo con la colaboración de todos los autores. JMJ: colaboró con el análisis formal de los datos. JLC: colaboró con las muestras.

Declaración de conflictos de intereses. Los autores declaran no tener conflictos de intereses financieros ni relaciones personales conocidas que pudieran haber influido en el trabajo presentado en este artículo.

Disponibilidad de datos. Los datos estarán disponibles previa solicitud.

ORCID

Cowper-Coles, F.  <https://orcid.org/0000-0001-6203-4933>
Jorge, M.J.  <https://orcid.org/0009-0004-1920-4772>
Jorge, L.C.  <https://orcid.org/0009-0001-2531-6787>

REFERENCIAS

1. Aldana-Salazar F, Rangel N, Rodríguez MJ, Baracaldo C, Martínez-Agüero M, Rondón-Lagos M. Chromosomal Damage, Chromosome Instability, and Polymorphisms in GSTP1 and XRCC1 as Biomarkers of Effect and Susceptibility in Farmers Exposed to Pesticides. *Int. J. Mol. Sci.* 2024; 25(8): 4167.
2. Belpaeme K, Delbeke K, Zhu L, Kirsch-Volders M. Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. *Mutagenesis*. 1996; 11(5):485-92.
3. Borges S, Dzubow C, Orrick G, Stavola A, Branch EF. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid analysis of risks to endangered and threatened salmon and steelhead. USEPA Environmental Field Branch Office of Pesticide Programs, USA. 2004. Disponible en: <https://19january2021snapshot.epa.gov/sites/static/files/2013-09/documents/24d-analysis.pdf>. Último acceso, 2024.
4. Caramello CS, Jorge MJ, Jorge NL, Jorge LC. Evaluación de los efectos del herbicida glifosato en el pez *Prochilodus lineatus* a través del test de aberración cromosómica. *Rev. Vet.* 2017; 28(1): 65-68.
5. Carriquiriborde P. Principios de Ecotoxicología. Libros de Cátedra. Ed de la UNLP. La Plata; 2021. p. 290.

6. Chandra P, Khuda-Bukhsh AR. Genotoxic effects of cadmium chloride and azadirachtin treated singly and in combination in fish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2004; 58 (2): 194-201.
7. Das P, John G. Induction of sister chromatid exchanges and chromosome aberrations in vivo in *Etroplus suratensis* (Bloch) following exposure to organophosphorus pesticides. *Toxicol Lett.* 1999; 104(1-2): 111-116.
8. Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. InfoStat versión 2020. Córdoba: Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponible en: <https://www.infostat.com.ar/index.php?mod=page&id=46>. Último acceso 2024.
9. Farah MA, Ateeq B, Ahmad W. Antimutagenic effect of neem leaves extract in freshwater fish, *Channa punctatus* evaluated by cytogenetic tests. *Sci. Total. Environ.* 2006; 364(1-3): 200-214.
10. Foresti F, Oliveira C, Foresti de Almeida-Toledo L. A method for chromosome preparations from large fish specimens using in vitro short-term treatment with colchicine. *Experientia.* 1993; 49: 810-813.
11. Freisthler MS, Robbins CR, Benbrook CM, Young HA, Haas DM, Winchester PD, Perry MJ. Association between increasing agricultural use of 2,4-D and population biomarkers of exposure: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey, 2001-2014. *Environmental Health.* 2022; 21(1): 23.
12. Gaaied S, Oliveira M, Barreto A, Zakhama A, Banni M. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) affects DNA integrity and retina structure in zebrafish larvae. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2022; 29(56): 85402-85412.
13. Islam F, Wang J, Farooq MA, Khan MSS, Xu L, Zhua J, Zhao M, Muñoz S, Li QX, Zhou W. Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. *Environ. Int.* 2018; 111: 332-351.
14. Laborde MR. Plaguicidas nanofuncionalizados de 2,4-D y lambdacialotrina: estudio de efectos cito-y genotóxicos y sus posibles mecanismos de acción en sistemas *in vitro* e *in vivo*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina. 2024. p. 263.
15. Magnoli K, Carranza CS, Aluffi ME, Magnoli CE, Barberis CL. Herbicides based on 2,4-D: its behavior in agricultural environments and microbial biodegradation aspects. A review. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2020; 27: 38501-38512.
16. Mesnage R, Brandsma I, Moelijker N, Zhang G, Antoniou MN. Genotoxicity evaluation of 2,4-D, dicamba and glyphosate alone or in combination with cell reporter assays for DNA damage, oxidative stress and unfolded protein response. *Food Chem. Toxicol.* 2021; 157: 112601.
17. Ministerio de Economía. Agricultura, Ganadería y Pesca. SENASA. Prohibiciones para el producto fitosanitario Ácido 2,4 Diclorofenoxiáctico. Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/noticias/prohibiciones-para-el-producto-fitosanitario-acido-24-diclorofenoxiacetico>. Último acceso 2025.
18. Palma Leotta ME. Los peces como indicadores de sanidad ambiental en sistemas acuáticos. *Divulgación Científica.* 2022; 1-3. Disponible en: https://www.colvetmza.com.ar/wp-content/uploads/2023/01/9-Palma-Leotta_-Los-peces-como....pdf. Último acceso, 2025.
19. Paravani EV., Acosta MG, Bianchi M, Battauz YS, Poletta GL, Sasal MC, Simoniello MF, Odetti LM, Querubín Pereyra PL, Roda RM. Estrés oxidativo y genotoxicidad en células branquiales de los peces cebra (*Danio rerio*) adultos sometidos a concentraciones ambientales de plaguicidas y mezclas complejas. *Cienc. Docencia Tecnol. Suplemento.* 2024; 14(16): 542-565.
20. Ramadan AA. Genotoxic effects of butataf herbicide on Nile Tilapia. *J. Arabian Aquac. Soc.* 2007; 2(1): 70-89.
21. Reyes-Palomino SE, Cano Ccoa DM. Efectos de la agricultura intensiva y el cambio climático sobre la biodiversidad. *Rev. Investig. Altoandin.* 2022; 24(1): 53-64.
22. Rishi KK, Grewal S. Chromosome aberration test for the insecticide, dichlorvos, on fish chromosomes. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 1995; 344(1-2): 1-4.
23. Savage JR. On the nature of visible chromosomal gaps and breaks. *Cytogenet Genome Res.* 2004; 104(1-4): 46-55.
24. Soto DA, Luque FA, Gnazzo V. Peces de consumo humano como indicadores de contaminación ambiental por plaguicidas en el norte de Misiones, Argentina. *Rev. Argent. Salud.* 2020; 11(42): 7-14.
25. Tagliaferro, M. Uso de peces y macrófitas como indicadores. En: La bioindicación en el monitoreo y evaluación de los sistemas fluviales de la Argentina: bases para el análisis de la integridad ecológica. Compilado por Domínguez E, Giorgi A, Gómez N. 1^a ed. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Eudeba, 2020 Libro digital, PDF. p 230-239.
26. Valbuena DS, Meléndez-Flórez MP, Villegas VE, Sánchez MC, Rondón-Lagos M. Daño celular y genético como determinantes de la toxicidad de los plaguicidas. *Cienc. Desarro.* 2020; 11(2): 25-42.
27. WHO. World Health Organization. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2019. Disponible en: <https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/36c193cd-2362-46d1-be00-fef570d80037/content>. Último acceso, 2023.
28. Zafra-Lemos L, Cusioli LF, Bergamasco R, Borin-Carvalho LA, de Brito Portela-Castro AL. Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of exposure to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in *Astyanax lacustris* (Pisces, Characidae) and the potential for its removal from contaminated water using a biosorbent. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 2021; 865: 503335.