BAG | Journal of Basic & Applied Genetics

Vol XXXVII (1); 19-27; Jan-July 2026

Journal of the Argentine Society of Genetics

RIESGO ECOTOXICOLÓGICO DE PLAGUICIDAS: RESPUESTAS GENOTÓXICAS Y BIOQUÍMICAS EN ESPECIES NATIVAS DE LA REGIÓN PAMPEANA

ECOTOXICOLOGICAL RISK OF PESTICIDES: GENOTOXIC AND BIOCHEMICAL RESPONSES IN NATIVE SPECIES OF THE PAMPEAN REGION

Ruiz de Arcaute C.[1,2], Laborde M. R. R.[1,2], Cardascia F.[1,3], Raffin Casanave M.[1,2], Pérez Ponce M.[1], Cabaleiro M.[1], Soloneski S.[1,2]

[1] Unidad de Genética Toxicológica y Ecotoxicología (GeToxE), Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, Calle 64 N° 3, B1904AMA La Plata, Argentina.

[2] Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires, Argentina.

[3] Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT), Buenos Aires, Argentina.

Corresponding author:
Dra. Sonia Soloneski
solonesk@fcnym.unlp.edu.ar

ORCID 0000-0001-5581-8748

Cite this article as:

Ruiz de Arcaute C., Laborde M. R. R., Cardascia F., Raffin Casanave M., Pérez Ponce M., Cabaleiro M., Soloneski S. 2026. ECOTOXICOLOGICAL RISK OF PESTICIDES: GENOTOXIC AND BIOCHEMICAL RESPONSES IN NATIVE SPECIES OF THE PAMPEAN REGION. BAG. Journal of Basic and Applied Genetics XXXVII (1): 19-27.

Received: 06/01/2026

Accepted: 07/27/2026

General Editor:
Guillermo Giovambattista

DOI: 10.35407/bag.2026.37.01.02

ISSN online version: 1852-6233

Available online at
www.sag.org.ar/jbag

RESUMEN

Los plaguicidas representan compuestos ubicuos que actúan como potentes contaminantes químicos ambientales. Su uso intensivo ocasiona diversas problemáticas asociadas a cambios en la biodiversidad, la contaminación ambiental, los efectos sobre la salud pública, y la degradación general del ambiente, agravada por los efectos del cambio climático. A continuación, presentamos un análisis integrado de datos basado en diversos resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo, en el que se describen algunos de los efectos ecotoxicológicos observados en especies nativas de peces y anfibios representativas de los ecosistemas acuáticos tras la exposición a formulaciones comerciales de plaguicidas en base a 2,4-D, lambdacialotrina (LCT) e imidacloprid (IMI), ampliamente utilizados en Argentina. Se evaluaron la genotoxicidad y las alteraciones del balance oxidante inducidas por el 2,4-D en ejemplares adultos del pez *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae) empleándose el formulado comercial DMA® (58,4 % 2,4-D) y el insecticida IMI contenido en la formulación comercial Punto 35® (30 % IMI). En larvas de *Rhinella arenarum* se evaluó el microformulado Karate® (25 % LCT) durante 48 y 96 h de exposición. Se emplearon la prueba de micronúcleos (MN) y el ensayo cometa (EC) así como variaciones en los niveles de catalasa (CAT), glutatión-S-transferasa (GST), glutatión reducido (GSH) y actividad acetilcolinesterasa (AChE). Los resultados obtenidos demuestran que los formulados comerciales ejercen efectos tóxicos significativos sobre las especies evaluadas, incluso a concentraciones relevantes para el ambiente. Se observó la inducción de daño genético, alteraciones del balance oxidante y, en algunos casos, efectos neurotóxicos. Estos hallazgos confirman y amplían la evidencia existente acerca de los efectos adversos de los plaguicidas ampliamente utilizados en la agricultura moderna, resaltando que los organismos no blanco pueden verse significativamente afectados aun cuando dichos productos sean considerados seguros bajo las condiciones de uso recomendadas.

Palabras clave: Alteraciones del balance oxidante, Genotoxicidad, Formulaciones comerciales, Organismos acuáticos, Plaguicidas

ABSTRACT

Pesticides are ubiquitous compounds that act as potent environmental chemical pollutants. Their intensive use leads to several problems associated with changes in biodiversity, environmental pollution, public health impacts, and general environmental degradation, a situation exacerbated by the effects of climate change. Here, we present an integrated data analysis derived from several studies conducted by our research group, describing some of the ecotoxicological effects observed in native fish and amphibian species, representative of aquatic ecosystems, following exposure to commercial pesticide formulations based on 2,4-D, lambda-cyhalothrin (LCT), and imidacloprid (IMI), all of which are widely used in Argentina. We evaluated both genotoxicity and alterations in oxidative balance induced by 2,4-D in adult specimens of the fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces, Poeciliidae) using the commercial formulation DMA® (58.4% 2,4-D), and by the insecticide IMI contained in the commercial formulation Punto 35® (30% IMI). In *Rhinella arenarum* larvae, the microformulation Karate® (25% LCT) was evaluated over exposure periods of 48 and 96 h. The employed methodologies included the micronucleus (MN) test and the comet assay (EC), as well as the measurement of catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), and reduced glutathione (GSH) levels, together with acetylcholinesterase (AChE) activity. The results demonstrate that the commercial formulations exert significant toxic effects on the evaluated species, even at environmentally relevant concentrations. The induction of genetic damage, alterations in oxidative balance, and, in some cases, neurotoxic effects were observed. These findings confirm and expand upon existing evidence regarding the adverse effects of pesticides widely employed in modern agriculture, highlighting that non-target organisms can be significantly affected even when such products are considered safe under recommended conditions of use.

Key words: Oxidative balance alterations, Genotoxicity, Commercial formulations, Aquatic organisms, Pesticides

INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas se utilizan ampliamente en la agricultura moderna y constituyen una forma eficaz y económica de mejorar la calidad y cantidad de los rendimientos, garantizando así la seguridad alimentaria de la población mundial en crecimiento. Si bien el empleo generalizado de plaguicidas en diversas prácticas agronómicas tiene una historia extensa, los problemas derivados de su uso aparecen con claridad en el siglo XX, cuando cambia la escala de aplicación y se desarrollan nuevas composiciones químicas de marcada efectividad en el tratamiento de cultivos. Como consecuencia, aparecen problemáticas asociadas con la contaminación del ambiente, en especial en los reservorios de agua dulce [1]. No obstante, estos impactos no se limitan al medio acuático, sino que también afectan a otros compartimentos ecosistémicos, como el suelo a través de procesos de acumulación y persistencia, y el aire, mediante procesos de deriva y volatilización [1]. Muchos plaguicidas son altamente persistentes y sus residuos afectan notoriamente a la biota, lo que constituye una de las amenazas ambientales más preocupantes, perturbando en gran medida la dinámica de los ecosistemas. Asimismo, los riesgos para la salud se vuelven más preocupantes ya que se reportan intoxicaciones agudas frecuentes, efectos crónicos como el desarrollo de cáncer, neurotoxicidad, alteraciones endócrinas e inmunosupresión y problemas asociados con bioacumulación en la cadena alimentaria, entre los efectos mayormente descritos [2].

El uso de plaguicidas en países emergentes, como Argentina y Brasil, se caracteriza por una combinación de expansión agrícola, intensificación productiva y marcos regulatorios desiguales, lo que explica tanto su crecimiento sostenido como los riesgos asociados a estas prácticas [3]. En países con economías en desarrollo, el uso indiscriminado de plaguicidas está condicionado por la falta de regulación efectiva y por las limitaciones en el acceso a las buenas prácticas agrícolas favoreciendo aplicaciones inadecuadas tanto en términos de dosis como de frecuencia. Diversos estudios demuestran que estas prácticas contribuyen a la degradación de los ecosistemas, particularmente a través de la contaminación del agua, suelo y aire, afectando tanto a la biodiversidad como a la salud humana [4].

En la actualidad, tanto en estudios epidemiológicos como en investigaciones de genotoxicidad experimental, existe un creciente interés en la identificación de biomarcadores que permitan evaluar la exposición activa y/o pasiva a contaminantes ambientales. En este contexto, se han desarrollado diversos biomarcadores de efecto capaces de detectar alteraciones a nivel celular y molecular, incluso a concentraciones bajas, muchas de ellas ambientalmente relevantes. Entre los biomarcadores más utilizados se destacan la estimación de la frecuencia de micronúcleos (MN), ampliamente validada para la detección de daño cromosómico originado a partir de eventos clastogénicos y/o aneugénicos; y el ensayo cometa (EC) en su versión alcalina, que permite cuantificar rupturas primarias en la molécula de ADN a nivel tanto de cadena sencilla como doble, constituyéndose en una herramienta altamente sensible para la detección temprana de eventos genotóxicos [5, 6]. Además, la incorporación de enzimas de reparación específicas, como la formamidopirimidina ADN-glicosilasa (Fpg) y la endonucleasa III (Endo III), han permitido adaptar el EC para la detección de oxidaciones introducidas en la molécula de ADN. Fpg es una enzima bifuncional que detecta y remueve purinas oxidadas tales como Fapy-guanina, Fapy-adenina y 8-oxoguanina, además de purinas de anillo abierto [7]; Endo III posee actividad N-glicosilasa y AP-liasa que reconoce y escinde pirimidinas oxidadas generando un sitio apurínico/apirimídico, que posteriormente es escindido mediante su actividad AP-liasa. Esta adaptación se ha empleado en estudios de índole mecanística, para evaluar la participación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en los procesos de toxicidad [8], en ensayos *in vivo* como *in vitro,* con el fin de determinar el potencial oxidante de múltiples xenobióticos [9]; asimismo se ha utilizado en biomonitoreo ambiental y humano, en estudios ecotoxicológicos [10] [11, 12] y también para evaluar el efecto protector que pueden presentar determinadas sustancias contra el daño oxidante celular [13]. De manera complementaria, la evaluación de biomarcadores del sistema antioxidante —como la actividad de la catalasa (CAT), la glutatión S-transferasa (GST) y los niveles del glutatión reducido (GSH)— resultan cruciales para interpretar los posibles mecanismos subyacentes de los xenobióticos que afectan el balance oxidante [14]. En conjunto, la integración de estos biomarcadores permite una evaluación más robusta de los efectos biológicos asociados a la exposición a compuestos tóxicos, aportando evidencia complementaria tanto sobre la inducción de daño genético como sobre las respuestas fisiológicas desencadenadas en los organismos expuestos.

En Argentina, la aplicación de agroquímicos se ha elevado significativamente, pasando de 38 millones de L en la década de 1990 a más de 500 millones de L en 2022 [15], lo que representa un incremento de aproximadamente 1216 % o, dicho de otro modo, un incremento de más de 13 veces en el volumen total utilizado. Además, a nivel mundial, nuestro país se encuentra entre los que presentan los mayores niveles de aplicación de plaguicidas para el control de diversos tipos de plagas [16]. En todo el mundo durante el mismo periodo, del total de plaguicidas comercializados, la mayor proporción correspondió a los herbicidas (64 %), seguidos por los fungicidas (20 %) y por los insecticidas (16 %) [16]. En el caso de Argentina, el mercado de plaguicidas está dominado principalmente por el consumo de herbicidas (86,8 %), siendo los más utilizados el glifosato, el 2,4-D

y la atrazina; les siguen los insecticidas (6,2 %), entre los que predominan la cipermetrina, el clorpirifos y la lambdacialotrina, y, finalmente los fungicidas (2,7 %), incluyendo el epoxiconazol, el tebuconazol y el metconazol [17].

En agricultura, los plaguicidas no se utilizan como un ingrediente activo único y aislado, sino como parte de una formulación comercial que, en la mayoría de los casos, implica una composición química más compleja debido a la presencia de diversos componentes adicionales. El ingrediente activo es el agente químico que previene, repele, destruye o mitiga una plaga, o que funciona en plantas como un regulador, desecante, defoliante estabilizador de nitrógeno, o que actúa como sinergista [18]. Además del componente activo, los productos formulados contienen diferentes disolventes y co-adyuvantes que favorecen su vehiculización y/o absorción para que su aplicación sea correcta, segura y efectiva [18]. La manera de aplicar correctamente cada tipo de plaguicida cumple un papel específico dentro de las estrategias de manejo de plagas, así como la selección del método apropiado depende del tipo de plaga, del ambiente y del resultado deseado del tratamiento [18]. Comprender estas formas de aplicación permite diseñar estrategias seguras y eficaces de control, al mismo tiempo que se minimizan los riesgos potenciales tanto sobre organismos no blanco como los impactos sobre el ambiente [18]. A pesar de que muchas de las formulaciones actuales son consideradas seguras para los organismos a los cuales no están destinados, existe evidencia experimental abundante que demuestra que diversos tipos de residuos de plaguicidas pueden tener impactos perjudiciales tanto de manera aguda como crónica sobre la salud humana y animal, así como sobre la estabilidad de los ecosistemas [19]. La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (U.S. EPA) [19] afirma que la toxicidad de un principio activo (p. a.) puede diferir significativamente de la del producto formulado, ya que las distintas formulaciones que contienen dicho p. a. pueden presentar coadyuvantes con propiedades específicas muy diferentes. Numerosos estudios han demostrado que la toxicidad de estos compuestos, considerados inertes, pueden presentar una mayor toxicidad que la del p. a. por sí solo [20-25]. Por lo tanto, una correcta evaluación del riesgo de exposición ante un agroquímico debe considerar los posibles efectos tóxicos aditivos provocados por la presencia de los excipientes como parte de las formulaciones comerciales. Así, tanto los trabajadores como los organismos no blanco, están expuestos a la acción simultánea del p. a. y a una variedad de otros productos químicos incluidos en su formulado.

El herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) se caracteriza por ser un compuesto cristalino de color blanco, peso molecular de 221,0 g/mol y de fórmula empírica $C_8H_6Cl_2O_3$. Su fórmula estructural se muestra en la Fig. 1.

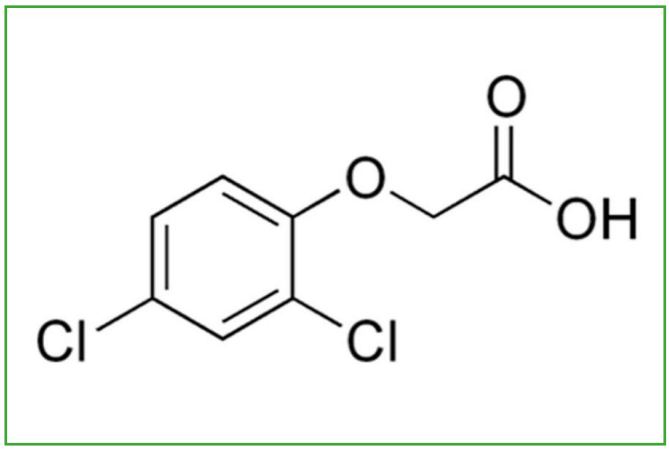


Figura 1. Estructura química del herbicida 2,4-D (tomado de PubChem).

Es un herbicida sistémico pre- y post-emergente y fue el primer herbicida selectivo comercializado desde 1946. Debido a su amplia selectividad y bajo costo es uno de los plaguicidas más utilizados en todo el mundo para el control selectivo de malezas de hoja ancha en áreas tales como agricultura, silvicultura, control de malezas en zonas urbanas y periurbanas, ecosistemas acuáticos, entre otros. Existen a nivel mundial cerca de 600 productos comerciales disponibles en el mercado que contienen 2,4-D como ingrediente activo ya sea de manera única o en forma de mezclas con otros p.a. [26, 27]. En nuestro país, y de acuerdo a SENASA, se comercializan alrededor de 341 formulaciones que contienen 2,4-D con una demanda anual estable de alrededor de 20 millones de L de formulaciones con base en este auxínico desde 2014 [28]. Cabe mencionar que, entre 2013 y 2015 el 2,4-D ocupó el tercer lugar entre los agroquímicos con mayor demanda en Argentina.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) lo ha clasificado de acuerdo a su toxicidad aguda como un compuesto perteneciente a la Clase II (moderadamente peligroso) [2] y U.S. EPA [29] dentro de las Categorías II-III (ligeramente/moderadamente tóxico). Por su parte, la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) lo clasifica como un compuesto perteneciente al Grupo 2B, es decir, como un agente posiblemente carcinógenico para los seres humanos [30]. En cuanto a la información toxicológica sobre el 2,4-D, la misma es amplia y ha sido estudiada en numerosos tipos de organismos, incluyendo la evaluación de riesgo para la salud humana y el ambiente [30]. Existen diversos niveles guía de uso de 2,4-D reportados en la bibliografía por distintas instituciones reguladoras. Así, los niveles guía para el agua de consumo establecidos por la OMS [31] proponen un valor máximo de 30 µg/L. Sin embargo, el límite guía de 2,4-D establecido por la Unión Europea para el agua de consumo es de 0,1 µg/L, valor muy por debajo del límite reportado por la OMS [32].

El insecticida lambdacialotrina (LCT) es un piretroide sintético de amplio espectro que pertenece a la familia de los agentes químicos de cuarta generación, caracterizados por su alta especificidad y baja toxicidad para los organismos a los que no están dirigidos. Tiene acción tanto insecticida como acaricida, de tipo II y actúa por contacto dérmico y ocular (Fig. 2). Se emplea en agricultura principalmente para el control de larvas de Lepidóptera, pero también presenta actividad ovicida y adulticida. Además, se usa en el control de áfidos, escarabajos y coleópteros, entre otros insectos.

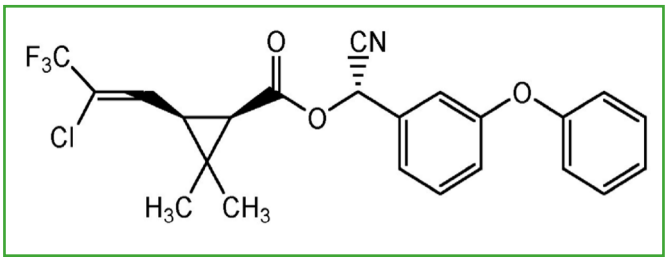


Figura 2. Estructura química del insecticida piretroide lambdacialotrina (tomado de PubChem).

Este piretroide es aplicado en una amplia variedad de cultivos agrícolas tales como alfalfa, algodón, girasol, maíz, soja, sorgo granífero, tabaco y trigo; en el ámbito hortícola, es muy usado en cultivos de papa, berenjenas y tomate, entre otros. Por su parte, posee uso recomendado para plantaciones de frutales de carozo y pepita que incluyen durazno, manzana y pera y para el tratamiento de plagas en plantaciones de nogales, pistachos y cítricos [28]. También se emplea en áreas urbanas y recreativas para el control de blatoideos y culícidos, entre otros insectos. LCT es el segundo piretroide más empleado a nivel mundial después de la deltametrina. Su reporte inicial de uso fue realizado por Robson y Crosby en 1984. Un año más tarde, en 1985, fue introducido en América Central y el Lejano Oriente por la compañía multinacional Syngenta AG y en 1988 fue registrado por la U.S. EPA como plaguicida [33, 34]. En Argentina, de los 1293 formulados con acción insecticida registrados, 217 contienen LCT como p. a., ya sea solo o en combinación con otros p. a. [28]. De estos formulados, cuatro pertenecen a la categoría toxicológica Ib (altamente peligroso), 163 a la categoría II (moderadamente peligroso), 47 a la categoría III (ligeramente peligroso) y tres a la categoría IV (productos que no ofrecen peligro), acorde con los criterios de clasificación y etiquetado de productos fitosanitarios establecidos por el SENASA [28].

De acuerdo a su toxicidad aguda, la OMS ha clasificado a LCT, como un compuesto perteneciente a la Clase II (moderadamente peligroso) [2], mientras que la US. EPA la ha catalogado como un compuesto probablemente no carcinogénico para los seres humanos con base en estudios llevados a cabo en roedores [27]. En relación con las concentraciones de LCT encontradas en el ambiente, en cuencas agrícolas de California (EE.UU.) se reportaron valores entre 0,11–0,14 µg/L [34] y para Argentina, en estudios realizados en el arroyo Carnaval (Pcia. de Buenos Aires), valores entre 0,004 y 0,010 µg/L [35] y entre 53,1 y 1790,8 µg/Kg en sedimentos recolectados del mismo arroyo [35].

El insecticida imidacloprid (IMI) es un compuesto de acción sistémica perteneciente al grupo de los neonicotinoides, ampliamente utilizado en agricultura para el control de insectos plaga en diversos cultivos. Su nombre químico es 1-(6-cloro-3-piridilmetil)-N-nitroimidazolidin-2-ilidenamina y su estructura química es muestra en la Fig. 3. Fue desarrollado a finales de la década de 1980 y su modo de acción se asocia con su toxicidad sobre el sistema nervioso central de los insectos mediante la unión a los receptores nicotínicos de acetilcolina, provocando hiperexcitación, parálisis y muerte [36]. Debido a su elevada eficacia, persistencia y acción sistémica, IMI ha sido ampliamente usado en tratamientos foliares, de semillas y de suelo [28]. Se utiliza para el control de insectos succionadores y es efectivo en insectos del suelo, termitas y especies de insectos masticadores como las orugas defoliadoras [28]. Sin embargo, numerosos estudios han demostrado que puede generar efectos adversos sobre organismos no blanco, especialmente polinizadores y otros insectos benéficos, y en peces y organismos acuáticos [36]. Particularmente para aves, es considerado el más tóxico dentro de los insecticidas neonicotinoides. Asimismo, se ha reportado su presencia en agua, suelo y sedimentos, evidenciando su potencial impacto ambiental [36]. Diversas investigaciones han asociado la exposición a IMI con efectos tóxicos a nivel celular y molecular, incluyendo estrés oxidante, alteraciones enzimáticas, daño genético, entre otros [36]. Además, se han observado trastornos durante el desarrollo y modificaciones en el comportamiento de distintas especies animales [37]. Debido a estas preocupaciones ambientales y toxicológicas, su uso ha sido restringido o reevaluado en varios países en los últimos años.

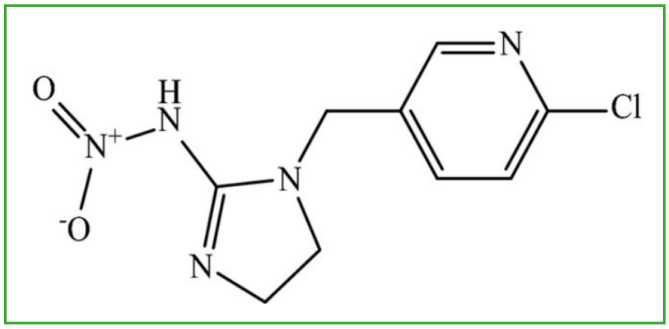


Figura 3. Estructura química del insecticida imidacloprid (tomado de PubChem).

En nuestro país y de acuerdo a SENASA, se comercializan alrededor de 229 formulaciones que contienen IMI como ingrediente activo, ya sea solo o en combinación con otros p. a. [28]. De estos formulados, dos pertenecen a la categoría toxicológica Ib (altamente peligroso), 154 a la categoría II (moderadamente peligroso), 64 a la categoría III (levemente peligroso) y nueve a la categoría IV (productos que no ofrecen peligro), de acuerdo con los criterios de clasificación y etiquetado de productos fitosanitarios establecidos por el SENASA [28]. Respecto a su toxicidad aguda, la OMS ha clasificado a IMI como un compuesto perteneciente a la Clase II (moderadamente peligroso) [2], mientras que la US. EPA lo ha catalogado como probablemente no carcinogénico para los seres humanos con base en estudios llevados a cabo en roedores [37]. En Argentina, el insecticida IMI ha sido detectado en aguas superficiales de uso mixto (agrícolas y no agrícolas) de la pampa húmeda en concentraciones que oscilan entre 0,003 y 1,5 µg/L [38].

A continuación, presentamos un análisis integrado de datos basados en diversos resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo. El interrogante central que orientó este estudio fue evaluar si algunas de las formulaciones comerciales de plaguicidas más utilizadas en Argentina, basadas en 2,4-D, LCT e IMI, a concentraciones ambientalmente relevantes, inducen daño genético, alteraciones del balance oxidante y efectos neurotóxicos en especies nativas de peces y anfibios representativas de los ecosistemas acuáticos pampeanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Compuestos químicos

Para los estudios se emplearon las siguientes formulaciones: a) herbicida 2,4-D (CAS 94-75-7): formulado comercial DMA® (58,4% 2,4-D, Dow AgroSciences Argentina S.A. Buenos Aires, Argentina); b) insecticida lambdacialotrina (CAS 91465-08-6): microformulado comercial Karate® (25% LCT, Syngenta Agro S.A., Buenos Aires, Argentina); y c) insecticida imidacloprid (CAS 138261-41-3): formulación comercial Punto 35® (30% IMI, Gleba S.A., Buenos Aires, Argentina). Mientras que, Endo III y Fpg fueron adquiridas en New England Biolabs® Inc. (Ipswich, MA), los demás compuestos utilizados fueron adquiridos en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE.UU.).

2. Modelos experimentales

Ejemplares adultos de *C. decemmaculatus* (Jenyns, 1842, Pisces: Poeciliidae) y puestas de *R. arenarum* (Anura: Bufonidae) en estadio de Gosner 9 [39], fueron recolectados en el arroyo San Juan (Parque Provincial Pereyra Iraola, Reserva de la Biósfera, UNESCO, Berazategui, Buenos Aires, Argentina). Los organismos fueron trasladados al laboratorio y aclimatados durante al menos 30 días en acuarios con agua de red declorinada, fotoperiodo 16:8 h luz/oscuridad, temperatura 22 °C y aireación artificial. Los peces y las larvas fueron alimentados diariamente con escamas para peces (TetraFin®, TetraWerke, Melle, Alemania) y hojas de lechuga (*Lactuca sativa*), respectivamente. *R. arenarum* se mantuvo en el laboratorio hasta alcanzar el estadio de Gosner 37 ± 2 [39]. Los parámetros físicos y químicos del agua utilizada en los ensayos fueron: pH 7,5 ± 0,1; oxígeno disuelto 6,3 ± 0,3 mg/L; conductividad 994 ± 8,5 µS/cm, y dureza del agua 143 ± 23,5 mg CaCO3/L.

3. Tratamientos con los agroquímicos

Los tratamientos agudos fueron realizados de manera continua (48 y 96 h) y siguiendo métodos estandarizados propuestos por la U.S. EPA [40, 41], con modificaciones menores establecidas por nuestro grupo de investigación [20, 42]. Mientras que, los peces fueron expuestos a concentraciones de 252, 504 y 756 mg/L de 2,4-D contenido en el formulado DMA®, durante 48 y de 96 h y de 0,175; 0,35 y 1 mg/L de IMI contenido en el formulado Punto 35® durante 96 h; los anfibios fueron tratados con una concentración ambiental de 0,1 µg/L de LCT en el microformulado Karate® durante 48 y 96 h de exposición. Luego de los tratamientos, el sacrificio de los ejemplares se realizó siguiendo los criterios de la Sociedad Americana de Ictiólogos y Herpetólogos [43]. A fin de minimizar el sufrimiento, los ejemplares fueron adormecidos por inmersión en agua helada (2-4°C) [43]. De cada ejemplar, se obtuvo 20 µl de sangre mediante un corte transversal por detrás del opérculo. La sangre fue diluida en 1 ml de PBS, centrifugada (2000 rpm, 9 min) y luego usada en los ensayos de genotoxicidad. El resto del ejemplar se congeló para ser usado en la determinación de los biomarcadores enzimáticos y no enzimáticos y de neurotoxicidad. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y en simultáneo para cada punto experimental.

4. Ensayos de genotoxicidad

Ensayo Cometa (EC)

Se utilizó la variante alcalina del EC descripta por Singh et al. [44] con modificaciones menores establecidas por nuestro grupo de investigación [20, 42]. Luego del procesamiento y coloración, se analizaron 100 nucleoides en un microscopio Olympus BX50 equipado con los filtros adecuados y se estimó el índice de daño genético [45]. Los niveles de daño oxidativo en el ADN se cuantificaron empleando la variante alcalina del EC modifica-

do con endonucleasas de restricción, según lo descripto por Collins et al. [46] y Guilherme et al. [47], con algunas modificaciones menores establecidas por nuestro grupo de investigación [10].

Análisis de las frecuencias de MN y de otras anormalidades nucleares

Se determinó en eritrocitos circulantes luego de 96 h de tratamiento y siguiendo recomendaciones previamente propuestas [45]. Se analizaron 1500 eritrocitos por cada ejemplar y los datos fueron expresados como el número total de MN/1000 células analizadas. La identificación de los MN y de otras anormalidades nucleares se realizó siguiendo los criterios reportados previamente [5, 20, 42, 45].

5. Biomarcadores enzimáticos, no enzimáticos y de neurotoxicidad

Al momento de realizar la medición, las muestras fueron descongeladas, pesadas y los siguientes biomarcadores enzimáticos fueron determinados: a) catalasa (CAT, EC1.11.1.6) fue medida siguiendo el método propuesto por Baudhuin et al. [48]; b) glutatión-S-transferasa (GST, EC2.5.1.18) fue determinada siguiendo el protocolo propuesto por Habig et al. [49]; c) glutatión (GSH) fue determinado utilizando el método descrito por Ellman [50] y d) el contenido de proteínas en tejido (PT) fue determinado de acuerdo a Lowry et al. [51] usando albúmina de suero bovino como estándar. La determinación de AChE fue realizada según el método de Ellman et al. [50].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los estudios llevados a cabo por nuestro grupo de trabajo evaluaron la toxicidad aguda del herbicida 2,4-D en ejemplares adultos del pequeño pez neotropical *C. decemmaculatus* y que forma parte de la ictiofauna habitual de la región pampeana. Los ejemplares fueron expuestos al formulado comercial DMA® basado en la sal dimetilamina del 2,4-D. Se trata de un herbicida de uso extendido en la agricultura, empleado para el control de malezas en cultivos de relevancia económica como trigo, maíz, sorgo, caña de azúcar, así como en pasturas y sistemas forrajeros. Los resultados mostraron que DMA® resultó moderadamente tóxico para *C. decemmaculatus* con una CL50 96 h = 1.008 mg/L [42]. Para los ensayos de genotoxicidad se emplearon concentraciones en un rango comprendido entre 252-756 mg/L de 2,4-D. Los resultados mostraron un incremento significativo de la frecuencia de MN, de otras anormalidades nucleares al igual que la inducción significativa de daño primario en el ADN [42]. En relación a los resultados del EC, se observó un aumento significativo con respecto a los valores control en el porcentaje de nucleoides dañados y en el índice de daño genético (IDG) para el formulado en base a 2,4-D en el rango de concentraciones de 252-756 mg/L, luego de 48 y de 96 h de exposición. Posteriormente, se empleó la modificación del EC con enzimas de restricción por tratamiento con endonucleasas Endo III y Fpg, enzimas que detectan oxidación de bases pirimidínicas y púricas, respectivamente. El EC modificado con enzimas de restricción puso en evidencia que las células de los peces que recibieron un post-tratamiento con la enzima Fpg mostraron un aumento significativo del daño oxidante neto, revelando que 2,4-D ejerce efecto en el ADN mediante la oxidación de purinas [52]. Por otro lado, las muestras que recibieron el post tratamiento con Endo III no evidenciaron diferencias significativas respecto al grupo control [52]. Por otra parte, se evaluó la posible respuesta antioxidante inducida por 2,4-D empleando biomarcadores enzimáticos y no enzimáticos como la detección de variaciones en los niveles de CAT, GST y GSH al igual que la actividad AChE. Los resultados evidenciaron que las actividades de CAT y GST aumentaron significativamente con respecto a valores control luego de 48 y 96 h de exposición [52]. Por su parte, la actividad de GSH mostró una disminución significativa únicamente al cabo de 96 h de exposición con el formulado 2,4-D. Adicionalmente, los niveles de AChE, como biomarcador de neurotoxicidad, revelaron una reducción significativa a las 96 h de exposición, pero no en tratamientos de 48 h [52].

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que el formulado comercial DMA® basado en 2,4-D ejerce una toxicidad aguda significativa sobre ejemplares adultos de *C. decemmaculatus*, evidenciada por la inducción de daño genético, estrés oxidante y alteraciones neurotóxicas. Estos resultados confirman la evidencia previa que existe sobre los efectos adversos del 2,4-D y destacan la necesidad de controlar tanto el uso intensivo como aplicabilidad del mismo como parte de estrategias de control y monitoreo de su utilización. Nuestros resultados destacan los efectos perjudiciales que experimentan los organismos no blanco, aun cuando estos productos son considerados seguros bajo las condiciones de uso recomendadas por las empresas que los comercializan.

Por otra parte, se evaluó la toxicidad aguda del piretroide LCT en larvas premetamórficas de *R. arenarum* de amplia distribución en Sudamérica. Estos anfibios son organismos que presentan un ciclo de vida bifásico en el cual huevos y larvas dependen del medio acuático y posteriormente, continúan su desarrollo en el medio terrestre [53]. Las larvas en el estadio de Gosner 37 + 2 fueron expuestas a la microformulación comercial Karate® en base a LCT de manera aguda durante 48 y 96 h. Los resultados mostraron un incremento significativo de la frecuencia de MN, de otras anormalidades nucleares al igual que la inducción significativa de daño primario en

el ADN [54]. En relación a los resultados del EC, se observó que la genotoxicidad inducida por la concentración ambientalmente relevante de 0,1 µg/L de LCT en larvas de *R. arenarum*, demostraron que el piretroide fue capaz de ejercer daño significativo en la hebra de ADN tras una exposición aguda. Cuando se analizaron los resultados de los biomarcadores enzimáticos y no enzimáticos de estrés oxidante se observó que la actividad de la enzima CAT aumentó significativamente en los individuos expuestos durante 48 h, mientras que, en los de 96 h, si bien también se observó un aumento de su actividad, la misma no resultó significativa estadísticamente [54]. La actividad de GSH en larvas expuestas durante 48 h disminuyó cuando se comparó con el grupo control, pero la misma no fue significativa, mientras que en las larvas expuestas durante 96 h se observó una elevación significativa en la actividad de GSH. Por último, se observó un incremento significativo en la actividad de GST a las 48 h de tratamiento con Karate®, mientras que a las 96 h no hubo modificaciones significativas en la actividad de la enzima [54].

Los resultados obtenidos demuestran que el microformulado comercial Karate® basado en LCT ejerce una toxicidad aguda significativa en estadios premetamóficos de *R. arenarum*, evidenciada por la inducción de daño genético y cambios significativos en el estatus oxidante modificando los niveles de CAT, GSH y GST. Los resultados confirman su potencial genotóxico y resaltan que el insecticida piretroide debe ser considerado como un agente inductor de inestabilidad genómica en la molécula de ADN. Sin embargo, evaluaciones realizadas por la FAO y la OMS [55] a partir de la estimación del perfil toxicológico del insecticida han concluido que LCT posee un bajo perfil genotóxico. Sin embargo, nuestros resultados evidencian la marcada genotoxicidad independientemente del tiempo de exposición empleado.

En otras investigaciones realizadas por nuestro grupo de investigación, se evaluó la toxicidad aguda del insecticida IMI en ejemplares de *C. decemmaculatus* tratados con la formulación comercial Punto 35® (30% IMI). Se empleó la variante alcalina del EC utilizando eritrocitos circulantes a partir de muestras sanguíneas de los peces tratados [56]. Para los ensayos de genotoxicidad se evaluó un rango de concentraciones incluyendo 0,175; 0,35 y 1 mg/L del formulado Punto 35® durante 96 h de exposición [56]. Los resultados demostraron que concentraciones bajas de IMI, comparables a las detectadas en ambientes acuáticos contaminados, fueron capaces de ejercer un incremento significativo del daño primario en el ADN [56]. Cuando se analizaron los resultados de los biomarcadores enzimáticos y no enzimáticos de estrés oxidante se observó que la actividad de la enzima CAT aumentó significativamente en los individuos expuestos. Por el contrario, la actividad de GSH no fue alterada cuando se comparó con el grupo control [56].

Los resultados obtenidos demuestran que el formulado comercial Punto 35® basado en IMI ejerce una toxicidad aguda significativa en ejemplares adultos de *C. decemmaculatus*, evidenciada por un incremento significativo del daño primario en el ADN al igual que cambios significativos en el estatus oxidante modificando los niveles de CAT. Debido a los efectos adversos demostrados en la biota silvestre, en la Unión Europea (UE), el IMI ha sido prohibido desde 2013, prohibición que aun continua en vigencia [57]. Comprender los impactos nocivos del IMI en peces y otras especies acuáticas es fundamental para formular estrategias que permitan mitigar su toxicidad y promover el desarrollo de plaguicidas más seguros y menos tóxicos que protejan no solo a los ambientes acuáticos sino a los organismos que accidentalmente puedan estar expuestos a este contaminante.

CONSIDERACIONES FINALES

En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que los formulados comerciales basados en 2,4-D, LCT e IMI ejercen efectos tóxicos significativos sobre organismos acuáticos no blanco, evidenciados por la inducción de daño genético, alteraciones en el estado oxidante y, en algunos casos, efectos neurotóxicos. Los plaguicidas evaluados afectan procesos celulares fundamentales bajo condiciones de exposición aguda y a concentraciones ambientalmente relevantes. Estos hallazgos confirman y amplían la evidencia existente acerca de los efectos adversos de diversos plaguicidas ampliamente utilizados en la agricultura moderna, resaltando que los organismos no blanco pueden verse significativamente afectados aun cuando dichos productos sean considerados seguros bajo las condiciones de uso recomendadas. En este contexto, resulta fundamental fortalecer las estrategias de monitoreo y evaluación ecotoxicológica de formulaciones comerciales, promoviendo el desarrollo y la implementación de alternativas eficaces y ambientalmente más seguras que permitan compatibilizar la productividad agrícola con la protección de los ecosistemas y la conservación de la biodiversidad. En este sentido, la implementación de políticas públicas orientadas a fortalecer la regulación, promover el conocimiento técnico y garantizar el uso responsable de agroquímicos resulta fundamental para mitigar estos impactos.

AGRADECIMIENTOS

Financiado por la Universidad Nacional de La Plata (Subsidios N° 11/N1014 y 1047), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2021-0773) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (PIP 0306) de Argentina.

ASPECTOS ÉTICOS

Las capturas de los animales se realizaron con la autorización de la Dirección de Flora y Fauna de la Provincia de Buenos Aires (Buenos Aires, Argentina, códigos 22500-22339/13 y 2023-34047574). Los procedimientos y protocolos que involucraron animales fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE) de la Facultad de Ciencias Naturales y Museo de la Universidad Nacional de La Plata (La Plata, Buenos Aires, Argentina) bajo los protocolos números 001.02.2022 y 019.07.2024.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] D. Pimentel, M. Burgess, Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States, Integrated Pest Management, 1 (2014) 47–71.

[2] WHO, World Health Organization recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification, 2019 edition, World Health Organization, (2020).

[3] EU, European Union. The use of pesticides in developing countries and their impact on health and the right to food, Policy Department for External Relations Directorate General for External Policies of the Union, PE 653.622. (2021) 1-56.

[4] T.K. Udeigwe, J. Teboh, P. Eze, M. Stietiya, V. Kumar, J. Hendrix, H. Mascagni, T. Ying, T. Kandakji, Implicaciones de las principales prácticas de producción de cultivos en la calidad ambiental y la salud humana, Revista de Gestion Ambiental, R151 (2015) 267-279.

[5] M. Fenech, The *in vitro* micronucleus technique, Mutat Res 455 (2000) 81-95.

[6] A. Collins, G. Koppen, V. Valdiglesias, M. Dusinska, M. Kruszewski, P. Møler, E. Rojas, A. Dhawan, I. Benzie, E. Coskun, M. Moretti, G. Speit, S. Bonassi, The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project, Mutat Res, 759 (2014) 27-39.

[7] A.R. Collins, M. Ai-guo, S.J. Duthie, The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells, Mutat Res, 336 (1995) 69-77.

[8] A. Azqueta, A.R. Collins, The essential comet assay: acomprehensive guide to measuring DNA damage and repair, Arch Toxicol, 87 (2013) 949-968.

[9] S. Soloneski, M.L. Larramendy, The use of the Ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculat*us (Jenyns, 1842) (Pisces, Poeciliidae) in the genotoxic evaluation of environmental pollutants, in: M.L. Larramendy (Ed.) Ecotoxicology and Genotoxicology - Non-tradiational Aquatic Models, Cambridge, 2017, pp. 327-344.

[10] J.M. Pérez-Iglesias, C. Ruiz de Arcaute, G.S. Natale, S. Soloneski, M.L. Larramendy, Evaluation of imazethapyr-induced DNA oxidative damage by alkaline Endo III- and Fpg-modified single-cell gel electrophoresis assay in *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae), Ecotoxicol Environ Saf, 142 (2017) 503-508.

[11] F.G. Iturburu, M.F. Simoniello, S. Medici, A.M. Panzeri, M.L. Menone, Imidacloprid causes DNA damage in fish: clastogenesis as a mechanism of genotoxicity, Bull Environ Contam Toxicol 100 (2018) 760-764.

[12] J. Williamson, C.M. Hughes, G. Burke, G.W. Davison, A combined γ-H2AX and 53BP1 approach to determine the DNA damage-repair response to exercise in hypoxia, Free Radical Biology and Medicine, 154 (2020) 9-17.

[13] N. Kager, F. Ferk, M. Kundi, K. Wagner, M. Mišík, S. Knasmüller, Prevention of oxidative DNA damage in inner organs and lymphocytes of rats by green tea extract, European Journal of Nutrition, 49 (2010) 227-234.

[14] D.R. Livingstone, Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms, Marine pollution bulletin, 42 (2001) 656-666.

[15] M. Ávila–Vazquez, Agricultura tóxica y pueblos fumigados en Argentina, +E: Revista De Extensión Universitaria, 4 (2014).

[16] FAO, Pesticides Use, Pesticides Trade and Pesticides Indicators. Global, Regional and Country Trends, 1990–2020, in: FAO (Ed.) FAOSTAT analytical briefs, Roma, Italia, 2022, pp. 13.

[17] CASAFE, Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes. Guía online de productos fitosanitarios. https://www.casafe.org/publicaciones/guia-de-productos-fitosanitarios/. Último acceso Marzo 2026, (2026).

[18] USEPA, Basic information about pesticide ingredients. https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/basic-information-about-pesticide-ingredients Último acceso Mayo 2026, (2026).

[19] V.P. Kalyabina, E. Esimbekova, K. Kopylova, V.A. Kratasyuk, Pesticides: formulants, distribution pathways and effects on human health – a review, Toxicol. Rep., 8 (2021) 1179–1192.

[20] N. Nikoloff, G.S. Natale, D. Marino, S. Soloneski, M.L. Larramendy, Flurochloridone-based herbicides induced genotoxicity effects on *Rhinella arenarum* tadpoles (Anura: Bufonidae), Ecotoxicol Environ Saf, 100 (2014) 275-281.

[21] J.M. Pérez-Iglesias, S. Soloneski, N. Nikoloff, G.S. Natale, M.L. Larramendy, Toxic and genotoxic effects of the imazethapyr-based herbicide formulation Pivot H® on montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae), Ecotoxicol Environ Saf, 119 (2015) 15-24.

[22] S. Soloneski, N. Nikoloff, M.L. Larramendy, Analysis of possible genotoxicity of the herbicide flurochloridone and its commercial formulations: Endo III and Fpg alkaline comet assays in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells, Mutat Res, 797 (2016) 46-52.

[23] J.M. Pérez-Iglesias, C. Ruiz de Arcaute, N. Nikoloff, L. Dury, S. Soloneski, G.S. Natale, M. Larramendy, The genotoxic effects of the imidacloprid-based insecticide formulation Glacoxan Imida on Montevideo tree frog *Hypsiboas pulchellus* tadpoles (Anura, Hylidae), Ecotoxicol Environ Saf, 104 (2014) 120-126.

[24] R. Mesnage, M.N. Antoniou, Ignoring Adjuvant Toxicity Falsifies the Safety Profile of Commercial Pesticides, Frontiers in Public Health, Volume 5 - 2017 (2018).

[25] C. Cox, M. Surgan, Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health, Environ Health Perspect, 114 (2006) 1803-1806.

[26] Y. Song, Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide, Journal of Integrative Plant Biology, 56 (2014) 106–113.

[27] USEPA, Pesticides industry sales and usage 2008-2012 market estimates. EPA´s Pesticide Program, United States Environmental Protection Agency, (2017).

[28] SENASA, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Vademecum. https://aps2.senasa.gov.ar/vademecum/app/publico. Último acceso Marzo 2026, 2026.

[29] USEPA, Chemicals evaluated for carcinogenic potential, Unites States Environmental Protection Agency2005, pp. 33.

[30] IARC, DDT, lindane, and 2,4-D, IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 113 (2016) 126.

[31] WHO, Guidelines for Drinking-water Quality, 1 (2011) 668.

[32] HSE, Health Service Executive. Pesticides in drinking water, National Drinking Water Group, (2018) 1-10.

[33] NPIC, National Pesticide Information Center. Lambda-cyhalothrin, General Fact Sheet, (2001) 1-6.

[34] L.M. He, J. Troiano, A. Wang, K. Goh, Environmental chemistry, ecotoxicity, and fate of lambda-cyhalothrin, in: D.M. Whitacre (Ed.) Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Springer New York, New York, 2008, pp. 71-91.

[35] T.M. Mac Loughlin, M.L. Peluso, D.J.G. Marino, Multiple pesticides occurrence, fate, and environmental risk assessment in a small horticultural stream of Argentina, Science of The Total Environment, 802 (2022) 149893.

[36] USEPA, Imidacloprid: Proposed Interim Registration Review Decision, Case Number 7605 EPA-HQ-OPP-2008-0844, (2020).

[37] NPIC, Imidacloprid: Pesticide Tolerances for Emergency Exemptions, Fed. Regist., 70 (2005) 59268-59276.

[38] D.J. Pérez, F.G. Iturburu, G. Calderon, L.A.E. Oyesqui, E. De Gerónimo, V.C. Aparicio, Ecological risk assessment of current-use pesticides and biocides in soils, sediments and surface water of a mixed land-use basin of the Pampas region, Argentina, Chemosphere, 263 (2021) 128061.

[39] K.L. Gosner, A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification, Herpetologica, 16 (1960) 183-190.

[40] USEPA, Methods for acute toxicity tests with fish, macroinvertebrates, and amphibians, U.S. Government Printing Office, Washington, DC, 660/3-75-009 (1975) 62.

[41] USEPA, United States Environmental Protection Agency. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. Fifth edition, U.S. Government Printing Office, Washington, DC, 821-R-02-012 (2002).

[42] C. Ruiz de Arcaute, S. Soloneski, M.L. Larramendy, Toxic and genotoxic effects of the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-based herbicide on the Neotropical fish *Cnesterodon decemmaculatus*, Ecotoxicol Environ Saf, 128 (2016) 222-229.

[43] S.J. Beaupre, E.R. Jacobson, H.B. Lillywhite, K. Zamudio, Guidelines for use of live amphibians and reptiles in field and laboratory research, 1 (2004) 1-42.

[44] N.P. Singh, Microgel electrophoresis of DNA from individual cells: principles and methodology, in: G.P. Pfeifer (Ed.) Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Plenum Press, New York, 1996, pp. 3-24.

[45] T. Cavaş, S. Könen, Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay, Mutagenesis, 22 (2007) 263-268.

[46] A.R. Collins, M. Duŝinská, G.M. Gedik, R. Ŝtětina, Oxidative damage to DNA:do we have a reliable biomarker?, Environ Health Perspect, 104 (1996) 465-469.

[47] S. Guilherme, I. Gaivão, M.A. Santos, M. Pacheco, DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide – Elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress, Mutation Research, 743 (2012) 1-9.

[48] P. Baudhuin, H. Beaufy, Y. Rahman-Li, O.Z. Sellinger, R. Wattiaux, P. Jacques, C. De Duve, Tissue fractionation studies. 17. Intracellular distribution of monoamine oxidase, alanine aminotransferase, D-amino acid oxidase and catalase in rat liver tissue, Biochemistry Journal, 92 (1964) 179-184.

[49] W.H. Habig, M.J. Pabst, W.B. Jakoby, Glutathione S-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation., Journal of Biological Chemistry, 249 (1974) 7130-7139.

[50] G.L. Ellman, Tissue sulfhydryl groups, Arch Biochem Biophys,, 82 (1959) 70-77.

[51] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randal, Protein measurement with the Folin phenol reagent, Journal of Biological Chemistry, 193 (1951) 265-275.

[52] C. Ruiz de Arcaute, N.A. Ossana, J.M. Pérez-Iglesias, S. Soloneski, M.L. Larramendy, Auxinic herbicides induce oxidative stress on *Cnesterodon decemmaculatus* (Pisces: Poeciliidae), Environmental Science and Pollution Research, 26 (2019) 20485-20498.

[53] F.G. Jara, M.E. Cuello, C.A. Úbeda, Afrontando el invierno: la rana de ceja corta se reproduce y desarrolla en condiciones climáticas adversas, Macroscopia, 8 (2019) 16-21.

[54] M.R.R. Laborde, C. Ruiz de Arcaute, S. Soloneski, Environmentally relevant lambda-cyhalothrin concentration induces genotoxicity and oxidative stress in the early life stages of *Rhinella arenarum*, Environ Toxicol, In press (2026).

[55] FAO, WHO, Pesticide residues in food: 2007, Toxicological evaluations, sponsored jointly by FAO and WHO, with the support of the International Programme on Chemical Safety, joint meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group, Geneva, Switzerland, 18-27 September 2007, (2009).

[56] C. Ruiz de Arcaute, M.R.R. Laborde, S. Soloneski, M.L. Larramendy, Do environmentally relevant concentrations of the neonicotinoid insecticide imidacloprid induce DNA damage and oxidative stress on *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842)?, Environ Toxicol Pharmacol, (2023).

[57] UE, Tribunal General de la Unión Europea. Disponible en: https://curia.europa.eu/jcms/upload/docs/application/pdf/2018-05/cp180068es.pdd, (2018).