



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Ciencias Veterinarias

Doctorado en Ciencias Veterinarias

Laboratorio de Zoología Aplicada: Anexo Vertebrados (FHUC - UNL / MMA)

“Evaluación del efecto de plaguicidas sobre el sistema inmune en
Caiman latirostris (yacaré overo)”.

Lic. Latorre, María Agustina.

Director: Dr. Siroski Pablo A.

Co-director: Méd. Vet. Larriera Alejandro.

Año: 2018

Resumen

El yacaré overo (*Caiman latirostris*) es una de las dos especies de cocodrilidos que habitan en la República Argentina. En los últimos años, muchas áreas de su distribución geográfica quedaron en la proximidad de zonas con actividades agrícolas intensas, donde formulaciones de plaguicidas y mezclas de ellas, son utilizadas rutinariamente para el control de plagas. Por otra parte, el período del año de máxima aplicación de plaguicidas coincide con la temporada reproductiva de esta especie, implicando un riesgo de contaminación particularmente importante para los embriones y los neonatos.

En este trabajo de Tesis Doctoral se realizaron ensayos controlados de exposición subcrónica de embriones y crías de *C. latirostris*, y exposición seminatural de juveniles; para determinar el efecto de formulaciones comerciales de plaguicidas a base de Endosulfán (END), Cipermetrina (CIP), Clorpirifos (CPF), Glifosato (GLI) y distintas mezclas complejas de estos formulados, ampliamente utilizadas en nuestra región; sobre algunos parámetros del sistema inmune (SI).

Los resultados obtenidos demostraron que estas formulaciones, a concentraciones similares a las recomendadas para su uso a campo, inducen alteraciones en el SI evidenciado principalmente por el recuento total y diferencial de glóbulos blancos (RTGB y RDGB), durante la exposición *in vivo* y *seminatural*. El crecimiento no se vio afectado en la mayoría de los casos. Las mezclas no mostraron mayor efecto que los compuestos por separado. En base a estos hallazgos, es necesario profundizar la evaluación de los efectos de plaguicidas, particularmente de mezclas complejas y exposición *seminatural*, mediante parámetros que nos permitan identificar las condiciones reales a las que se encuentra expuesta esta especie en su ambiente natural.

Abstract

Broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) is one of the two species of crocodylians that inhabit the Argentina. In recent years, many areas of the geographical distribution of broad-snouted caiman are inmersed in areas with intense agricultural activity, where formulations of pesticides and mixtures are routinely used for pest control. On the other hand, the time of the year of maximum application of pesticides coincides with the reproductive season of this species, and it implies a risk of contamination particularly important for the embryos and the neonates.

In this thesis, different assays were conducted under subchronic exposure controlled conditions in embryos and neonates of *C. latirostris*, and seminatural exposure of juveniles were carried out. In order to determine the effect of commercial formulations on some parameters of the immune system (IS), some pesticides widely used in the region (Endosulfan (END), Cypermethrin (CYP), Chlorpyrifos (CPF), Glyphosate (GLY) and complex mixtures) of these were evaluated.

The results showed that these formulations, at concentrations similar to those recommended for field use, induced alterations in the IS evidenced mainly by the total and differential white blood cell count (TWBC and DWBC), during *in vivo* and semi-natural exposure. Growth was not affected in most cases. The mixtures showed no greater effect than the compounds alone.

Based on these findings, it is necessary to deepen the evaluation of the effects of pesticides, particularly complex mixtures and semi-natural exposure, through parameters that allow us to identify the actual conditions to which this species is exposed in its natural environment.

Agradecimientos:

-Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme la beca de posgrado que hicieron posible la realización de este trabajo de tesis doctoral.

-A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral, por permitir realizar mi formación doctoral.

-A todos los integrantes del Laboratorio de Zoología Aplicada: Anexo Vertebrados (FHUC-UNL / MMA-MUPCN, Santa Fe).

-A mi co-director Méd. Vet. Alejandro Larriera, Director del Proyecto Yacaré, por permitir que sea parte de esto.

-A mi director Dr. Pablo Siroski y a la Dra. Gisela Poletta, por enseñarme, guiarme y aconsejarme en este camino.

-A mi gran amiga y compañera Dra. López González Evelyn, por su incondicional apoyo, predisposición y ayuda en este camino que transitamos juntas hace ya más de 5 años.

-A mis compañeras de equipo que también formaron parte de esto y me ayudaron: Ma. Laura Romito y Soledad Moleón; y a Melina Simoncini por estar siempre dispuesta a ayudarme.

-A todos mis amigos que siempre me acompañan en las buenas y en las malas.

-A mi familia por estar incondicionalmente, apoyarme en todas mis decisiones y ayudarme cuando más lo necesito.

-A Daián, por estar siempre, acompañarme, aconsejarme y bajarme a tierra.

-A mi hijo, Fausto, por enseñarme a ser mamá y llenarnos de felicidad.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
CAPÍTULO 1. Introducción	4
1.1 Expansión agrícola y usos de plaguicidas	5
1.1.1 Insecticidas.....	9
1.1.1.1 <i>Cipermetrina</i>	10
1.1.1.2 <i>Endosulfán</i>	12
1.1.1.3 <i>Clorpirifos</i>	13
1.1.2 Herbicidas.....	14
1.1.2.1 <i>Glifosato</i>	15
1.2 Impacto en las especies silvestres	17
1.3 Descripción de la especie y distribución geográfica	19
1.4 Programas de uso sustentable	22
1.5 Especies centinelas	27
1.5.1 Cocodrilianos como indicadores de contaminación ambiental.....	29
1.6 Generalidades del Sistema Inmune (SI)	31
1.7 Sistema inmune innato (SII) y sistema inmune adaptativo (SIA)	33
1.7.1 Glóbulos blancos o leucocitos.....	36
1.7.2 Anticuerpos naturales (AcN).....	37
1.7.3 Sistema de complemento (SC).....	38
1.7.4 Hematología sanguínea.....	41
1.8 Hipótesis	41
1.9 Objetivos	41
1.9.1 Objetivo general.....	41
1.9.2 Objetivos específicos.....	42
CAPÍTULO 2. Parámetros inmunológicos en <i>Caiman latirostris</i> y descripción de técnicas utilizadas	43
2.1 Introducción: parámetros inmunológicos en reptiles	44
2.2 Parámetros inmunológicos en cocodrilianos	45
2.3 Descripción de técnicas utilizadas	46
2.3.1 Recuento total y diferencial de glóbulos blancos (RTGB y RDGB).....	46

2.3.2	Anticuerpos naturales (AnC).....	48
2.3.3	Sistema de complemento (SC).....	50
2.4	Discusión.....	51
CAPÍTULO 3. Evaluación del efecto inmunotóxico de diferentes formulaciones de plaguicidas (Endosulfán, Cipermetrina, Clorpirifós, y Glifosato), en embriones de <i>Caiman latirostris</i> (Etapa 1).....		
3.1	Introducción	54
3.1.1	Antecedentes de exposición embrionaria en cocodrilianos	56
3.2	Materiales y métodos.....	58
3.2.1	Huevos de <i>Caiman latirostris</i>	58
3.2.2	Diseño experimental y exposición	59
3.2.2.1	<i>Ensayo de Exposición Embrionaria 1 (EEE1)</i>	62
3.2.2.2	<i>Ensayo de Exposición Embrionaria 2 (EEE2)</i>	62
3.2.2.3	<i>Ensayo de Exposición Embrionaria 3 (EEE3)</i>	63
3.2.3	Ensayo de exposición embrionaria por pulverización (sobre material de nido).....	63
3.2.4	Parámetros y variables analizados.....	65
3.3	Análisis estadístico.....	67
3.4	Resultados.....	67
3.5	Discusión.....	75
CAPÍTULO 4. Evaluación del efecto inmunotóxico de diferentes formulaciones de plaguicidas (Endosulfán, Cipermetrina, Clorpirifós, y Glifosato) en neonatos de <i>Caiman latirostris</i> (Etapa 2).....		
4.1	Introducción.....	80
4.2	Materiales y Métodos.....	81
4.2.1	Neonatos de <i>Caiman latirostris</i>	81
4.2.2	Diseño experimental y exposición.....	81
4.2.2.1	<i>Ensayo de Exposición de Neonatos 1 (EEN1)</i>	84
4.2.2.2	<i>Ensayo de Exposición de Neonatos 2 (EEN2)</i>	84
4.2.2.3	<i>Ensayo de Exposición de Neonatos 3 (EEN3)</i>	84
4.2.2.4	<i>Proteinograma</i>	85
4.3	Análisis estadístico.....	85

4.4 Resultados.....	86
4.5 Discusión.....	96
CAPÍTULO 5. Ensayos de exposición a mezclas complejas de formulaciones comerciales de plaguicidas en <i>Caiman latirostris</i> (In ovo e In vivo).....	103
5.1 Introducción.....	104
5.2 Materiales y Métodos.....	105
5.2.1 Ensayos de exposición a mezclas de plaguicidas formulados.....	105
5.2.1.1 Ensayos de exposición embrionaria (In ovo: por topicación y por pulverización).....	105
5.2.1.2 Por topicación sobre la cáscaras de huevos.....	105
5.2.1.3 Por pulverización sobre el material de nido.....	106
5.2.2 Ensayo de exposición de neonatos (In vivo).....	107
5.2.2.1 Evaluación de mezclas de tres formulaciones.....	107
5.2.2.1.1 EENM1: GLI, CIP y END.....	107
5.2.2.1.2 EENM2: GLI, CIP y CPF.....	108
5.3 Análisis estadístico.....	108
5.4 Resultados.....	109
5.5 Discusión.....	113
CAPÍTULO 6. Evaluación del efecto inmunotóxico de diferentes formulaciones de plaguicidas (Cipermetrina, Clorpirifós, y Glifosato) y mezcla en juveniles de <i>Caiman latirostris</i> en condiciones seminaturales.....	116
6.1 Introducción.....	117
6.2 Materiales y Métodos.....	118
6.2.1 Juveniles de <i>Caiman latirostris</i>	118
6.2.2 Diseño experimental y exposición.....	118
6.3 Análisis estadístico.....	121
6.4 Resultados.....	121
6.5 Discusión.....	123
CAPÍTULO 7. Conclusiones finales.....	127

Bibliografía citada.....	131
---------------------------------	------------

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1.1: Producción de soja total en el país (toneladas), 1970 a 2016. Fuente: SIIA MAGyP.....	6
Figura 1.2: Superficie cubierta por el cultivo de soja en Argentina. Fuente: SAGPyA.....	6
Figura 1.3: Estructura molecular de Cipermetrina.....	11
Figura 1.4: Estructura molecular de Endosulfán... ..	12
Figura 1.5: Estructura molecular de Clorpirifos.....	13
Figura 1.6: Estructura molecular de Glifosato.....	16
Figura 1.7: Distribución geográfica de <i>C. latirostris</i> y <i>C. yacaré</i> en Argentina (Larriera y col., 2008). Barra=100 km.....	20
Figura 1.8: Ejemplares juvenil (izquierda) y adulto (derecha) de <i>C. latirostris</i>	21
Figura 1.9: Cría de <i>C. latirostris</i> saliendo del huevo.....	22
Figura 1.10: Cosecha de huevos de <i>C. latirostris</i> en el Dpto. San Cristóbal, provincia de Santa Fe (Argentina).....	25
Figura 1.11: Incubadora del "Proyecto Yacaré" mostrando los cajones de incubación de los huevos.....	26
Figura 1.12: Piletas de cría del "Proyecto Yacaré" donde se observa la superficie seca y con agua.....	27
Figura 1.13: Ejemplar adulto de <i>C. latirostris</i> en un canal de agua de un área de cultivo.....	31
Figura 1.14: Esquema de evolución de la inmunidad innata a la adaptativa. Fuente: Health & Medicine, 2014.....	35
Figura 1.15: Esquema de la cascada sistema del complemento (SC), con el detalle de las tres vías de activación y de la vía efectora (Favoreel y col., 2003).....	40
Figura 2.1: Cámara de Neubauer.....	47
Figura 2.2: Representación esquemática de las cuadrículas dentro de la cámara de Neubauer.....	48
Figura 2.3: Microplaca	49
Figura 3.1: A) Imagen satelital de la Reserva Natural Manejada "El Fisco" en el centro-norte de la provincia de Santa Fe, Argentina. B) Imagen de la laguna principal donde se colectan los huevos de yacaré. Tomada de Google Earth.....	58
Figura 3.2: Huevos marcados por nido, colocados en bandejas plásticas.....	59
Figura 3.3: Aplicación de los tratamientos en forma tópica sobre la cáscara del huevo de <i>C. latirostris</i> en la zona de inicio de la banda de calcificación, de mayor intercambio con el exterior.....	60
Figura 3.4: Sistema de marcación por corte de verticilos caudales utilizado para la individualización de los pichones nacidos por año y nido.....	61
Figura 3.5: Imagen de la aplicación de las soluciones a evaluar por pulverización sobre el material de nido en el Ensayo de Exposición embrionaria por Pulverización.....	65

Figura 3.6: Extracción de sangre de la vena espinal a un ejemplar recién nacido, siguiendo la técnica de Myburgh y col. (2014).....	66
Figura 4.1: Exposición de neonatos por inmersión.....	82
Figura 4.2: Recuento total de glóbulos blancos (RTGB; Kruskall-Wallis/Mann Whitney), observados en neonatos de <i>Caiman latirostris</i> en los diferentes grupos experimentales del Ensayo de Exposición de Neonatos 1 (ENN1). CN: Control negativo; CV: Control vehículo (etanol); CIP1 y CIP2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Cipermetrina Atanor®; END1 y END2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Endosulfán Galgofan®; RU1 y RU2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Glifosato Roundup Full II®; PANZ1 y PANZ2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Glifosato PanzerGold®. *p < 0,05 estadísticamente significativo respecto al CN; #p < 0,05 estadísticamente significativo respecto al CV.....	88
Figura 4.3: A) Heterófilos (ANOVA/Tukey); B) Linfocitos (Kruskall-Wallis/Mann Whitney); C) Monocitos (Kruskall-Wallis/Mann Whitney); y E) Eosinófilos (ANOVA/Tukey), observados en neonatos de <i>Caiman latirostris</i> en los diferentes grupos experimentales del Ensayo de Exposición de Neonatos 1 (ENN1). CN: Control negativo; CV: Control vehículo (etanol); CIP1 y CIP2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Cipermetrina Atanor®; END1 y END2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Endosulfán Galgofan®; RU1 y RU2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Glifosato Roundup Full II®; PANZ1 y PANZ2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Glifosato PanzerGold®. *p < 0,05 estadísticamente significativo respecto al CN; #p < 0,05 estadísticamente significativo respecto al CV.....	89
Figura 4.4: Anticuerpos Naturales (AnC, Kruskall-Wallis/Mann Whitney), observados en neonatos de <i>Caiman latirostris</i> en los diferentes grupos experimentales del Ensayo de Exposición de Neonatos 1 (ENN1). CN: Control negativo; CV: Control vehículo (etanol); CIP1 y CIP2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Cipermetrina Atanor®; END1 y END2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Endosulfán Galgofan®; RU1 y RU2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Glifosato Roundup Full II®; PANZ1 y PANZ2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Glifosato PanzerGold®. #p < 0,05 estadísticamente significativo respecto al CV.....	90
Figura 4.5: A) Recuento Total Glóbulos Blancos (RTGB, ANOVA/Tukey); B) Monocitos (Kruskall-Wallis/Mann Whitney) observados en neonatos de <i>C. latirostris</i> en los diferentes grupos experimentales del Ensayo de Exposición de Neonatos 2 (ENN2). CN: Control negativo; CV: Control vehículo (etanol); CIP1 y CIP2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Cipermetrina Atanor®; END1 y END2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Endosulfán Galgofan®; RU1 y RU2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Glifosato Roundup Full II®. *p < 0,05 estadísticamente significativo respecto al CN, #p < 0,05 estadísticamente significativo respecto al CV.....	91

Figura 4.6: PT (Proteínas Totales; ANOVA/Dunnet) en neonatos de *C. latirostris* en los diferentes grupos experimentales del Ensayo de Exposición de Neonatos 2 (ENN2). CN: Control negativo; CV: Control vehículo (etanol); CIP1 y CIP2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Cipermetrina Atanor®; END1 y END2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Endosulfán Galgofan®; RU1 y RU2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Glifosato Roundup Full II®. *p < 0,05 estadísticamente significativo respecto al CN.....92

Figura 4.7: Recuento Total Glóbulos Blancos (RTGB, ANOVA/Dunnet) observados en neonatos de *C. latirostris* en los diferentes grupos experimentales del Ensayo de Exposición de Neonatos 3 (ENN3). CV: Control vehículo (etanol); CPF1 y CPF2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®. #p < 0,05 estadísticamente significativo respecto al CV.....93

Figura 4.8: Concentración de la fracción proteica Gamma ([Gamma], Kruskal-Wallis/Mann-Whitney) en neonatos de *C. latirostris* en los diferentes grupos experimentales del Ensayo de Exposición de Neonatos 3 (ENN3). CN: Control Negativo; CPF1 y CPF2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®. *p ≤ 0,05 estadísticamente significativo respecto al CN.....94

Figura 5.1: Recuento Total Glóbulos Blancos (RTGB, ANOVA/Dunnet) observados en neonatos de *C. latirostris* en los diferentes grupos experimentales del Ensayo de Exposición de Neonatos a Mezclas 1 (EENM1). CN: Control Negativo; CV: Control vehículo (etanol); M (GLI + CIP + END): grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato Roundup Full II®, 66,2% p.a. + Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Endosulfán Galgofan®, 35% p.a. *p < 0,05 estadísticamente significativo respecto al CN.....111

Figura 5.2: Recuento Total Glóbulos Blancos (RTGB, ANOVA/Dunnet) observados en neonatos de *C. latirostris* en los diferentes grupos experimentales del Ensayo de Exposición de Neonatos a Mezclas 2 (EENM2). CV: Control vehículo (etanol); M (GLI + CIP + CPF): grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato Roundup Full II®, 66,2% p.a. + Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a. #p < 0,05 estadísticamente significativo respecto al CV.....112

Figura 6.1: Parche de vegetación (izq), utilizado por una hembra para la construcción del nido. El mismo se encontraba rodeado de cultivos como se puede ver en el fondo de la fotografía. Se observa el canal de agua utilizado por la hembra para refugiarse.....117

Figura 6.2: Recintos artificiales de 4,5 m² de superficie.....119

Figura 6.3: Recuento Total Glóbulos Blancos (RTGB, ANOVA/Dunnet) observados en ejemplares de *C. latirostris* en los diferentes grupos experimentales del Ensayo de Exposición *In Vivo* en condiciones seminaturales. CN: Control negativo; CIP: grupo expuesto a Cipermetrina (Atanor®); CPF: grupo expuesto a la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®; GLI (RU): grupo expuesto a Glifosato (Roundup Full II®); M (CIP+CPF+GLI): grupo experimental de mezcla de los formulados: Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a + Glifosato -RoundupFull II®,

66,2% p.a; *p < 0,05 estadísticamente significativo respecto al CN..... 122

Figura 6.4: A) LHC (cm) y B) peso (g) observados en ejemplares de *C. latirostris* en los diferentes grupos experimentales del Ensayo de Exposición *In Vivo* en condiciones seminaturales. CN: Control negativo; CIP: grupo expuesto a Cipermetrina (Atanor®); CPF: grupo expuesto a la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®; GLI (RU): grupo expuesto a Glifosato (Roundup Full II®); M (CIP+CPF+GLI): grupo experimental de mezcla de los formulados: Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a + Glifosato -RoundupFull II®, 66,2% p.a; *p < 0,05 estadísticamente significativo respecto al CN..... 123

ÍNDICE DE TABLAS:

Tabla 1.1: Clases toxicológicas de plaguicidas establecidas por la OMS.....	8
Tabla 1.2: Principales componentes del sistema inmune.....	36
Tabla 3.1: Grupos experimentales y tratamientos aplicados en el Ensayo de Exposición Embrionaria por topicación (<i>EEE1, EEE2 y EEE3</i>).....	63
Tabla 3.2: Grupos experimentales y tratamientos aplicados en el Ensayo de Exposición embrionaria por Pulverización.....	65
Tabla 3.3: Resultados (Media \pm E.E.) de todos los parámetros inmunológicos analizados para los distintos grupos experimentales del Ensayo de Exposición Embrionaria 1 (<i>EEE1</i>).....	68
Tabla 3.4: Resultados (Media \pm E.E.) de todos los parámetros inmunológicos analizados para los distintos grupos experimentales del Ensayo de Exposición Embrionaria 2 (<i>EEE2</i>).....	69
Tabla 3.5: Resultados (Media \pm E.E.) de todos los parámetros inmunológicos analizados para los distintos grupos experimentales del Ensayo de Exposición Embrionaria 3 (<i>EEE3</i>).....	69
Tabla 3.6: Parámetros de tamaño (Media \pm E.E.) en neonatos de <i>C. latirostris</i> en los distintos grupos experimentales del Ensayo de Exposición Embrionaria 1 (<i>EEE1</i>).....	70
Tabla 3.7: Parámetros de tamaño (Media \pm E.E.) en neonatos de <i>C. latirostris</i> en los distintos grupos experimentales del Ensayo de Exposición Embrionaria 2 (<i>EEE2</i>).....	72
Tabla 3.8: Parámetros de tamaño (Media \pm E.E.) en neonatos de <i>C. latirostris</i> en los distintos grupos experimentales del Ensayo de Exposición Embrionaria 3 (<i>EEE3</i>).....	73
Tabla 3.9: Resultados (Media \pm E.E.) de todos los parámetros inmunológicos analizados para los distintos grupos experimentales del Ensayo de Pulverización sobre material de nido.....	74
Tabla 3.10: Parámetros de tamaño (Media \pm E.E.) al nacer en <i>C. latirostris</i> observados en los distintos grupos experimentales del Ensayo de Pulverización sobre material de nido.....	75
Tabla 4.1: Grupos experimentales y tratamientos aplicados en el Ensayo de Exposición de Neonatos (<i>EEN1, EEN2, EEN3</i>).....	85
Tabla 4.2: Resultados (Media \pm E.E.) de todos los parámetros inmunológicos analizados para los distintos grupos experimentales del Ensayo de Exposición de Neonatos (<i>EEN1</i>).....	87
Tabla 4.3: Resultados (Media \pm E.E.) de todos los parámetros inmunológicos analizados para los distintos grupos experimentales del Ensayo de Exposición de Neonatos (<i>EEN2</i>).....	91
Tabla 4.4: Valores de proteínas totales (PT) y proteinograma para ensayo <i>EEN2</i> (Media \pm EE) para los diferentes grupos experimentales. (*) Diferencia estadísticamente significativa respecto del CN.....	92
Tabla 4.5: Resultados (Media \pm E.E.) de todos los parámetros inmunológicos analizados para los distintos grupos experimentales del Ensayo de Exposición de Neonatos (<i>EEN3</i>).....	93

Tabla 4.6: Valores de proteínas totales (PT) y proteinograma para ensayo <i>EEN3</i> (media \pm EE) para los diferentes grupos experimentales. (*) Diferencia estadísticamente significativa respecto del CN.....	94
Tabla 4.7: Parámetros de Crecimiento (Media \pm E.E.) evaluados en <i>C. latirostris</i> en los distintos grupos de experimentación del Ensayo de exposición de Neonatos 1 (<i>EEN1</i>).....	95
Tabla 4.8: Parámetros de Crecimiento (Media \pm E.E.) evaluados en <i>C. latirostris</i> en los distintos grupos de experimentación del Ensayo de exposición de Neonatos 2 (<i>EEN2</i>).....	95
Tabla 4.9: Parámetros de Crecimiento (Media \pm E.E.) evaluados en <i>C. latirostris</i> en los grupos de experimentación del Ensayo de exposición de Neonatos 3 (<i>EEN3</i>).....	96
Tabla 5.1: Grupos experimentales del Ensayo de Exposición Embrionaria de Mezclas por topicación (<i>EEEMt</i>) a las formulaciones de GLI, CIP y CPF.....	106
Tabla 5.2: Grupos experimentales del Ensayo de Exposición Embrionaria de Mezclas por pulverización sobre el material de nido (<i>EEEMp</i>) a las formulaciones de GLI, CIP y CPF.....	107
Tabla 5.3: Grupos experimentales aplicados en el Ensayo de Exposición de Neonatos a Mezclas 1 (<i>EENM1</i>), a las formulaciones de GLI, CIP y END.....	108
Tabla 5.4: Grupos experimentales del Ensayo de Exposición de Neonatos a Mezclas 2 (<i>EENM2</i>), a las formulaciones de GLI, CIP y CPF.....	108
Tabla 5.5: Resultados (Media \pm E.E.) de todos los parámetros inmunológicos analizados para los distintos grupos experimentales de los Ensayos de exposición embrionaria (<i>EEEMt</i> y <i>EEEMp</i>).....	109
Tabla 5.6: Parámetros de tamaño (medias \pm E.E.) evaluados en individuos recién nacidos de <i>C. latirostris</i> en cada Ensayo de exposición embrionaria a Mezclas (<i>EEEM</i>).....	110
Tabla 5.7: Resultados (Media \pm E.E.) de todos los parámetros inmunológicos analizados para los distintos grupos experimentales del Ensayo de Exposición de Neonatos a Mezclas 1 y 2 (<i>EENM1</i> y <i>EENM2</i>).....	111
Tabla 5.8: Parámetros de crecimiento (final – inicial; Medias \pm E.E.) evaluados en animales de <i>C. latirostris</i> de los Ensayos de Exposición de Neonatos a Mezclas 1 y 2 (<i>EENM1</i> y <i>EENM2</i>).....	112
Tabla 6.1: Grupos experimentales y tratamientos aplicados en el Ensayo de Exposición <i>In vivo</i> en condiciones seminaturales.....	120
Tabla 6.2: Resultados (Media \pm E.E.) de todos los parámetros inmunológicos analizados para los distintos grupos experimentales del Ensayo de Exposición <i>In vivo</i> en condiciones seminaturales.....	121
Tabla 6.3: Resultados (Media \pm E.E.) de los parámetros de crecimiento analizados para los distintos grupos experimentales del Ensayo de Exposición <i>In vivo</i> en condiciones seminaturales.....	123

ABREVIATURAS:

AnC: Anticuerpos naturales

ANOVA: análisis de la varianza

°C: grados centígrados

CAM: Complejo de Ataque de Membrana

CASAFE: Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes

CBs: carbamatos

c.c: concentración aplicada a campo

CIP: Cipermetrina

CN: control negativo

CPF: Clorpirifós

CTL: en inglés: cytotoxic T lymphocyte; linfocito T citotóxico

CV: control vehículo

DL50: dosis letal 50

E.E.: Error Estándar

EEE: ensayo de exposición embrionaria

EEEM: ensayo de exposición embrionaria a la mezcla

EEN: ensayo de exposición de neonatos

EENM: ensayo de exposición de neonatos a la mezcla

END: Endosulfán

FAO: en inglés Food and Agriculture Organisation: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

g: gramos

GB: glóbulos blancos

GLI: Glifosato

h.a: hectárea

i.a: ingrediente activo

Ig: Inmunoglobulinas

kg: kilogramo

km: kilómetros

LHC: longitud hocico cloaca

LT: longitud total

M: mezcla compleja de formulados comerciales

mg: microgramo

MH: Máxima Hemólisis

ml: mililitro

mm³: milímetro cúbico

NaCl: cloruro de sodio

ND: No disponible

NK: en inglés: Natural Killer, células naturales asesinas

L / l: litro

OMS: Organización Mundial de la Salud, o WHO en inglés: World Health Organization

OPs: organoclorados

p.a: principio activo

PANZ: PanzerGold® (formulación comercial de herbicida con glifosato)

PBS: en inglés: Phosphate Buffered Saline

PY: Proyecto Yacaré

RDGB: recuento diferencial glóbulos blancos

RRBC: en inglés: rabbit red blood cells, glóbulos rojos de conejo

RTGB: recuento total glóbulos blancos

RU: Roundup Full II® (formulación comercial de herbicida con glifosato)

SC: Sistema de Complemento

SENASA: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria

SGRC: solución glóbulos rojos de conejo

SI: Sistema Inmune

SIA: Sistema Inmune Adaptativo o Específico

SII: Sistema Inmune Innato o Inespecífico

SNC: Sistema Nervioso Central

SRBC: sheep red blood cells, glóbulos rojos de oveja

UICN: Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

µl: microlitro

UNEP: en inglés: *United Nations Environment Programme: Programa Medioambiental de las Naciones Unidas*

USEPA: Agencia de Protección Ambiental; en inglés *United States Environmental Protection Agency*

CAPITULO 1

CAPÍTULO 1.

Introducción.

1.1 EXPANSIÓN AGRÍCOLA Y USOS DE PLAGUICIDAS

La soja, un cultivo casi irrelevante para la producción agrícola de la Argentina a comienzos de la década de los '70, se ha convertido en el cultivo estrella del campo argentino debido a que en 1996, se aprobó en nuestro país, la producción comercial de soja transgénica (genéticamente modificada) y a la popularización y desarrollo de la siembra directa como nueva técnica de manejo de los cultivos.

La soja y sus derivados (pellets, aceites, etc.) constituyen el principal rubro de exportación de la Argentina, uno de los países productores líderes a nivel mundial (Aizen y col., 2009). Según los registros, el área agrícola se mantuvo relativamente constante hasta mediados de la década del '90 alcanzando los 22 millones de ha. A partir de ese punto empezó a crecer de manera acelerada, llegando a más de 30 millones de ha en el año 2006 y más del 50% era soja (Satorre, 2005). El área sembrada con soja en Argentina alcanzó más de 20 millones de hectáreas durante la temporada 2016-2017, expandiéndose sobre el hábitat nativo en muchas áreas del país (Bolsa de Cereales de Buenos Aires, 2017, Fig. 1.1); esto lleva a suponer que la expansión de la frontera agrícola en Argentina puede explicarse, en gran parte, como consecuencia de la expansión del cultivo de soja. Esta expansión está en relación con otros procesos: el primero surge en concordancia con una expansión de la frontera agrícola acompañado con un desmonte acelerado y al reemplazo de sistemas naturales o seminaturales por soja, lo que implica una pérdida directa de biodiversidad nativa (Donald, 2004; Grau y col., 2005). El segundo, una expansión virtual resultante de la introducción de la "soja de segunda", lo que permite realizar dos cosechas anuales (combinación trigo-soja) donde antes se realizaba una y que conlleva a una intensificación en el uso de la tierra (Paruelo y col., 2005; Trigo, 2005). El tercero, es el reemplazo de área sembrada con otros cultivos o destinada a la ganadería por soja (Satorre, 2005), lo que se traduce en una homogeneización del paisaje.

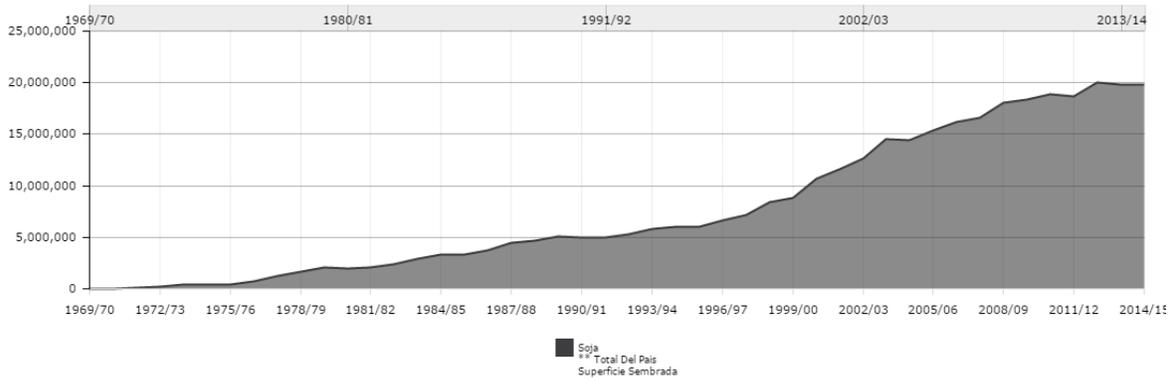


Fig 1.1: Producción de soja total en el país (toneladas), 1970 a 2016. Fuente: SIIA MAGyP.

En la actualidad, el cultivo de soja en Argentina ocupa una amplia región ecológica, que va desde los 23° a los 39° de latitud sur, presentando una mayor concentración en la Región Pampeana (Fig. 1.2).

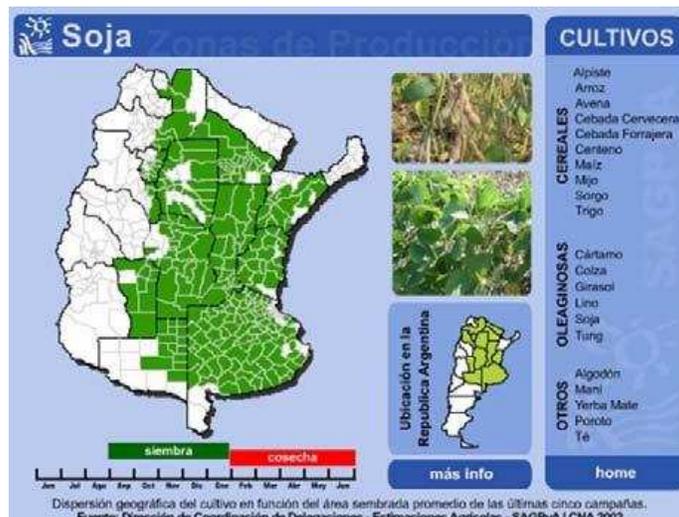


Fig. 1.2: Superficie cubierta por el cultivo de soja en Argentina. Fuente: SAGPyA.

A mediados de la década del 90 se comenzaron a difundir las variedades de soja transgénica (soja RR), resistentes al herbicida glifosato (GLI), desarrolladas por la empresa multinacional Monsanto®. La resistencia al herbicida, lograda mediante la inclusión de un gen de origen bacteriano denominado "RR", permitía la aplicación del mismo en post emergencia, en cualquier estadio de la planta. Se podía aplicar más de una vez en caso de necesidad o realizar mezclas de plaguicidas para asegurar un mejor

control de malezas y plagas. El reemplazo de la variedad tradicional por las variedades RR se produjo prácticamente en la totalidad de la superficie sembrada con ese cultivo en tan sólo dos años (Hang y col., 2011).

La principal propiedad de la soja RR es ser resistente al GLI, un herbicida total o de amplio espectro que elimina todas las malezas en cualquier momento del ciclo sin afectar la planta de soja, lo cual implica una reducción importante de costos por la eliminación de las labores e insumos asociados con la aplicación de herbicidas selectivos de pre y post-emergencia, que requerían las variedades convencionales (Reboratti, 2010). La otra innovación importante, por la que con frecuencia se argumenta que la soja RR es sostenible ambientalmente, fue la adopción de la siembra directa, un método que evita el arado y minimiza el laboreo con el fin de conservar el suelo intacto antes de la siembra, que se realiza con máquinas preparadas especialmente para tal fin. La semilla se siembra directamente en el suelo a la profundidad requerida con una remoción mínima de la tierra, y las malezas se controlan con herbicidas (a base de GLI) en lugar de utilizarse métodos mecánicos. Las supuestas ventajas de la siembra directa son que disminuye la evaporación y la escorrentía del agua, la erosión del suelo y el empobrecimiento de la capa superficial. Entre las desventajas se mencionan la compactación del suelo y el aumento de la acidez (Antoniou y col., 2010).

Esta incorporación de los nuevos paquetes biotecnológicos junto con la siembra directa, nuevos productos químicos (herbicidas, plaguicidas, fertilizantes) y el desarrollo de maquinaria agrícola acorde a las nuevas tecnologías, ha aumentado considerablemente el rendimiento de las cosechas y reducido los costos (Carrasco y col., 2012).

La producción de soja se incrementó en proporciones sin precedentes, con cultivos que aumentaron su área y con el evidente aumento en el uso de plaguicidas y fertilizantes.

El uso de agroquímicos, o productos fitosanitarios diseñados para mejorar la salud de las especies cultivadas, se incrementó rápidamente después de la Segunda Guerra Mundial.

Los fertilizantes promueven el crecimiento rápido de los cultivos, reduciendo las zonas sin crecimiento y por tanto limitando la posibilidad de desarrollo de otras plantas, este hecho genera una clara disminución de la diversidad y disponibilidad de recursos para la fauna.

Entre los fitosanitarios, los plaguicidas son los que constituyen un mayor riesgo para la fauna, siendo herbicidas y fungicidas los más utilizados en términos generales (Ortiz Santaliestra y Egea Serrano, 2013). La FAO-OMS definen como **plaguicida** a cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier

plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies de plantas, animales o microorganismos indeseables que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y sus productos, alimentos para animales o que se pueden administrar a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en, o sobre sus cuerpos. El término abarca todos los ingredientes activos en cualquiera de sus formas, sin importar si fueron formulados para su aplicación. Incluye también las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra el deterioro que se genera durante el almacenamiento y transporte, pero no así los fertilizantes, nutrientes de origen vegetal o animal ni aditivos alimentarios (FAO/WHO, 2010). La toxicidad es la capacidad inherente de una sustancia química de producir efectos adversos en los organismos vivos. Efectos de deterioro de tipo funcional, lesiones patológicas que afectan el funcionamiento del organismo y reducen su capacidad de respuesta a factores de riesgo o estrés. La OMS ha recomendado una clasificación de los plaguicidas, sujeta a actualizaciones periódicas, de acuerdo a los riesgos que implica el uso de los mismos. Esta clasificación se basa en la dosis letal media (DL₅₀) aguda, por vía oral o dérmica en ratas, según las características y clase toxicológica del producto comercializado (Tabla 1.1).

Los plaguicidas pueden clasificarse de acuerdo a su finalidad, es decir según la plaga que controlan, y se denominan *acaricidas* cuando se utilizan para el control de ácaros o arañuelas, *bactericidas* en el control de bacterias, *fungicidas* cuando se destinan al control de hongos, *insecticidas* cuando controlan insectos, *herbicidas* para malezas, etc (Cavallo, 2006; Novo y col., 2011).

Tabla 1.1: Clases toxicológicas de plaguicidas establecidas por la OMS.

CLASE TOXICOLÓGICA	Formulación Líquida DL50 (mg/kg) aguda	Formulación Sólida DL50 (mg/kg) aguda		
	Vía oral	Vía dérmica	Vía oral	Vía dérmica
I-a Productos sumamente peligrosos	< 20	< 40	> 5	< 10
I-b Productos muy peligrosos	20 a 200	40 a 400	5 a 50	10 a 100

II Productos Moderadamente peligrosos	200 a 2000	400 a 4000	50 a 500	100 a 1000
III Productos poco peligrosos	2000 a 3000	> a 4000	500 a 2000	> a 1000
IV Productos que normalmente no ofrecen peligro	> a 3000	ND	> a 2000	ND

ND: no disponible

En cuanto a su composición y formulación, en cada producto comercial normalmente hay sólo una sustancia que tiene efecto pesticida, y es la denominada principio o ingrediente activo (PA/IA). También existen otros productos comerciales que incluyen más de un IA a fin de combinar los efectos de todos ellos. El resto de los ingredientes son los denominados inertes ya que no poseen una acción biocida *per se* y comprenden una serie de funciones diferentes. Entre ellos se puede mencionar a los solventes, humectantes, tensioactivos, adherentes, etc. La combinación de estas sustancias en un producto comercial, a fin de lograr efectividad, es lo que se denomina composición. Por otra parte, una misma sustancia activa se puede comercializar bajo diferentes "aspectos o formatos", y con propiedades diferentes entre sí, y es lo que conocemos como formulaciones (Cid, 2014).

1.1.1 INSECTICIDAS

La OMS-FAO define a un ***insecticida*** como un producto químico de origen sintético o natural, destinado a destruir, contrarrestar, neutralizar, controlar o impedir la acción de cualquier organismo, generalmente artrópodos, considerado nocivo para la salud humana y animal o que ejercen perjuicio sobre la agricultura.

Los insecticidas pueden actuar sobre uno o diferentes estados de desarrollo del insecto, siendo ovicidas, larvicidas y adulticidas si eliminan los huevos, las larvas, los imagos o los adultos, respectivamente. Los insecticidas pueden llegar hasta el lugar donde realizan su acción fisiológica en el insecto (órgano blanco) por varias vías:

De ingestión a través del consumo de plantas que han incorporado a su sistema vascular el producto insecticida.

De contacto, por acción del insecticida directamente al entrar en contacto con el organismo blanco.

Combinados de ingestión y contacto, que es la acción sinérgica de los dos anteriores.

Sistémico, que hace contacto directo con el organismo blanco, pero no actúa en el sitio, sino que es trasladado dentro del cuerpo del insecto, ejerciendo su acción de diversas maneras, interviniendo en alguna de sus vías metabólicas.

No sistémicos, matan bloqueando las vías respiratorias o por envenenamiento.

La acción del insecticida sobre el organismo blanco o *target* es la muerte a corto o mediano plazo. A veces, provocan que los insectos dejen de alimentarse o impiden su metamorfosis que, a largo plazo, implica la muerte (CASAFE, 2010).

En base a sus mecanismos de acción de los insecticidas, se pueden establecer dos tipos de insecticidas:

I- Insecticidas convencionales

II- Insecticidas bioracionales.

I- Convencionales

Se dividen en cuatro grupos según los procesos fisiológicos sobre los que actúan:

a) los capaces de alterar la transmisión de impulsos nerviosos; este proceso es general en todos los animales. Al acelerarse la transmisión del impulso nervioso, los músculos se tensan, se reduce el oxígeno, colapsando los músculos y derivando en un infarto de miocardio., la disminución de la transmisión del impulso nervioso produce el aletargamiento del organismo. A este grupo de insecticidas pertenecen los Organofosforados, Carbamatos y piretroides. Antiguamente, estaban incorporados también los Organoclorados, que actualmente están prohibidos en su mayoría.

b) los que forman complejos con metalo-enzimas

c) los que bloquean la síntesis de quitina.

d) los que son capaces de alterar la respiración del organismo, bloqueando enzimas o la cadena de transporte electrónico mitocondrial. Actualmente no se usan.

II- Bioracionales

Estos insecticidas se caracterizan por tener una acción particular en cada insecto Interfiriendo en procesos biológicos como por ejemplo mudas de larvas, crecimiento, apareamiento, puesta de huevos, la alimentación, la detección olfativa, otros productos evitan la eclosión de los huevos. También pueden considerarse como insecticidas bioracionales a las feromonas, u otros productos que actúan de manera similar.

1.1.1.1 CIPERMETRINA

La cipermetrina ((R, S)-alfa-ciano-3-fenoxibenzil (1RS)-cis, trans-3-(2,2-diclorovinil) 2,2-

Dimetilciclopropano – carboxilato/ CAS 52315-07-8) es un plaguicida sintético de la familia de los piretroides, por tener como base estructural el piretro extraída de flores de crisantemo; clasificado como Clase II (moderadamente tóxico) por la USEPA (United States Environmental Protection Agency). Presenta ocho isómeros, tiene un peso molecular de 416,31 g y su fórmula molecular es C₂₂H₁₉Cl₂NO₃ (Fig. 1.3). Tiene amplitud de usos en numerosos cultivos tales como algodón y cereales, en vegetales y frutales, en los que controla una gran gama de insectos entre ellos lepidópteros, coleópteros y hemípteros. También es utilizada en el almacenamiento de comida, para controlar las moscas y pulgas en los habitáculos de los animales domésticos y de manera extensiva para plagas domésticas y aquéllas que afectan la salud pública como cucarachas, mosquitos y piojos (Who, 1989).

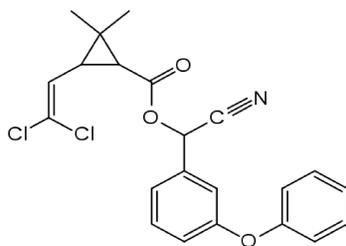


Fig. 1.3: Estructura molecular de Cipermetrina

En relación al destino ambiental, la cipermetrina tiene persistencia moderada en suelos y se degrada más rápidamente en aquellos suelos con bajo contenido de materia orgánica. Su vida media varía de 8 a 16 días, siendo susceptible a la fotodegradación. Al contar con una muy baja solubilidad y baja presión de vapor, se adsorbe, y se asocia a material particulado en ambientes acuosos. Esto limita su movimiento particularmente en los suelos. En nuestro país se detectaron concentraciones de cipermetrina en arroyos adyacentes a cultivos de soja pampeanos con un promedio de $18,78 \times 10^{-3}$ mg/l posterior a eventos de lluvia (Marino y Ronco, 2005).

Como todos los piretroides, la cipermetrina es un compuesto neurotóxico que actúa sobre el sistema nervioso central (SNC), desactivando el cierre de los canales de sodio, prolongando su permeabilidad durante la fase de recuperación del potencial de acción de las neuronas. Esto produce un aumento del flujo de sodio y persistencia de la despolarización de la membrana, dando lugar a una larga secuencia de impulsos

repetitivos en los órganos sensitivos que genera un estado de hiperexcitación. También inhibe los canales de calcio y la ATPasa de calcio y magnesio (Ecobichon, 2005).

1.1.1.2 ENDOSULFÁN

El Endosulfán (3-Oxido 6,7,8,9,10,10- hexacloro- 1,5,5a,6,9,9a- hexahidro-6,9-metano-2,4,3- benzodioxatiepina / CAS 115-29-7 (isómero α , 959-98-8; isómero β , 33213-65-9) es un insecticida organoclorado de tipo ciclodieno que actúa por contacto sobre una gran variedad de insectos y ácaros en cultivos agrícolas y hortícolas, y también como preservador de la madera. Su fórmula molecular es $C_9H_6Cl_6O_3S$ (Fig. 1.4).

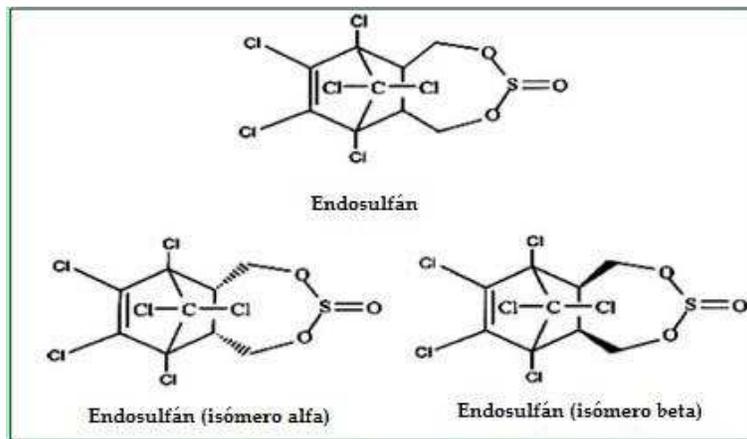


Fig. 1.4: Estructura molecular de Endosulfán y sus isómeros α - y β -endosulfán.

Los ciclodienos parecen afectar a todos los animales de manera similar, produciendo un incremento de la actividad del sistema nervioso, seguido por temblores, convulsiones y postración (Ecobichon, 2005).

Como la mayoría de los ciclodienos el endosulfán es muy persistente y estable en el ambiente. Debido a ello, a los fenómenos de bioacumulación y biomagnificación y la muy alta toxicidad reportada para numerosos organismos de distintos niveles de organización, desde microorganismos hasta vertebrados incluyendo el hombre, el uso del endosulfán ha sido prohibido en 57 países, está restringido en otros, mientras que en algunos como Brasil, Uruguay y Chile se está realizando un proceso de reevaluación en función de estudios que demuestran su teratogenicidad y mutagenicidad, así como posible carcinogenicidad y disrupción endocrina (Harikrishnan y Usha, 2004; Bejarano González,

2008). En nuestro país, se estableció un período de cinco años para la eliminación gradual hacia fuera desde la fecha de la Resolución 511/2011 (SENASA, 2011) efectiva, incluyendo una prohibición total para el uso, importación, procesamiento (síntesis), formulación y comercialización para el ingrediente activo y productos, ampliando así el uso legal hasta 2016. El Programa Medioambiental de las Naciones Unidas (UNEP) incluye a este insecticida en la lista de contaminantes orgánicos prohibidos (Convenio de Estocolmo sobre POP's 2011).

El endosulfán es relativamente inmóvil en el suelo y moderadamente persistente, con una vida media de 35 días para el isómero alfa y de 150 días para el beta en condiciones neutras. Estos isómeros pueden persistir por mucho más tiempo en condiciones ácidas. El transporte desde el suelo se puede producir por escorrentía si el endosulfán se encuentra adsorbido a partículas de suelo superficiales. En agua tiene una vida media de 35 días en condiciones neutras que alcanza a 150 días en condiciones ácidas o básicas. Se pueden encontrar grandes cantidades de endosulfán en aguas superficiales cercanas a los sitios de aplicación, no se disuelve fácilmente y se puede bioacumular en el cuerpo de los peces y de otros organismos acuáticos (Harikrishnan y Usha, 2004).

1.1.1.3 CLORPIRIFOS

El clorpirifos (O, O-dietil O-(3, 5, 6-tricloro-2-piridil) fosforotioato / CAS 2921-88-2) es un plaguicida organofosforado, moderadamente tóxico de amplio uso en la agricultura y de fórmula molecular $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ (Fig. 1.5).

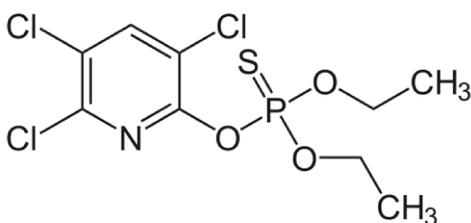


Fig. 1.5: Estructura molecular de Clorpirifos.

Las formulaciones de clorpirifos son utilizadas como insecticida y acaricida que actúa por contacto, ingestión y/o inhalación sobre los organismos. El principal modo de acción es la inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa, una enzima implicada en las sinapsis

nerviosas y en la neurotransmisión muscular, produciendo efectos neurotóxicos (Krieger, 2010).

El comportamiento ambiental del insecticida indica una persistencia moderada en suelos y bajos valores de vidas medias en aguas. Este comportamiento es resultante de su tendencia a volatilizarse, debido a una presión de vapor moderada con baja solubilidad en agua, y a asociarse con el sedimento. En nuestro país, se detectaron concentraciones de clorpirifos en arroyos adyacentes a cultivos de soja pampeanos con un promedio de 1,7 x 10⁻³ mg/l posterior a eventos de lluvia (Marino y Ronco, 2005); y la comercialización de este insecticida pasó de 1.575.238 l en el año 1999 a 9.121.959 l en el año 2010, liderando el mercado según el volumen de ventas en el año 2011 (CASAFE, 2011).

1.1.2 HERBICIDAS

Los herbicidas son productos fitosanitarios utilizados para controlar especies vegetales no deseadas por su impacto negativo en la producción y rendimiento de los cultivos.

Existen varias formas de clasificar los herbicidas, incluyendo como se usan, sus propiedades químicas y su modo de acción.

Cabe aclarar también que un mismo herbicida, puede ser englobado en diferentes categorías (CASAFE, 2010). No obstante, los mismos se pueden dividir en:

Selectivos: aquellos que controlan un objetivo, preservando el cultivo de interés económico.

Totales: generalmente utilizados para limpieza de terrenos donde se controlan todas las especies existentes, sin discriminación.

Residuales: persisten en el suelo controlando la nacencia de malezas provenientes de semillas de especies anuales, al impedir su germinación. Normalmente no son activos sobre especies perennes que rebrotan a partir de rizomas, bulbos o estolones.

Preemergentes: son herbicidas que se aplican antes de la nacencia del cultivo.

Postemergentes: son herbicidas que se aplican después de la nacencia del cultivo.

Sistémicos: se aplican sobre la planta, pero actúan a distancia, al ser traslocado hasta la raíz mediante el floema.

De contacto: se aplican sobre la planta actuando localmente en la superficie, sin necesidad de ser traslocado.

Mecanismos de acción de los herbicidas

Los herbicidas actúan sobre diferentes procesos fisiológicos de los vegetales. En función de esto se pueden nombrar cuatro tipos de herbicidas:

1- Herbicidas que actúan sobre la fotosíntesis. Se dividen a su vez en cuatro grupos que pueden inhibir o desacoplar la cadena de transporte de electrones, impedir la formación de ATP o alterar la biosíntesis de carotenoides.

2- Herbicidas que alteran la biosíntesis de metabolitos distintos a los hidratos de carbono. Se subdividen en tres grupos: los que alteran la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, los que inhiben la síntesis de lípidos y los que alteran la biosíntesis de la glutamina.

3- Herbicidas que alteran el crecimiento vegetal. Incluyen aquellos que alteran la elongación celular, los que impiden la división celular y los que inhiben la síntesis de giberelinas.

4- Herbicidas con otros mecanismos de acción. Aquellos que provocan la disrupción de la membrana celular, los que actúan sobre pigmentos o que poseen actividad hormonal.

1.1.2.1 GLIFOSATO

El Glifosato (N-fosfometil glicina; CAS 1071-83-6) es un herbicida sistémico y de amplio espectro, extensamente utilizado en agricultura y también en ambientes forestales, acuáticos, jardines, y en la industria de la madera, para el control no selectivo de malezas anuales y perennes, gamíneas y latifoliada (Who, 1994). Se lo clasifica como inhibidor de la EPSP (5-enolpiruvil-shikimato-3- fosfato) sintetasa, enzima que cataliza la formación de un precursor de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en vegetales (Mallory Smith y Retzinger Jr, 2003). Se lo considera como un herbicida que se adsorbe (une) fuertemente a los suelos, por lo que a pesar de ser muy soluble, tiene reducida movilidad.

De las diez formulaciones más comercializadas de plaguicidas en todo el país, ocho tienen como ingrediente activo (i.a) el glifosato (CASAFE, 2011). Las dosis de aplicación recomendadas para el cultivo de soja varían dependiendo de las malezas presentes en los lotes y las formulaciones utilizadas.

Su fórmula molecular es $C_3H_8NO_5P$ (Fig. 1.6). El grado de persistencia del glifosato en el ambiente está muy discutido. En nuestro país, existen estudios en los que se informa asociación del compuesto al material en suspensión en aguas de lagunas, con una vida media de 5,77 días para una dosis de 6 mg/l y 7,73 días para una dosis de 12 mg/l (Pérez y col., 2007). Su degradación por microorganismos es la vía primaria de disipación en el ambiente, siendo la fotodegradación y la volatilización despreciables. Se estima una vida media de entre 7 a 14 días en el agua, según los datos reportados (Giesy y col., 1999).

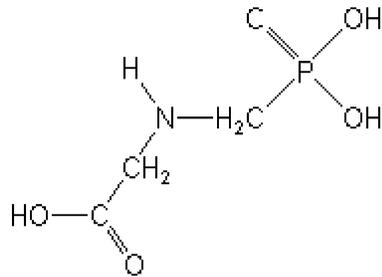


Fig. 1.6: Estructura molecular de Glifosato.

La formulación comercial a base de glifosato más conocida es Roundup®, fue introducida por primera vez en 1974 por la empresa multinacional Monsanto (Franz y col., 1997). Las formulaciones comerciales, además de un porcentaje del principio activo, contienen surfactantes y otros coadyudantes, para permitir que el glifosato pueda atravesar las cutículas foliares cerosas y membranas celulares hidrofóbicas de las malezas.

El uso principal del glifosato es en el barbecho químico (Arregui y col., 2009). Este procedimiento consiste en eliminar las malezas que consumen agua y nutrientes antes de la siembra del cultivo, para que éste pueda emerger e implantarse en mejores condiciones. Esto es especialmente relevante en el centro de Santa Fe ya que en el período de implantación de los cultivos estivales es frecuente el déficit hídrico.

La propiedad que permite aplicar el glifosato hasta tres días antes de la implantación de trigo y/o maíz no RR, es que al quedar adsorbido en el suelo no está disponible para el cultivo y entonces no le puede causar daño.

Algunas de las formulaciones comerciales de glifosato más utilizadas en Argentina incluyen: Glifosato Atanor (Atanor), Mifos (Chemotécnica), Eskoba Amonio Surcos, Eskoba Max Surcos, Eskoba Surcos (CIAGRO), Dupont Premium SL, Dupont Premium WG, Glifosato Dupont (Dupont) Glifomax NG, Glifomax Zamba, Glifoplus Zamba, Glifosato Zamba, Glifotop Zamba (Nidera), Roundup, Roundup Amonio, Roundup FG, Roundup Full II, Roundup Max, Roundup Ultramax, Panzer, entre muchas otras. Las dosis recomendadas para su aplicación van desde 1,1 a 6,0 l/ha dependiendo del cultivo y de la maleza que se quiera combatir, siendo mayor la dosis en el caso de las perennes. Para cultivos de soja se recomienda una dosis de 2,5 a 6,0 l/ha (CASAFE, 2010). Las aplicaciones se realizan normalmente con mochila, equipos pulverizadores terrestres

(conocidos como mosquitos) o, más raramente, aplicaciones aéreas, dependiendo del cultivo.

El GLI fue recientemente reclasificado por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 2015; del inglés *International Agency for Research of Cancer*), como una sustancia cancerígena en el Grupo 2A (*probablemente carcinógeno para humanos*), y se evidencia la necesidad de realizar estudios principalmente sobre la salud humana, debido a "pruebas suficientes" en experimentos con animales.

1.2 IMPACTO EN LAS ESPECIES SILVESTRES

Desde hace mucho tiempo existe la hipótesis del impacto que generan las prácticas agrícolas sobre la vida silvestre. Algunos estudios estuvieron orientados al conocimiento sobre la fragmentación del hábitat de los entornos agrícolas y el efecto negativo sobre el hábitat de los animales, las poblaciones de vertebrados (Fischer y Lindemayer, 2007) y sus efectos secundarios en los perfiles de salud de individuos de libre acceso (Johnstone y col., 2012). Menos se sabe sobre el impacto de la amplia y comúnmente utilización de productos químicos agrícolas en la vida silvestre, que viven en estos entornos (Amaral y col., 2012a, 2012b). De manera Individual o combinada, los cambios en el ecosistema, la exposición a sustancias químicas ambientales y otros procesos influyentes que no están directamente relacionados con la agricultura pueden dar lugar a descensos de la población y, en algunos casos, extinciones regionales o generalizadas (Selcer, 2005; Brown y col., 2008). Por lo tanto, es necesario determinar de que manera actúan los factores sobre la vida silvestre en las áreas agrícolas, y como revertir estos descensos.

La fauna puede adaptarse y sobrevivir siempre y cuando cuente con una cantidad y calidad de hábitat adecuada, aún en presencia de humanos. Tanto plantas como animales, así como sus hábitats, pueden ser integrados en una unidad definida por una gama amplia de interacciones denominada ecosistema.

El conocimiento de las relaciones biológicas y ecológicas de estos elementos vivos y el rol que cada uno de ellos tiene en el ecosistema es necesario para evaluar el impacto potencial de un pesticida específico en una especie específica (Badii y col., 2006). Los estudios sobre la acumulación de xenobióticos son muy importantes, debido a que es uno de los pocos indicadores que se puede tener sobre la exposición de la fauna silvestre en diferentes lugares y poblaciones (Zakrzewski, 1991).

Los componentes de mayor importancia para detectar son los compuestos clorados (OC), los cuales tienen un potencial de bioacumulación elevado, afectan la supervivencia de las especies y poseen un peligro potencial para la salud humana (OMS, 1982). El descubrimiento de insecticidas OC como el DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano), que son altamente persistentes, bioacumulables y que pueden afectar poblaciones completas de animales silvestres, ha generado la prohibición y restricciones en su utilización (Kendall y col., 1990). Muchos trabajos describen el efecto de los OC en diferentes especies (Wu y col., 2000; Fagotti y col., 2005; Keller y col., 2006; Sherwin y col., 2016).

Aparentemente, un plaguicida clorado puede ser encontrado en la fauna y raramente en las personas, debido a la constante exposición a la que están sometidas las especies que habitan en los campos cultivados. Como la bioacumulación de OC depende de la cantidad de grasas del organismo, los especímenes adultos pueden tener relativamente altos niveles de plaguicidas y no presentar signos de intoxicación. Puesto que estos compuestos están almacenados en el tejido adiposo, al movilizar las reservas grasas durante la reproducción o las migraciones, se puede producir la intoxicación de los animales. Además, su liposolubilidad les confiere un medio favorable para su conservación y acumulación facilitando los procesos de traslocación a través de las redes tróficas (Lajmanovich y Peltzer, 2008).

Los organofosforados (OPs) y carbamatos (CBs) presentan una baja persistencia ambiental (Racke, 1992). La hidrólisis, fotólisis y la degradación microbiana son los mecanismos más importantes en la destrucción de estas moléculas. A su vez, los organismos cuentan con sistemas de detoxificación capaces de degradar y eliminar los OPs y CBs, como son las enzimas carboxilesterasas y las fosfotriesterasas. Con el objetivo de desarrollar sistemas de monitoreo no letales, se ha empleado el análisis de la actividad de la butirilcolinesterasa (BChE) sanguínea para evaluar la exposición de la fauna silvestre a los OPs y CBs (Sánchez Hernández, 2001). Son potentes neurotóxicos, tanto para sus organismos diana como para el resto de la fauna, entre otros (Amaral y col., 2012; Muller y col., 2014; Siroski y col., 2016).

Otro de los agroquímicos muy utilizados en los agroecosistemas, son los piretroides. Se caracterizan por una actividad insecticida de amplio espectro basada en su neurotoxicidad (Salibián y Marazzo, 1995). Se sabe que actúan interfiriendo la permeabilidad iónica de las membranas celulares, dificultando la generación y conducción de los impulsos del sistema nervioso central y periférico.

1.3 DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La clase Reptilia está compuesta por 4 órdenes: Chelonia, Crocodylia, Rhynoncephalia y Squamata. Están presentes desde la Era Mesozoica, a la que también llamaron la "Era de los Reptiles", donde existían 17 órdenes. Los miembros de esta clase se fueron modificando, reduciendo, e incluso desapareciendo, hasta llegar a la actualidad. Estos evolucionaron a partir de los anfibios y con los cuales comparten ciertas características morfológicas.

Los reptiles son los únicos ectotermos amniotas por lo tanto los convierte en un grupo central de estudio para proveer conocimientos importantes sobre la evolución del sistema inmune como el funcionamiento del sistema en un contexto ecológico.

El Orden Crocodylia (Clase Reptilia) presenta en la actualidad 24 especies distribuidas en todo el mundo (CSG, 2016). En Argentina, se pueden encontrar dos de ellas, *Caiman latirostris* (yacaré overo o yacaré ñato) y *C. yacare* (yacaré negro), ambas pertenecientes a la familia Alligatoridae. Estas especies se distribuyen en el centro norte del país, pero *C. latirostris* llega más al sur que *C. yacare*. Se ha registrado la existencia de *C. yacare* en Chaco, Corrientes, Formosa y Santa Fe, mientras que el yacaré overo además llega a Entre Ríos, Misiones, Salta, Santiago del Estero y Jujuy (Yanosky, 1990; Larriera e Imhof, 2000). La mayor distribución de *C. latirostris* dentro del país se debe a que esta especie presenta una mayor tolerancia climática (Siroski, 2004; Fig. 1.7).

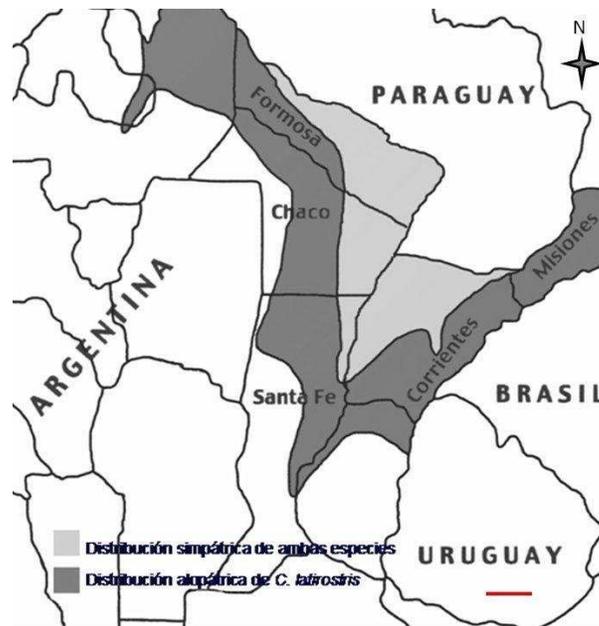


Fig. 1.7: Distribución geográfica de *Caiman latirostris* y *C. yacaré* en Argentina. Tomado de Larriera y col., (2008). Barra = 100 Km.

La existencia de los caimanes está indefectiblemente asociada al agua, aunque a diferencia de la mayoría de los *Crocodylia*, no son fáciles de observar en los grandes espejos o cursos de aguas limpias. En la provincia de Santa Fe, *C. latirostris* habita una diversa gama de ambientes acuáticos del valle de inundación del río Paraná, la cuenca del río Salado y de los Saladillos, (Larriera, 1995) siendo éstos generalmente, cuerpos de agua poco profundos, fuertemente vegetados y de difícil acceso (Larriera, 1992).

El yacaré overo presenta su cuerpo comprimido dorsoventralmente, la cola musculosa y afilada lateralmente, y una piel prácticamente impermeable y con manchas de camuflaje, que lo transforma en un nadador adaptado a lugares ricamente vegetados donde, gracias a sus ojos y narinas de ubicación dorsal, puede pasar desapercibido tanto para potenciales presas como para predadores (Medem, 1983; Fig. 1.8). El tamaño de los adultos en el caso de los machos está en el orden de los 2,60 m de longitud y unos 80 kg de peso. Registros históricos citan animales de hasta 3,20 m (Larriera y col., 2008).



Fig. 1.8: Ejemplares juvenil (izquierda) y adulto (derecha) de *C. latirostris*.

Los yacarés dependen de la temperatura exterior para desarrollar sus actividades, por lo que en invierno su vida se limita a unos pocos movimientos para exponerse al sol o sumergirse. Cuando llega la primavera y los primeros calores, comienzan a alimentarse con mayor frecuencia, hasta llegar al pico máximo de actividad en la temporada reproductiva (Larriera e Imhof, 2006). En este período se producen algunas disputas territoriales hasta que comienzan las cópulas. Los apareamientos se producen siempre en el agua, luego de que el macho, tras una persecución de duración variable, logra atrapar y cubrir a la hembra. Una vez fecundadas, las hembras se alejan a lugares apartados, a veces a kilómetros de los ambientes de residencia habitual en aguas permanentes, incluso a la profundidad del bosque, para iniciar la construcción del nido (Yanosky, 1990). Los nidos varían en su constitución en función del ambiente en el cual fueron construidos (Montini y col., 2006). Se trata de montículos de material vegetal, tierra, arena, ramas y deyecciones que actúan como incubadoras naturales por medio del calor del sol y la fermentación vegetal, produciendo una temperatura interior adecuada relativamente constante (30 – 32 °C) durante todo el período. Las posturas tienen lugar entre principios de diciembre y mediados de enero, frecuentemente con 35 huevos aproximadamente (Larriera y col., 2008). Por lo general, durante el proceso de incubación, la hembra atiende el nido en reiteradas ocasiones y, en muchos casos, manifiesta actitudes de defensa, mostrándose agresiva ante la aparición de intrusos o potenciales predadores (Larriera, 1993). La incubación tiene una duración que oscila entre los 65 y 75 días (a 31°C aproximadamente) y las crías nacen en febrero-marzo con un tamaño promedio de 40 g de peso y 22 cm de longitud (Larriera y col., 2008; Fig. 1.9).



Fig. 1.9: Cría de *C. latirostris* saliendo del huevo.

Se estima que en condiciones naturales, solo eclosionan entre el 30 y el 50% de los huevos puestos en la temporada y debido a algunos factores como el de las bajas temperaturas extremas y los predadores, aproximadamente el 10 % llega al año de vida. Esto fácilmente explica la estrategia reproductiva de la especie, que como en el caso de la mayoría de los reptiles, producen una frágil, pero abundante descendencia, lo que garantiza que al menos unos pocos lleguen al estado adulto (Larriera y col., 2008).

En todas las especies de cocodrilianos estudiados hasta el momento, el sexo del embrión se determina mediante la temperatura de incubación, particularidad que también es frecuente observar en tortugas y algunos lagartos. El embrión tiene la potencialidad de diferenciarse en cualquiera de los dos sexos y, dependiendo de la temperatura durante el llamado, Período Termosensible (PTS) de la incubación, se diferenciará en macho o en hembra. Así, una incubación constante a 33 °C produce 100% machos, a temperaturas de 29 y 31 °C sólo se producen hembras (Piña y col., 2003), mientras que a temperaturas intermedias entre 31 y 33 °C, se producen ejemplares de ambos sexos.

1.4 PROGRAMAS DE USO SUSTENTABLE

La valorización de los ecosistemas naturales en términos económicos y su incorporación a los procesos productivos se presenta hoy como la herramienta más sólida de conservación de hábitat, ya que el sostenimiento de dicha productividad resulta de interés general (Larriera e Imhof, 2000).

Una de las alternativas para valorizar los ecosistemas naturales es mediante la utilización sustentable de especies de la fauna silvestre de interés económico, en la medida en que el beneficio comercial producido actúe como estímulo para su conservación. Por otra parte, la identificación de especies clave para determinados ecosistemas permite

desarrollar programas de conservación indirecta sobre las otras especies asociadas en el mismo hábitat (UICN, 1991).

En el pasado la explotación de diversas especies de cocodrilianos representó una actividad económica relevante en algunas regiones del mundo, y debido a la extracción desmedida a la que fueron sometidos, muchas de ellas se vieron en serio peligro. Las especies argentinas también se aprovecharon comercialmente, generando preocupación en el ámbito local e internacional (Waller y Micucci, 1993). Desde principios del siglo XX, hubo una utilización diferencial entre estas especies de caimanes, ya que debido a la mayor osificación de los osteodermos que posee el *C. yacare*, la más buscada fue el *C. latirostris*, en función de su mayor calidad marroquinera, y por ende, valor económico superior. Es por este motivo, y por haber tenido una presión de caza mayor debido a la calidad de su piel, siempre se ha reportado que las poblaciones de *C. latirostris* se encontraban más disminuidas que las de la otra especie.

La combinación de una serie de factores, como gran tamaño, larga vida, ectotermia, conducta maternal, rápido aprendizaje y un complejo sistema social; les han permitido usar de manera efectiva variados hábitats tropicales y subtropicales, y enfrentar tanto la variabilidad natural como las perturbaciones humanas. En tal sentido, la relativa independencia entre el reclutamiento y el éxito reproductivo de los cocodrilianos, permite manejar sus poblaciones y cosecharlos de manera sostenible (Larriera, 1991).

A partir del año 1990, las poblaciones silvestres de yacaré overo de la provincia de Santa Fe, Argentina, comenzaron a ser objeto de manejo a través de un programa para la preservación de la especie y la explotación racional de productos de interés comercial. Este programa, basado en la técnica de "Rancho" (del inglés *ranching* o cosecha de huevos silvestres para cría en granjas), consiste en mantener los reproductores en la naturaleza, extrayendo solamente los huevos y retornando al medio silvestre, a los nueve meses de edad aproximadamente, a los animales nacidos y criados en cautiverio. Esta metodología de manejo se fundamenta en el factor crítico que representan tanto la alta mortandad embrionaria durante la incubación como la predación durante el primer año de vida. La implementación de este sistema de manejo evita la pérdida de huevos que ocurre naturalmente y la gran mortandad de individuos con menos de un año de edad, con los que se obtiene un número significativamente mayor de individuos viables. Como resultado del rancho, una proporción equivalente o mayor de animales de la que hubiera sobrevivido en condiciones naturales es reintroducida al ecosistema de origen. El

excedente es destinado a la obtención de cuero y carne con un enfoque de producción económica ambientalmente sustentable (Larriera, 1994).

Inicialmente, el objetivo del programa fue la recuperación poblacional del yacaré overo que en ese momento se encontraba en peligro de extinción. Las poblaciones de caimanes habían disminuido enormemente como resultado del efecto de sobre captura por caza de subsistencia, sumado a la drástica pérdida de hábitat por el avance de la frontera agrícola, las canalizaciones y construcción de represas para el secado de esteros y su posterior utilización como tierras para cultivo (Larriera e Imhof, 2006). Gracias a la implementación de este programa, se logró una importante recuperación de las poblaciones naturales de *C. latirostris*, de manera que la especie fue transferida en el año 1997 del Apéndice I al II de CITES, permitiendo la comercialización de sus productos, siempre y cuando provinieran de programas de rancheo debidamente habilitados por los organismos de fiscalización en Argentina (Res 283/00, Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación).

Estos emprendimientos, además de beneficiar a los propietarios de los establecimientos, involucran y benefician a los pobladores locales. Estos programas son a su vez, generadores de variada información científica sobre la biología, dinámica poblacional e historia natural de las especies en cuestión. El nivel de difusión de estos proyectos, el incentivo para los pobladores locales y los mecanismos de control, permiten que hoy las poblaciones se encuentren en un evidente crecimiento, sin registros de ningún tipo actividades ilegales ligadas a los yacarés en Argentina (Larriera y col., 2008).

Actualmente, existen otros programas de manejo de las dos especies de caimanes argentinos que utilizan el sistema de rancheo en las provincias de Chaco, Corrientes y Formosa. En la provincia de Santa Fe, la recolección de huevos se realiza a partir de nidos ubicados en albardones, embalsados, esteros, cuerpos de agua artificiales y bosques o montes (Larriera, 1995). Las recolecciones se realizan a caballo, a pie o utilizando embarcaciones pequeñas en el caso de cursos de agua más profundos. Aproximadamente el 80% de los huevos son recolectados durante la primer semana de desarrollo embrionario. En el momento de la cosecha, los huevos son marcados (Fig. 1.10) a fin de no alterar la posición en la que fueron puestos para no producir daño al embrión, ya que el mismo se fija a la parte superior de la membrana dentro de las 24 hs después de la postura.



Fig. 1.10: Cosecha de huevos de *C. latirostris* en el Dpto. San Cristóbal, provincia de Santa Fe (Argentina). El nido se abre hasta encontrar la cámara con los huevos. Antes de ser colectados, los huevos se marcan en la cara superior en la posición en la que son encontrados dentro del nido, y que se mantiene durante toda la incubación.

Luego, los huevos son trasladados en recipientes plásticos con material vegetal proveniente del nido para evitar su movimiento, hasta las instalaciones del Proyecto Yacaré, en la ciudad de Santa Fe, donde se realiza la incubación y cría.

La incubación se lleva a cabo en una sala acondicionada para tal fin, con temperatura y humedad estrictamente controladas (Fig. 1.11). La temperatura de incubación se mantiene a 31 ± 1 °C, para obtener una proporción de hembras y machos determinada y la humedad entre 95 y 98%.



Fig. 1.11: Incubadora del "Proyecto Yacaré" mostrando los cajones de incubación de los huevos. Se observa la numeración utilizada para identificar los mismos.

Los animales de cada nido son marcados al nacer mediante el corte de los verticilos caudales que indican su año de nacimiento (verticilos dobles) y el nido de origen (verticilos simples) (Larriera, 1994). Posteriormente los pichones se alojan en habitáculos climatizados con un gradiente térmico entre 29 y 32 °C, contando con una superficie seca y una con agua (Fig. 1.12).



Fig. 1.12: Piletas de cría del "Proyecto Yacaré" donde se observa la superficie seca y con agua.

La alimentación se provee día por medio *ad libitum* y consiste en una mezcla húmeda compuesta por 60% de cabeza de pollo molida y 40% de balanceado seco con una formulación particular, especialmente preparada para estos animales (Larriera y col., 2008). En el mes de noviembre se devuelve a la naturaleza un porcentaje de los animales nacidos en ese año, proporción que se determina en función de la situación de la población a partir de la cual se cosechan los huevos. Para la liberación se respeta el origen de los nidos, es decir, los individuos son liberados en el mismo sitio donde fueron cosechados los huevos que les dieron origen.

1.5 ESPECIES CENTINELAS

El concepto de organismo centinela fue definido por Stahl (1997) como "cualquier organismo no-humano que pueda reaccionar ante un contaminante ambiental antes de que el contaminante impacte sobre los humanos". De este modo las respuestas endógenas del organismo proveen una señal de alerta temprana sobre potenciales riesgos para la salud humana y de los ecosistemas.

Ciertos animales salvajes representan excelentes modelos, o *centinelas*, para hacer frente a los problemas relacionados con la contaminación del medio ambiente, ya que pueden

proporcionar datos integradores sobre la exposición (es decir, información sobre el tipo, la cantidad y disponibilidad de los contaminantes) y efecto (es decir, información subletal y respuestas clínicas de salud) (Basu y col., 2007).

Algunos criterios importantes para la selección de especies centinelas son los siguientes (LeBlanc y Bain, 1997; Cunha y Guilhermino, 2006):

- Sensibilidad relativamente amplia a la contaminación.
- Alta disponibilidad y abundancia.
- Amplia distribución geográfica.
- Organismos autóctonos o representativos del ecosistema que se evalúa y con su ciclo de vida completamente desarrollado en el lugar.
- Conocimiento de su biología, fisiología y hábitos nutricionales.
- Preferencia por especies de importancia recreativa, comercial y/o ecológica.
- Disponibilidad de ejemplares a lo largo de todo el año.
- Preferencia por especies de tamaño reducido para facilitar la obtención de gran número de datos y el mantenimiento en laboratorio para realizar ensayos de toxicidad.

La identificación de especies centinelas, así como de biomarcadores ("herramientas que pueden utilizarse para aclarar la relación, si la hay, entre la exposición a xenobióticos y la enfermedad" (Musalli Galante y col., 2013)) sensibles para ser aplicados en la biota son indispensables para relacionar la respuesta de los organismos a la exposición a xenobióticos, proveyendo de esta manera mejores herramientas predictivas para la protección ambiental de las especies silvestres (LeBlanc y Bain, 1997; Moore y col., 2004). A pesar de que los datos obtenidos en especies centinelas no son factores determinantes en la evaluación del riesgo para los seres humanos, pero pueden ser tomadas como evidencias significativas frente a decisiones de evaluación de riesgo; proveyendo alertas tempranas de situaciones que requieren más estudio, o sugiriendo potenciales causas y efectos (Van der Schalie y col., 1999).

El uso de animales como especies centinelas presenta varias ventajas para proveer una advertencia temprana sobre potenciales riesgos para la población humana antes de que la misma resulte afectada.

De esta manera, los organismos centinelas se seleccionan para realizar monitoreos ambientales con el objeto de controlar la salud del medioambiente y de las especies que lo habitan.

Los modelos animales con fines experimentales tienen incontables requisitos, algunos de los más importantes son: ser confiable como herramienta de evaluación, permitir replicación de los resultados obtenidos, mostrar manifestaciones detectables del proceso, efectos predecibles y la posibilidad de extrapolar resultados a otras especies en situaciones experimentales o hacer inferencias a poblaciones en ambientes naturales.

Los reptiles son modelos de vertebrados utilizados en el estudio de la mayoría de los campos de investigación, genética, inmunología y toxicología. Su singular fisiología, crecimiento indefinido y fecundidad creciente a lo largo de la vida de la hembra adulta, motivan el estudio de cómo la fisiología a nivel mecanicista, la historia de vida a nivel organizacional y la selección natural en la escala evolutiva definen la vida en este grupo taxonómico diverso. Constituyen un grupo "antiguo" con mecanismos fisiológicos tan complicados como su comportamiento, y con adaptaciones particulares que probablemente explican el éxito evolutivo de este grupo durante millones de años y su diversidad actual.

A diferencia de la mayoría de las especies utilizadas en estas áreas de estudio, los reptiles no suelen presentar cortos tiempos de generación, no producen muchos descendientes en un corto período de tiempo, y por lo general son difíciles de mantener en cautividad para los requisitos de cría y el espacio. Irónicamente, las características que hacen que los reptiles parezcan difíciles de estudiar, de hecho presentan a los científicos con una oportunidad única de crear nuevos paradigmas ecológicamente significativos de modelos animales para estudiar temas ambientales y relevantes (Poletta y col., 2013).

La pérdida de hábitat y la degradación son dos de las principales causas de disminución de la población en reptiles. Debido a la falta de estudios experimentales, se sabe muy poco sobre los mecanismos de captación de contaminantes en los reptiles. Al igual que otros vertebrados, los reptiles están expuestos a los contaminantes a través de diferentes maneras: a través cutánea o por inhalación o ingestión. La importancia relativa de cada vía dependerá de una variedad de factores, incluyendo la ecología y la fisiología del organismo, características del contaminante, y el medio ambiente físico-químico en el que el organismo se encuentra con el contaminante. En la mayoría de los casos, el contacto con la piel e ingestión serán las vías más importantes de la exposición (Hopkins, 2005).

Entre los reptiles, los cocodrilianos pueden estar expuestos a los contaminantes presentes en todas las etapas de la vida.

1.5.1 COCODRILIANOS COMO INDICADORES DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

Cocodrilianos, caimanes (lagartos, cocodrilianos, gaviales) son componentes integrales de los humedales; son de larga vida, carnívoros del nivel más alto de la cadena trófica, con distribución restringida necesariamente asociados al agua, que habitan en hábitats tropicales y subtropicales en todo el mundo (Crain y Gillette, 1998; Campbell, 2003). En vista de esto, los cocodrilianos parecen ser excelentes indicadores de la contaminación del medio ambiente.

Los cocodrilianos son reptiles generalmente de cuerpo grande, acuáticos que viven en las regiones tropicales de todo el mundo. Tienen una estrategia de historia de vida basada en la madurez tardía, longevidad extrema, y grandes garras. Exhiben cuidado de sus padres y tienen la determinación del sexo dependiente de la temperatura. Son depredadores peligrosos, y valorados por su piel y la carne. Muchas poblaciones están amenazadas o en peligro en todo el mundo por lo que ha aumentado la atención en los efectos de los contaminantes sobre las poblaciones de cocodrilianos (Guillette, 2000; Wu y col., 2000; Gunderson y col., 2004).

Los jóvenes y los adultos pueden estar expuestos a través de la comida, el agua, y los sedimentos que se presentan en el entorno natural donde viven. Además, los contaminantes acumulados en la madre pueden llegar al embrión a través de la yema, lo que también afecta el desarrollo embrionario *in ovo*. Con frecuencia, las hembras anidan cerca de los cuerpos de agua adyacentes a los cultivos. Por esta razón, los embriones están expuestos a los pesticidas utilizados en estos cultivos. Los embriones y las crías pueden estar expuestos a tales compuestos que recorren la cáscara del huevo de la atmósfera durante la incubación o después de la eclosión (Siroski y col., 2016).

Particularmente, en el caso de *C. latirostris*, en los últimos años y como resultado de la expansión de las fronteras agrícolas, muchas áreas de su distribución geográfica en las provincias de Santa Fe, Chaco, Formosa y Corrientes (Argentina) han quedado en la proximidad de zonas con actividad agrícola intensa, donde innumerables formulaciones de plaguicidas se utilizan en forma creciente como método estándar de control de plagas. Por otra parte, el período del año de máxima aplicación de plaguicidas coincide con la temporada reproductiva de esta especie (noviembre- marzo), implicando un riesgo de contaminación particularmente importante para los embriones en desarrollo y neonatos (Poletta y col., 2009; Fig. 1.13).



Fig. 1.13: Ejemplar adulto de *C. latirostris* de 2,4 m de longitud en un canal de agua de un área de cultivos.

En nuestro país, *C. latirostris* fue previamente utilizado como indicador de contaminación ambiental relacionado con contaminantes que actúan sobre el sistema inmune, estrés oxidativo, disruptores endócrinos y genética (Stoker y col., 2003; Rey y col., 2006; Beldoménico y col., 2007; Poletta y col., 2008, 2009, 2009a, 2011, López González y col., 2013, Latorre y col., 2013, Siroski y col., 2016).

1.6 GENERALIDADES DEL SISTEMA INMUNE (SI)

Alrededor de cada uno de nuestros animales, o de nosotros mismos, abundan constantemente millones de agentes patógenos, entre bacterias, hongos, parásitos y virus, todos ellos con potencial para producirnos la muerte. Sin embargo, desde muy temprano en la evolución, se han desarrollado mecanismos para identificar a esos agentes patógenos y eliminarlos, diferenciándolos de los componentes propios del organismo, frente a los que muestran tolerancia. Esta labor de defensa de las agresiones externas está a cargo del **sistema inmune** (SI), compuesto por un conjunto de órganos, tejidos, células y moléculas, que elaboran una respuesta coordinada (Collado y col., 2008).

En los vertebrados superiores se ha establecido un SI efectivo y altamente complejo con el objetivo de combatir partículas extrañas y mantener la integridad de los tejidos. Sobre la base del potencial tóxico, el SI tiene la necesidad de discriminar entre las células del hospedador y las extrañas. De esta manera, podemos enumerar 4 funciones centrales del SI: i) reconocimiento de células propias y extrañas; ii) discriminación entre células propias y extrañas; iii) protección de las células propias; y iv) muerte o eliminación de las partículas extrañas (Tizard, 2009).

Todos los organismos, tanto uni- como pluricelulares, y de distinto nivel de complejidad, tienen mecanismos para defenderse de posibles ataques de agentes extraños. El primer mecanismo de defensa que actúa impidiendo la entrada de los patógenos son las barreras físicas y/o químicas. Este tipo de barreras se encuentran en todos los seres vivos, con características peculiares dependiendo de qué organismo se trate. Junto a estas barreras, todos los animales presentan un segundo nivel de complejidad denominado sistema inmune innato o inespecífico (SII). Únicamente los vertebrados poseen un tercer nivel de complejidad, el denominado sistema inmune adaptativo (SIA) o específico, que entra en acción cuando la inmunidad innata no es suficiente o ante ciertas reincidencias (Collado y col., 2008).

Una respuesta inmune es el resultado de una cascada de eventos múltiples que convergen conduciendo, en el mejor escenario, a la eliminación de la señal que provoca la reacción de reconocimiento. La multiplicidad de mecanismos puede ser muy grande dentro de un individuo, dentro de varias clases o dentro del *phyla*. Esta multiplicidad es una consecuencia de la importancia de la tarea a cumplir y, aunque es raro que una función tan importante se lleve a cabo por un mecanismo simple en un individuo, en algunos casos existen alternativas cuando algunos de los mecanismos no funcionan de manera adecuada (Du Pasquier, 2001).

La integridad del sistema inmunitario es esencial para la defensa contra los organismos infecciosos y sus productos tóxicos y, por lo tanto, para la supervivencia de todos los individuos. El SI es muy sensible a la exposición a compuestos químicos, por ser uno de los sistemas fisiológicos que responden con mayor rapidez, tal es así, que algunos de los parámetros que caracterizan su actividad son utilizados como marcadores de dicha exposición (Lafuente Giménez y col., 2001).

1.7 SISTEMA INMUNE INNATO (SII) Y SISTEMA INMUNE ADAPTATIVO (SIA)

El sistema inmune (SI) en los vertebrados está compuesto de 2 grandes subsistemas que se interrelacionan: el SI innato (SII) y el adaptativo (SIA). Existen numerosas hipótesis, suposiciones y ejemplos en los que se intenta mostrar una transición gradual entre el SII y el SIA desde múltiples puntos de vista. A pesar de que continúan los estudios sobre la interacción entre ambos, algunos conocimientos elementales mencionan que mientras el SII responde rápidamente a la presencia de agentes patógenos, el SIA puede tomar varios días o semanas en activarse por completo y, además, requiere una exposición previa a un antígeno para generar una respuesta inmunológica integral, utilizando la respuesta humoral y la mediada por células (Coico y col., 2003).

La inmunidad innata surgió evolutivamente antes que la adaptativa y funcionó perfectamente durante millones de años en seres progresivamente más complejos. Es la inmunidad más universal (la mayor parte de los seres sobreviven exclusivamente gracias a los mecanismos innatos) y, según varios autores, la más importante (Beutler, 2004). El SII puede ser definido como todas las defensas inmunes que no tienen memoria inmunológica, la respuesta es rápida (desde algunos minutos a horas) y ha evolucionado a partir de las asociaciones entre el huésped y el patógeno (Medzhitov y Janeway, 2000).

Los componentes constitutivos del SII en los vertebrados, incluyen macrófagos, granulocitos, células naturales asesinas (NK), y complemento, lisozima, defensinas y otras proteínas antimicrobianas. Estas células y las proteínas están constitutivamente presentes en niveles bajos en la sangre y proporcionan defensas rápidas de primera línea. Los macrófagos y granulocitos ingieren patógenos, producen especies reactivas del oxígeno y producen citoquinas que reclutan células blancas de la sangre adicionales y ayudan a organizar las respuestas inmunes inducidas. Las células NK reconocen y destruyen las células huésped infectadas o anormales. Las proteínas del complemento forman complejos que los patógenos lisan o etiquetan para el reconocimiento por anticuerpos y células fagocíticas (Janeway y col., 1999).

El SIA, tiene un repertorio extremadamente amplio de receptores que reconocen específicamente los antígenos y posee una flexibilidad superior al SII en su adaptación a los cambios moleculares que presentan los diferentes patógenos. Sin embargo, las reacciones con moléculas o partículas desconocidas son lentas, debido a que lleva de tres a siete días hasta que se produce la selección clonal para que luego la expansión de los linfocitos asegure una respuesta inmune específica. Entre otras numerosas cualidades

y en referencia al nombre que se le ha asignado, la respuesta se va adaptando de manera tal de asegurar una respuesta inmune satisfactoria, generando una memoria inmunológica de gran vigencia en el tiempo contra posibles reinfecciones (Andersson y col., 1981).

El SIA de los vertebrados se divide generalmente en: inmunidad mediada por componentes de la célula y la inmunidad humoral. Los principales efectores de la inmunidad mediada por células, son una clase de células T-helper (Th1) y linfocitos T citotóxicos (CTL), que pueden reconocer y destruir las células huésped infectadas, y por lo tanto la inmunidad mediada por células defiende principalmente contra patógenos intracelulares como virus. Un subconjunto de células T también puede conservar la memoria de los encuentros pasados con los patógenos, lo que permite respuestas más rápidas a las exposiciones posteriores (Janeway y col., 1999). Las respuestas mediadas por células se acompañan de la secreción de citoquinas proinflamatorias, y algunas veces están asociados con la respuesta inflamatoria sistémica, la cual es costosa energéticamente y nutricionalmente (Halloran y col., 1992; Janeway y col., 1999).

Los efectores del componente humoral del sistema inmune adaptativo son las células B y células Th2. Los patógenos son reconocidos por las células B, y las células Th2 estimulan las células B para diferenciarse y producir anticuerpos [inmunoglobulinas (Ig)], que luego se unen y neutralizan patógenos o los marcan para la fagocitosis. Una ventaja importante de la inmunidad humoral es la capacidad de reconocer una amplia variedad de parásitos extracelulares y agentes patógenos para almacenar este reconocimiento en forma de memoria inmunológica. Los costos de la utilización de respuestas humorales se cree que son pequeñas en comparación con las de las defensas innatas y mediadas por células, porque la inmunidad humoral se asocia con la producción de citocinas antiinflamatorias de tipo Th2 (Janeway y col., 1999; Fig. 1.14).

Inmunidad Innata y adaptativa

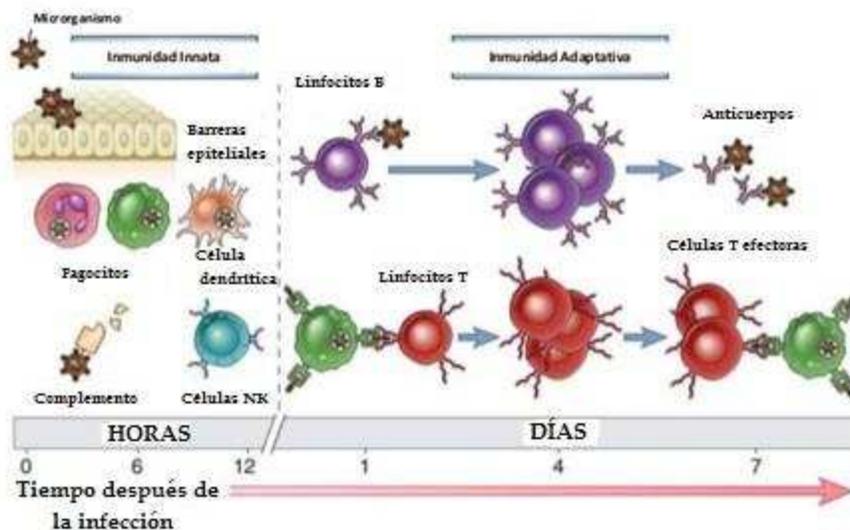


Fig. 1.14: Esquema de la evolución de la inmunidad innata a la adaptativa. Fuente: Health & Medicine, 2014.

En general, el SII fue relegado a aquellas funciones de inmunidad que estaban involucradas en la prevención y el confinamiento de la infección mientras que la inmunidad adaptativa proveía los efectores para “limpiar” la infección en forma definitiva. Generalmente, la inmunidad innata está basada en mecanismos activos y pasivos menos específicos y poco sofisticados de defensa de un hospedador. El SII es evolutivamente más antiguo que el SIA y es utilizado tanto por invertebrados (insectos y equinodermos) como por animales superiores. En esencia, parecen ser mucho más simple que la respuesta del SIA pero no hay que dejar de considerar que reconoce pequeñas características distintivas de los microorganismos patógenos (Medzhitov y Janeway, 2000) y además de proveer la primera línea de defensa, también juega un rol crítico en la activación e induciendo la respuesta inmune adaptativa (Tabla 1.2) (Fearon, 1997).

Tabla 1.2: Principales componentes del sistema inmune.

Inmunidad innata	Celular	Fagocitos: monocitos, macrófago, neutrófilos Células dendríticas Células natural killer
	Humoral	Complemento: <ul style="list-style-type: none"> • Via de activación de las lectinas • Via de activación clásica • Via de activación alternativa Proteínas de Fase Aguda Citoquinas: por ej. Interferón Quimoquinas
Inmunidad adquirida	Celular	Linfocitos T y B (LT y LB)
	Humoral	Anticuerpos (secretados por LB o células de memoria)

1.7.1 GLÓBULOS BLANCOS O LEUCOCITOS

Los leucocitos o glóbulos blancos (GB) son importantes mediadores del SI, que llevan a cabo las tareas de detección y librar el cuerpo de los microbios patógenos. Derivan de las células madre hematopoyéticas pluripotentes situadas dentro de la médula ósea, que se diferencian además en linfoide común y progenitores mieloides comunes. Las células mieloides incluyen eritrocitos, trombocitos, granulocitos y monocitos, mientras que las células asesinas naturales y los linfocitos B, y células T (células de adaptación), son miembros del linaje linfoide (Finger, 2014).

Los leucocitos de los reptiles se pueden clasificar como granulocitos (heterófilos, eosinófilos, basófilos) y células mononucleares (linfocitos, monocitos, azurófilos). Los leucocitos varían mucho en número y la morfología de los gránulos, los patrones de tinción citoquímica, y la concentración relativa en la sangre periférica en función de las especies y géneros.

En general, heterófilos (nombrados como tales a consecuencia de sus prominentes gránulos citoplasmáticos de color rosa-naranja brillante) son el equivalente de los neutrófilos de mamíferos, mientras que los monocitos y linfocitos de los reptiles tienen la morfología y función similares a los de los mamíferos, aves y peces. Los azurófilos son exclusivos de los reptiles (Stacy y col., 2011).

Los GB están involucrados en una cantidad importante de procesos en ambos sistemas (SII y SIA). Dentro del SII, uno de los procesos es el de fagocitosis, mediante el cual ingieren y destruyen bacterias junto a otras sustancias extrañas. Muchas veces, este mecanismo no es suficiente para eliminar a los agentes extraños y es necesario que intervengan otros. En estos casos, los GB desencadenan innumerables procesos entre los que se encuentran la producción de proteínas, siendo las más importantes los anticuerpos, que forman parte de la respuesta inmune adaptativa (Song y col., 2000).

Un recuento total de glóbulos blancos (RTGB) es importante con el fin de evaluar su respuesta a una infección o incluso identificar recuentos reducidos que son comunes en los reptiles en cautiverio que pueden estar inmunocomprometidos (Eatwell y col., 2014). Además, es de gran utilidad clínica ya que define los conceptos de leucopenia (disminución) y leucocitosis (aumento), alteraciones que pueden estar asociadas con una amplia variedad de enfermedades y estados fisiológicos (Maya, 2007). En algunos reptiles, algunos factores como el estrés y los cambios estacionales, producen variaciones en el total de leucocitos aumentando los recuentos totales (Campbell y Ellis, 2007; Martínez Silvestre y col., 2011).

1.7.2 ANTICUERPOS NATURALES (AcN)

Entre las moléculas efectoras del sistema inmune los anticuerpos son, sin lugar a dudas, cruciales para el control de infecciones, especialmente para aquellas producidas por microorganismos extracelulares o en los que su ciclo de vida transcurre con una etapa extracelular. Sin embargo, los anticuerpos no siempre tienen un papel protector ya que pueden ser responsables de daño tisular en procesos autoinmunes y mediadores de procesos alérgicos.

Los anticuerpos son secretados por células plasmáticas, las cuales corresponden al estadio de diferenciación terminal de los linfocitos B. Existen diferentes poblaciones de linfocitos B maduros con capacidad para producir anticuerpos: 1) linfocitos B

convencionales también conocidos como linfocitos B foliculares o linfocitos B2 o linfocitos B0, 2) linfocitos B de zona marginal esplénica, y 3) linfocitos B1 (Merino y Gruppi, 2006). Los anticuerpos son producidos tanto en los compartimentos innato y adaptativo del sistema inmune (Murphy y col., 2011; Vas y col., 2013). Los AcN se producen principalmente por linfocitos B1 y están presentes en el sistema inmune sin el estímulo de la infección (Kohler y col., 2003; Vas y col., 2013). Estos anticuerpos se cree que proporcionan una primera línea de defensa contra la infección y facilitan la respuesta adaptativa inmune después de la infección (Ochsenbein y Zinkernagel, 2000; Durrbach y col., 2007). En contraste, los anticuerpos producidos a través de la respuesta inmune adaptativa son hechos por linfocitos B2 estimulados por antígenos introducidos durante la infección (Kohler y col., 2003; Murphy y col., 2011).

Se ha propuesto que la inmunocompetencia es un factor clave en la regulación de las poblaciones de fauna (Lochmiller, 1996). Los componentes del SII podrían estar implicados en la supervivencia de un organismo a medida que participan activamente en la resistencia y la respuesta rápida a la infección. Los AcN son un componente de la inmunidad humoral innata, y son inusuales en comparación con otras inmunoglobulinas, en que su producción es constitutiva y no requiere la exposición previa a un antígeno particular (Ochsenbein y Zinkernagel, 2000). Teniendo en cuenta que los AcN confieren inmunidad humoral independiente de la estimulación antigénica y son estables en el tiempo, tienen el potencial para ser utilizados como indicadores de la competencia inmune en los animales salvajes (Racca y col., 2014).

1.7.3 SISTEMA DE COMPLEMENTO (SC)

La respuesta inmune humoral comprende una parte significativa del sistema inmunológico y actúa como un mecanismo de defensa inicial contra el crecimiento microbiano que se produce poco después de la infección. El sistema del complemento de suero, un componente importante de la respuesta inmune humoral, se compone de 25-30 proteínas que se pueden activar para iniciar la respuesta inflamatoria, reclutar leucocitos al sitio de la infección, mediar opsonización de materiales extraños de partículas y matar los microorganismos directamente por el ensamblaje de un complejo de ataque de membrana multiproteicos en la membrana externa de microbios (Muller Eberhard, 1986; Dalmaso y col., 1989). Debido a la importancia inmunológica del sistema de complemento en suero,

una deficiencia o mutación en cualquier proteína del complemento se asocia casi siempre con múltiples infecciones recurrentes (Morgan y Walport, 1991; Pascual y French, 1995). Las proteínas del complemento se expresan y se distribuyen como proteínas precursoras inactivas que se pueden activar de una manera muy precisa y altamente coordinada (Campbell y col., 1988). La cascada del complemento pueden ser iniciada por tres mecanismos distintos: una vía dependiente de anticuerpos clásica, una vía alternativa de anticuerpos independiente, y una vía de las lectinas que se traduce en la modulación de la función inmune (Fig. 1.15).

En la activación del SC se pone en marcha una serie de reacciones consecutivas y en cascada, de forma tal que a partir de cada una de ellas se genera un producto activo que, además de determinar que la reacción consecutiva prosiga, puede tener diferentes acciones biológicas importantes en la defensa del organismo. Las 3 vías se activan de manera independiente pero secuencialmente, o sea, la activación de uno de los componentes conduce a la activación del siguiente.

La activación del SC a través de cualquiera de las 3 vías es llevada a cabo por la activación del C3, que es la proteína central del SC. La molécula C3 tiene la capacidad para interactuar con más de 20 proteínas, incluso algunas no pertenecientes al SC.

Una vez producida la activación del complemento, todas las reacciones subsiguientes se llevan a cabo por un proceso multiplicador, de tal forma, que aunque la activación comienza por un número limitado de moléculas, son muchos los factores con actividad biológica que aparecen en el curso de las reacciones. La acción de las moléculas puede ser local, en el sitio de su producción, pero también puede ejercerse a distancia por dispersión a otras zonas.

En líneas generales, y por lo mencionado anteriormente, el SC, como parte de la inmunidad innata, puede ser capaz por sí mismo de defender al hospedador contra la invasión de patógenos sin la participación de componentes de la inmunidad adaptativa (Siroski, 2012).

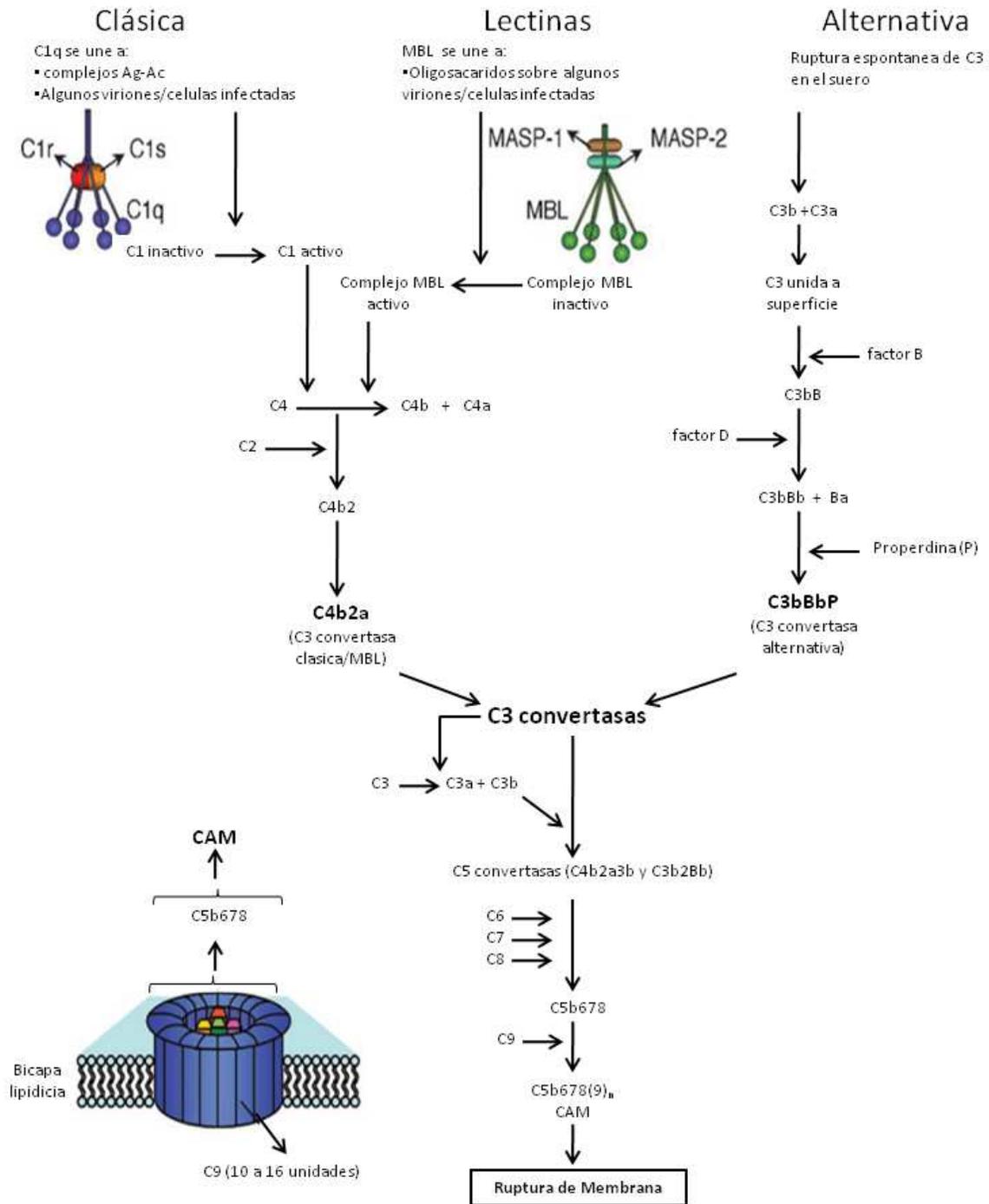


Fig. 1.15: Esquema de la cascada sistema del complemento (SC), con el detalle de las tres vías de activación y de la vía efectora (Favoreel y col., 2003).

1.7.4 HEMATOLOGÍA SANGUÍNEA

El sistema inmune es muy sensible a la exposición de xenobióticos, por lo que es uno de los sistemas fisiológicos que antes responden frente a la exposición a estos compuestos, sirviendo así algunos de los parámetros que caracterizan su actividad como marcadores de dicha exposición (Lafuente Giménez y col., 2001).

La hematología sanguínea es una herramienta muy útil en la evaluación clínica de mamíferos, aves y reptiles. La sangre es el medio de transporte de los nutrientes a las células y por medio de ella se excretan los productos de desecho metabólico a través de los riñones, intestino, pulmones, hígado y piel. Adicionalmente, controla el contenido de agua de las células corporales y del líquido intersticial, distribuye hormonas para controlar las funciones del organismo y a su vez resulta afectada por hormonas que actúan sobre los órganos hematopoyéticos (bazo, medula ósea). Otra función no menos importante de la sangre es la que desempeña en la defensa y desarrollo de inmunidad ante enfermedades (Pough y col., 1996). Por tales razones, la sangre constituye inequívocamente el fluido más expresivo con el que se puede contar a la hora de un diagnóstico (Manzanilla Fuentes y col., 2011).

Al evaluar las respuestas hematológicas y bioquímicas de los reptiles, se debe considerar la diversidad fisiológica normal y los factores externos que pueden potenciar o inhibir la respuesta de estos ectotermos a las infecciones. Estos factores incluyen la edad, el género, el medio ambiente, la estación y el estado nutricional (Zaias y col., 2006; Scheelings y Jessop, 2011).

1.8 HIPÓTESIS

Caiman latirostris se encuentra expuesto a contaminación por plaguicidas, que afectan el normal funcionamiento del sistema inmune, alterando algunos de sus parámetros; poniendo en riesgo su conservación.

1.9 OBJETIVOS

1.9.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar los posibles efectos de diferentes plaguicidas de uso masivo en las prácticas agrícolas actuales, empleando a *C. latirostris* como organismo centinela de los humedales de nuestro país.

1.9.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Evaluar la utilidad de *C. latirostris* como modelo biológico para monitoreo de toxicidad e inmunotoxicidad durante el desarrollo embrionario y post-embrionario.
- 2- Evaluar el efecto de diferentes plaguicidas sobre parámetros del sistema inmune (SI) de *C. latirostris*: sistema complemento, recuento total y diferencial de glóbulos blancos, detección de anticuerpos naturales, determinación de la concentración de proteínas totales y de fracciones proteicas.
- 3- Aplicar la metodología y técnica de detección de anticuerpos naturales, ante la ausencia de antecedentes en esta especie.
- 4- Determinar, en condiciones experimentales, el efecto de estos plaguicidas sobre el desarrollo pre y posnatal (crecimiento).
- 5- Incrementar los conocimientos sobre la biología y los factores que afectan a esta especie de importancia regional y transferir los mismos a otras especies domésticas, al ámbito académico y social de manera de contribuir a la conservación de las poblaciones.

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2.

Parámetros inmunológicos en *Caiman latirostris* y descripción de técnicas utilizadas.

2.1 INTRODUCCIÓN: PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS EN REPTILES

Muchos ensayos inmunológicos tradicionales se han utilizado en especies de reptiles. En los últimos años comenzaron a aplicarse para el estudio de los efectos tóxicos de los contaminantes sobre el sistema inmunológico de reptiles.

Existen numerosos estudios en los cuales se analizan diversos parámetros inmunológicos pero sin ninguna exposición a contaminantes: Mussart y col., 2006 y Barboza y col., 2008; establecen valores basales de glóbulos blancos y recuento diferencial para *C. yacaré* y *C. latirostris* respectivamente, en condiciones de cautiverio; Carrascal Velásquez y col., (2014); realizaron una caracterización hematológica de *Trachemys callirostris* en condiciones tanto *ex situ* como *in situ*; Latorre y López González y col., (2015), y Mestre y col., (2017); establecen valores basales de algunos parámetros hematológicos para *Phrynops hilarii* y *Salvator merianae*, respectivamente, en condiciones de cautiverio.

Como ya se mencionó anteriormente, son pocos los estudios de inmunología relacionados a contaminantes ambientales en reptiles.

Burnham y col., 2003, examinaron el efecto del 17 α –etinilestradiol sobre la inmunidad del lagarto *Sceloporus occidentalis*. Dicha exposición condujo a una disminución de leucocitos circulantes y al número total de células de bazo. Smyth y col., 2014, compararon la salud de dos poblaciones de lagartos (*Tiliqua rugosa*), separados geográficamente entre un entorno de pastizales y un medio de cultivo, utilizando el índice de tamaño corporal lineal (LBSI) y diferentes parámetros hematológicos. Los animales en el sitio de cultivo fueron más pequeños, lo que sugiere diferencias genéticas como resultado del aislamiento geográfico. Los animales en el sitio de cultivo tenían un LBSI más bajo y muchos experimentaban una anemia regenerativa. Se postuló que la anemia era la causa del LBSI bajo. La anemia parecía ser el resultado de la hemólisis y probablemente era causada por la exposición a productos químicos agrícolas aplicados en el sitio de cultivo, pero no en el sitio del pastizal. Los recuentos elevados de glóbulos blancos en lagartijas en el sitio de los pastizales, sugirieron que estaban experimentando una enfermedad inflamatoria de posible importancia ecológica.

Otra investigación realizada en tortuga (*Terrapene carolina carolina*), encontraron que los efectos inmunosupresores de la exposición a bajos niveles de organoclorados, como el endosulfán y el clordano; podrían estar implicados en la patogénesis de las infecciones observadas (ausencia de apnea, secreción ocular y nasal, conjuntivitis y otitis; Tangredi y

Evans, 1997). En *Caretta caretta* se encontraron asociaciones negativas entre concentraciones de oxiclordano en sangre y el recuento total de glóbulos blancos (Peden Adams, 2002); y con el recuento de linfocitos (Keller y col., 2004). Este último autor, observó además, que el sistema inmune de las tortugas marinas es modulado por las concentraciones ambientales de contaminantes organoclorados (Keller y col., 2006). Del mismo modo, Yu y col., 2012 estudiaron los posibles efectos en tortugas acuáticas (*Trachemys scripta elegans*) expuestas a PCBs sugiriendo posible modulación del sistema inmune por estos organoclorados.

2.2 PARÁMETROS INMUNOLÓGICOS EN COCODRILIANOS

El SI de los cocodrilianos está poco estudiado, y particularmente, reviste gran interés a los fines evolutivos, ecológicos y potencialmente terapéuticos. Las recientes observaciones e investigaciones han aumentado el entusiasmo por profundizar en el conocimiento de los componentes y los mecanismos del SI de los cocodrilianos. A pesar de que el SI comprende tanto los sistemas adaptativos e innatos, la mayoría de los estudios en estos animales fueron sobre el segundo, principalmente compuesto por péptidos, proteínas, y los leucocitos (Finger, 2014).

Los cocodrilianos comparten un ancestro común con las aves, que comprende el linaje archosaurian por lo que son un eslabón importante para nuestra comprensión de la evolución del sistema inmune.

El hecho de ser organismos ectotermos, por lo que las temperaturas ambientales afectan sus procesos fisiológicos, presumiblemente su función inmune también lo sea. Hasta el momento, se conoce que los cocodrilianos prefieren mantener su temperatura corporal dentro de un rango estrecho de 28-33 °C usando termogradientes en su ambiente natural, por ejemplo, sol / sombra y superficies calientes / aguas profundas frías (Huchzermeyer, 2002). Se ha demostrado que la temperatura afecta a los valores hematológicos de cocodrilos de agua salada en cautiverio, *Crocodylus porosus*, aunque curiosamente no hubo ningún efecto sobre los niveles de inmunoglobulinas (Turton y col., 1997). Estos datos respaldan estudios previos que indican que la temperatura ambiental juega un papel fundamental en la homeostasis de los vertebrados ectotérmicos, incluyendo la formación de anticuerpos y la respuesta inmune (Klesius, 1990).

Gran parte de la estacionalidad en los parámetros inmunológicos puede ser el resultado de la acción de hormonas endógenas, ya que algunos estudios han demostrado cambios

cuantitativos en el número de leucocitos, y la involución linfoide puede ser asociada con los cambios en los niveles de glucocorticoides y esteroides sexuales (Morici y col., 1997; Turton y col., 1997). Además, la exposición exógena a imitadores hormonales, como los perturbadores endocrinos (EDCs), también podría afectar a la inmunidad. La exposición a los EDCs en cocodrilos también se ha asociado con un número de anomalías inmunes incluyendo alteraciones histológicas en órganos blanco (Rooney y col., 2003). Algunos estudios han asociado la contaminación por plaguicidas en el lago Apopka (Florida, Estados Unidos) con efectos en la actividad endócrina y anomalías en la reproducción para *American alligator* (Guillette y col., 1996; Crain y col., 1998a). Latorre y col., (2013) han demostrado que la exposición *in vivo* a Roundup en *C. latirostris*, produce alteraciones en determinados parámetros inmunes y en el crecimiento; los mismos autores en 2016 observaron alteraciones en el recuento diferencial e índice Heterófilos/Linfocitos (H/L), luego de la exposición *in vivo* a Cipermetrina y Endosulfán en *C. latirostris*. Así mismo, Siroski y col., (2016) demostraron para la misma especie, que diferentes concentraciones de Roundup afectan negativamente la actividad del sistema de complemento.

2.3 DESCRIPCIÓN DE TÉCNICAS UTILIZADAS

2.3.1 RECUENTO TOTAL Y DIFERENCIAL DE GLÓBULOS BLANCOS (RTGB Y RDGB)

Como ya se mencionó en el capítulo 1 (1.7.1), el RTGB es de gran utilidad clínica ya que define los conceptos de leucopenia (disminución) y leucocitosis (aumento), alteraciones que pueden estar asociadas con una amplia variedad de enfermedades y estados fisiológicos. El RDGB permite establecer los conceptos de neutrofilia, neutropenia, agranulocitosis, eosinofilia, eosinopenia, basofilia, basopenia, monocitosis, monocitopenia, linfocitosis y linfopenia que pueden estar asociados a enfermedades benignas como procesos infecciosos, procesos inflamatorios y mielotoxicidad, entre otros, o enfermedades malignas como leucemia y mieloptisis (Maya, 2007).

El RTGB consiste en determinar la cantidad de glóbulos blancos en sangre periférica por unidad de volumen por microlitro (μl), milímetro cúbico (mm^3) o litro (L).

El recuento del número total de leucocitos se realizó con sangre entera mediante el uso de la cámara de Neubauer (Fig. 2.1).



Fig. 2.1: Cámara de Neubauer.

Para ello, tuvimos que realizar diferentes diluciones (1:100, 1:200) para poder llegar a la mejor dilución que nos permitiera distinguir con mayor claridad los glóbulos blancos. Cabe aclarar que para realizar el recuento, utilizamos dicha cámara debido a que los glóbulos rojos en esta especie son nucleados, a diferencias de otras especies. Es por esto que no se puede utilizar cualquier otro tipo de contador automático, ya que se confundirían glóbulos blancos con rojos.

El RDGB corresponde al porcentaje de las subpoblaciones de glóbulos blancos en sangre periférica: linfocitos, heterófilos, monocitos, eosinófilos y basófilos.

Para el RTGB se tomó una alícuota de sangre y se la diluyó con una solución de NaCl 0,6% (Lewis y col., 2008) en una proporción de 1:200. La solución de NaCl actúa como agente lisante de los hematíes sin intervenir en la integridad de los leucocitos. Se homogeneizó la mezcla para que actúe dicha solución, se cargó la cámara con el volumen necesario y se dejó reposar durante 5 min para que sedimenten las células; luego se observaron al microscopio óptico con un aumento de 450x.

Para el recuento se usaron los 4 cuadrantes externos de la cámara, donde cada uno está dividido en 16 cuadrados más pequeños (Fig. 2.2, recuadros en celeste).

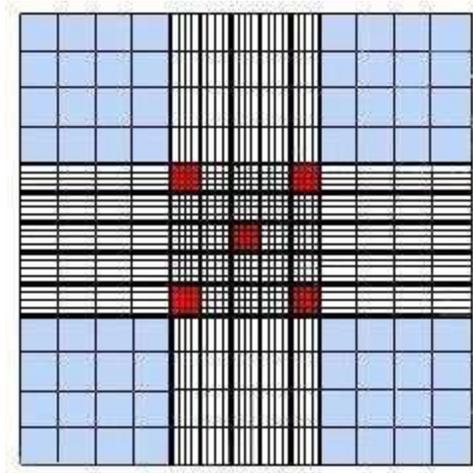


Fig 2.2: Representación esquemática de las cuadrículas dentro de la cámara de Neubauer.

Los resultados se expresaron en número de células por milímetro cúbico de sangre.

$$\text{N}^{\circ} \text{ de céls/mm}^3 \text{ de sangre} = (A/V) * f$$

Donde:

A= número de células contadas

V= volumen del cuadrado de la cámara (en mm³)

f= factor de dilución

Para el RDGB se realizaron 2 frotis por animal sobre portaobjetos limpios, se fijaron con etanol durante 10 min y se tiñeron con solución de May Grunwald (50%) - Giemsa (10%). Los preparados fueron codificados para lograr el máximo de objetividad al momento del análisis. Las muestras se observaron en microscopio óptico con aumento de 1000x. Se registró la cantidad de cada uno de los subtipos de glóbulos blancos (heterófilos, basófilos, eosinófilos, linfocitos y monocitos) cada 100 GB analizados por frotis (de ambas réplicas).

2.3.2 ANTICUERPOS NATURALES (AnC)

La determinación de los títulos de aglutinación se llevó a cabo utilizando el ensayo de hemaglutinación descrito por Matson y col., (2005), con algunas modificaciones, ya que ésta técnica hasta el momento no ha sido descrita para ninguna especie de cocodriliano.

Dicho ensayo, se basa en la interacción antígeno-anticuerpo y glóbulos rojos de conejo (RRBC, del inglés "rabbit red blood cells"). La lisis refleja la interacción del complemento y los AnC, mientras que la aglutinación resulta solo de AnC (Matson y col., 2005) (Fig. 2.3).



Fig. 2.3: Microplaca en la cual se puede observar en los diferentes pocillos, los procesos de lisis y aglutinación.

Debido a que las aglutininas de conejo existen en niveles altos en varias especies de aves (Cotter, 1998a, 1998b), pueden proporcionar un sistema de prueba conveniente para estudiar las interacciones entre anticuerpos adquiridos y naturales. Es por esto que utilizamos sangre de conejo, debido al ancestro en común que comparten los cocodrilianos con las aves.

Se obtuvieron glóbulos rojos de sangre entera heparinizada extraída de conejo (*Oryctolagus cuniculus*) del bioterio de la facultad de Ciencias Veterinarias de la UNL. La sangre de conejo fue centrifugada a 2500 rpm durante 20 min y el sobrenadante fue descartado, realizándose lavados repetidos con una solución de *buffer* fosfato salino (PBS, pH 7.4) hasta clarificar el sobrenadante. Después del último lavado, se preparó una solución al 1% (v/v) de glóbulos rojos de conejo con el mismo *buffer* a partir del paquete globular (SGRC, solución 1).

Por otra parte, se preparó otra solución al 1% de PBS con plasma de conejo (solución 2). El ensayo se llevó a cabo en microplacas de 96 pocillos (Cromoplate®, policubetas fondo "U"). Todos los pocillos fueron llenados con 25 µl de la solución 2; luego se añadió 25 µl de plasma de *C. latirostris*, solo en la columna 1. Con el uso del microdiluidor (volumen

fijo) se fue diluyendo de manera seriada desde la columna 1 hasta la 11, ya que la 12 se utiliza como control negativo (sin plasma).

Una vez realizadas todas las diluciones, se agrega a todos los pocillos, 25 µl de la solución 1. Se deja reposar la placa tapada por 1 hora aproximadamente, incubada a temperatura ambiente (25 ± 2 °C); para observar los resultados. Los títulos se expresaron como la inversa de la dilución más alta.

2.3.3 SISTEMA DE COMPLEMENTO (SC)

El ensayo de hemólisis de glóbulos rojos de oveja (SRBC del inglés "*sheep red blood cells*") se basa en la ruptura de los SRBC por las proteínas inmunológicas circulantes en el plasma. Estas proteínas reconocen a los SRBC como antígenos y provocan la activación de la cascada del SC, que culmina en la formación de un complejo proteico que genera un poro (CAM: Complejo de Ataque a Membrana) en la membrana de los SRBC y la posterior lisis de los mismos. La consecuente liberación de hemoglobina es registrada por espectrofotometría y se considera proporcional a la actividad del SC. Este ensayo es utilizado en forma rutinaria para evaluar el SC en los laboratorios clínicos (Kirschfink y Mollnes, 2003) y fue adaptado para el análisis del mismo en el suero de los cocodrilianos por Merchant y col., (2006).

Los SRBC fueron obtenidos a partir de sangre entera heparinizada extraída de ovejas merino (*Ovis aries*) en la facultad de Ciencias Veterinarias de la UNL.

La sangre de oveja fue centrifugada a 2500 rpm durante 20 min y el sobrenadante fue descartado, realizándose lavados repetidos con una solución de *buffer* fosfato salino (PBS, 1% pH 7.4) hasta clarificar el sobrenadante. Después del último lavado, se preparó una solución al 2% (v/v) de SBRC con el mismo *buffer* a partir del paquete globular.

En un endorff, se colocó 200 µl de dicha solución + 200 µl de plasma de *C. latirostris*. Se homogeneizó y se dejó reposar por 30 min a temperatura ambiente. Luego se centrifugó a 2500 rpm por 5 min. Posteriormente, se tomaron 250 µl del sobrenadante y se transfirió a una microplaca de 96 pocillos (Cromoplate, policubetas fondo "U") para la medición de la densidad óptica en un lector de microplacas a 540 nm (Spectrostar Nano BMG Labtech).

Para obtener un control positivo, se agregó 2 µl de Triton X-100 a 1 ml de solución de SRBC al 1% y se homogeneizó varias veces. El resultado obtenido fue considerado como

la máxima hemólisis (MH). Todos los resultados de la hemólisis de SRBC se dividieron por la absorbancia del control positivo para obtener el porcentaje máximo de hemólisis (%MH).

2.4 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos permitieron estandarizar el ensayo de detección de anticuerpos naturales como una técnica de evaluación de inmunotoxicidad para su aplicación en sangre en *C. latirostris*. Esta es la primera referencia de la aplicación de dicha técnica en esta especie.

A su vez, como ya hemos dicho anteriormente, los anticuerpos naturales tienen el potencial de ser usados como indicadores de la competencia inmune en animales salvajes (Racca y col., 2014). Existen trabajos en los que se describe la utilización de esta técnica, pero en otros grupos, como peces (Gonzalez y col., 1988), aves (Parmentier y col., 2004; Matson y col., 2005; Whiteman y col., 2006; Mendes y col., 2006; Killpack y Karasov, 2012), mamíferos (Racca y col., 2014), serpientes (Madsen y col., 2007; Sparkman y Palacios, 2009) y tortugas (Sandmeier y col., 2012).

Los valores hematológicos, inmunológicos y la química de la sangre son necesarios para una correcta valoración de los efectos del estrés ambiental, enfermedades infecciosas, parasitarias o toxicológicas en animales (Merchant y col., 2006 a, b); además poseen gran utilidad y aplicabilidad en la evaluación del estado de salud-enfermedad, tanto en animales mantenidos bajo condiciones controladas como en programas de cría o capturados en la naturaleza (Zayas, 2014).

Si bien la información disponible sobre la influencia de plaguicidas sobre estos valores se han informado para muchas especies de aves (Grasman y Fox., 2001), peces (Iannacone y Alvariano, 2008; Modesto y Martinez, 2010; Salbergo y col., 2010), anfibios (Cabagna y col., 2005; Brodtkin y col., 2007; Attademo y col., 2011) y reptiles (Keller y col., 2006; Yu y col., 2012; Smyth y col., 2014); son escasos los trabajos que incluyen cocodrilos (Finger y Gogal, 2013; Latorre y col., 2013, 2016; Siroski y col., 2016).

En cuanto al SC, muchos autores informaron su presencia en urodelos y anfibios (Carey y col., 1999; Major y col., 2011) y en reptiles (Koppenheffer, 1987; Sunyer y col., 1998; Ferronato y col., 2009). Para cocodrilos, se describieron diversas actividades antimicrobianas de sus tejidos (Shaharabany y col., 1999; Merchant y col., 2003, 2004, 2005; Merchant y Britton, 2006; Siroski y col., 2009) que fueron atribuidos a un sistema de

complemento eficaz. Sin embargo, hasta ese momento no se había investigado la detección y caracterización del sistema de complemento en *C. latirostris*. En 2010, Siroski y col., pusieron de manifiesto la contribución significativa del sistema de complemento a las actividades inmunológicas de esta especie; y en 2016 estudiaron el efecto de Roundup sobre dicho sistema. El sistema de complemento podría ser un componente inmune innato muy importante en la resistencia al ataque de microorganismos, y podría ser una de las razones de la longevidad de esta especie (Siroski y col., 2010).

CAPÍTULO 3

CAPÍTULO 3.

Evaluación del efecto inmunotóxico de diferentes formulaciones de plaguicidas (Endosulfán, Cipermetrina, Clorpirifós, y Glifosato), en embriones de *Caiman latirostris* (*Etapa 1*).

3.1 INTRODUCCIÓN

Los embriones de reptiles están expuestos a los contaminantes a través de dos mecanismos principales: la transferencia de madre a hijo y la absorción de los alrededores del huevo (Hopkins, 2005; Charruau y col., 2013; de Solla y col., 2014). Los jóvenes y los adultos pueden estar expuestos a través de la comida, el agua, y los sedimentos que se presentan en el entorno natural donde viven. Además, los contaminantes acumulados en la madre pueden llegar al embrión a través de la yema, lo que también afecta el desarrollo embrionario *in ovo*. Con frecuencia, las hembras anidan cerca de los cuerpos de agua adyacentes a los cultivos. Por esta razón, los embriones están expuestos a los pesticidas utilizados en estos cultivos. Los embriones y las crías pueden estar expuestos a tales compuestos que recorren la cáscara del huevo de la atmósfera durante la incubación o después de la eclosión.

El período de máxima aplicación de plaguicidas coincide con la temporada de reproducción de esta especie (noviembre a marzo), lo que representa un grave riesgo de contaminación para el desarrollo de embriones y recién nacidos (Siroski y col., 2016).

La transferencia materna se inicia a principios de la vitelogénesis cuando las hembras comienzan la síntesis de grandes cantidades de lipoproteínas que son críticas para el suministro de nutrientes, trazas de metales esenciales, y hormonas para el desarrollo del embrión (Specker, 1994). Desafortunadamente, estas mismas lipoproteínas pueden servir como moléculas de transporte de contaminantes ambientales de madre a hijo. Los compuestos que tienden a transferirse de la hembra a la descendencia incluyen contaminantes orgánicos que se asocian con los lípidos (por ejemplo, organoclorados), contaminantes inorgánicos que también son nutrientes esenciales o análogos de nutrientes esenciales (por ejemplo, selenio y estroncio como análogos de azufre y calcio), y contaminantes que se unen fácilmente a las proteínas del huevo (por ejemplo, mercurio).

Debido a que las primeras etapas del desarrollo embrionario dirigen la trayectoria del desarrollo del individuo, la transferencia materna de tales compuestos representa una vulnerabilidad importante para el desarrollo de la descendencia y, en última instancia, para la forma física de la madre (Hopkins, 2005). En algunos casos, las cantidades de contaminantes transferidos pueden llegar a interrumpir el desarrollo temprano (Bishop y col., 1998; Guillette, 2000).

En la mayoría de los cocodrilianos, la textura porosa de la cáscara de huevo permite el intercambio de sustancias líquidas y gaseosas entre el medio externo y el embrión durante el desarrollo. La parte superior es la zona de implantación del embrión, donde se inicia la banda opaca de calcificación, es la zona de mayor irrigación y de poros más grandes, en la que se produce el mayor intercambio con el ambiente (Ferguson, 1981). Se ha reportado que la estructura de la cáscara de los huevos del yacaré overo sufre modificaciones durante el transcurso de la incubación. Según Simoncini y col. (2014), la descomposición de la materia orgánica del nido genera un ambiente propicio para el desarrollo de diversos microorganismos que contribuyen a la modificación de la cáscara bajo condiciones naturales. El material orgánico de nidificación, más la humedad de las deyecciones de la hembra y las precipitaciones, aumentaría el tamaño de los canales de los poros, incrementando el intercambio de distintas sustancias gaseosas y líquidas entre el embrión con el medio exterior, favoreciendo el ingreso de otros tipos de compuesto (de Solla y col., 2014; Burella y col., 2016).

Un aspecto importante a tener en cuenta, y más aún en reptiles, es el "*efecto nido*". Éste es una de las principales causas de variabilidad ampliamente estudiada en parámetros analizados en especies de cocodrilianos (Schulte y Chabreck, 1990; Piña y col., 2005; Schaumburg y col., 2010). Verdade (1997) propuso esta expresión para referirse al efecto sobre los neonatos que combina la influencia genética y fenotípica de los padres (por ej. estado nutricional y sanitario de la madre) asociada a la influencia fenotípica del ambiente de incubación (temperatura, humedad, entre otros). De esta manera, los neonatos que provienen de diferentes nidos de origen pueden responder en forma diferente a las condiciones ambientales variables durante su vida, pero principalmente durante el primer año de vida.

La toxicología del desarrollo (embriotoxicología) se toma en sentido amplio incluyendo el estudio de cualquier efecto que interfiera con el normal desarrollo de un organismo dado y que se manifieste antes o después del nacimiento del mismo (IPCS, 2001). Los compuestos químicos inducen efectos en el embrión por una variedad de mecanismos que pueden incluir interacción del agente exógeno con receptores endógenos, generación de intermediarios reactivos con el ADN o con proteínas, peroxidación lipídica, inhibición enzimática y alteraciones de la membrana celular, entre otros (USNRC, 2000). Dentro de los biomarcadores de embriotoxicidad se pueden incluir el peso al nacer, anormalidades cromosómicas, retardo en el desarrollo y/o crecimiento posterior del organismo o de

sistemas orgánicos específicos, defectos estructurales (teratogénesis) y funcionales, senescencia reproductiva temprana así como una disminución en la vida media del organismo (IPCS, 2001). Desde el punto de vista de los estudios exploratorios, la ganancia en peso y las desviaciones del rango normal de peso corporal de los organismos a una determinada edad, pueden ser importantes indicadores de toxicidad del desarrollo (Mitchelmore, 2005).

3.1.1 ANTECEDENTES DE EXPOSICIÓN EMBRIONARIA EN COCODRILIANOS

Numerosos estudios, han demostrado la transferencia de plaguicidas de madre a hijo y/o la absorción de los mismos a través de la cáscara del huevo. Wu y col., (2000) demostraron la presencia de organoclorados (anticonceptivos orales) en huevos de *Crocodylus moreletii* de todos los nidos recolectados de ríos de Belize.

Pepper y col. (2004), analizaron las concentraciones de organoclorados en las membranas corioalantoidea de huevos de *Crocodylus moreletii* desde el norte de Belize. Los resultados indicaron que los plaguicidas organoclorados se acumulan en dichas membranas de los huevos, lo que demuestra la exposición de embriones y hembras a estos plaguicidas.

Rauschenberger y col. (2004; 2004a) demostraron en *Alligator mississippiensis*, que los pesticidas organoclorados son transferidos por vía materna al óvulo en desarrollo, y que la exposición materna se asocia con una reducción del éxito de eclosión y aumento de la mortalidad embrionaria.

Milnes y col. (2005) demostraron que el metabolito pesticida p,p-DDE (1,1-dicloro-2,2-bis (p-clorofenil) etileno) es capaz de influir en la diferenciación de las gónadas en *Alligator mississippiensis*.

Numerosos estudios de laboratorio han descrito efectos embriotóxicos en reptiles y aves, relacionados con exposición a diferentes plaguicidas y a sus formulaciones (Marco y col., 2004; Sparling y col., 2006; Muller y col., 2007; Uggini y col., 2010; Schaumburg y col., 2016) y también a través de pulverizaciones y/o aplicaciones sobre el material de nido (Cañas y Anderson, 2002; Mayne y col., 2005; de Solla y col., 2014).

En relación a la especie objeto de esta tesis, Beldoménico y col. (2007), expusieron huevos de *C. latirostris* a diferentes concentraciones de atrazina y endosulfán, observando pérdida del peso del huevo durante la incubación, y reducción en el peso de las crías al nacer. De manera similar, Poletta y col. (2009), evaluaron los efectos

genotóxicos de Roundup® en embriones con el fin de evaluar el riesgo potencial asociado a la exposición *in ovo*; demostrando efectos adversos de este plaguicida en el ADN de dicha especie. En 2011, estudiaron el efecto de formulaciones y mezclas de plaguicidas, demostrando genotoxicidad, alteraciones enzimáticas y metabólicas, como así también un retardo en el crecimiento. Otros daños genotóxicos fueron estudiados por Burella y col. (2016) demostrando que RU produce daño en el ADN en embriones de *C. latirostris*, independientemente de la etapa de desarrollo en la que se produzca la exposición. Así mismo, López González y col. (2017) observaron que formulaciones comerciales de plaguicidas indujeron efectos genotóxicos en *C. latirostris* y demostraron que las anomalías nucleares (ANs) son un buen indicador de genotoxicidad en dicha especie. Stoker y col. (2011), realizaron un estudio para estimar los residuos organoclorados presentes en los huevos y para determinar la relación entre las concentraciones de los organoclorados y el rendimiento reproductivo; donde encontraron una correlación negativa entre el tamaño de postura y la media de las concentraciones de los organoclorados, lo que sugiere que el comportamiento reproductivo de la madre se ve afectada por la exposición a los contaminantes. Por otro lado, Charruau y col. (2013), analizaron compuestos organoclorados en huevos infértiles y sustratos de nidos en *Crocodylus acutus*, observando que la transferencia materna de las hembras, probablemente es la principal fuente de contaminación de los huevos.

Los estudios bajo condiciones controladas de laboratorio son fundamentales para proporcionar relaciones directas de los efectos producidos por los compuestos en estudio a distintas concentraciones (concentración-efecto), y para la determinación de los mecanismos específicos implicados en el origen de cualquier tipo de alteración, ya que ambientalmente los embriones no están expuestos a un producto químico a la vez, sino a mezclas complejas de estos en forma simultánea, influyendo no sólo la interacción entre los mismos sino los diversos factores físico-químicos ambientales (Eisenreich y Rowe, 2013; Ortiz Santalieu y Egea Serrano, 2013).

Los reptiles son modelos de vertebrados utilizados en el estudio de la mayoría de los campos de investigación. Su fisiología única, crecimiento indefinido y fecundidad creciente a lo largo de la vida de la hembra adulta motivan el estudio de cómo la fisiología a nivel mecanicista, la historia de vida a nivel organizacional y la selección natural en la escala evolutiva definen la vida en este grupo taxonómico diverso. Constituyen un grupo "antiguo" con mecanismos fisiológicos complicados como su comportamiento y con

adaptaciones particulares que probablemente explican el éxito evolutivo de este grupo durante millones de años.

La manera en que los reptiles reaccionan fisiológicamente y conductualmente en sus ambientes, o bajo condiciones controladas, cambia delante de cualquier situación potencialmente agotadora, colocándolos como modelos interesantes para la investigación (Poletta y col., 2013). Numerosos autores estudiaron el efecto de diferentes contaminantes en distintas clases de cocodrilianos, pero es escasa o nula la información existente sobre el sistema inmune luego de una exposición embrionaria.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 HUEVOS DE *Caiman latirostris*

Se utilizaron huevos de yacaré overo cosechados en la naturaleza, en el marco de las actividades del programa de rancheo: "Proyecto Yacaré" (PY; convenio Gob. Santa Fe - MMA/MUPCN). Los nidos fueron recolectados de la Reserva Natural Manejada "El Fisco" (30°11'26" S, 61°0'27" O, Dpto. San Cristóbal, Santa Fe, Argentina) por tratarse de un área libre de contaminación, dado que se trata de un Área Natural Protegida (Ley 12.930, 2008; Fig. 3.1 a y b). De esta manera nos aseguramos que los huevos no estuvieron expuestos ambientalmente a ningún plaguicida.

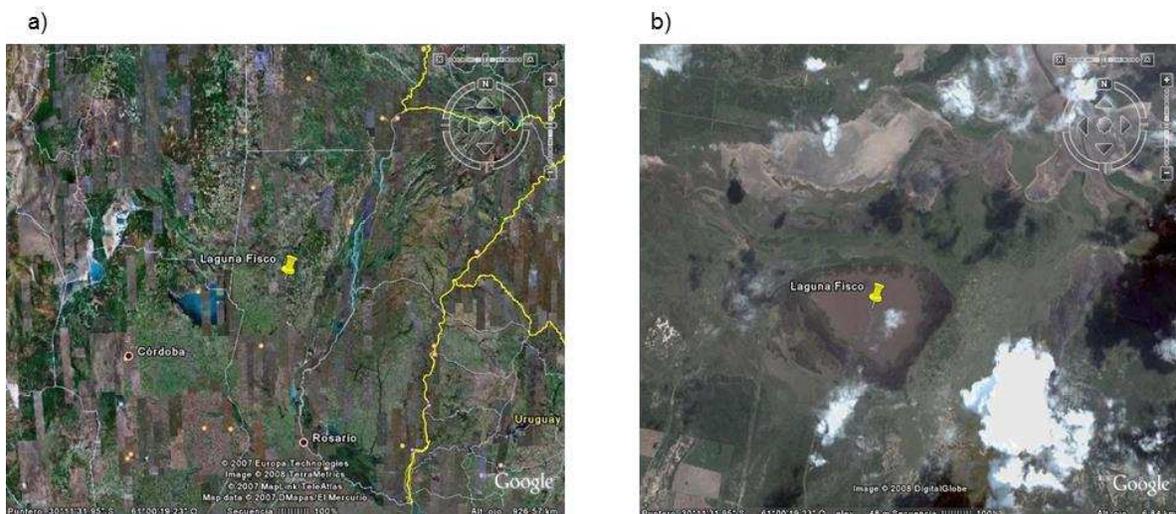


Fig. 3.1: a) Imagen satelital de la Reserva Natural Manejada "El Fisco" en el centro-norte de la provincia de Santa Fe, Argentina y b) de la laguna principal donde se colectan los huevos de yacaré. Tomada de Google Earth.

Los huevos se colectaron al inicio de la temporada reproductiva (diciembre), inmediatamente luego de su postura. Diferentes nidos fueron cosechados y trasladados hasta las instalaciones del PY, Laboratorio de Zoología Aplicada: Anexo Vertebrados (FHUC-UNL/MMA-MUPCN, Santa Fe), según procedimientos de rutina como fue descrito en el punto 1.4.

Al llegar a las instalaciones del PY, se realizaron ovoscopías para determinar la viabilidad de los huevos por identificación de la banda opaca de calcificación (lungman y col., 2008). En este contexto se seleccionaron para los experimentales sólo aquellos viables. En todos los estudios se emplearon huevos provenientes de diferentes nidos, para controlar lo mencionado como "efecto nido" (Verdade, 1997).

3.2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL Y EXPOSICIÓN

Se realizaron 3 ensayos de exposición embrionaria (*EEE1*, *EEE2*, *EEE3*), con el objetivo de evaluar la reproducibilidad de los resultados. En todos los casos, la exposición se realizó en una etapa temprana del desarrollo (durante los cinco días siguientes a la oviposición), con una duración de 2 meses. Posteriormente, los huevos fueron incubados en condiciones controladas: 31 ± 1 °C y 90 % humedad. Los huevos de cada nido en cada grupo experimental fueron separados en bandejas plásticas independientes utilizando vermiculita como sustrato y cubiertos con material vegetal del nido natural, libre de cualquier sustancia exógena (Fig 3.2).



Fig 3.2: Huevos marcados por nido, colocados en bandejas plásticas.

Los huevos se controlaron periódicamente durante los experimentos, para identificar y descartar aquellos que se tornaban inviables.

La exposición se realizó por topicación con la solución del plaguicida sobre la cáscara del huevo, en una única aplicación, como fue descrito por Poletta y col. (2009), en la zona donde se inicia la banda opaca de calcificación, zona de mayor irrigación y de poros más grandes, en la que se produce el mayor intercambio con el ambiente (Ferguson 1985; Crews y col., 1991; Fig. 3.3).



Fig. 3.3: Aplicación de los tratamientos en forma tópica sobre la cáscara del huevo de *C. latirostris* en la zona de inicio de la banda de calcificación, de mayor intercambio con el exterior.

En el momento en que los pichones comenzaron a “vocalizar el sonido típico del nacimiento”, los huevos correspondientes se sacaron de la incubadora y, si la eclosión no se producía espontáneamente dentro de las 24 hs, los pichones fueron asistidos para su nacimiento (Larriera y col., 2008). Los animales de cada nido fueron marcados al nacer mediante el corte de los verticilos caudales correspondientes al número del nido y a la marca individual de cada pichón según orden de nacimiento (Larriera, 1994; Fig. 3.4).



Fig. 3.4: Sistema de marcación por corte de verticilos caudales utilizado para la individualización de los pichones nacidos por año y nido.

Para las formulaciones de END y CIP, se tomaron como referencia los estudios realizados en *C. latirostris* (Beldoménico y col., 2007) los cuales expusieron huevos a 0.02; 2 y 20 ppm de END; y en otras especies de aves y mamíferos: Sinha y col., (1997); evaluaron el efecto de varias dosis de END en ratas en crecimiento desde el destete a los 90 días de edad para ver el efecto de este pesticida sobre el testículo alcanzando la madurez sexual.; Anwar (2003); investigaron los efectos tóxicos, en el embrión de pollitos de once días, de diferentes concentraciones (50, 100, 200 y 400 ppm) de CIP administrada en una dosis subletal simple (0,005 ml) en los huevos al día 0 de incubación; Patel y col., (2006); estudiaron los efectos genotóxicos de la CIP en múltiples órganos (cerebro, riñón, hígado, bazo) y tejidos (médula ósea, linfocitos) del ratón).

Para las formulaciones de GLI, se aplicaron concentraciones determinadas como efectivas en un estudio previo realizado en la especie con la formulación RU, por nuestro grupo de trabajo (Poletta y col., 2009).

En lo que respecta a las concentraciones de la formulación de CPF no existían datos de referencia, solo estudios en otras especies expuestos por inmersión (Widder y Bidwell, (2006) (*Rana sphenoccephala*); Ruiz de Arcaute y col., (2012) (*Rhinella fernandezae*); Vera Candiotti y col., (2013) (*Cnesterodon decemmaculatus*); Paracampo y col., (2014) (*Cnesterodon decemmaculatus*)), por lo que se decidió aplicar el mismo rango de concentraciones que para END y CIP.

Para todos los casos, se las adaptó al peso promedio de los huevos de *C. latirostris* que se calcula en 70 g aproximadamente (Poletta y col., 2009) y a nuestras condiciones experimentales.

Para las formulaciones de CIP, END y CPF, debido a su baja solubilidad en agua (Cap 1: 1.1.1.1; 1.1.1.2 y 1.1.1.3), se utilizó etanol (C₂H₆O) como vehículo, por lo que fue necesario incluir un nuevo grupo experimental para evaluar si el etanol producía algún efecto sobre los embriones, denominado "control de vehículo" (CV).

Las formulaciones comerciales de plaguicidas utilizadas para este estudio fueron: (1) Roundup® Full II (RU; 66.2% p.a.), CAS No. 70901-12-1; (2) PanzerGold® (PANZ; 60.2% p.a.), CAS No. 1071-83-6; (3) Cipermetrina Atanor® (CIP; 25% p.a.), CAS No. 52315-07-8; (4) Endosulfán Galgofan® (END; 35% p.a.), CAS No. 115-29-7; y (5) Clorpirifos Lorsban 48E® (CPF; 48% p.a.), CAS No. 2921-88-2 (EXTOXNET, 1996).

3.2.2.1 ENSAYO DE EXPOSICIÓN EMBRIONARIA 1 (EEE1)

Se evaluó el efecto de los insecticidas CIP, END; y de dos formulaciones del herbicida GLI: la formulación RU y la formulación PANZ.

Los huevos de 6 nidos (N=192) fueron distribuidos al azar en 16 grupos experimentales de 12 huevos cada uno (seis huevos por c/u) con sus respectivas réplicas: grupo control negativo (CN, sin exposición al contaminante), grupo control vehículo (CV, tratado con etanol 50 ul), 4 grupos tratados con END y 4 con CIP (1; 10; 100 y 1000 µg/huevo), 3 grupos tratados con RU y 3 con PANZ (500, 750 y 1000 µg/huevo). El peso promedio de los huevos fue de 69,82 ± 4,89 (g).

3.2.2.2 ENSAYO DE EXPOSICIÓN EMBRIONARIA 2 (EEE2)

Este ensayo fue una repetición del ensayo anterior (EEE1), pero con la diferencia que no se utilizó la formulación de PANZ, ya que no fue posible conseguirla nuevamente; por lo que se evaluó el efecto de CIP, END y RU, con las mismas formulaciones y concentraciones descritas para el EEE1.

Se utilizaron huevos de 4 nidos (N=104) que fueron distribuidos al azar en 13 grupos experimentales de 8 huevos cada uno (cuatro huevos por c/u) con sus respectivas réplicas: grupo control negativo (CN, sin exposición al contaminante), grupo control vehículo (CV, tratado con etanol 50 ul), 4 grupos tratados con END y 4 con CIP (1; 10; 100 y 1000 µg/huevo), y 3 grupos con RU (500, 750 y 1000 µg/huevo). El peso promedio de los huevos fue de 64,98 ± 4,26 (g).

En este ensayo, el seguimiento del crecimiento de los individuos se realizó hasta los 6 meses de edad para evaluar el efecto de la exposición sobre el crecimiento postnatal (3 y 6 meses de edad).

3.2.2.3 ENSAYO DE EXPOSICIÓN EMBRIONARIA 3 (EEE3)

Este ensayo fue una repetición del ensayo anterior (*EEE1* y *EEE2*), pero solo se evaluó el efecto de CPF. Se utilizaron 3 nidos (N=72) que fueron distribuidos al azar en 6 grupos experimentales de 12 huevos cada uno (seis huevos por c/u) con sus respectivas réplicas: grupo control negativo (CN, sin exposición al contaminante), grupo control vehículo (CV tratado con etanol 50 ul), y 4 grupos tratados con CPF (1, 10, 100 y 1000 µg/huevo).

A continuación se resume en una tabla los datos de todos los ensayos juntos (Tabla 3.1)

Tabla 3.1: Grupos experimentales y tratamientos aplicados en el *Ensayo de Exposición Embrionaria por topicación (EEE1, EEE2, EEE3)*.

Ensayo	N	Grupos experimentales	[µg/h] CIP	[µg/h] END	[µg/h] RU	[µg/h] PANZ	[µg/h] CPF
<i>EEE1</i>	192	16	1,10,100,1000	1,10,100,1000	500,750,1000	500,750,1000	---
<i>EEE2</i>	104	13	1,10,100,1000	1,10,100,1000	500,750,1000	---	---
<i>EEE3</i>	72	6	---	---	---	---	1,10,100,1000

EEE: Ensayo de Exposición Embrionaria; N: números de huevos por grupo de experimentación; CIP: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Cipermetrina Atanor®; END: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Endosulfán Galgofan®; RU: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de glifosato Roundup Full II®; PANZ: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de PanzerGold®; CPF: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®.

3.2.3 Ensayo de exposición embrionaria por Pulverización (sobre material de nido).

Con el objetivo de evaluar otro mecanismo probable de exposición de embriones que se asemeje a lo que sucede en los ambientes naturales, se realizó mediante la *pulverización* de los plaguicidas sobre el material de nido simulando el momento en que los mismos son expuestos durante la fumigación de los cultivos.

El experimento se llevó a cabo bajo las mismas condiciones de incubación que los ensayos de topicación, como fue descripto por Poletta y col., 2009; y tomando como

referencia un estudio de pulverización sobre nidos artificiales reportado en la especie por nuestro grupo de trabajo (Poletta y col., 2011).

Se utilizaron 84 huevos provenientes de 3 nidos, colectados de la Reserva Natural Manejada "El Fisco" (ver ítem 3.2.1). La cosecha, traslado y selección de los mismos para el experimento se realizaron en iguales condiciones que las descritas en el punto 1.4. Se distribuyeron al azar en 7 grupos experimentales de 12 huevos cada uno, dentro de bandejas plásticas con vermiculita estéril como sustrato, cubiertos por el material de nidos proveniente de la zona control, a ser pulverizado con las respectivas formulaciones a testear.

Se utilizaron un CN rociado con agua utilizada para la dilución (3,5 ml); dos grupos experimentales de la formulación comercial de CPF: CPF c.c. (0,8 %) y CPF 1/2 c.c. (0,4 %); dos grupos experimentales de la formulación comercial de CIP: CIP c.c. (0,12 %) y CIP 1/2 c.c. (0,06 %); dos grupos experimentales de la formulación comercial RU (GLI): GLI c.c. (2%) y GLI 1/2 c.c. (1%).

Las concentraciones se calcularon teniendo en cuenta las recomendadas para la aplicación del producto a campo en cultivos de soja RR (c.c. 0,8%, 0,12% y 2%) y la mitad de las mismas (1/2 c.c.), de los siguientes formulados comerciales: los insecticidas CPF (Lorsban®, 48% p.a.) y CIP (Atanor®, 25% p.a.), y el herbicida GLI (RoundupFull II® -RU, 66,2% p.a.), tomando como referencia la superficie de base de las bandejas de experimentación como área a pulverizar (0,0340 m²; Tabla 3.2).

A diferencia de los anteriores, se realizó un solo ensayo sin repeticiones temporales. El material de nido se roció en función de los tratamientos predeterminados, en una sola aplicación y al inicio de la etapa embrionaria (Fig. 3.5).



Fig. 3.5: Imagen de la aplicación de las soluciones a evaluar por pulverización sobre el material de nido en el *Ensayo de Exposición embrionaria por Pulverización*.

Tabla 3.2: Grupos experimentales y tratamientos aplicados en el *Ensayo de Exposición Embrionaria por Pulverización*.

Grupos experimentales	Compuesto	Concentraciones	N° huevos/nido	N
CN	Agua potable declorada	3,5 ml	4	12
CPF c.c.	Lorsban 48E®, 48% p.a.	0,80%	4	12
CPF 1/2 c.c.		0,40%	4	12
CIP c.c.	Atanor®, 25% p.a.	0,12%	4	12
CIP 1/2 c.c.		0,06%	4	12
GLI (RU) c.c.	RoundupFull II®, 66,2% p.a.	2%	4	12
GLI (RU) 1/2 c.c.		1%	4	12

CN: Control negativo; CPF c.c. y CPF ½ c.c.: grupos expuestos a distintas concentraciones de la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®; CIP c.c. y CIP ½ c.c.: grupos expuestos a distintas concentraciones de Cipermetrina (Atanor®) y GLI (RU) c.c. y GLI (RU) ½ c.c.: grupos expuestos a distintas concentraciones de la formulación de Glifosato (Roundup Full II®); c.c.: concentración aplicada a campo adaptada a la superficie de la bandeja de incubación y ½ c.c.: mitad de la concentración aplicada a campo; p.a.: principio activo; N: número de huevos por grupo de experimentación.

3.2.4 Parámetros y variables analizadas.

En todos los casos, al final del experimento, se tomaron muestras de sangre por punción de la vena espinal. Se aplicó la técnica descrita por Myburgh y col. (2014) en condiciones de asepsia, que consiste en la punción entre la 1° y 2° vértebra cervical, ubicadas a nivel de las escamas postoccipitales. La punción se realizó con jeringa estéril de 3 ml previamente heparinizada y aguja TERUMO® 25G x 5/8" – (0,5 mm), para extraer

0,5 ml de sangre entera de cada ejemplar, para la determinación de los parámetros inmunológicos (Fig. 3.6).



Fig. 3.6: Extracción de sangre de la vena espinal a un ejemplar recién nacido, siguiendo la técnica de Myburgh y col. (2014).

En todos los experimentales se registraron las siguientes variables: éxito de eclosión de cada grupo experimental (cantidad de neonatos nacidos del total de huevos expuestos), existencia de malformaciones externas en los neonatos, tamaño de los pichones al nacer (LT, SVL y peso; y seguimiento del crecimiento posterior en el caso de *EEE2*), y los parámetros inmunológicos propuestos en este trabajo de Tesis: Recuento total y diferencial de glóbulos blancos, anticuerpos naturales y sistema de complemento, siguiendo las metodologías descritas anteriormente en el punto 2.4.

Las longitud total y hocico-cloaca al nacer se realizaron con cinta métrica de 0,1 cm de precisión, y se pesaron con balanza eléctrica (OHAUS® *Compact scale* CS200) de 0,1 gr de precisión. Respecto al crecimiento postnatal, en el *EEE2*, todos los pichones se mantuvieron individualizados y bajo condiciones controladas de crianza en las instalaciones del PY, con el fin de evaluar el efecto de los tratamientos sobre el crecimiento de los caimanes durante los primeros meses de vida, tomándose mediciones correspondientes de peso, LT y LHC a los 3 y 6 meses de edad. El alimento fue suministrado *ad libitum* 3 veces a la semana, estaba compuesto por una mezcla de 50% de cabezas de pollo molidas y 50% de balanceado seco para reptiles (Larriera y col., 2008).

3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

El análisis estadístico se realizó utilizando el *software* SPSS 17.0 para Windows. Los valores de la media \pm error estándar (E.E.) se calcularon a partir de los animales de cada grupo experimental.

Las diferencias entre réplicas de cada grupo experimental se analizaron mediante Test *t*.

La normalidad de las variables fue corroborada mediante el test de Kolmogorov- Smirnov y la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Levene.

Luego del análisis de los supuestos, se utilizaron test paramétricos (ANOVA y Dunnett o Tukey) o no paramétricos (Kruskal-Wallis y Mann-Whitney U-test) para comparar los diferentes grupos en función de las distintas variables analizadas, considerando en todos los casos los tratamientos y los nidos como variables de agrupamiento. En el caso de la comparación entre grupos experimentales, aquellos expuestos a las formulaciones de CIP, END y CPF se contrastaron con el CV, mientras que los expuestos a formulaciones de GLI con el CN, excepto en el ensayo de pulverización donde no se utilizó CV ya que los compuestos se aplicaron por aspersion.

En el *EEE2*, el análisis de crecimiento se llevó a cabo mediante un Modelo Lineal General: medidas repetidas, ya que se contaba con 3 mediciones de peso y longitud (nacimiento, 3 y 6 meses de edad).

Se consideró estadísticamente significativa una diferencia de $p \leq 0,05$.

3.4 RESULTADOS

Al analizar nuestros resultados, no se observaron diferencias significativas entre las réplicas de los grupos experimentales para ninguna de las variables analizadas de cada uno de los ensayos ($p > 0,05$; Test *t*), por este motivo que todos los resultados se informan por grupo experimental (media \pm E.E.).

El porcentaje de eclosión (*éxito de eclosión*) no fue estadísticamente diferente entre los grupos experimentales de cada ensayo de *Topicación y Pulverización* ($p > 0,05$), ni se registraron malformaciones externas en los animales recién nacidos.

Además, no se observaron diferencias en las variables analizadas entre el CN y CV ($p > 0,05$) en ninguno de los ensayos donde se emplearon ambos controles (*EEE1*, *EEE2* y *EEE3*), lo que demuestra que el etanol no causaría algún daño manifiesto en los embriones.

En cuanto al *EEE1*, no se observaron diferencias significativas entre los grupos analizados por tratamiento ($p > 0,05$) para todas las variables analizadas (Tabla 3.3).

Tabla 3.3 Resultados (Media \pm E.E.) de todos los parámetros inmunológicos analizados para los distintos grupos experimentales del *Ensayo de Exposición Embrionaria 1 (EEE1)*.

Grupos Experimentales	RTGB/mm3	Heterófilos (%)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Eosinófilos (%)	AcN	% MH
CN	32050 \pm 5537,97	12,5 \pm 3,04	83,1 \pm 3,7	0,5 \pm 0,31	3 \pm 0,7	25,6 \pm 6,72	33,11 \pm 5,38
CV	38000 \pm 4791,56	19,73 \pm 3,26	75,73 \pm 3,34	0,64 \pm 0,24	3 \pm 0,73	26,18 \pm 4,83	34,02 \pm 7,19
CIP1	32750 \pm 3920,21	17,8 \pm 2,08	78,4 \pm 2,3	0,8 \pm 0,33	2 \pm 0,45	19,56 \pm 3,3	49,03 \pm 12,35
CIP10	44818,18 \pm 8006,61	23 \pm 2,8	75 \pm 3,56	0,55 \pm 0,25	2,45 \pm 0,47	22,55 \pm 2,82	52,43 \pm 8,43
CIP100	32909,09 \pm 3270,26	22,73 \pm 3,38	72,18 \pm 3,43	0,55 \pm 0,31	3,45 \pm 0,69	24 \pm 4,92	32,82 \pm 6,36
CIP1000	39300 \pm 3008,51	20 \pm 4,37	76,2 \pm 4,48	0,5 \pm 0,22	2,2 \pm 0,47	22,4 \pm 5,31	45,97 \pm 9,25
END1	34350 \pm 4796,44	22,33 \pm 3,24	74,78 \pm 3,66	0,89 \pm 0,45	2,33 \pm 0,58	34,4 \pm 10,8	27,22 \pm 5,51
END10	40812,5 \pm 9641,77	21 \pm 3,6	75,88 \pm 3,87	0,63 \pm 0,26	1,75 \pm 0,41	23 \pm 6,31	32,78 \pm 7,71
END100	37090,91 \pm 2869,76	17,64 \pm 2,06	79,55 \pm 2,37	0,91 \pm 0,39	1 \pm 0,3	29,82 \pm 6,01	42,74 \pm 4,79
END1000	46950 \pm 7477,54	17,2 \pm 2,32	78,6 \pm 2,64	0,4 \pm 0,22	3,1 \pm 0,57	24 \pm 2,67	34,44 \pm 3,74
RU500	35777,78 \pm 6856,22	17,67 \pm 2,92	73,78 \pm 5,36	0,33 \pm 0,17	3,11 \pm 0,54	20,44 \pm 5,51	43,54 \pm 6,95
RU750	39590,91 \pm 3142,68	13,73 \pm 3,4	81,36 \pm 3,58	0	4,09 \pm 0,73	34,18 \pm 9,77	35,5 \pm 7,55
RU1000	36863,64 \pm 7391,67	14,73 \pm 2,32	80,64 \pm 2,74	0	3,27 \pm 1,08	27,2 \pm 6,66	50,05 \pm 12,08
PANZ500	54000 \pm 8871,77	11 \pm 4,42	85,75 \pm 5,71	0	2,5 \pm 1,19	24 \pm 4,62	65,35 \pm 16,13
PANZ750	27375 \pm 2409,83	16,5 \pm 4,37	80,75 \pm 5,07	0	2,5 \pm 0,64	37,33 \pm 14,11	36,04 \pm 25
PANZ1000	28200 \pm 4897,96	15 \pm 4,56	79 \pm 4,68	0	5 \pm 1,05	13,6 \pm 2,4	32,91 \pm 5,64

CN: Control negativo; CV: Control vehículo; CIP 1, 10, 100 y 1000 ($\mu\text{g}/\text{huevo}$): grupos expuestos a distintas concentraciones de la formulación de Cipermetrina Atanor®; END 1, 10, 100 y 1000 ($\mu\text{g}/\text{huevo}$): grupos expuestos a distintas concentraciones de la formulación de Endosulfan Galgofan®; RU 500, 750 y 1000 ($\mu\text{g}/\text{huevo}$): grupos expuestos a distintas concentraciones de la formulación de Glifosato Roundup Full II®; PANZ 500, 750 y 1000 ($\mu\text{g}/\text{huevo}$): grupos expuestos a distintas concentraciones de la formulación de Glifosato PanzerGold®. RTGB: Recuento Total de Glóbulos Blancos. AcN: Anticuerpos naturales. %MH: Máxima Hemólisis.

Lo mismo ocurrió para *EEE2* (Tabla 3.4) y *EEE3* (Tabla 3.5), donde tampoco se observaron diferencias significativas entre los grupos analizados por tratamiento ($p > 0,05$) para todas las variables analizadas.

Tabla 3.4 Resultados (Media \pm E.E.) de todos los parámetros inmunológicos analizados para los distintos grupos experimentales del *Ensayo de Exposición Embrionaria 2 (EEE2)*.

Grupos Experimentales	RTGB/mm ³	Heterófilos (%)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Eosinófilos (%)	NAbs	% MH
CN	27250 \pm 7709,57	54,5 \pm 13,09	40,25 \pm 12,09	0	4,75 \pm 1,84	40 \pm 13,86	55,44 \pm 21,33
CV	22750 \pm 1509,69	61,83 \pm 4,28	33,83 \pm 3,78	0,17 \pm 0,17	3,33 \pm 1,45	40 \pm 10,73	22,31 \pm 3,7
CIP1	20500 \pm 3626,29	53,2 \pm 5,23	42,4 \pm 4,95	0,2 \pm 0,2	3,6 \pm 1,5	28,8 \pm 10,31	44,35 \pm 13,21
CIP10	17937,5 \pm 1862,31	53,75 \pm 5,32	41,25 \pm 4,77	0,5 \pm 0,38	3,38 \pm 0,78	23 \pm 6,83	38,41 \pm 8,17
CIP100	21500 \pm 3474,91	48,6 \pm 6,5	44,8 \pm 7,15	0,4 \pm 0,24	5,4 \pm 1,75	16 \pm 4,38	26,42 \pm 7,87
CIP1000	17416,67 \pm 4184,13	49,17 \pm 4,7	45,83 \pm 5,08	0	3,67 \pm 0,67	38,4 \pm 10,85	60,44 \pm 19,14
END1	15900 \pm 1435,27	47,6 \pm 8,5	49,2 \pm 7,49	0	3 \pm 0,84	20 \pm 4	39,35 \pm 13,24
END10	22312,5 \pm 2675,85	54,5 \pm 4,17	39,75 \pm 4,33	0,5 \pm 0,19	4,5 \pm 1,45	37 \pm 14,42	25,26 \pm 8,58
END100	16750 \pm 3217,79	59 \pm 8,24	37,25 \pm 7,05	0,25 \pm 0,25	2,25 \pm 1,03	28 \pm 12	48,43 \pm 24,88
END1000	22200 \pm 3437,29	45,2 \pm 3,54	48,4 \pm 4,32	0,6 \pm 0,24	4,6 \pm 0,87	27,2 \pm 10	27,46 \pm 10,03
RU500	22000 \pm 2549,51	51,5 \pm 8,71	44 \pm 7,37	0	3,67 \pm 1,41	22,67 \pm 8,37	25,09 \pm 15,47
RU750	16571,43 \pm 2970,95	45 \pm 4	50 \pm 3,81	0,33 \pm 0,21	4,17 \pm 1,11	28,8 \pm 10,31	19,82 \pm 5,03
RU1000	20500 \pm 1695,58	43,4 \pm 9,14	54 \pm 8,64	0,2 \pm 0,2	1,6 \pm 0,75	22,4 \pm 10,55	22,84 \pm 11,45

CN: Control negativo; CV: Control vehículo; CIP 1, 10, 100 y 1000 (μ g/huevo): grupos expuestos a distintas concentraciones de la formulación de Cipermetrina Atanor®; END 1, 10, 100 y 1000 (μ g/huevo): grupos expuestos a distintas concentraciones de la formulación de Endosulfán Galgofan®; RU 500, 750 y 1000 (μ g/huevo): grupos expuestos a distintas concentraciones de la formulación de Glifosato Roundup Full II®; RTGB: Recuento Total de Glóbulos Blancos. AcN: Anticuerpos naturales. %MH: Máxima Hemólisis.

Tabla 3.5 Resultados (Media \pm E.E.) de todos los parámetros inmunológicos analizados para los distintos grupos experimentales del *Ensayo de Exposición Embrionaria 3 (EEE3)*.

Grupos Experimentales	RTGB/mm ³	Heterófilos (%)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Eosinófilos (%)	AnC	% MH
CN	20166,67 \pm 1759,89	24,56 \pm 1,99	69,89 \pm 2,09	0	4,67 \pm 0,99	16,89 \pm 3,11	22,99 \pm 4,65
CV	17388,89 \pm 1141,93	33,67 \pm 3,28	63,11 \pm 2,91	0	2,33 \pm 0,64	15,11 \pm 2,73	26,39 \pm 6,62
CPF1	23000 \pm 2164,1	22,83 \pm 4,14	74,5 \pm 3,96	0	2,17 \pm 0,75	12,67 \pm 2,17	28,07 \pm 6,27
CPF10	20875 \pm 2375	19,43 \pm 5,96	76 \pm 5,49	0,14 \pm 0,14	3,86 \pm 0,86	16 \pm 5,66	31,4 \pm 8,64
CPF100	25071,43 \pm 2639,96	28,5 \pm 4,96	67,83 \pm 4,69	0	3,17 \pm 0,79	14,86 \pm 3,23	27,51 \pm 7,17
CPF1000	26562,5 \pm 3140,23	36,14 \pm 7,34	60,86 \pm 7,18	0,14 \pm 0,14	2,57 \pm 0,53	14 \pm 4,34	36,37 \pm 12,45

CN: control negativo; CV: control vehículo; CPF1, 10, 100 y 1000 (μ g/huevo): grupos expuestos a distintas concentraciones de la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®. RTGB: Recuento Total de Glóbulos Blancos. AnC: Anticuerpos naturales. %MH: Máxima Hemólisis.

En cuanto a los resultados sobre el "efecto nido" que se examinaron para todas las variables observadas, se encontraron diferencias entre nidos en *EEE1* en el RDGB para la categoría heterófilos y linfocitos ($p < 0,05$; ANOVA/Tukey); y para eosinófilos (Kruskal Wallis/Mann-Whitney, $p < 0,05$). En *EEE2*, también se obtuvieron diferencias entre nidos en el RDGB para heterófilos y linfocitos ($p < 0,05$; ANOVA/Tukey); y para eosinófilos, AnC y SC (Kruskal Wallis/Mann-Whitney, $p < 0,05$). Para *EEE3*, también se obtuvieron diferencias entre nidos en el RDGB para eosinófilos (Kruskal Wallis/Mann-Whitney, $p < 0,05$).

En lo que refiere al tamaño de los animales al nacer, en *EEE1* no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos de experimentación ($p > 0,05$; ANOVA/Tukey; Tabla 3.6), pero si se observó una diferencia de peso al nacer entre nidos ($p < 0,05$; Kruskal Wallis/Mann-Whitney; aplicándose la corrección de Bonferroni ($p=0,003$)).

Tabla 3.6 Parámetros de tamaño (media \pm E.E.) en neonatos de *C. latirostris* en los distintos grupos experimentales del *Ensayo de Exposición Embrionaria 1 (EEE1)*.

Grupos Experimentales	LT (cm)	LHC (cm)	PESO (g)
CN	21,08 \pm 2,35	10,08 \pm 1,12	44,09 \pm 1,25
CV	23,02 \pm 0,24	10,81 \pm 1,12	44,45 \pm 10,02
CIP1	23,45 \pm 0,18	11,16 \pm 0,18	44,86 \pm 1,41
CIP10	23,39 \pm 0,16	11,09 \pm 0,10	43,95 \pm 1,01
CIP100	23,42 \pm 0,19	11,04 \pm 0,09	44,30 \pm 0,47
CIP1000	23,17 \pm 0,23	11,10 \pm 0,10	44,52 \pm 0,93
END1	21,11 \pm 2,36	9,99 \pm 1,12	39,53 \pm 4,51
END10	23,49 \pm 0,24	10,06 \pm 1,11	44,76 \pm 1,32
END100	22,42 \pm 1,16	12,21 \pm 1,03	44,77 \pm 0,79
END1000	23,39 \pm 0,14	11,32 \pm 0,07	44,47 \pm 0,50
RU500	22,55 \pm 0,55	10,87 \pm 0,22	42,32 \pm 1,21
RU750	23,55 \pm 0,54	11,15 \pm 0,26	44,42 \pm 0,98
RU1000	23,52 \pm 0,29	11,44 \pm 0,07	46,58 \pm 0,96
PANZ500	23,44 \pm 0,26	11,23 \pm 0,11	45,45 \pm 0,62
PANZ750	23,27 \pm 0,12	11,11 \pm 0,07	44,47 \pm 0,86
PANZ1000	20,66 \pm 2,30	9,91 \pm 1,10	44,18 \pm 0,80

CN: Control negativo; CV: Control vehículo; CIP 1, 10, 100 y 1000 ($\mu\text{g/huevo}$): grupos expuestos a distintas concentraciones de Cipermetrina Atanor®; END 1, 10, 100 y 1000 ($\mu\text{g/huevo}$): grupos expuestos a distintas concentraciones de Endosulfan Galgofan®; RU 500, 750 y 1000 ($\mu\text{g/huevo}$): grupos expuestos a distintas concentraciones la formulación de Glifosato Roundup Full II®; PANZ 500, 750 y 1000 ($\mu\text{g/huevo}$): grupos expuestos a distintas concentraciones la formulación de Glifosato PanzerGold®. $p > 0,05$; ANOVA/Tukey. LT: longitud total. LHC: longitud hocico-cloaca. cm: centímetro. g: gramos

En *EEE2* tampoco se observaron diferencias entre los grupos en peso y longitud (LT/LHC) al momento del nacimiento, ni a los 3 o 6 meses posteriores al nacimiento ($p > 0,05$; *Modelo Lineal General: Medidas repetidas*; Tabla 3.7). Por este motivo, se decidió no continuar con el seguimiento de los parámetros del crecimiento luego del nacimiento, teniéndose en cuenta solo el tamaño al nacer en los ensayos posteriores.

En el análisis entre nidos, se encontraron diferencias en LT, LHC y peso (al nacer, a los 3 y 6 meses de edad; $p < 0,05$; *Modelo Lineal General: Medidas repetidas*).

Tabla 3.7 Parámetros del crecimiento (media \pm E.E.) observados al nacer, a los 3 y 6 meses de edad en *C. latirostris*, en los distintos grupos experimentales del *Ensayo de Exposición Embrionaria 2 (EEE2)*.

		Grupos experimentales													
		CN	CV	CP	END1	END10	END100	END1000	CIP1	CIP10	CIP100	CIP1000	RU500	RU750	RU1000
LT (cm)	Nacimiento	20,17 ± 0,27	22,45 ± 0,48	22,57 ± 0,50	21,75 ± 0,48	22,40 ± 0,46	22,45 ± 0,59	22,38 ± 0,41	22,75 ± 0,68	22,14 ± 0,21	21,28 ± 0,26	22,28 ± 0,44	21,38 ± 0,64	22,05 ± 0,44	22,70 ± 0,32
	3 meses	29,75 ± 0,52	30,08 ± 0,58	30,62 ± 0,47	29,25 ± 0,63	29,70 ± 1,02	30,75 ± 0,48	29,60 ± 0,76	30,37 ± 0,24	29,00 ± 0,51	28,00 ± 0,63	28,83 ± 0,87	27,80 ± 0,49	28,50 ± 0,91	29,50 ± 0,46
	6 meses	36,92 ± 1,28	36,98 ± 1,40	37,67 ± 2,16	33,90 ± 1,54	35,34 ± 2,14	38,20 ± 1,57	35,96 ± 1,72	36,75 ± 1,00	34,56 ± 0,93	34,80 ± 2,19	34,13 ± 1,62	32,30 ± 0,58	33,75 ± 1,66	37,17 ± 2,08
LHC (cm)	Nacimiento	10,82 ± 0,12	10,90 ± 0,13	11,05 ± 0,05	10,82 ± 0,27	10,84 ± 0,22	10,95 ± 0,21	10,84 ± 0,25	10,92 ± 0,15	10,86 ± 0,13	10,98 ± 0,02	10,70 ± 0,26	10,60 ± 0,14	10,92 ± 0,20	10,97 ± 0,06
	3 meses	14,62 ± 0,31	10,75 ± 0,28	15,12 ± 0,31	10,25 ± 0,25	14,5 ± 0,47	15,37 ± 0,31	14,20 ± 0,34	14,87 ± 0,24	14,07 ± 0,30	13,70 ± 0,30	14,17 ± 0,38	13,90 ± 0,29	13,83 ± 0,48	14,50 ± 0,29
	6 meses	18,05 ± 0,55	18,12 ± 0,71	18,50 ± 1,06	16,42 ± 0,67	17,06 ± 0,81	18,70 ± 0,93	17,30 ± 0,81	17,65 ± 0,46	16,87 ± 0,47	16,80 ± 1,12	16,52 ± 0,76	16,06 ± 0,45	16,47 ± 0,82	18,25 ± 0,97
Peso (g)	Nacimiento	38,00 ± 0,45	45,35 ± 0,89	43,40 ± 0,38	40,10 ± 0,75	42,34 ± 0,75	41,47 ± 0,93	41,80 ± 1,37	42,40 ± 2,36	40,50 ± 0,90	42,92 ± 1,47	38,62 ± 2,06	42,08 ± 0,87	41,25 ± 2,28	42,42 ± 1,69
	3 meses	95,05 ± 6,32	96,33 ± 7,83	98,57 ± 6,77	77,90 ± 6,52	94,64 ± 11,61	106,27 ± 8,23	96,48 ± 6,84	96,82 ± 4,95	79,73 ± 3,41	85,68 ± 9,75	84,93 ± 8,95	79,7 ± 4,43	85,52 ± 7,60	94,22 ± 4,67
	6 meses	175,50 ± 22,94	179,72 ± 19,79	184,10 ± 41,01	121,85 ± 17,04	157,00 ± 26,06	207,50 ± 37,18	168,42 ± 29,22	167,92 ± 15,56	133,51 ± 9,97	159,00 ± 36,72	138,96 ± 23,57	117,08 ± 11,11	131,48 ± 17,66	171,10 ± 33,95

CN: Control Negativo; CV: Control vehículo; CIP 1, 10, 100 y 1000 (µg/huevo): grupos expuestos a distintas concentraciones de Cipermetrina Atanor®; END 1, 10, 100 y 1000 (µg/huevo): grupos expuestos a distintas concentraciones de Endosulfán Galgofán®; RU 500, 750 y 1000 (µg/huevo): grupos expuestos a distintas concentraciones de la formulación de Glifosato Roundup Full II®. *p* > 0,05/ *Modelo Lineal General: Medidas Repetidas*. LT: longitud total. LHC: longitud hocico-cloaca. cm: centímetros. g: gramos.

Para los *EEE3* no se observaron diferencias en el tamaño de los pichones al nacer entre los grupos expuestos y CN o CV (ANOVA/Tukey-Dunnett; Tabla 3.8), pero si entre los nidos: en *EEE3* para la LT, LHC y peso ($p < 0,01$; ANOVA/Tukey).

Tabla 3.8 Parámetros de tamaño al nacer (media \pm E.E.) en *C. latirostris* observados en los distintos grupos experimentales del *Ensayo de Exposición Embrionaria 3 (EEE3)*.

Grupos experimentales	LT (cm)	LHC (cm)	Peso (g)
CN	23,37 \pm 0,28	11,30 \pm 0,13	45,24 \pm 1,23
CV	23,02 \pm 0,64	11,14 \pm 0,07	44,28 \pm 0,98
CPF1	23,53 \pm 0,43	11,02 \pm 0,18	45,50 \pm 1,30
CPF10	23,22 \pm 0,44	11,29 \pm 0,10	44,49 \pm 0,98
CPF100	22,94 \pm 0,66	10,89 \pm 0,26	43,56 \pm 1,53
CPF100	22,92 \pm 0,38	10,96 \pm 0,18	42,56 \pm 1,11

Todos los valores se expresan como media \pm error estándar. CV: Control vehículo; CPF: 1, 10, 100 y 1000 ($\mu\text{g/huevo}$): grupos expuestos a distintas concentraciones de la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®. $p > 0,05$; ANOVA/Tukey.

LT: longitud total. LHC: longitud hocico-cloaca. cm: centímetros. g: gramos.

En relación al ensayo de *Pulverización* sobre el material de nido, no se observaron diferencias significativas entre los grupos analizados por tratamiento ($p > 0,05$) para todas las variables analizadas (Tabla 3.9).

Tabla 3.9 Resultados (Media \pm E.E.) de todos los parámetros inmunológicos analizados para los distintos grupos experimentales del *Ensayo de Pulverización sobre el material de nido*.

Grupos Experimentales	RTGB/mm3	Heterófilos (%)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Eosinófilos (%)	AnC	% MH
CN	10750 \pm 680,07	48,43 \pm 4,81	49,29 \pm 5,03	0,14 \pm 0,14	2,14 \pm 0,59	18,67 \pm 4,46	36,76 \pm 23,46
CPF c.c.	16545,45 \pm 1454,54	33,2 \pm 3,24	65 \pm 3,02	0,5 \pm 0,31	1,30 \pm 0,26	48 \pm 13,93	29,8 \pm 8,15
CPF 1/2 c.c.	19937,5 \pm 3668,69	44,63 \pm 2,82	53,63 \pm 2,55	0,13 \pm 0,12	1,63 \pm 0,5	15,11 \pm 3,58	26,3 \pm 14,06
CIP c.c.	15409,09 \pm 1873,04	38,22 \pm 5,85	59,22 \pm 5,87	0,11 \pm 0,11	2,44 \pm 0,44	43,2 \pm 15,05	32,22 \pm 7,78
CIP 1/2 c.c.	17600 \pm 3483,93	39,6 \pm 3,6	58,7 \pm 3,72	0,10 \pm 0,10	1,6 \pm 0,58	74,67 \pm 54,96	18,4 \pm 6,81
GLI (RU) c.c.	17000 \pm 2253,28	37,64 \pm 3,99	61,64 \pm 4,47	0,27 \pm 0,19	1,55 \pm 0,56	25,6 \pm 7,11	18,44 \pm 7,4
GLI (RU) 1/2 c.c.	14800 \pm 1447,60	45,56 \pm 5,45	52 \pm 5,89	0,33 \pm 0,17	2,11 \pm 0,51	45,6 \pm 14,75	22,7 \pm 11,33

CN: control negativo; CPF c.c. (0,8%) y CPF 1/2 c.c. (0,4%): grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®; CIP c.c. (0,12%) y CIP 1/2 c.c. (0,06%): grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Cipermetrina Atanor® y GLI c.c. (2%) y GLI 1/2 c.c. (1%): grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Glifosato Roundup Full II®. RTGB: Recuento Total de Glóbulos Blancos.

AcN: Anticuerpos naturales. %MH: Máxima Hemólisis.

Al igual que los demás ensayos de exposición *in ovo*, no se observaron diferencias de tamaño entre los animales expuestos y los controles al momento del nacimiento ($p > 0,05$; ANOVA; Tabla 3.10). Pero si un *efecto nido* marcado en la longitud: LT, LHC ($p < 0,01$; ANOVA) y peso ($p < 0,05$; Kruskal Wallis/Mann-Whitney, aplicando corrección de Bonferroni, considerando significativo un $p \leq 0,016$).

Tabla 3.10 Parámetros de tamaño (media \pm E.E.) al nacer en *C. latirostris* observados en los distintos grupos experimentales del *Ensayo de Pulverización sobre el material de nido*.

Grupos Experimentales	LT (cm)	LHC (cm)	Peso (g)
CN	23,86 ± 0,13	11,30 ± 0,11	45,79 ± 2,36
CPF c.c.	23,18 ± 0,66	11,08 ± 0,27	11,57 ± 1,84
CPF 1/2 c.c.	23,54 ± 0,29	11,40 ± 0,14	45,16 ± 1,60
CIP c.c.	24,13 ± 0,21	11,48 ± 0,11	47,03 ± 2
CIP 1/2 c.c.	23,94 ± 0,24	11,34 ± 0,18	46,04 ± 1,80
GLI (RU) c.c.	24,01 ± 0,20	11,49 ± 0,10	47,69 ± 1,75
GLI (RU) 1/2 c.c.	24,01 ± 0,27	11,20 ± 0,10	46,64 ± 2,16

CN: Control negativo; CPF c.c. (0,8%) y CPF ½ c.c. (0,4%): grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®; CIP c.c. (0,12%) y CIP ½ c.c. (0,06%): grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Cipermetrina Atanor® y GLI c.c. (2%) y GLI ½ c.c. (1%): grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Glifosato Roundup Full II®. $p > 0,05$; ANOVA. c.c.: concentración a campo. ½ c.c.: mitad de la concentración a campo LT: longitud total. LHC: longitud hocico-cloaca. cm: centímetros. g: gramos.

3.5 Discusión y conclusiones generales del capítulo

En muchas especies ovíparas, los factores que afectan la supervivencia de los embriones pueden representar una causa muy importante en la disminución de la población (Overall, 1994). Entre otras perturbaciones, los contaminantes ambientales pueden afectar gravemente el desarrollo embrionario y, potencialmente, pueden contribuir a la mortalidad embrionaria.

Muchos trabajos realizados bajo condiciones controladas han comprobado la absorción de plaguicidas a través de la cáscara del huevo, ya sea por topicación (Beldoménico y col., 2007; Poletta y col., 2009; Rey y col., 2009; Charruau y col., 2013; Burella y col., 2016; Schaumburg y col., 2016) o aplicación sobre el material de nido (Cañas y Anderson, 2002; Mayne y col., 2005; Poletta y col., 2011; de Solla y Martin, 2011; de Solla y col., 2014). Ambas técnicas representan dos vías eficientes de exposición a contaminantes de los embriones en desarrollo, ya que las sustancias pasan de una u otra forma a través de la cáscara del huevo e induce efectos perjudiciales en los embriones. Sin embargo, los resultados obtenidos en esta etapa de exposición, tanto por topicación sobre la cáscara del huevo y por pulverización sobre el material de nido, no demostraron diferencias entre los grupos experimentales para todas las variables analizadas es los estudios en los que se testearon los plaguicidas de manera independiente, en todas las etapas experimentales (*EEE1*, *EEN2*, *EEN3* y *Ensayo de Exposición por Pulverización*).

Estos resultados coinciden con los de Spiteri y col., (1999), cuyo objetivo fue detectar las alteraciones endócrinas, como resultado de la exposición de embriones de alligators a herbicidas como la atrazina y el 2,4 D. Sus resultados sugieren que dicha exposición embrionaria, no causó alteraciones significativas en la estructura gonadal en la actividad hepática de los cocodrilos norteamericanos. Portelli y col., (1999), evaluaron la hipótesis de que el diclorodifeniltricloroetano (p, p' -DDE) causa feminización de la tortuga común (*Chelydra s. serpentina*), una especie con determinación del sexo dependiente de la temperatura. En la etapa 14 del desarrollo embrionario, p, p' -DDE se aplicó tópicamente a cuatro concentraciones diferentes. Los resultados indican que p, p' -DDE, en los niveles que existen en el medio ambiente en los Grandes Lagos (Ontario, Canadá), no causa la feminización de las tortugas durante el desarrollo embrionario.

De manera similar, Milnes y col., (2004), expusieron por topicación, embriones de *A. mississippiensis* a concentraciones variables de toxafeno, un plaguicida de amplio espectro encontrado en altas concentraciones en yemas de huevos de estos animales que viven en el lago Apopka (en dicho lago, la población de alligators ha recibido particular atención por los investigadores que analizan las consecuencias reproductivas y de desarrollo de la exposición crónica a contaminantes ambientales). Sus resultados indicaron que el toxafeno tuvo poco o ningún efecto en los criterios morfológicos examinados (incluyendo masa corporal y tamaño), hígado, tiroides y el desarrollo de las gónadas. Además, el plaguicida tampoco tuvo efecto sobre la diferenciación sexual, la producción *in vitro* de tiroxina, testosterona y estradiol.

A pesar de los antecedentes de efectos de los plaguicidas por topicación y pulverización sobre otros sistemas, no existen estudios realizados sobre los mecanismos de defensa. El hecho de que no se observaron efectos sobre las variables inmunológicas medidas, podría relacionarse a que las concentraciones de los plaguicidas utilizadas en esta etapa, pueden no haber sido lo suficientemente efectivas como para provocar alguna alteración detectable. Sumado a esto, la etapa temprana de desarrollo en la que los animales fueron expuestos además de una única exposición, podrían ser factores influyentes en la ausencia de efectos.

La mortalidad de los embriones en todos los ensayos y grupos experimentales, fue menor al 20%, un valor considerado aceptable respecto a la mortandad reportada en los

programas de uso sustentable bajo la técnica de rancheo, con incubación artificial (Larriera e Imhof, 2006). Respecto al crecimiento, no observamos efectos sobre el tamaño y el crecimiento posterior, luego de la exposición embrionaria. Esto concuerda con trabajos recientes en la especie (Burella y col., 2016; Latorre y col., 2016), en la iguana overa (Schaumburg y col., 2016), y en el lagarto *Podarcis bocagei* expuestos ambientalmente a plaguicidas (Amaral y col., 2012a).

En estudios previos realizados en *C. latirostris*; Poletta y col., (2011) observaron un menor tamaño al nacer y un retraso del crecimiento a los 3 meses de edad luego de la exposición *in ovo* por pulverización en condiciones seminaturales a RU, y a la mezcla de GLI+CIP+END. En otro estudio, Beldoménico y col., (2007), observaron una mayor pérdida de peso de los huevos y las crías, tratados con la dosis más alta de END (2 y 20 ppm) y una reducción en el peso fraccionario de los nidos luego de la exposición *in ovo*. La falta de efectos en el crecimiento fue evaluada por Amaral y col. (2012a), y sugieren que los valores en las concentraciones de plaguicidas aplicadas no fueron suficientes como para generar un desequilibrio en los procesos bioenergéticos subyacentes tales como asimilación de energía y gasto metabólico. Además, la tasa de recuperación metabólica en reptiles es difícil de sostener frente a las continuas exposiciones ambientales. Las aplicaciones de los plaguicidas que ocurren generalmente durante la primavera y el otoño, coincide con el período en el cual los reptiles adquieren energía suficiente para la producción de huevos, la reproducción y para sobrevivir al invierno.

Como mencionamos anteriormente (apartado 3.1), una de las principales causas de variabilidad ampliamente estudiada en parámetros analizados en especies de cocodrilianos, es el "*efecto nido*". Este término fue definido por Verdade (1997) como la influencia de la carga genética y fenotípica transmitida por los reproductores al embrión y al contenido del huevo, asociado a la influencia del entorno de incubación de los huevos. Así, las crías procedentes de distintos nidos de origen podrían mostrar posteriormente, diferencias en la respuesta frente a la exposición de condiciones ambientales variables.

En este trabajo de tesis, el *efecto nido* se comprobó para algunas categorías del RDGB (*EEE1*, *EEE2* y *EEE3*) y para los parámetros relacionados al crecimiento en todos los ensayos; lo cual coincide con estudios previos que han descripto la influencia del nido de origen como uno de los factores determinantes en el crecimiento de los animales durante los primeros meses de vida (Webb y col., 1992; Verdade, 1997).

Estos resultados, validan la utilización de diferentes nidos y su distribución equitativa en los diferentes grupos experimentales de los ensayos controlados de exposición y comprueban la necesidad de seguir teniendo en cuenta este factor en los diseños experimentales de este tipo.

CAPÍTULO 4

CAPÍTULO 4.

Evaluación del efecto inmunotóxico de diferentes formulaciones de plaguicidas (Endosulfán, Cipermetrina, Clorpirifós, y Glifosato) en neonatos de *Caiman latirostris* (*Etapa 2*).

4.1 INTRODUCCIÓN

Como mencionamos anteriormente, la etapa reproductiva del yacaré overo coincide con el periodo del año de máxima aplicación de plaguicidas, es por esto que durante el nacimiento de las crías en Santa Fe, Argentina (febrero-marzo), pueda existir la posibilidad de que la exposición a plaguicidas en zonas agrícolas se produzca no sólo en estado embrionario, sino también en el período neonatal y de otras edades. En Argentina, la campaña de soja de primera se extiende desde el mes de septiembre hasta mayo, mientras la soja de segunda, inicia en noviembre-enero y culmina en julio. En cualquiera de los casos, implica un gran riesgo de exposición ambiental a plaguicidas para los individuos de *C. latirostris*.

Durante los primeros meses de vida, los organismos suelen ser más vulnerables a cualquier variación ambiental y presentan una mayor sensibilidad a los contaminantes químicos que los adultos, debido a la inmadurez en los sistemas de detoxificación y reparación del daño (Russel y col., 1999; Novillo y col., 2005; Poletta y col., 2009). Algunos trabajos realizados en aves y mamíferos en vida libre demuestran las implicancias a nivel poblacional del efecto depresivo sobre el sistema inmunológico que causarían los tóxicos liberados, voluntaria o involuntariamente, al medioambiente (Grasman y col., 1996; Ross y col., 1996; Grasman y Fox, 2001). Otro estudio confirma las sospechas de que la exposición en el medioambiente a concentraciones importantes de contaminantes puede suprimir la función inmune en la fauna silvestre y puede llevar a una disminución de la resistencia del hospedador, mayor vulnerabilidad a las enfermedades, aumento de la mortalidad y, por ende, una reducción en el tamaño de las poblaciones (Keller y col., 2005).

En cuanto a *C. latirostris*, en los últimos años, se han reportado numerosos efectos producidos por formulaciones de plaguicidas sobre las primeras etapas de su vida, en condiciones controladas o seminaturales, incluyendo alteraciones sobre el desarrollo, modificaciones a nivel genético, enzimático y metabólico, así como en la respuesta inmune (Poletta y col., 2009; 2011; 2016; Latorre y col., 2013; 2016; López González y col., 2013; 2017; Siroski y col., 2016; Burella y col., 2016).

En este capítulo se describe la evaluación posnatal del efecto de formulaciones de plaguicidas a base de END, CIP, CPF y GLI en neonatos de *C. latirostris* bajo condiciones controladas de exposición.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 NEONATOS DE *C. latirostris*

Se utilizaron neonatos de *C. latirostris* de 20 días de edad, provenientes de diferentes nidos cosechados en el sitio descrito en 3.2.1. Fueron incubados artificialmente y mantenidos bajo condiciones controladas hasta el inicio del tratamiento, en las instalaciones del PY.

Los animales se individualizaron mediante cortes en los verticilos caudales (que corresponden al número del nido y a la marca individual de cada animal (Larriera y col., 1994) como fue explicado en Capítulo 1 (1.4), y para controlar el *efecto nido* (Verdade, 1997), se seleccionaron animales nacidos de diferentes nidos de la misma manera que en los demás experimentales.

4.2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL Y EXPOSICIÓN

Se realizaron 3 ensayos de exposición de neonatos (*EEN1*, *EEN2* y *EEN3*). La exposición a los diferentes plaguicidas se llevó a cabo en agua por inmersión. Los animales de cada grupo experimental fueron mantenidos, en bateas plásticas de 55 cm de largo por 35 cm de ancho y 27 cm de altura (0,20 m² de área de base). Las bateas se dispusieron de manera inclinada para proporcionar un 60% de agua y 40% de superficie seca, con un volumen fijo de 4 L (agua potable declorada) y una profundidad máxima de aproximadamente 15 cm (Fig. 4.1), ubicadas dentro de un ambiente calefaccionado (30 ± 1 °C). La temperatura de cada batea se registró mediante un almacenador de datos Hobbo Temp (Onset Computer Corporation, Pocasset, MA, USA), a fin de evitar cualquier fluctuación y que se desprenda del rango previamente estipulado. La incorporación de los compuestos al agua de las bateas se realizó en un volumen fijo de agua de 4 L.



Fig. 4.1: Exposición de neonatos por inmersión

Cada ensayo tuvo una duración de 60 días, definidos como sub-crónicos ya que no superaron los 90 días de exposición (Eaton y Klassen, 2005), con renovación de agua y soluciones cada 48 h, coincidiendo con el régimen de limpieza. Dicha duración se basó en el período de tiempo en el cual los neonatos podrían estar expuestos a los plaguicidas en la naturaleza, que va desde su nacimiento en febrero-marzo hasta fines de abril-mayo, momento hasta el que se extienden la mayor cantidad de fumigaciones.

Las formulaciones plaguicidas utilizadas en esta instancia fueron las mismas indicadas en el capítulo anterior para los ensayos de exposiciones embrionarias (*EEE*; Capítulo 2): (1) Roundup® Full II (RU; 66.2% p.a.), CAS No. 70901-12-1; (2) PanzerGold® (PANZ; 60.2% p.a.), CAS No. 1071-83-6; (3) Cipermetrina Atanor® (CIP; 25% p.a.), CAS No. 52315-07-8; (4) Endosulfán Galgofan® (END; 35% p.a.), CAS No. 115-29-7; y (5) Clorpirifos Lorsban 48E® (CPF; 48% p.a.), CAS No. 2921-88-2 (EXTOXNET, 1996).

Al igual que en los *EEE* (Capítulo 2), se utilizó etanol (C₂H₆O) como vehículo para las formulaciones de los insecticidas END, CIP y CPF, debido a la baja solubilidad de estos compuestos en agua, incluyéndose nuevamente para estas condiciones de experimentación, un control de vehículo (CV).

Para las formulaciones basadas en GLI, se utilizaron las concentraciones recomendadas para la aplicación del producto a campo en cultivos de soja, es decir, al 2% / ha y el doble de la misma, para evaluar la relación concentración-efecto. En el caso de las

formulaciones de insecticidas (CIP, END y CPF), la cantidad recomendada para su aplicación en cultivos no pudo utilizarse porque, al ser trasladadas a las bateas de bioensayo según área de base de la misma como área de aplicación, dieron concentraciones superiores a la dosis de referencia tóxica, por lo que se decidió aplicar concentraciones inferiores y equivalentes en los tres casos (0,5 y 1 µg/L), teniendo en cuenta la información disponible en otros estudios (CIP: Simoniello y col., 2009; END: Sharma y col., 2007; Shao y col., 2012; CPF: Widder y Bidwell, 2006; Vera Candiotti y col., 2013a).

Todas las concentraciones fueron aplicadas en función de la superficie de base de la batea (0,20 m²) y diluidas luego en un volumen de agua constante (4 L), como se ha descrito en trabajos anteriores para exposición de neonatos de *C. latirostris* (Latorre y col., 2013; 2016; López González y col., 2013; Siroski y col., 2016; Poletta y col., en prensa); y también se redujeron progresivamente en el tiempo durante los ensayos, con el fin de simular la degradación de los compuestos en el agua, previamente determinada por HPLC (del inglés *High Performance Liquid Chromatography*) en el caso de GLI o por Cromatografía gaseosa en el caso de los insecticidas como fue descrito por Poletta y col., (2011) y Siroski y col., (2016).

El alimento se suministró *ad libitum* tres veces a la semana, consistiendo en la misma mezcla húmeda descrita en 1.4. La limpieza de las bateas se intercaló con los días de alimentación. Al finalizar los experimentales se tomaron muestras de sangre periférica de cada neonato (volumen de 0,5 ml de sangre entera), por punción de la vena espinal (Myburgh y col., (2014)), como se detalló en el apartado 3.2.4. No se realizaron muestreos de sangre previos a la exposición para evitar cualquier daño a los neonatos, debido al riesgo que conlleva la técnica de extracción en animales de tan pequeño tamaño. Se registraron las siguientes variables: Recuento total y diferencial de glóbulos blancos, anticuerpos naturales y la actividad del sistema de complemento, siguiendo las metodologías descriptas anteriormente en el punto 2.4.

Asimismo, se realizó en una submuestra para la determinación de proteínas totales (PT) y un perfil proteico, orientado a determinar las distintas concentraciones proteicas presentes en el suero de cada animal y comparar los valores entre aquellos expuestos y los controles. También se registró para todos los ensayos: el crecimiento durante el ensayo en cada grupo experimental (LT, LHC y peso, valores finales – valores iniciales).

Se realizaron 3 ensayos consecutivos de exposición de neonatos por inmersión en diferentes años, en iguales condiciones, difiriendo particularmente en los compuestos testeados. En los *EEN1* y *EEN2* se evaluaron las formulaciones de GLI, CIP y END, con diferencias menores entre ellos, con el objetivo de comprobar los resultados obtenidos; mientras que en el *EEN3* se evaluó la formulación de CPF, los mismos se detallan a continuación.

4.2.2.1 ENSAYO DE EXPOSICIÓN DE NEONATOS 1 (*EEN1*)

Se evaluaron las dos formulaciones del herbicida GLI utilizadas para los *EEE*: RU y PANZ, además de las formulaciones de los insecticidas CIP y END.

Los individuos de 6 nidos (N=120) fueron distribuidos al azar en 10 grupos experimentales de 12 neonatos cada uno: un grupo control negativo (CN, sin exposición al contaminante, tratado con agua potable declorada), un grupo control vehículo (CV, tratado con etanol, 200 µl/L), 2 grupos tratados con END (END 1 y END2) y 2 con CIP (CIP1 y CIP2), utilizando en ambos casos etanol como vehículo; 2 grupos expuestos a la formulación de GLI RU (RU1 y RU2) y 2 grupos expuestos a la formulación GLI PANZ (PANZ1 y PANZ2) (Tabla 4.1).

4.2.2.2 ENSAYO DE EXPOSICIÓN DE NEONATOS 2 (*EEN2*)

Este ensayo consistió en la repetición del *EEN1*, bajo iguales condiciones que las descritas para ese ensayo salvo que la evaluación la formulación comercial PANZ, no fue incluida en este caso.

Los individuos provenientes de 6 nidos (N=96) fueron distribuidos al azar en 8 grupos experimentales de 12 neonatos cada uno: el CN, sin exposición al contaminante, tratado con agua potable declorada; CV, tratado con etanol 50 ul; 2 grupos expuestos a diferentes concentraciones de END (END1 y END2); 2 expuestos a CIP (CIP1 y CIP2), utilizando en ambos casos etanol como vehículo; y 2 grupos expuestos a la formulación GLI RU (RU1 y RU2) (Tabla 4.1).

4.2.2.3 ENSAYO DE EXPOSICIÓN DE NEONATOS 3 (*EEN3*)

Se evaluó el efecto de Clorpirifós (CPF; Lorsban® 48E). Se utilizaron 3 nidos (N=36) que fueron distribuidos al azar en 3 grupos experimentales de 12 neonatos cada uno: un CV

tratado con etanol 50 ul, y 2 grupos expuestos a distintas concentraciones de CPF (CPF1 y CPF2) (Tabla 4.1).

A continuación, se resume en una tabla los datos de todos los ensayos.

Tabla 4.1 Grupos experimentales y tratamientos aplicados en el *Ensayo de Exposición de Neonatos (EEN1, EEN2, EEN3)*.

Ensayo	N	Grupos experimentales	[µg/L] CIP	[µg/L] END	[µg/L] RU	[µg/L] PANZ	[µg/L] CPF
EEN1	120	10	CIP1:0,05-0,5 CIP2:0,1-1	END1:0,05-0,5 END2:0,1-1	RU1:2,5-0,25 RU2:5-0,5	PANZ1:2,5-0,25 PANZ2:5-0,5	---
EEN2	96	8	CIP1:0,05-0,5 CIP2:0,1-1	END1:0,05-0,5 END2:0,1-1	RU1:2,5-0,25 RU2:5-0,5	---	---
EEN3	36	3	---	---	---	---	CPF1:0,05-0,5 CPF2:0,1-1

EEN: Ensayo de Exposición de Neonatos; N: Número de individuos expuestos; CIP1 y CIP2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Cipermetrina Atanor®; END1 y END2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Endosulfan Galgofan®; RU1 y RU2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de glifosato Roundup Full II®; PANZ1 Y PANZ2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de glifosato PanzerGold®; CPF1 y CPF2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®.

4.2.2.4 PROTEINOGRAMA

Mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa, que permite la identificación de las bandas, cada una formada por la superposición de varias proteínas específicas con una movilidad electroforética semejante (Díaz Portillo y col., 1996). Las determinaciones para PT se realizaron con un refractómetro ATAGO, y para el proteinograma se utilizó un automatizador Hydrasys SEBIA; ambas llevadas a cabo en Laboratorio Integral de Determinaciones Bioquímicas (Santa Fe). Por tal motivo, se tomaron al azar submuestras, tanto para *EEN2* como para *EEN3*.

4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó utilizando el *software* SPSS 17.0 para Windows. Las diferencias entre réplicas de cada grupo experimental se analizaron mediante Test *t*.

Todas las variables se testearon en normalidad mediante el test de Kolmogorov- Smirnov y la homogeneidad de las varianzas entre los grupos se comprobó con el test de Levene.

Según se comprobaron o no los supuestos, se utilizaron test paramétricos (ANOVA y Dunnett o Tukey) o no paramétricos (Kruskal-Wallis y U-test Mann-Whitney) para comparar los diferentes grupos en función de las distintas variables analizadas.

El crecimiento para cada caso, se analizó mediante un ANOVA utilizando las diferencias de peso y longitud antes y después del experimento (medidas finales-medidas iniciales) como variable de respuesta a la exposición.

El valor de $p \leq 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo, excepto en los casos donde se aplicó la corrección de Bonferroni en la que el valor p depende del número de análisis de a pares realizado (informado en cada caso).

4.4 RESULTADOS

No se observaron diferencias entre las réplicas de los grupos experimentales para ninguna de las variables analizadas de cada uno de los ensayos ($p > 0,05$; *Test t*), de manera que todos los resultados se informan por grupo experimental (media \pm E.E.).

Para los ensayos en los que se utilizó CN y CV (*EEN1* y *EEN2*), no se observaron diferencias significativas entre ellos para ninguna de las variables analizadas, lo que demuestra que el etanol tampoco causa algún efecto en las crías de yacaré overo, a las concentraciones utilizadas para estos ensayos ($p > 0,05$). Por esta razón, en el *EEN3* sólo se utilizó el CV como control negativo del ensayo de evaluación de la formulación de CPF. Los resultados obtenidos en el *EEN1* demostraron diferencias significativas en el RTGB en los individuos expuestos a RU1 y RU2 ($p=0$), respecto al CN; y en los individuos expuestos a END2 ($p=0,004$), respecto al CV (Kruskal-Wallis/Mann-Whitney) (Fig. 4.2). En cuanto al RDGB, observamos diferencias para *Heterófilos*: individuos expuestos a CIP1 ($p=0$) y END1 ($p=0,001$) respecto al CV (ANOVA/Tukey); *Linfocitos*: individuos expuestos a RU1 ($p=0,029$), respecto al CN e individuos expuestos a CIP1 ($p=0$), CIP2 ($p=0,002$), END1 ($p=0$) y END2 ($p=0,007$), respecto al CV (Kruskal-Wallis/Mann-Whitney); *Monocitos*: individuos expuestos a RU1 ($p=0,025$) y RU2 ($p=0,011$), respecto al CN; e individuos expuestos a CIP1 ($p=0,002$) y END1 ($p=0$), respecto al CV (Kruskal-Wallis/Mann-Whitney); y *Eosinófilos*: individuos expuestos a PANZ2 ($p= 0,038$), respecto al CN e individuos expuestos a CIP2 ($p=0$) y END1 ($p=0,036$), respecto al CV (ANOVA/Tukey) (Fig. 4.3).

Para los AnC, encontramos diferencias entre los individuos expuestos a CIP2 ($p=0,003$) y END2 ($p=0,003$), respecto al CV (Kruskall-Wallis/Mann-Whitney; Fig. 4.4).

En cuanto al SC, no encontramos diferencias para ninguno de los grupos analizados.

Tabla 4.2 Resultados (Media \pm E.E.) de todos los parámetros inmunológicos analizados para los distintos grupos experimentales del *Ensayo de Exposición de Neonatos (EEN1)*.

Grupos Experimentales	RTGB/mm ³	Heterófilos (%)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Eosinófilos (%)	AnC	% MH
CN	22733,33 \pm 811,91	31,53 \pm 2,74	62,4 \pm 3,11	0,53 \pm 0,29	4,47 \pm 0,69	614,4 \pm 69,77	10,79 \pm 2,10
CV	24533,33 \pm 638,95	26,4 \pm 1,28	69,4 \pm 1,48	0,33 \pm 0,13	2,93 \pm 0,34	1245,87 \pm 501,45	20,88 \pm 6,8
CIP1	24642,86 \pm 2954,99	43,57 \pm 3,40#	50,29 \pm 3,48#	1,79 \pm 0,37#	3,43 \pm 0,44	731,43 \pm 84,25	22,87 \pm 7,26
CIP2	22466,67 \pm 1173,58	31,4 \pm 1,68	59,93 \pm 2,22#	1,27 \pm 0,34	6,33 \pm 0,77#	429,71 \pm 59,41#	11,75 \pm 2,06
END1	25285,71 \pm 1887,43	40,14 \pm 1,82#	51,36 \pm 1,95#	2,43 \pm 0,45#	5 \pm 0,67#	886,86 \pm 281,61	7,27 \pm 3,57
END2	20500 \pm 1333,73#	33,92 \pm 2,26	59,77 \pm 2,71#	1,08 \pm 0,31	4,23 \pm 0,9	393,85 \pm 87,51#	8,71 \pm 3,54
RU1	37366,67 \pm 1659,36*	24,13 \pm 1,28	70,13 \pm 1,12*	1,20 \pm 0,26*	3,6 \pm 0,81	600 \pm 127,31	22,51 \pm 4,9
RU2	31966,67 \pm 1805,06*	28,2 \pm 2,49	64,73 \pm 2,64	1,33 \pm 0,32*	5 \pm 0,57	469,33 \pm 52,5	19,14 \pm 4,7
PANZ1	25933,33 \pm 1521,17	24,27 \pm 2,3	71,6 \pm 2,44	0,27 \pm 0,12	2,93 \pm 0,48	460,8 \pm 70,44	26,92 \pm 7,5
PANZ2	20464,29 \pm 1158,42	28,15 \pm 2,85	67,92 \pm 2,90	0,23 \pm 0,12	2,69 \pm 0,67*	539,43 \pm 78,44	13,12 \pm 3,22

CN: Control negativo; CV: Control vehículo (etanol); CIP1 y CIP2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Cipermetrina Atanor®; END1 y END2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Endosulfán Galgofan®; RU1 y RU2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de glifosato Roundup Full II®; PANZ1 y PANZ2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de glifosato PanzerGold®. * $p < 0,05$ estadísticamente significativo respecto al CN. # $p < 0,05$ estadísticamente significativo respecto al CV.

RTGB: Recuento Total de Glóbulos. AnC: Anticuerpos naturales. %MH: Máxima Hemólisis.

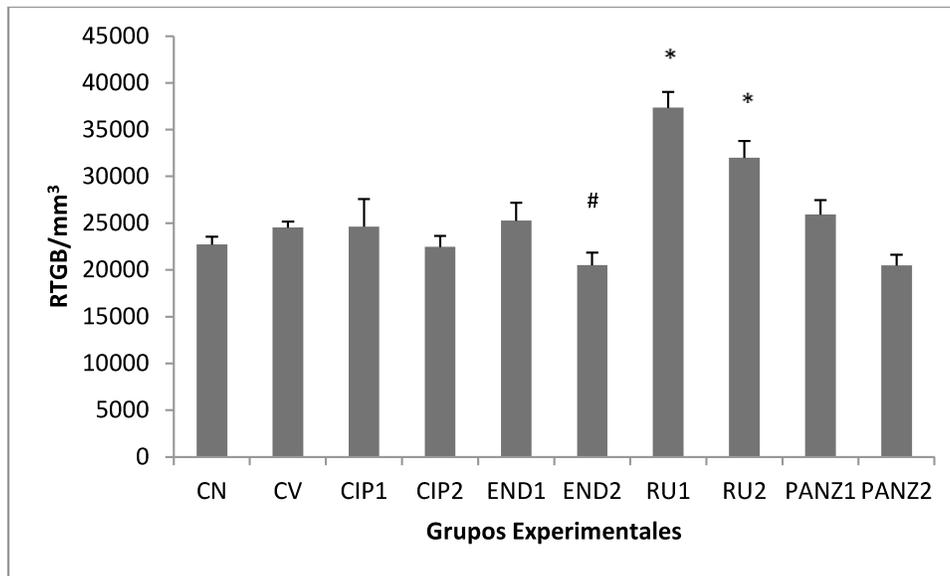


Fig. 4.2 Recuento total de glóbulos blancos (RTGB; Kruskal-Wallis/Mann Whitney), observados en neonatos de *C. latirostris* en los diferentes grupos experimentales del *Ensayo de Exposición de Neonatos 1 (ENN1)*. CN: Control negativo; CV: Control vehículo (etanol); CIP1 y CIP2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Cipermetrina Atanor®; END1 y END2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Endosulfán Galgofan®; RU1 y RU2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Glifosato Roundup Full II®; PANZ1 y PANZ2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Glifosato PanzerGold®. * $p < 0,05$ estadísticamente significativo respecto al CN; # $p < 0,05$ estadísticamente significativo respecto al CV.

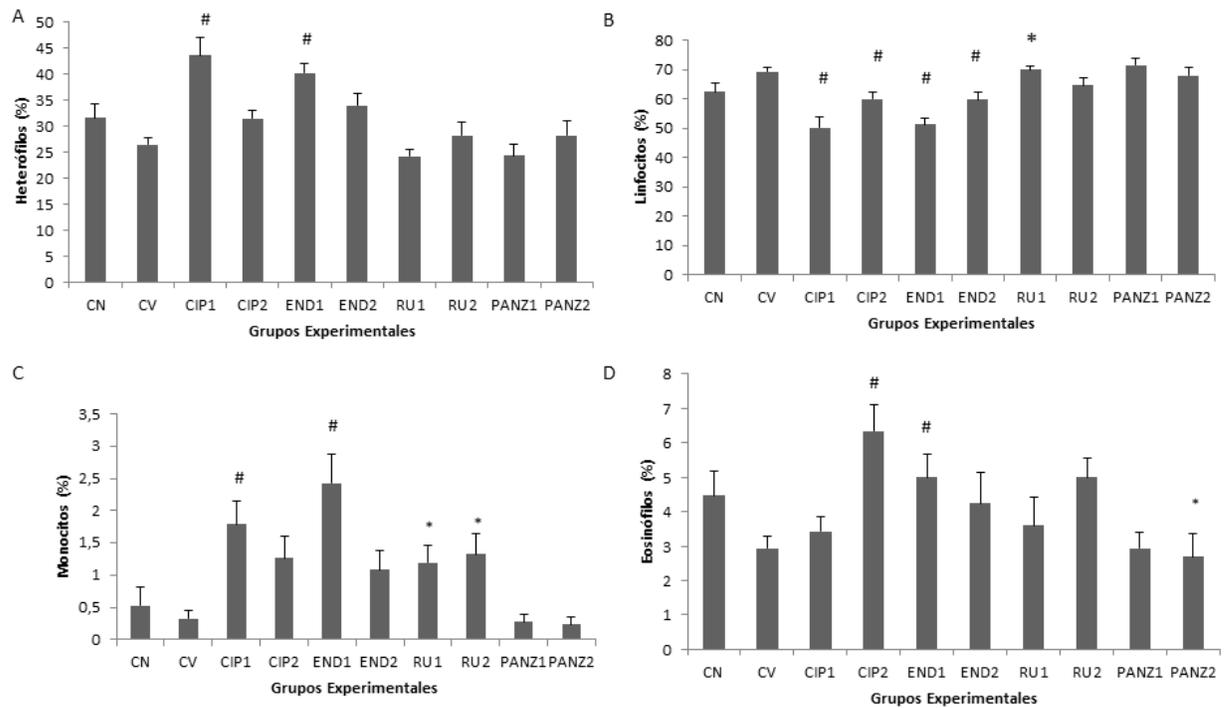


Fig. 4.3 A) Heterófilos (ANOVA/Tukey); B) Linfocitos (Kruskall-Wallis/Mann Whitney); C) Monocitos (Kruskall-Wallis/Mann Whitney); y D) Eosinófilos (ANOVA/Tukey), observados en neonatos de *C. latirostris* en los diferentes grupos experimentales del *Ensayo de Exposición de Neonatos 1 (ENN1)*. CN: Control negativo; CV: Control vehículo (etanol); CIP1 y CIP2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Cipermetrina Atanor®; END1 y END2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Endosulfán Galgofan®; RU1 y RU2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Glifosato Roundup Full II®; PANZ1 y PANZ2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Glifosato PanzerGold®. * $p < 0,05$ estadísticamente significativo respecto al CN; # $p < 0,05$ estadísticamente significativo respecto al CV.

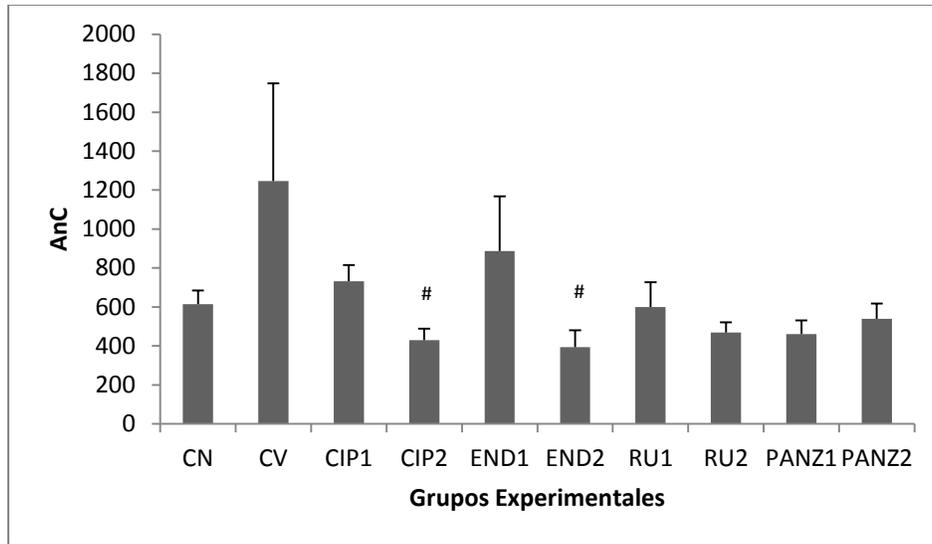


Fig 4.4 Anticuerpos Naturales (AnC, Kruskal-Wallis/Mann Whitney), observados en neonatos de *C. latirostris* en los diferentes grupos experimentales del *Ensayo de Exposición de Neonatos 1 (ENN1)*. CN: Control negativo; CV: Control vehículo (etanol); CIP1 y CIP2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Cipermetrina Atanor®; END1 y END2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Endosulfán Galgofan®; RU1 y RU2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Glifosato Roundup Full II®; PANZ1 y PANZ2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Glifosato PanzerGold®. # $p < 0,05$ estadísticamente significativo respecto al CV.

En *ENN2*, también encontramos diferencias en el RTGB en los individuos expuestos a RU1 y RU2 ($p=0$), respecto al CN; e individuos expuestos a END2 ($p=0,008$) y CIP2 ($p=0,044$), respecto al CV (ANOVA/Tukey) (Fig 4.5).

Para el RDGB solo hallamos diferencias en los *Monocitos*, entre los individuos expuestos a RU2 en comparación con el CN ($p=0,011$) (Kruskal-Wallis/Mann-Whitney) (Fig 4.5).

En AnC y SC, no encontramos diferencias entre los grupos analizados por tratamiento ($p > 0,05$).

Tabla 4.3 Resultados (Media \pm E.E.) de todos los parámetros inmunológicos analizados para los distintos grupos experimentales del *Ensayo de Exposición de Neonatos (EEN2)*.

Grupos Experimentales	RTGB/mm ³	Heterófilos (%)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Eosinófilos (%)	AnC	% MH
CN	35875 \pm 1687,89	28 \pm 3,08	62,25 \pm 2,87	0	9,25 \pm 1,44	1024 \pm 362,04	13,6 \pm 5,43
CV	32750 \pm 1831,42	23,5 \pm 3,4	67,5 \pm 3,93	0,25 \pm 0,25	7,75 \pm 1,11	352 \pm 96	14,72 \pm 12,58
CIP1	23125 \pm 1196,78	17,5 \pm 1,89	74,25 \pm 2,66	0,5 \pm 0,5	7 \pm 1,29	2336 \pm 1954,10	24,33 \pm 13,3
CIP2	22625 \pm 3144,94#	26,25 \pm 2,06	65 \pm 2,48	0	8 \pm 0,41	512 \pm 181,02	8,9 \pm 4,64
END1	24250 \pm 2005,20	18,25 \pm 2,87	71,25 \pm 1,89	0,5 \pm 0,5	9,5 \pm 1,94	320 \pm 64	40,27 \pm 20,38
END2	20375 \pm 2867,74#	20,75 \pm 1,44	70 \pm 2,41	0	8,25 \pm 2,06	384 \pm 73,9	33,95 \pm 5,09
RU1	16500 \pm 1099,24*	24 \pm 4,08	67,5 \pm 4,05	0,75 \pm 0,48	7 \pm 1,58	960 \pm 396,25	3,17 \pm 1,38
RU2	15750 \pm 2250*	24,25 \pm 1,11	69,75 \pm 1,65	1,25 \pm 0,25*	4 \pm 0,91	1152 \pm 517,31	14,85 \pm 8,23

CN: Control negativo; CV: Control vehículo (etanol); CIP1 y CIP2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Cipermetrina Atanor®; END1 y END2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Endosulfán Galgofan®; RU1 y RU2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de glifosato Roundup Full II®. * $p < 0,05$ estadísticamente significativo respecto al CN. # $p < 0,05$ estadísticamente significativo respecto al CV. RTGB: Recuento Total de Glóbulos. AnC: Anticuerpos naturales. %MH: Máxima Hemólisis.

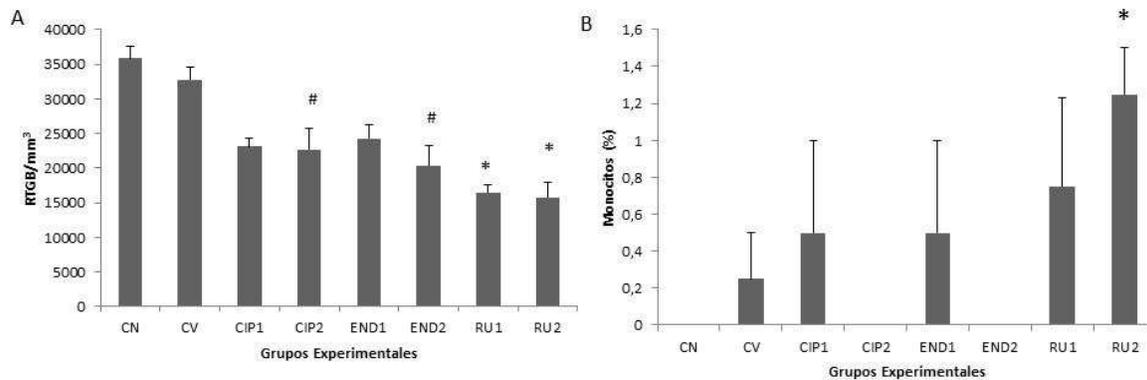


Fig 4.5 A) Recuento Total Glóbulos Blancos (RTGB, ANOVA/Tukey); B) Monocitos (Kruskall-Wallis/Mann Whitney) observados en neonatos de *C. latirostris* en los diferentes grupos experimentales del *Ensayo de Exposición de Neonatos 2 (EEN2)*. CN: Control negativo; CV: Control vehículo (etanol); CIP1 y CIP2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Cipermetrina Atanor®; END1 y END2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Endosulfán Galgofan®; RU1 y RU2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Glifosato Roundup Full II®. * $p < 0,05$ estadísticamente significativo respecto al CN, # $p < 0,05$ estadísticamente significativo respecto al CV.

En cuanto al análisis de las proteínas, sólo encontramos diferencias en las PT en los individuos expuestos a END1 ($p=0,017$), RU1 ($p=0,019$) y RU2 ($p=0,010$), con respecto al CN (ANOVA/Dunnet; Tabla 4.4; Fig 4.6).

Tabla 4.4 Valores de proteínas totales (PT) y proteinograma para ensayo *EEN2* (media \pm EE) para los diferentes grupos experimentales. (*) Diferencia estadísticamente significativa respecto del CN.

Grupos experimentales	PT (g/dl)	[Albúmina]	[Alfa 1]	[Alfa 2]	[Beta1]	[Beta2]	[Gamma]
CN	2,13 \pm 0,52	24,9 \pm 1,20	2,37 \pm 0,09	22,13 \pm 3,09	17,93 \pm 1,42	12,97 \pm 1,43	19,33 \pm 1,96
CIP1	2,13 \pm 0,13	21,37 \pm 0,75	3,27 \pm 0,46	42 \pm 5,71	11,83 \pm 1,76	10,4 \pm 1,25	11,13 \pm 2
CIP2	3,47 \pm 0,59	23,53 \pm 0,54	1,93 \pm 0,81	29,03 \pm 9,45	18,43 \pm 4,76	10,23 \pm 2,69	16,83 \pm 6,2
END1	3,83 \pm 0,12*	23,13 \pm 0,81	2,47 \pm 0,20	27,93 \pm 6,53	18,77 \pm 2,04	11,2 \pm 1,7	16,5 \pm 2,32
END2	3,47 \pm 0,35	23,4 \pm 1,22	2,07 \pm 0,24	36,33 \pm 9,93	12,07 \pm 3,76	11,5 \pm 1,07	14,63 \pm 5,47
RU1	3,8 \pm 0,11*	23,83 \pm 0,65	2,47 \pm 0,24	36,73 \pm 4,53	9,27 \pm 1,03	10,67 \pm 1,63	17,03 \pm 3,91
RU2	3,8 \pm 0,2*	21,85 \pm 2,35	2,3 \pm 0,4	36,45 \pm 4,25	19,3 \pm 5,6	9,9 \pm 2	10,2 \pm 0,6

PT: Proteínas Totales (g/dl); CN: Control Negativo; CIP1 y CIP2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Cipermetrina Atanor®; END1 y END2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Endosulfán Galgofan®; RU1 y RU2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de glifosato Roundup Full II.* $p < 0,05$ estadísticamente significativo respecto al CN.

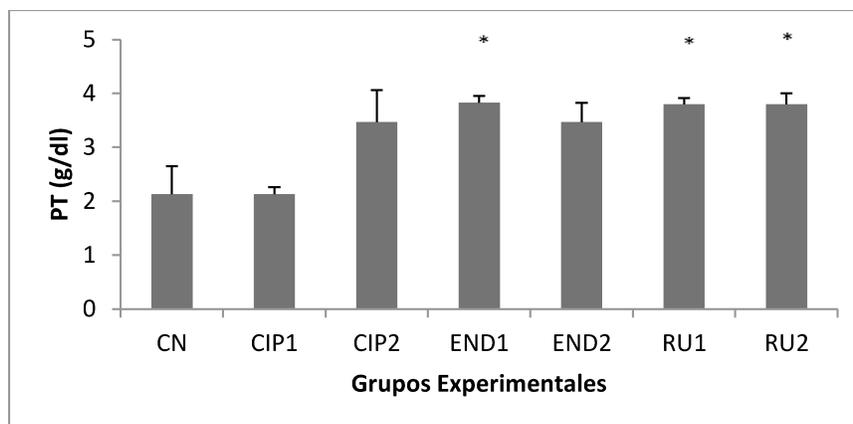


Fig 4.6 PT (Proteínas Totales; ANOVA/Dunnet) en neonatos de *C. latirostris* en los diferentes grupos experimentales del *Ensayo de Exposición de Neonatos 2 (ENN2)*. CN: Control negativo; CV: Control vehículo (etanol); CIP1 y CIP2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Cipermetrina Atanor®; END1 y END2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Endosulfán Galgofan®; RU1 y RU2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Glifosato Roundup Full II®. * $p < 0,05$ estadísticamente significativo respecto al CN.

De la misma manera, en *EEN3* también encontramos diferencias en el RTGB en los individuos expuestos a CPF1 y CPF2 ($p=0,009$), con respecto al CV (ANOVA/Dunnet) (Fig 4.7). En cambio, para el RDGB, AnC y SC, no hubo diferencias entre los grupos analizados por tratamiento ($p > 0,05$; Tabla 4.5).

Tabla 4.5 Resultados (Media \pm E.E.) de todos los parámetros inmunológicos analizados para los distintos grupos experimentales del *Ensayo de Exposición de Neonatos (EEN3)*.

Grupos Experimentales	RTGB/mm ³	Heterófilos (%)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Eosinófilos (%)	AnC	% MH
CV	9187,5 \pm 566,45	16,13 \pm 3,31	80 \pm 3,64	1,13 \pm 0,35	1,88 \pm 0,4	99876,57 \pm 72927,86	27,58 \pm 7
CPF1	6944,44 \pm 367,46#	16,33 \pm 2,49	79,78 \pm 2,56	0,56 \pm 0,18	2,67 \pm 0,58	14951,20 \pm 12923,05	42,28 \pm 7,6
CPF2	6944,44 \pm 467,29#	19,22 \pm 1,74	77,33 \pm 1,6	0,44 \pm 0,18	2,11 \pm 0,31	17921,78 \pm 14256,77	28,13 \pm 10,91

CV: Control vehículo (etanol); CPF1y CPF2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Clorpirifós Lorsban®. # $p < 0,05$ estadísticamente significativo respecto al CV. RTGB: Recuento Total de Glóbulos. AnC: Anticuerpos naturales. %MH: Máxima Hemólisis.

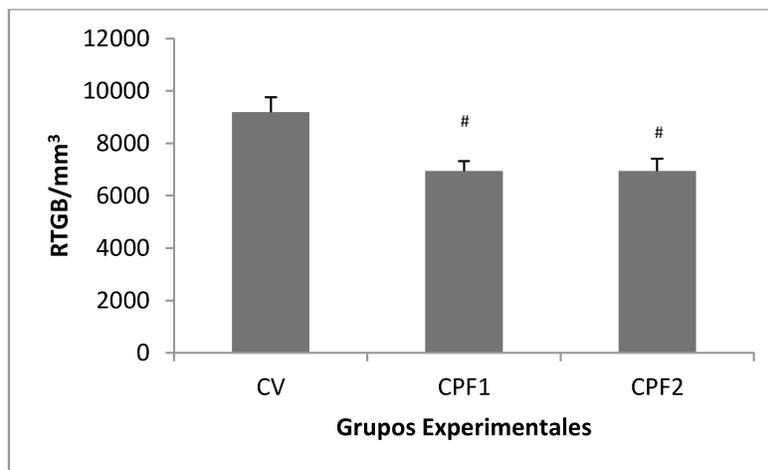


Fig 4.7 Recuento Total Glóbulos Blancos (RTGB, ANOVA/Dunnet) observados en neonatos de *C. latirostris* en los diferentes grupos experimentales del *Ensayo de Exposición de Neonatos 3 (ENN3)*. CV: Control vehículo (etanol); CPF1 y CPF2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Clorpirifós Lorsban 48E®. # $p < 0,05$ estadísticamente significativo respecto al CV.

En cuanto a las proteínas, solo se observaron diferencias en la fracción proteica gamma, entre el CN y CPF1, CPF2 ($p \leq 0,05$, Kruskal-Wallis/Mann-Whitney; Fig 4.8).

Tabla 4.6 Valores de proteínas totales (PT) y proteinograma para ensayo *EEN3* (media \pm EE) para los diferentes grupos experimentales. (*) Diferencia estadísticamente significativa respecto del CN.

Grupos experimentales	PT (g/dl)	[Albúmina]	[Alfa 1]	[Alfa 2]	[Beta1]	[Beta2]	[Gamma]
CN	2,13 \pm 0,52	24,9 \pm 1,20	2,37 \pm 0,09	22,13 \pm 3,09	17,93 \pm 1,42	12,97 \pm 1,43	19,33 \pm 1,96
CPF1	3 \pm 0,3	25,9 \pm 0,93	3,87 \pm 0,93	24,6 \pm 4,41	20,7 \pm 5,13	16,03 \pm 0,96	8,9 \pm 0,43*
CPF2	3,5 \pm 0,32	26 \pm 1,37	3,57 \pm 0,55	18,77 \pm 0,9	24,13 \pm 1,82	17,43 \pm 1,02	10,1 \pm 0,38*

PT: Proteínas Totales (g/dl); CN: Control Negativo; CPF1 y CPF2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®. * $p \leq 0,05$ estadísticamente significativo respecto al CN.

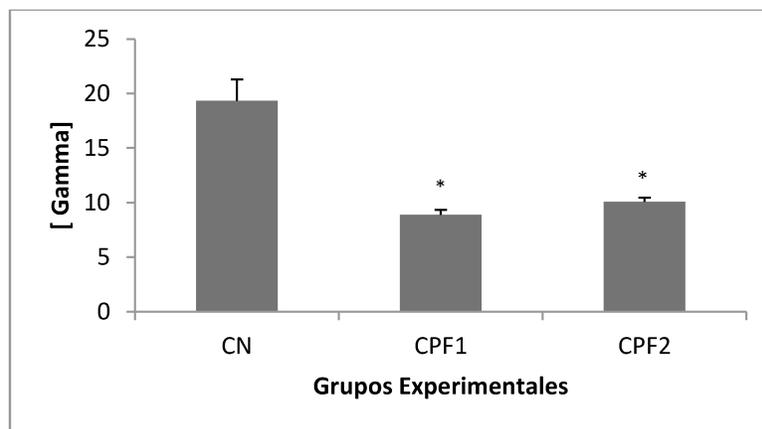


Fig 4.8 Concentración de la fracción proteica Gamma ([Gamma], Kruskal-Wallis/Mann-Whitney) en neonatos de *C. latirostris* en los diferentes grupos experimentales del *Ensayo de Exposición de Neonatos 3 (ENN3)*. CN: Control Negativo; CPF1 y CPF2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®. * $p \leq 0,05$ estadísticamente significativo respecto al CN.

En cuanto a los resultados sobre el "efecto nido" que se examinaron para todas las variables observadas, no se encontraron diferencias en ninguno de los grupos analizados.

El análisis de los parámetros de crecimiento en *EEN1* mostró una disminución de la talla corporal para las variables de LT y peso en los individuos expuestos a PANZ1 ($p < 0,05$), respecto al CN y en PANZ2 hubo una tendencia similar aunque no llegó a ser significativa

($p=0,063$ en LT y $p=0,05$ en peso). Por el contrario, en los individuos expuestos a END1 se observó un incremento significativo tanto del peso ($p < 0,05$) como de la LHC ($p < 0,01$), en comparación con el CV (Test de Kruskal-Wallis / Mann-Whitney para todos los casos) (Tabla 4.7).

Tabla 4.7 Parámetros de crecimiento (media \pm E.E.) evaluados en *C. latirostris* en los distintos grupos de experimentación del *Ensayo de exposición de Neonatos 1 (EEN1)*.

Grupos Experimentales	LT (cm)	LHC (cm)	Peso (g)
CN	7,25 \pm 0,66	3,62 \pm 0,39	79,58 \pm 13,64
CV	7,05 \pm 0,52	3,28 \pm 0,23	71,50 \pm 6,85
CIP1	5,56 \pm 0,86	2,99 \pm 0,42	56,40 \pm 7,05
CIP2	6,21 \pm 1,14	3,24 \pm 0,55	70,85 \pm 15,47
END1	8,25 \pm 0,50	4,33 \pm 0,29###	93,17 \pm 7,17#
END2	7,99 \pm 0,53	3,99 \pm 0,31	84,72 \pm 9,85
RU1	6,76 \pm 0,64	3,63 \pm 0,23	82,55 \pm 7,08
RU2	5,42 \pm 0,86	3,17 \pm 0,35	65,39 \pm 10,51
PANZ1	4,58 \pm 0,91*	2,86 \pm 0,31	50,51 \pm 8,20*
PANZ2	5,44 \pm 0,55	2,86 \pm 0,28	53,75 \pm 8,12

CN: Control negativo; CV: Control vehículo (etanol); CIP1 y CIP2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de Cipermetrina Atanor®; END1 y END2: grupos expuestos a las concentraciones de Endosulfán Galgofan®; RU1 y RU2: grupos expuestos a las diferentes concentraciones de Roundup Full II®; PANZ1 y PANZ2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de PanzerGold®. LT: longitud total LHC: longitud hocico cloaca cm: centímetros g: gramos *: $p < 0,05$ / **: $p < 0,01$; estadísticamente significativo respecto al CN. #: $p < 0,05$ / ###: $p < 0,01$; estadísticamente significativo respecto al CV (Test Kruskal-Wallis / Mann-Whitney).

En el *EEN2*, no hubo diferencias en el crecimiento entre los diferentes grupos experimentales ($p > 0,05$; Tabla 4.8). Se encontraron diferencias entre nidos solamente en la LT ($p < 0,01$; ANOVA/Tukey), pero no en las demás variables de crecimiento.

Tabla 4.8 Parámetros de crecimiento (media \pm E.E.) evaluados en *C. latirostris* en los distintos grupos de experimentación del *Ensayo de exposición de Neonatos 2 (EEN2)*.

Grupos Experimentales	LT (cm)	LHC (cm)	Peso (g)
CN	5,3 \pm 1,48	2,43 \pm 0,87	44 \pm 19,08
CV	6,78 \pm 1,66	3,32 \pm 0,93	71,5 \pm 24,92
CIP1	1 \pm 3,75	11,95 \pm 8,25	49,5 \pm 13,5
CIP2	2,33 \pm 2,52	2,5 \pm 0,69	37 \pm 19,26

END1	5,10 ± 2,51	3,88 ± 0,37	78,75 ± 7,34
END2	7,85 ± 0,95	4,03 ± 0,44	88,5 ± 15,59
RU1	6,56 ± 1,14	3,34 ± 0,62	76,8 ± 21,92
RU2	3,96 ± 1,96	1,84 ± 0,61	29,8 ± 20,08

CN: Control negativo; CV: Control vehículo (etanol); CIP1 y CIP2: grupos expuestos a diferentes concentraciones de la formulación de Cipermetrina Atanor®; END1 y END2: grupos expuestos a las concentraciones de la formulación de Endosulfán Galgofan®; RU1 y RU2: grupos expuestos a las diferentes concentraciones de la formulación de Glifosato Roundup Full II®. LT: longitud total LHC: longitud hocico cloaca cm: centímetros g: gramos.

En *EEN3* no se encontraron diferencias en el crecimiento entre los grupos de experimentación (Tabla 4.9); pero sí entre los nidos: LT y LHC ($p < 0,05$; ANOVA/Tukey) y peso (Test Kruskal-Wallis /-Whitney aplicando la corrección de Bonferroni, $p \leq 0,016$).

Tabla 4.9 Parámetros de Crecimiento (media ± E.E.) evaluados en *C. latirostris* en los grupos de experimentación del *Ensayo de exposición de Neonatos 3 (EEN3)*.

Grupos Experimentales	LT (cm)	LHC (cm)	Peso (g)
CV	12,24 ± 1,04	6,23 ± 0,71	125,43 ± 16,77
CPF1	11,69 ± 0,67	5,61 ± 0,36	114 ± 11,11
CPF2	11,33 ± 0,67	5,49 ± 0,3	115,58 ± 10,36

CV: Control vehículo (etanol); CPF1 y CPF2: grupos expuestos a las concentraciones de la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®. LT: longitud total. LHC: longitud hocico cloaca. cm: centímetros. g: gramos.

4.5 DISCUSIÓN

En el presente capítulo, se observó que las formulaciones comerciales de plaguicidas pueden provocar alteraciones en algunos parámetros inmunológicos en neonatos de *C. latirostris*, en condiciones controladas de exposición.

Como mencionamos anteriormente en los Capítulos 1 y 2, los parámetros hematológicos tradicionales pueden proveer información sobre el estrés general y el estado de salud de un individuo y la relación con diferentes enfermedades (Aguirre y col., 1995; Work y col., 2001; Knotek y col., 2002).

En cuanto al RTGB, en el primer ensayo (*EEN1*), pudimos ver efectos para ambas formulaciones testeadas de RU, en las cuales se produjo un aumento significativo en

comparación con el CN; sin embargo, en la repetición del ensayo (*EEN2*) observamos una disminución significativa en algunos grupos con respecto a los controles. En *EEN3*, se demostró que el CPF provocó disminuciones con respecto al CN.

Nuestros resultados coinciden con numerosos trabajos en diferentes especies, donde se observa el efecto de los distintos plaguicidas sobre parámetros inmunológicos: RU (Glusckaz y col., 2006; Modesto y Martinez, 2010; Salbergo y col., 2010; Latorre y col., 2013); CIP (Dorucu y Girgin, 2001; Atamanalp y col., 2002; Velisek y col., 2006; Parma y col., 2007; Latorre y col., 2016); END (Hii y col., 2007; Bachetta y col., 2011; Latorre y col., 2016), y CPF (Ramesh y Saravanan, 2008; Yonar y col., 2012; Ural, 2013). Sin embargo, en cuanto al RTGB entre *EEN1* y *EEN2*, existe una diferencia importante ya que en *EEN1* los valores aumentan significativamente con respecto al CN y en *EEN2*, ocurre lo contrario. El aumento encontrado en el RTGB en *EEN1*, podría ser una respuesta del organismo como resultado de la activación del sistema inmune por la presencia de contaminantes, que da como resultado una defensa inmunitaria más efectiva (Barreto-Medeiros y col., 2005). Bachetta y col., (2011), observaron un aumento significativo en el RTGB a la concentración más alta de END en *Prochilodus lineatus*; estos autores postulan que la leucocitosis reportada, puede ser atribuida a una mayor movilización de leucocitos para proteger el cuerpo contra posibles infecciones en los tejidos dañados por el insecticida. Otros autores argumentan que un incremento en el RTGB expuestos a insecticidas refleja un estado general de toxicosis, que deriva en un deterioro de los mecanismos de defensa (Dutta y col., 1992; Ramesh y Saravanan, 2008).

La disminución de los valores en *EEN2*, concuerdan además con otros trabajos en los que usan diferentes insecticidas a los empleados en esta tesis; por ejemplo, Mahananda y Mohanty, (2012); observaron una reducción en el RTGB en *Bufo melanostictus*, luego de una exposición de 24, 48 y 72 hs a Malatión. Estos autores atribuyen este cambio del RTGB al estrés. Soltanian y col., (2018), demostraron que la exposición a Diazinón indujo una disminución en el RTGB en *Mauremys caspica caspica*. Hii y col., (2007), sugieren que la disminución de los parámetros sanguíneos puede deberse al efecto disruptivo del END sobre las membranas y a la viabilidad celular; por lo cual, podríamos asumir un efecto coincidente en nuestros estudios para CIP, RU y CPF.

En cuanto al RDGB, para *EEN1* encontramos diferencias entre los controles y las diferentes clases de leucocitos:

-*Heterófilos*: se observa un aumento significativo con respecto al CV. Estos datos concuerdan con trabajos anteriores para la misma especie, luego de una exposición a RU y CIP (Latorre y col., 2013, 2016). Debido a que la función primaria de los heterófilos es la fagocitosis, los aumentos significativos en el recuento de heterófilos de los reptiles se asocian generalmente con una respuesta inflamatoria, especialmente infecciones microbianas y parasitarias, o lesión de tejido. Las condiciones no inflamatorias que pueden resultar en heterofilia, incluyen estrés (exceso de glucocorticoides), neoplasia y leucemia heterofílica (Campbell, 2006).

-*Linfocitos*: se observa una disminución significativa con respecto al CV. Estos datos concuerdan con otros trabajos donde se observa el mismo efecto (Velisek y col., 2006; Bachetta y col., 2011; Latorre y col., 2016). La disminución de linfocitos se produce de forma secundaria a la presencia de enfermedades asociadas con la inmunosupresión, el estrés y la malnutrición crónica (Strik y col., 2007).

-*Monocitos*: se observa un aumento significativo en relación al CV. Lo mismo ocurrió en *EEN2*, pero con respecto al CN. Estos datos concuerdan con otros trabajos publicados (Velisek y col., 2006; Bachetta y col., 2011; Latorre y col., 2016). El porcentaje de monocitos en reptiles, aumenta durante la estimulación antigénica crónica, la inflamación crónica y las enfermedades bacterianas o parasitarias (Gregory y col., 2004).

Un hecho muy importante, es el de los recuentos de heterofilos en *EEN1*, los efectos observados ocurrieron a las concentraciones más bajas tanto en CIP y END. Creemos que una posible justificación a la falta de efectos significativos en las concentraciones más altas utilizadas, podría ser la aparición de una tolerancia diferencial o la existencia de un umbral para inducir una respuesta. La tolerancia a los insecticidas se describe casi exclusivamente como un rasgo constitutivo que surge de una microevolución de susceptibilidad disminuida en el tiempo (Feyereisen, 1995; Lopes y col., 2008).

Sin embargo, la teoría de la plasticidad predice que las poblaciones que experimentan condiciones ambientales variables deben mantener la capacidad de inducir fenotipos adaptativos en respuesta a ambientes cambiantes (Schlichting y Pigliucci, 1998). En este escenario, la exposición a niveles de insecticidas subletales puede inducir una mayor tolerancia a una concentración letal del mismo plaguicida en el futuro, de modo que concentraciones más altas podrían inducir un comienzo de tolerancia más rápido que las concentraciones más bajas (Hua y col., 2013). Con respecto a la explicación de umbral, en relación a la escasez de efectos observados, es evidente que no se había alcanzado

un umbral tóxico para el desarrollo de ninguna respuesta. Claramente, por encima de este nivel, la magnitud de esas respuestas estaría probablemente relacionada con una mayor concentración de plaguicidas. Incluso, es igualmente probable que el uso de tales dosis ("más altas") genere una mayor mortalidad del hospedero. Por lo tanto, existe la posibilidad de que sea justo que estos agentes no tengan realmente un efecto "tóxico" en los puntos estudiados. Además, deben tenerse en cuenta otros factores como la variabilidad de los datos experimentales y la variación interindividual en la respuesta entre los individuos expuestos a una misma formulación de plaguicidas.

En cuanto a AnC y SC, son escasos los trabajos realizados en relación a la función de dichos parámetros frente a la exposición de compuestos químicos considerados contaminantes. Con respecto a los AnC, solo obtuvimos diferencias en el *EEN1*, lo que implicó una disminución significativa en algunos animales expuestos en relación al CV. Nuestros resultados coinciden con los de Plumb y Areechon, (1990); que expusieron peces (*Edwardsiella ictaluri*) a 0,5 y 1,75 mg/L de malatión, observando que los títulos de aglutinación en los peces expuestos a la mayor concentración fueron significativamente menor que el control y que los expuestos a 0,5 mg/L. Blakley, (1997); observó que luego de exponer ratones a Tordon 202C (ácido 2,4-diclorofenoxiacético [2,4-D] y picloram) y a Roundup (glifosato) en agua potable, la producción de anticuerpos no fue afectada por la dosificación de Roundup, lo que sugiere que Roundup es poco probable que cause disfunción inmune en condiciones normales de aplicación. Por el contrario, todos los niveles de exposición a Tordon 202C redujeron la producción de anticuerpos en un 45%. Studnicka y col., (2000); encontraron que la inyección intraperitoneal de lindano en carpa común (*Cyprinus carpio*), después de la inmunización con bacteria de *Yersinia ruckeri* y estimuladas con lisozima dimerizada, disminuyó los niveles de anticuerpos en plasma y de células productoras de anticuerpos. Aly y El Gendi, (2000); determinaron el efecto de una sola dosis oral de dimetoato en ratones hembra después de diferentes intervalos de tiempo, observando que el total de anticuerpos y de IgM disminuyeron significativamente en ratones tratados en comparación con el control. Ellos argumentan que es posible que la inhibición de la producción de anticuerpos (inmunidad humoral) en las células de bazo tratadas resulte de la generación de células T supresoras inespecíficas (Dorf y Benacerraf, 1984).

Esta disminución significativa de los anticuerpos en los animales expuestos, podría deberse al estrés causado por la exposición a los plaguicidas. En roedores, como la rata y el ratón, se ha descrito que el estrés crónico ejerce efectos adversos sobre la producción de anticuerpos contra virus inoculados previamente o durante la exposición del organismo al estrés (Ader y Cohen, 1993). La respuesta humoral del sistema inmune ante agentes extraños al organismo también está sujeta a las influencias moduladoras del estrés. Las alteraciones inmunológicas subsecuentes a la exposición del organismo al estrés tienen importantes repercusiones sobre el estado de salud en los animales experimentales (Gómez González y Escobar, 2006).

Se sabe que los reptiles tienen respuestas humorales primarias muy lentas, que se desarrollan en cuatro a seis semanas en lugar de los cuatro a seis días típicos de las respuestas de los mamíferos (Zimmerman y col., 2010).

Las proteínas plasmáticas ayudan a mantener el volumen del fluido en circulación y ayudan en la inactivación de compuestos tóxicos y defensa de nuevos patógenos. La alteración en los niveles de proteína total se producen durante condiciones patológicas, incluyendo la exposición a agentes xenobióticos. Como tal, la determinación de las proteínas totales (niveles y perfiles) se utilizan como un punto final de la salud general de un organismo (Poletta y col., 2013).

Los resultados del proteinograma revelaron para *EEN2*, que la concentración de proteínas totales fue significativamente mayor en END1, RU1 y RU2 comparado con el CN. Estos resultados coinciden con un trabajo previo para la misma especie y en las mismas condiciones, en el cual se observa un aumento significativo de PT en los animales expuestos a la más baja concentración de RU comparado con el CN (Latorre y col., 2013). Además este aumento de las PT concuerdan con otros trabajos, aunque en ellos no fue significativo (Atamanalp y col., 2002; Velisek y col., 2006 y Bachetta, 2013). Cuando el valor de las proteínas totales esta aumentado (hiperproteinemia) se asocia a deshidratación o a una elevación de la fracción globulínica, debida a enfermedad inflamatoria crónica. Bajo condiciones de anestesia, y debido a la deshidratación y redistribución de fluidos pueden observarse variaciones en las proteínas plasmáticas (Knotkova y col., 2006). El análisis de las fracciones proteicas reveló para *EEN3*, que la concentración de la fracción gamma, fue significativamente menor en CPF1 y CPF2 con respecto al CN. Esta fracción contiene a las inmunoglobulinas, por lo que una

concentración baja de todas las inmunoglobulinas podría provocar una deficiencia en la respuesta adquirida y un aumento del riesgo de infección.

La correcta interpretación de los fenómenos fisiológicos de los reptiles, así como el diagnóstico apropiado de la enfermedad y el control nutricional, requieren un conocimiento profundo de las proteínas séricas, ya que son responsables de importantes funciones como transporte, nutrición, coagulación, inmunidad, control enzimático, viscosidad interna del medio ambiente y mantenimiento de la presión coloidosmótica (Hoar, 1983; Kalinov, 1984; Coppo, 2001).

Los parámetros del crecimiento de los neonatos expuestos sólo se vieron afectados en el *EEN1* a las menores concentraciones de las formulaciones de PANZ y END, pero no en los demás grupos ni ensayos. En el caso del END observamos que los animales de ese grupo sufrieron un aumento significativo de peso y LHC en comparación con el CV. Esto podría deberse a que el END es un potente disruptor endócrino que puede tener un efecto obesogénico. Se considera que estos compuestos están muy relacionados con el metabolismo e interfieren en la función hormonal en las etapas tempranas del desarrollo, asociadas en gran parte a la homeostasis del peso. La alteración endocrina en las primeras etapas de la vida parece ser un mecanismo plausible a una predisposición de sobrepeso posterior en función del efecto causado por los compuestos obesógenos durante el período prenatal o postnatal temprano (de Cook y van de Bor, 2014). Algunos autores sugieren que la exposición temprana a estos tóxicos puede tener efectos diferentes en comparación con la edad adulta, ya que las perturbaciones durante las etapas de plasticidad del desarrollo pueden dar lugar a efectos más profundos (Newbold, 2010). Esto podría explicar el por qué los animales de *EEN1* luego de la exposición a END, aumentaron de talla. Existe un estudio previo en la especie y para yacaré negro, en el cual reportan un aumento de masa en el cuerpo graso luego de exposición natural a compuestos orgánicos persistentes (COP's) y bajo condiciones controladas de laboratorio (Canesini y col., 2013).

En los individuos expuestos a PANZ, el efecto fue inverso, hubo menor crecimiento en LT y peso en relación al CN. Esta disminución podría estar relacionada a las alteraciones producidas por el herbicida sobre los procesos metabólicos de detoxificación que implicaría además un mayor gasto energético. Poletta y col. (2011) observaron que con la formulación de RU de manera independiente, y en mezcla con CIP y END, alteraciones de la actividad enzimático-metabólica y efectos en el crecimiento a los caimanes a los 3

meses de edad luego de la exposición *in ovo* de manera semi-natural a estos compuestos. Ese consumo energético adicional, les implicaría a los organismos utilizar sus reservas nutricionales produciendo un descenso en el crecimiento.

Debemos tener en cuenta que el período en el cual fueron expuestos los animales fue solo de 2 meses, lo cual podría ser un tiempo relativamente corto, para que se visualicen alteraciones en el crecimiento. Sin embargo, en la naturaleza, estos animales reciben exposiciones repetidas durante el primer año de vida, ya que las mismas se realizan varias veces durante el año y con diversos compuestos dependiendo de la existencia de rotaciones de cultivo y la siembra de la soja de primera o segunda, sumado a la falta de disponibilidad de alimento en esos ambientes ampliamente fragmentados.

Como mencionamos anteriormente, los primeros meses de vida son cruciales para el desarrollo en los reptiles, ya que presentan la mayor tasa de crecimiento y cualquier alteración sobre los procesos bioenergéticos subyacentes provocarían una reducción en la tasa de crecimiento normal. Estos procesos pueden modificarse por contaminantes, dependiendo de las concentraciones y el tiempo de exposición, siendo en muchos casos no evidentes en forma inmediata (Mitchelmore y col., 2005; Amaral y col., 2012b).

En cuanto al "efecto nido", resultó ser evidente para los parámetros de crecimiento. Como mencionamos en el capítulo anterior, se sabe que los animales que provienen de nidos distintos crecen a tasas diferentes durante el primer año de vida, generando variabilidad de respuestas (Verdade, 1997).

La aplicación y resultados de estos ensayos, nos permitieron obtener más información y conocimiento sobre la evaluación de los plaguicidas y sus mecanismos a nivel inmunológico en la especie; complementando y ampliando el conocimiento existente sobre los efectos de los plaguicidas en diferentes parámetros, tanto en crías como en embriones.

CAPÍTULO 5

CAPÍTULO 5.

Ensayos de exposición a mezclas complejas de formulaciones comerciales de plaguicidas en *Caiman latirostris* (*In ovo* e *In vivo*).

5.1 INTRODUCCIÓN

Los plaguicidas se comercializan como formulaciones que contienen aditivos, tales como vehículos, emulsionantes, tensioactivos o adyuvantes que se agregan al ingrediente activo para mejorar las propiedades físicas y químicas y facilitar la penetración al organismo blanco (Krogh y col., 2003). Para ahorrar tiempo y recursos, y debido a que las plagas pueden aparecer en los cultivos en forma simultánea; en un mismo tanque de aplicación se mezclan varios pesticidas con distintos principios activos, aditivos y para distintos organismos blanco, cuando las formulaciones están diseñadas para ser usadas individualmente disueltas en agua. En estas mezclas se desestiman las posibles interacciones no sólo entre los principios activos, sino también entre los aditivos de las distintas formulaciones (Coalova y col., 2013). De esta manera, es posible que las mezclas de pesticidas puedan producir efectos aditivos o sinérgicos, o incluso producir antagonismo (Lydy y col., 2004). Del mismo modo, los efectos que muchas veces pueden ser despreciables cuando se consideran los compuestos por separado, se convierten en significativos cuando los mismos se integran en mezclas complejas (Pimentel y col., 1998).

En los últimos años se ha incrementado el estudio sobre las evaluaciones de mezclas complejas, de herbicidas y/o insecticidas, reportando diferentes efectos en distintos organismos (Liu y col., 2006; Relyea, 2009; Uggini y col., 2010; Poletta y col., 2011; Ciliberti y col., 2013; Brodeur y col., 2014; Bonifacio y col., 2016; Soloneski y col., 2016; Svartz y col., 2016).

En lo que respecta a *C. latirostris*, se ha demostrado que una mezcla compleja compuesta por END, CIP, y GLI, con las mismas formulaciones utilizadas en este trabajo, provocó efectos genotóxicos, así como alteraciones metabólicas y enzimáticas en neonatos, luego de la exposición de los nidos por fumigación, en condiciones seminaturales (*in ovo*) (Poletta y col., 2011). Debido a que esta es la única referencia de evaluación de mezclas de plaguicidas en esta especie, se propuso realizar ensayos de exposición a mezclas complejas de formulaciones (M) en las mismas condiciones que las evaluaciones de los compuestos por separado, previamente realizadas en los *EEE* y *EEN*, descritas en los capítulos 3 y 4 respectivamente, de este trabajo. Por lo tanto, el objetivo de este capítulo, fue analizar el efecto de la interacción entre las distintas formulaciones, por lo que se llevaron a cabo diferentes ensayos utilizando mezclas de dos y tres compuestos, en embriones (*in ovo*) y neonatos (*in vivo*).

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ejemplares de yacaré overo (huevos y neonatos) colectados de la Reserva Natural Manejada "El Fisco". La recolección, traslado, selección de los nidos y huevos, la crianza de pichones (previa al experimento de exposición de neonatos), y la obtención de muestras de sangre al finalizar los experimentales se realizaron en iguales condiciones que las descritas para los *EEE* (*in ovo*: topicación/pulverización, Capítulo 3) y los *EEN* (*in vivo*, por inmersión, Capítulo 4).

Para las evaluaciones llevadas a cabo en este ensayo, se utilizaron las mismas formulaciones que se describieron en 3.2.2 y 4.2.2.

5.2.1 ENSAYOS DE EXPOSICIÓN A MEZCLAS DE PLAGUICIDAS FORMULADOS

Para estos ensayos, se utilizaron mezclas de los mismos formulados plaguicidas aplicados en los *EEE* y *EEN*, previamente descritos en 3.3.2 y 4.2.2. Se evaluaron mezclas complejas de estas formulaciones tanto para los ensayo de exposición embrionaria (*por topicación y por pulverización*), como para los ensayos de exposición de neonatos. Las mezclas evaluadas fueron las siguientes: mezclas de tres formulaciones: GLI+CIP+CPF en embriones y neonatos; GLI+CIP+END en neonatos; y mezclas de dos formulaciones: GLI+CPF, GLI+CIP y CPF+CIP, sólo en neonatos.

5.2.1.1 ENSAYOS DE EXPOSICIÓN EMBRIONARIA (IN OVO: POR TOPICACIÓN Y POR PULVERIZACIÓN)

Se evaluó la mezcla de tres formulaciones: *GLI*, *CIP* y *CPF*. En ambos ensayos fueron consideradas las condiciones de cada tipo de exposición (*topicación y pulverización*) como fue detallada en: 3.2.2 y 3.2.3.

5.2.1.2 POR TOPICACIÓN SOBRE LA CÁSCARA DE HUEVOS:

EEEMt: Se utilizaron huevos provenientes de 3 nidos (8 huevos cada uno) cosechados de la Reserva Natural Manejada "El Fisco" (3.2.1), que fueron distribuidos en forma equitativa en 3 grupos experimentales de 12 huevos cada uno (6 en cada réplica; N total= 36 huevos): 1) Grupo de control: -CV (con etanol) y 2) la -M de: GLI (RU) + CIP + CPF. La topicación del grupo M consistió en la aplicación de los compuestos directamente sobre la cáscara de los huevos y en una única aplicación. En la Tabla 5.1 se detallan los grupos experimentales de este ensayo.

Tabla 5.1 Grupos experimentales del *Ensayo de Exposición Embrionaria de Mezclas por topicación (EEEMt)* a las formulaciones de GLI, CIP y CPF.

Grupos Experimentales	Compuestos	Concentraciones	Nº huevos/nido	N
CN	Agua potable	---	8	12
CV	Etanol	50 µl/huevo	8	12
M	GLI+CIP+CPF	500 + 10 + 10 (µg/huevo)	8	12

CV: Control vehículo; M (GLI + CIP + CPF): grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato –Roundup Full II®, 66,2% p.a. + Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a.; N: números de individuos totales por grupo de experimentación.

5.2.1.3 POR PULVERIZACIÓN SOBRE EL MATERIAL DE NIDO:

EEEMp: En el caso de la exposición embrionaria indirecta por pulverización sobre el material de nido, y también como ocurrió para el testeo de las formulaciones por separado, se aplicaron concentraciones equivalentes a la aplicación a campo (c.c.) recomendadas para cultivos de soja RR de los formulados comerciales: CPF (Lorsban®, 48% p.a.), CIP (Atanor®, 25% p.a.), y la formulación comercial del herbicida GLI (RoundupFull II® -RU, 66,2% p.a.): c.c. 0,8%, 0,12% y 2%, respectivamente y la mitad de las mismas (1/2 c.c.), considerando para este último caso, una simulación de la posible llegada de los compuestos por deriva o escorrentía (a través de agua, aire o suelo) y la metabolización del compuesto como ocurriría en la naturaleza. Al igual que en el ensayo de pulverización de plaguicidas individuales sobre el material de nido, se tomó como referencia la superficie de base de las bandejas de experimentación como área a pulverizar (0,0340m²). Siendo los 3 grupos de experimentación para este ensayo el CN: compuesto por agua potable declorada, y dos grupos para la M: M c.c. y M 1/2 c.c., tal como se detallan en la Tabla 5.2, los valores de las concentraciones de los componentes de la M se expresan en porcentaje (%).

Cada grupo de experimentación presentó un total 12 huevos (N total = 36), 6 en cada réplica y provenientes de 3 nidos cosechados en la naturaleza (12 huevos de cada nido). Todos los huevos para este ensayo también siguieron los procedimientos explicados en el Capítulo 3 (3.2.1) y el estudio de pulverización sobre material de nido ya reportados en la especie (Poletta y col., 2011).

Tabla 5.2 Grupos experimentales del *Ensayo de Exposición Embrionaria de Mezclas por pulverización sobre el material de nido (EEEMp)* a las formulaciones de GLI, CIP y CPF.

Grupos Experimentales	Compuestos	Concentraciones	Nº huevos/nido	N
CN	Agua potable declarada	3,5 ml	12	12
M c.c	GLI c.c + CIP c.c + CPF c.c	2+0,12+0,8 (%)	12	12
M ½ c.c	GLI ½ c.c + CIP ½ c.c + CPF ½ c.c	1+0,06+0,4 (%)	12	12

CN: agua potable declarada; M c.c. (GLI c.c. + CIP c.c. + CPF c.c.) y M ½ c.c. (GLI (RU) ½ c.c. + CIP ½ c.c. + CPF ½ c.c.): grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato RoundupFull II®, 66,2% p.a. + Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a.; c.c.: concentraciones aplicadas a campo; ½ c.c.: mitad de las concentraciones aplicadas a campo; N: números de individuos totales por grupo de experimentación.

En todos los ensayos, una vez producido los nacimientos se registraron las mismas variables que las descritas en el Capítulo 3: éxito de eclosión, registro de malformaciones externas, tamaño al nacer de cada individuo, además del análisis de los parámetros inmunológicos (RTGB, RDGB, AnC y SC).

5.2.2 ENSAYOS DE EXPOSICIÓN DE NEONATOS (IN VIVO):

El diseño experimental y tratamientos, número de individuos utilizados, su distribución, así como las condiciones experimentales de exposición y crianza, fueron exactamente las mismas que en *EEN* (Capítulo 4). Las concentraciones utilizadas en estos casos fueron siempre, las concentraciones más bajas aplicadas de los compuestos por separado (c.c.1/2).

5.2.2.1 EVALUACIÓN DE MEZCLAS DE TRES FORMULACIONES:

5.2.2.1.1 EENM1: GLI, CIP y END

Se utilizaron para este ensayo un total de 36 individuos (neonatos de 20 días de edad) provenientes de 3 nidos cosechados de la naturaleza de la Reserva Natural: "El Fisco", seleccionando 8 huevos de cada nido para este experimental. La cosecha de los nidos, traslado y selección, así como la duración y las condiciones experimentales, fueron exactamente las mismas que se detallaron en 4.2.1 y 4.2.2.

Los individuos se distribuyeron al azar en 3 grupos experimentales de 12 neonatos cada uno: un CN, sin exposición al contaminante, tratado con agua potable declarada; un CV con etanol y un grupo M con la mezcla de formulaciones a base de GLI, CIP y END, cuyas

concentraciones se redujeron progresivamente en el tiempo durante los dos meses del experimento, al igual que en los *EEN* descriptos en el Capítulo 4 (Tabla 5.3).

Tabla 5.3 Grupos experimentales aplicados en el *Ensayo de Exposición de Neonatos a Mezclas 1 (EENM1)*, a las formulaciones de GLI, CIP y END.

Grupos Experimentales	Compuestos	Concentraciones iniciales	Concentraciones finales	Nº indiv./nido	N
CN	Agua potable	---	---	8	12
CV	Etanol	200 µl/L	200 µl/L	8	12
M	GLI+CIP+END	2,5 mg/L+0,5 µg/L+0,5 µg/L	0,25 mg/L+0,05 µg/L+0,05 µg/L	8	12

CN: Control Negativo; CV: Control vehículo; M (GLI + CIP + END): grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato –Roundup Full II®, 66,2% p.a. + Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Endosulfán Galgofan®, 35% p.a.; Nº indiv./nido: número de individuos expuesto por nido; N: números de individuos totales por grupo de experimentación.

5.2.2.1.2 *EENM2: GLI, CIP y CPF*

Este ensayo, presentó las mismas condiciones experimentales que el *EENM1* (cantidad de nidos, individuos, condiciones de exposición y crianza, mantenimiento y duración), con la única diferencia de que se reemplazó la formulación de END por la de CPF, con motivo de su prohibición en nuestro país (*Res. 511/2011*; SENASA, 2011), como fue desarrollado en Capítulo 1: apartado 1.1.1.2. Las concentraciones aplicadas de cada compuesto en la M2 se describen en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4 Grupos experimentales del *Ensayo de Exposición de Neonatos a Mezclas 2 (EENM2)*, a las formulaciones de GLI, CIP y CPF.

Grupos Experimentales	Compuestos	Concentraciones iniciales	Concentraciones finales	Nº indiv./nido	N
CV	Etanol	200 µl/L	200 µl/L	8	12
M	GLI+CIP+CPF	2,5 mg/L+0,5 µg/L+0,5 µg/L	0,25 mg/L+0,05 µg/L+0,05 µg/L	8	12

CV: Control vehículo; M (GLI + CIP + CPF): grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato –Roundup Full II®, 66,2% p.a. + Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a.; Nº indiv./nido: número de individuos expuesto por nido; N: números de individuos totales por grupo de experimentación.

5.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el *software* SPSS 17.0 para Windows.

Las diferencias entre réplicas de cada grupo experimental se analizaron mediante un Test *t*.

Todas las variables se testearon en normalidad mediante el test de Kolmogorov- Smirnov y la homogeneidad de varianzas entre los grupos se comprobó con el test de Levene. Según se comprobaron o no los supuestos, y según el Nro de grupos experimentales (2 o más), se utilizaron test paramétricos (Test *t* o ANOVA/Dunnnett o Tukey) o no paramétricos (Kruskal-Wallis y/o U-test Mann-Whitney), para comparar los diferentes grupos en función de los distintos parámetros inmunológicos o variables de crecimiento analizados.

Para el crecimiento se utilizaron las diferencias de peso y longitud, antes y después del experimento (medidas finales-medidas iniciales), como variable de respuesta a la exposición.

En todos los casos las variables de agrupamiento fueron los tratamientos y los nidos. El valor de $p \leq 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo, excepto para el caso donde se aplicó la corrección de Bonferroni, que se indica en cada caso.

5.4 RESULTADOS

En ninguno de los ensayos se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre réplicas, por lo que todos los resultados se informan como la media \pm E.E. por grupo experimental.

Del total de pichones nacidos de todos los ensayos *in ovo* no se reportaron malformaciones externas, ni tampoco hubo diferencias significativas respecto al éxito de eclosión ($p > 0,05$).

Para ambos *Ensayos de exposición embrionaria (EEEMt y EEEMp)* no se observaron diferencias significativas entre los grupos analizados por tratamiento ($p > 0,05$) para ninguna de las variables (Tabla 5.5).

Tabla 5.5 Resultados (Media \pm E.E.) de todos los parámetros inmunológicos analizados para los distintos grupos experimentales de los *Ensayos de exposición embrionaria (EEEMt y EEEMp)*.

Ensayos	Grupos Experimentales	RTGB/mm ³	Heterófilos (%)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Eosinófilos (%)	AnC	%MH
EEEMt	CN	20166,67 \pm 1759,89	24,56 \pm 1,99	69,89 \pm 2,09	---	4,67 \pm 0,99	16,89 \pm 3,11	22,99 \pm 4,65
	CV	17388,89 \pm 1141,93	33,67 \pm 3,28	63,11 \pm 2,91	---	2,33 \pm 0,64	15,11 \pm 2,73	26,39 \pm 6,62
	M	22285,71 \pm 2981,8	31,86 \pm 5,52	65,86 \pm 5,53	---	1,71 \pm 0,29	9,71 \pm 3,79	31,14 \pm 13,5
	CN	10750 \pm 680,07	48,43 \pm 4,81	49,29 \pm 5,03	0,14 \pm 0,14	2,14 \pm 0,59	18,67 \pm 4,46	36,76 \pm 23,46

"Evaluación del efecto de plaguicidas sobre el sistema inmune en *Caiman latirostris* (yacaré overo)"

EEEMp	M c.c	15166,67±1895,30	40 ± 5,52	57,88 ± 5,67	0,25 ± 0,25	1,88 ± 0,61	32,67 ± 9,67	39,73 ± 12,86
	M ½ c.c	14000±1500	47,14 ± 7,17	50,86 ± 7,18	0,29 ± 0,18	1,71 ± 0,36	29,33 ± 8,74	34,89 ± 12,26

EEEMt: Ensayo de Exposición Embrionaria por topicación; EEEMp: Ensayo de Exposición Embrionaria por pulverización; CN: Control Negtivo; CV: Control vehículo; M (GLI + CIP + CPF): grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato Roundup Full II®, 66,2% p.a. + Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a.; M c.c. (GLI c.c. + CIP c.c. + CPF c.c.) y M ½ c.c. (GLI ½ c.c. + CIP ½ c.c. + CPF ½ c.c.): grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato Roundup Full II®, 66,2% p.a. + Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a.; c.c.: concentraciones aplicadas a campo; ½ c.c.: mitad de las concentraciones aplicadas a campo; RTGB: Recuento Total de Glóbulos Blancos; AnC: Anticuerpos naturales; %MH: Máxima Hemólisis.

En cuanto a las variables relacionadas al tamaño de los individuos en el momento de los nacimientos (LT, LHC y peso), no se evidenció efectos en ninguno de los ensayos.

Por el contrario, si se observó “*efecto nido*” en *EEEMt* en la categoría eosinófilos y SC; y en *EEEMp* en el RTGB (Kruskal-Wallis / Mann Whitney; aplicando la corrección de Bonferroni con un valor $p < 0,017$). En la Tabla 5.6 se muestran los valores correspondientes a los parámetros de tamaño al nacer que se obtuvieron en cada ensayo (medias ± E.E.), correspondientes a esta etapa de evaluación (*in ovo*).

Tabla 5.6 Parámetros de tamaño (medias ± E.E.) evaluados en individuos recién nacidos de *C. latirostris* en cada *Ensayo de exposición embrionaria a Mezclas (EEEM)*.

Ensayos	Grupos Experimentales	LT (cm)	LHC (cm)	Peso (g)
EEEMt	CN	23,37 ± 0,28	11,3 ± 0,13	45,24 ± 1,23
	CV	23 ± 0,64	11,14 ± 0,07	44,28 ± 0,98
	M	23,03 ± 0,31	10,66 ± 0,26	44,07 ± 1,36
EEEMp	CN	23,86 ± 0,23	11,3 ± 0,11	45,79 ± 2,36
	M c.c	23,58 ± 0,21	11,15 ± 0,12	44,31 ± 1,66
	M ½ c.c	24,23 ± 0,20	11,72 ± 0,17	45,66 ± 1,92

EEEMt: Ensayo de Exposición Embrionaria a Mezclas por topicación; *EEEMp*: Ensayo de Exposición Embrionaria a Mezclas por pulverización; CN: Control Negtivo; CV: Control vehículo; M (GLI + CIP + CPF): grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato Roundup Full II®, 66,2% p.a. + Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a.; c.c.: concentraciones aplicadas a campo; ½ c.c.: mitad de las concentraciones aplicadas a campo; LT: longitud total; LHC: longitud hocico-cloaca; cm: centímetros; g: gramos.

Para el ensayo de exposición de crías a las M de tres componentes (*EENM1* y *EENM2*), los resultados indicaron una disminución significativa del RTGB con respecto al CN (ANOVA/Dunnet, $p=0$; Fig 5.1) en *EENM1*. Lo mismo ocurrió en *EENM2*, en comparación con el CV (ANOVA/Dunnet, $p=0,003$; Fig 5.2).

En la tabla 5.7 se muestran todos los valores de los diferentes parámetros, para ambos ensayos; y en la tabla 5.8 los valores correspondientes a los parámetros de crecimiento (tamaño final – inicial) que se obtuvieron en cada ensayo (medias \pm E.E.).

Para estos ensayos no se detectó “*efecto nido*” en ninguna de las variables analizadas ($p > 0,05$) ni tampoco relación entre los parámetros de crecimiento.

Tabla 5.7 Resultados (Media \pm E.E.) de todos los parámetros inmunológicos analizados para los distintos grupos experimentales del *Ensayo de Exposición de Neonatos a Mezclas 1 y 2 (EENM1 y EENM2)*.

Ensayos	Grupos Experimentales	RTGB/mm ³	Heterófilos (%)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Eosinófilos (%)	AnC	%MH
EENM1	CN	35875 \pm 1687,89	28 \pm 3,08	62,25 \pm 2,87	---	9,25 \pm 1,44	1024 \pm 362,04	13,6 \pm 5,43
	CV	32567 \pm 2046,34	23,5 \pm 3,4	67,5 \pm 3,93	0,25 \pm 0,25	7,75 \pm 1,11	352 \pm 96	14,72 \pm 12,58
	M	22214,29 \pm 1105,32*	28,64 \pm 1,78	63,71 \pm 1,89	0,21 \pm 0,11	6,57 \pm 0,72	1901,71 \pm 728,4	9,92 \pm 4,8
EENM2	CV	9187,5 \pm 566,45	16,13 \pm 3,31	80 \pm 3,64	1,13 \pm 0,35	1,88 \pm 0,4	99876,57 \pm 72927,86	27,58 \pm 7
	M	6700 \pm 528,1#	19,7 \pm 2,12	76,2 \pm 1,59	0,3 \pm 0,15	2,8 \pm 0,55	11084,8 \pm 4734,89	25,82 \pm 10,26

EENM1: *Ensayo de Exposición de Neonatos a Mezclas 1*; CN: Control Negativo; CV: Control vehículo; M (GLI + CIP + END): grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato Roundup Full II®, 66,2% p.a. + Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Endosulfán Galgofan®, 35% p.a. EENM2: *Ensayo de Exposición de Neonatos a Mezclas 2*; CV: Control vehículo; M (GLI + CIP + CPF): grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato Roundup Full II®, 66,2% p.a. + Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a.; RTGB: Recuento Total de Glóbulos Blancos; AnC: Anticuerpos naturales; %MH: Máxima Hemólisis

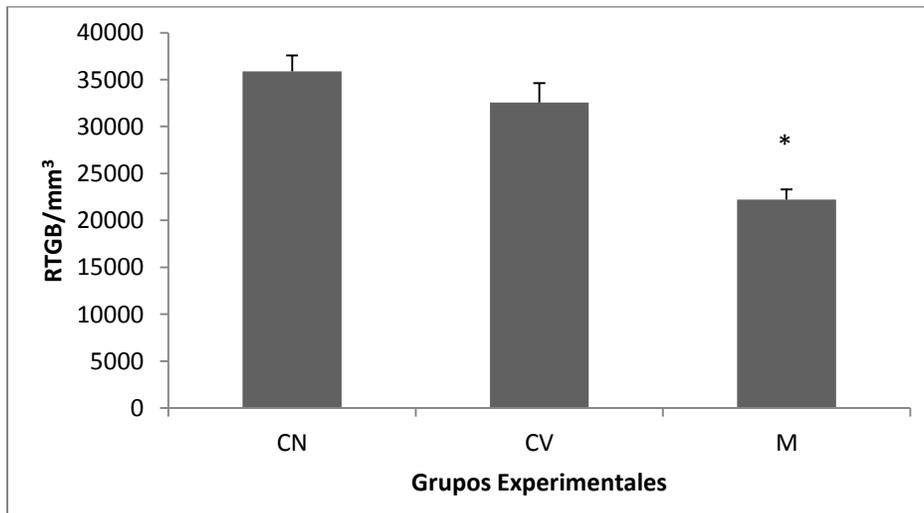


Fig 5.1 Recuento Total Glóbulos Blancos (RTGB, ANOVA/Dunnet) observados en neonatos de *C. latirostris* en los diferentes grupos experimentales del *Ensayo de Exposición de Neonatos a Mezclas 1 (EENM1)*. CN: Control Negativo; CV: Control vehículo (etanol); M (GLI + CIP + END): grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato Roundup Full II®, 66,2% p.a. + Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Endosulfán Galgofan®, 35% p.a. * $p < 0,05$ estadísticamente significativo respecto al CN.

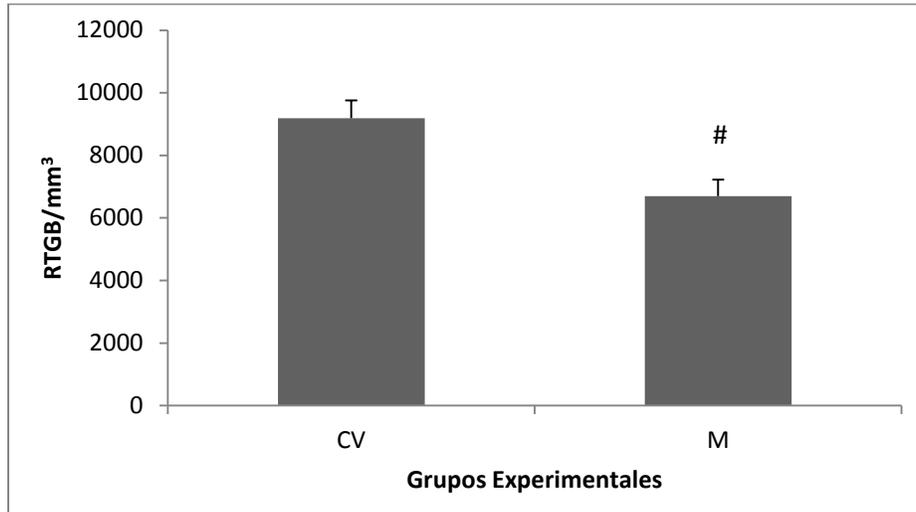


Fig 5.2 Recuento Total Glóbulos Blancos (RTGB, ANOVA/Dunnet) observados en neonatos de *C. latirostris* en los diferentes grupos experimentales del *Ensayo de Exposición de Neonatos a Mezclas 2 (EENM2)*. CV: Control vehículo (etanol); M (GLI + CIP + CPF): grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato Roundup Full II®, 66,2% p.a. + Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a, # $p < 0,05$ estadísticamente significativo respecto al CV.

Tabla 5.8 Parámetros de crecimiento (final – inicial; medias \pm E.E.) evaluados en animales de *C. latirostris* de los *Ensayos de Exposición de Neonatos a Mezclas 1 y 2 (EENM1 y EENM2)*.

Ensayos	Grupos Experimentales	LT (cm)	LHC (cm)	Peso (g)
EENM1	CN	5,3 \pm 1,48	2,43 \pm 0,87	44 \pm 19,08
	CV	6,78 \pm 1,66	3,33 \pm 0,93	71,5 \pm 24,92
	M	5,10 \pm 0,75	2,12 \pm 0,31	31,36 \pm 6,95
EENM2	CV	12,24 \pm 1,04	6,23 \pm 0,71	125,43 \pm 16,77
	M	11,32 \pm 0,43	5,53 \pm 0,22	108,17 \pm 8,19

EENM1: *Ensayo de Exposición de Neonatos a Mezclas 1*; CN: Control Negativo; CV: Control vehículo; M (GLI + CIP + END): grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato Roundup Full II®, 66,2% p.a. + Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Endosulfán Galgofan®, 35% p.a.

EENM2: *Ensayo de Exposición de Neonatos a Mezclas 2*; CV: Control vehículo; M (GLI + CIP + CPF): grupo experimental de mezcla de los formulados: Glifosato Roundup Full II®, 66,2% p.a. + Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a. LT: longitud total; LHC: longitud hocico-cloaca; cm: centímetros; g: gramos.

5.5 DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Como se mencionó anteriormente, el estudio más cercano sobre el efecto de las mezclas en la especie, fue realizado Poletta y col., (2011), donde se simularon exposiciones de nidos a campo, mediante pulverizaciones en condiciones seminaturales con la formulación de RU sola por un lado y la M de las tres formulaciones testeadas en este trabajo de tesis (GLI+CIP+END) por otro, a concentraciones similares (3%; 0,12%; 0,85%), tal como puede ocurrir en los ambientes cercanos a campos cultivados con soja. En el mencionado trabajo, se encontraron efectos genotóxicos y metabólicos/enzimáticos mayores para la M que para la formulación del herbicida (RU) testado individualmente.

En cuanto a nuestros resultados, pudimos observar que para los ensayos de mezclas de formulaciones comerciales de plaguicidas, los efectos inmunológicos nuevamente fueron evidenciados solo en la instancia de evaluación *in vivo*, afectando el RTGB en ambos casos (*EENM1* y *EENM2*).

Son escasos los trabajos que evalúan el efecto de mezclas sobre el SI. Gendron y col., (2003); expusieron a *Rana pipiens* a una mezcla de pesticidas (atrazina, metribuzina, endosulfán, lindano, dieldrín y aldicard), observando que ciertos componentes de la respuesta inmune se suprimieron significativamente luego de la exposición. Para la misma especie, Christin y col. (2003, 2004) demostraron que la mezcla de pesticidas (atrazina, metribuzina, endosulfán, lindano, dieldrín y aldicard) podría alterar algunos parámetros de la respuesta inmune, contribuyendo al declive global de la especie y haciéndolas más susceptibles a ciertas infecciones. Liu y col., (2006); mostraron que la exposición a mezclas de dosis bajas de cipermetrina y metil paratión puede afectar los niveles hormonales (especialmente el estradiol) y la función inmune en ratas. Fatima y col., (2007) demostraron que una mezcla de herbicidas, probada en peces, genera un bloqueo del sistema de defensa antioxidante enzimático, causando daño celular y oxidativo, lo cual interfiere con la actividad fagocítica y la actividad lisosómica, generando inmunosupresión.

A pesar de que los contaminantes poseen diferentes modos de acción, la combinación de ellos puede influir sobre la toxicidad del otro, dando como resultado un número casi ilimitado de posibles combinaciones aditivas, sinérgicas o antagonistas. Para el caso de una acción combinada que envuelve a herbicidas e insecticidas, generalmente es casi siempre diferente. Un concepto importante en el examen de las mezclas de plaguicidas es descifrar el lenguaje de las interacciones químicas (Lydy y col., 2004).

Para el caso de ambos *Ensayos de exposición embrionaria (EEEMt y EEEMp)* no obtuvimos ningún efecto. Esto concuerda con lo ocurrido en los Ensayos de Exposición

Embrionaria del Capítulo 3 (*EEE1*, *EEE2*, *EEE3*). Como se mencionó en dicho capítulo, aplicar dosis de una magnitud mucho mayor; que se extienda la duración del experimento, y además evaluar los animales a largo plazo, meses después de la exposición; podría ser necesario para poder alcanzar un efecto en los parámetros deseados.

Por otro lado, en las exposiciones *in vivo*, en el primer ensayo de exposición de neonatos a la M de GLI+CIP+END (*EENM1*), se presentó una disminución significativa en el RTGB con respecto al CN, siendo esto coincidente con lo observado con los compuestos por separado (*EEN1*, Capítulo 4). Para el *EENM2* con la M compuesta por GLI+CIP+CPF, también se mostró una disminución significativa en el RTGB con respecto al CV; sucediendo lo mismo con los compuestos por separado (*EEN1* y *EEN3*, Capítulo 4). En base a esto, podríamos concluir que ambos ensayos (*EENM1* y *EENM2*) demostrarían que no existe interacción entre los componentes de ambas mezclas, aditiva o antagónica, ya que el efecto individual y combinado de los compuestos condujeron a un efecto inmunotóxico similar. Esto difiere de lo observado por Relyea, (2009), que compararon en anuros toxicidad de mezclas de insecticidas y de insecticidas con herbicidas frente a la de los compuestos aislados, y comprobaron que las mezclas presentaron un mayor efecto (mortalidad y alteraciones en la metamorfosis de los organismos) que los compuestos testeados por separado. Poletta y col., (2011) también observaron que todos los parámetros analizados indicaron una toxicidad más alta para la mezcla de pesticidas que para la formulación de RU.

El modo de acción exacto con el que actúan los compuestos en la mezcla es difícil de estimar y puede variar con diversas condiciones ambientales, pero este tipo de estudios también nos permite analizar su actividad sobre los sistemas biológicos. Las propiedades químicas de cada formulación, la interacción con otros compuestos y el mecanismo de acción de cada tóxico, pueden producir efectos muy variables. Además, los factores no químicos que también pueden actuar como factores de estrés añaden una mayor complejidad a las múltiples situaciones (Beyer y col., 2014), como son los factores ambientales, ecológicos, las respuestas fisiológicas a esa interacción y la susceptibilidad individual de cada organismo frente a la exposición (Amaral y col., 2012).

Para esta instancia de evaluación, no se manifestaron malformaciones externas en los recién nacidos, ni tampoco se observaron efectos sobre el crecimiento al finalizar cada ensayo. Contrariamente, Uggini y col., (2010); demostraron la inducción de anomalías

morfológicas y efectos sobre el crecimiento de los recién nacidos en embriones de pollo expuestos a la M de formulaciones de plaguicidas CPF+CIP, en un rango de concentraciones de 0,005 a 5 µg/huevo aplicadas al día cero de incubación, confirmando el efecto teratogénico y embriotóxico de estos compuestos en combinación. Poletta y col., (2011); demostraron que los ejemplares de *C. latirostris* expuestos a RU y a la mezcla de plaguicidas presentaron menor tamaño al nacer y durante los primeros meses de vida comparados con el CN.

En nuestro caso, no se realizaron seguimientos posteriores en los animales, ya que en condiciones controladas de laboratorio se hace muy difícil el mantenimiento de los mismos. En este sentido, es importante mencionar la longevidad que presentan los reptiles, donde los efectos sobre el crecimiento pueden no ser inmediatamente evidenciados a corto plazo (Mitchelmore y col., 2005), como podría ser un período de dos meses, sino que se podrían comprobar sólo con un seguimiento a largo plazo.

Las mezclas de plaguicidas son comúnmente aplicadas en los cultivos de soja entre dos y tres veces por ciclo de crecimiento, sumado a la escorrentía superficial causada principalmente por los eventos de lluvias durante esos períodos, hacen que los cuerpos de agua adyacentes a cultivos reciban varios pulsos de toxicidad por campaña agrícola (Demetrio y col., 2014; Ronco y col., 2016). Esta problemática es la que ocurre en muchos ambientes habitados por poblaciones naturales de *C. latirostris*, los cuales se encuentran expuestos, en gran parte, a estos compuestos.

Podemos concluir que los resultados de nuestro estudio demostraron que las diferentes mezclas de formulaciones comerciales de plaguicidas ejercen algún efecto a nivel inmunológico sobre neonatos expuestos *in vivo*, similares a los observados para los compuestos por separado, mientras que no se observaron interacciones de ningún tipo entre los diferentes componentes en las M.

Esta información nos permite empezar a tratar de interpretar lo que podría estar pasando en los escenarios reales de exposición, donde el yacaré overo está expuesto continuamente en su hábitat a los formulados comerciales de plaguicidas en forma de mezclas.

CAPÍTULO 6

CAPÍTULO 6.

Evaluación del efecto inmunotóxico de diferentes formulaciones de plaguicidas (Cipermetrina, Clorpirifós, y Glifosato) y mezcla en juveniles de *Caiman latirostris* en condiciones seminaturales.

6.1 INTRODUCCIÓN

Como mencionamos anteriormente, el yacaré overo se encuentra ambientalmente expuesto a plaguicidas por haber quedado muchas de las regiones de distribución natural de la especie, como relictos de ambientes naturales rodeados por grandes extensiones de tierras cultivadas. En estas zonas, la aplicación de plaguicidas es el método elegido para el control de las diversas especies perjudiciales. Además, CIP, CPF y GLI se aplican extensa e intensivamente en el mismo período del año en que tiene lugar la época reproductiva de la especie (noviembre-marzo), lo que implica un riesgo particular para los embriones en desarrollo y los neonatos. En estos lugares, es común que las hembras de yacaré construyan los nidos en las cercanías de los cultivos, en "parches" de vegetación, o contiguos a los molinos, ya que utilizan los estanques como cuerpos de agua temporales (Figura 6.1).



Fig 6.1: Parche de vegetación (izq), utilizado por una hembra para la construcción del nido. El mismo se encontraba rodeado de cultivos como se puede ver en el fondo de la fotografía. Se observa el canal de agua utilizado por la hembra para refugiarse.

Debido a que las plagas pueden aparecer en los cultivos en forma simultánea, se preparan mezclas de plaguicidas para atacar diferentes malezas, insectos y

microorganismos al mismo tiempo. Sólo una parte menor de los plaguicidas aplicados impacta directamente sobre los organismos blanco, mientras que el resto se dispersa afectando las poblaciones de la flora y fauna silvestres en las áreas naturales circundantes (Donald, 2004). La exposición prolongada a pequeñas dosis de plaguicidas puede interferir con el desarrollo y crecimiento, a nivel de los parámetros hematológicos y fisiológicos y de la estabilidad genética de los organismos que allí habitan (Gluszczac y col., 2006).

Para predecir el efecto de los compuestos químicos en los organismos, normalmente se realizan a partir de datos obtenidos en ensayos de laboratorio considerando que los ecosistemas naturales son mucho más complejos y variables que los sistemas estandarizados de laboratorio. Por consiguiente, los ensayos de toxicidad controlados deben ser complementados con estudios realizados en niveles superiores de complejidad como son las condiciones seminaturales, por ejemplo. Una de las características más importantes de este tipo de estudios es que incorporan regímenes de exposición más próximos a los reales, permitiendo una mejor comprensión de los efectos biológicos de los compuestos en estudio en las condiciones naturales de su aplicación (Graney y col., 2003).

6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1 JUVENILES DE *C. latirostris*

Se utilizaron ejemplares de *C. latirostris* de 10 meses de edad aproximadamente, provenientes de diferentes nidos cosechados en el sitio descrito en 3.2.1 (Capítulo 3), incubados artificialmente y mantenidos bajo condiciones controladas hasta el inicio del tratamiento en las instalaciones del PY.

Los animales se individualizaron mediante cortes en los verticilos caudales (que corresponden al número del nido y a la marca individual de cada animal (Larriera y col., 1994) como fue explicado en Capítulo 1 (1.4), y para evaluar el *efecto nido*, se incluyeron animales nacidos de diferentes nidos (Verdade, 1997).

6.2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL Y EXPOSICIÓN

Se construyeron artificialmente recintos de 4,5 m² de superficie (Figura 6.2), en un sitio libre de cualquier actividad contaminante, manteniendo una distancia de 100 m aproximadamente entre ellos. Los recintos contenían un recipiente con agua potable, la

cual era renovada todos los días (de esta manera se les suministraba a los animales un sitio donde poder estar en contacto con el agua, ya que ellos pasan parte del tiempo en agua y parte en tierra; y además servía también de bebedero) y el alimento se suministró *ad libitum* tres veces a la semana, como fue descrita en el Capítulo 1 (1.4).



Fig 6.2: Recintos artificiales de 4,5 m² de superficie.

Se utilizaron un total de 120 animales de 6 nidos diferentes (20 animales por grupo), los que fueron distribuidos aleatoriamente en 4 grupos experimentales: CN (agua potable declorada), CIP, CPF, GLI y M (CIP+CPF+GLI) (Tabla 6.1). Los animales fueron colocados en los recintos 7 días antes de la fumigación para su aclimatamiento. Inmediatamente antes de la fumigación, los animales fueron retirados de los recintos para evitar que los plaguicidas tomen contacto directo con ellos, incluso los del control negativo; de esta manera, asegurarnos que todos estuvieron bajo las mismas condiciones antes de entrar al recinto.

Las formulaciones de plaguicidas utilizadas en esta instancia fueron: (1) Cipermetrina Atanor® (CIP; 25%), CAS No. 52315-07-8; (2) Clorpirifos Lorsban 48E® (CPF; 48%), CAS No. 2921-88-2; y (3) Roundup® Full II (RU; 66.2%), CAS No. 70901-12-1; (EXTOXNET, 1996). Estas concentraciones corresponden a las recomendadas en agricultura para su

aplicación en cultivos de soja RR, y la cantidad fue adaptada a la superficie del recinto (4,5 m²).

Tabla 6.1: Grupos experimentales y tratamientos aplicados en el *Ensayo de Exposición In vivo en condiciones seminaturales*.

Grupos Experimentales	Compuesto	Concentraciones	Nº animales/grupo	N
CN	Agua potable declarada	100 ml	20	120
CIP	Atanor®, 25% p.a.	0,12 %	20	120
CPF	Lorsban 48E®, 48% p.a.	0,8 %	20	120
GLI	RoundupFull II®, 66,2% p.a.	2%	20	120
M	(CIP+CPF+GLI)	(0,12%+0,8%+2%)	20	120

CN: Control negativo; CIP: grupo expuesto a Cipermetrina (Atanor®); CPF: grupo expuesto a la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®; GLI: grupo expuesto a Glifosato (Roundup Full II®); M (CIP+CPF+GLI): grupo experimental de mezcla de los formulados: Cipermetrina Atanor®, 25% + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48%+ Glifosato -RoundupFull II®, 66,2%; N: número total de animales utilizados.

Al igual que en los *EEE* (Capítulo 3), se utilizó etanol (C₂H₆O) como vehículo para las formulaciones de los insecticidas CIP y CPF, debido a la baja solubilidad de estos compuestos en agua. Se realizó la exposición de los animales a los diferentes plaguicidas y controles, a través de la fumigación de los recintos siguiendo el cronograma de aplicación utilizado en cultivos de soja, de la misma manera que ocurriría en la naturaleza. Al finalizar los experimentales se tomaron muestras de sangre periférica de cada animal (volumen de 2 ml de sangre entera), por punción de la vena espinal (Myburgh y col., 2014), como se detalló en el apartado 3.2.3 (Capítulo 3), y se registraron las siguientes variables: Recuento total y diferencial de glóbulos blancos, anticuerpos naturales y sistema de complemento, siguiendo las metodologías descritas anteriormente en el punto 2.4 (Capítulo 2). También se registraron variables de crecimiento (LT, LHC y peso, valores finales-valores iniciales).

6.3 ANALISIS ESTADISTICO

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el *software* SPSS 17.0 para Windows.

Las diferencias entre réplicas de cada grupo experimental se analizaron mediante un Test *t*.

Todas las variables se testearon en normalidad mediante el test de Kolmogorov- Smirnov y la homogeneidad de varianzas entre los grupos se comprobó con el test de Levene. Según se comprobaron o no los supuestos, y según el Nro de grupos experimentales (2 o más), se utilizaron test paramétricos (Test *t* o ANOVA/Dunnnett o Tukey) o no paramétricos (Kruskal-Wallis y/o U-test Mann-Whitney), para comparar los diferentes grupos en función de las distintos parámetros inmunológicos o variables de crecimiento analizados.

Para el crecimiento se utilizaron las diferencias de peso y longitud antes y después del experimento (medidas finales-medidas iniciales) como variable de respuesta a la exposición.

En todos los casos las variables de agrupamiento fueron los tratamientos y los nidos. El valor de $p \leq 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

6.4 RESULTADOS

En lo que respecta a los parámetros inmunológicos, solo obtuvimos diferencias en el RTGB. Se observó un aumento significativo en los animales expuestos a GLI en comparación con el CN ($p=0,029$; ANOVA/Dunnet; Tabla 6.2, Figura 6.3).

Tabla 6.2: Resultados (Media \pm E.E.) de todos los parámetros inmunológicos analizados para los distintos grupos experimentales del *Ensayo de Exposición In vivo en condiciones seminaturales*.

Grupos Experimentales	RTGB/mm ³	Heterófilos (%)	Linfocitos (%)	Monocitos (%)	Eosinófilos (%)	AnC	% MH
CN	22475 \pm 1747,73	18,67 \pm 2,44	77,78 \pm 2,68	1,17 \pm 0,34	2,28 \pm 0,47	430,4 \pm 77,95	16,51 \pm 3,56
CIP	29571,43 \pm 1946,3	19,45 \pm 2,34	73,82 \pm 2,38	2,36 \pm 0,72	4,27 \pm 0,93	187,08 \pm 31,14	24,96 \pm 5,83
CPF	27192,31 \pm 2108,85	19,43 \pm 4,32	75,71 \pm 4,45	0,71 \pm 0,42	4,14 \pm 1,06	602,67 \pm 210,24	16,72 \pm 4,67
GLI	29852,94 \pm 2298,4*	17,7 \pm 3,76	79,2 \pm 4,35	1,5 \pm 0,69	1,6 \pm 0,87	993,88 \pm 269,36	13,01 \pm 2,97
M	20076,92 \pm 2344,42	17,55 \pm 1,64	78,55 \pm 1,5	1,27 \pm 0,3	2,55 \pm 0,41	295,38 \pm 52,53	24,89 \pm 7,74

CN: Control negativo; CIP: grupo expuesto a Cipermetrina (Atanor®); CPF: grupo expuesto a la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®; GLI: grupo expuesto a Glifosato (Roundup Full II®); M (CIP+CPF+GLI): grupo experimental de mezcla de los formulados: Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a + Glifosato -RoundupFull II®, 66,2% p.a.; RTGB: Recuento Total de Glóbulos Blancos; AnC: Anticuerpos naturales; %MH: Máxima Hemólisis.

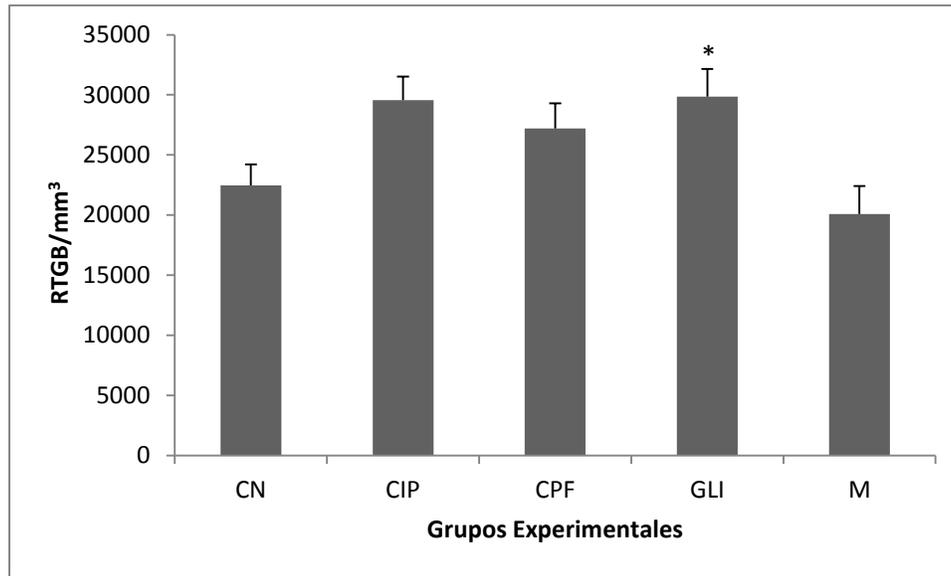


Fig 6.3 Recuento Total Glóbulos Blancos (RTGB, ANOVA/Dunnet) observados en ejemplares de *C. latirostris* en los diferentes grupos experimentales del *Ensayo de Exposición In Vivo en condiciones seminaturales*. CN: Control negativo; CIP: grupo expuesto a Cipermetrina (Atanor®); CPF: grupo expuesto a la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®; GLI: grupo expuesto a Glifosato (Roundup Full II®); M (CIP+CPF+GLI): grupo experimental de mezcla de los formulados: Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a + Glifosato -RoundupFull II®, 66,2% p.a; * $p < 0,05$ estadísticamente significativo respecto al CN.

En cuanto al crecimiento de los animales (LT, LHC y peso), obtuvimos un aumento significativo en LHC en los animales expuestos a CIP ($p=0,002$) y M ($p=0,004$; ANOVA/Dunnet) en comparación con el CN (Tabla 6.3, Figura 6.4 A). Lo mismo ocurrió en el peso, donde obtuvimos un aumento significativo entre los animales expuestos a M en comparación con el CN ($p=0,001$, Kruskal Wallis/Mann. Whitney; Tabla 6.3, Figura 6.4 B).

Tabla 6.3: Resultados (Media \pm E.E.) de los parámetros de crecimiento analizados para los distintos grupos experimentales del *Ensayo de Exposición In vivo en condiciones seminaturales*.

Grupos Experimentales	LT (cm)	LHC (cm)	Peso (g)
CN	1,26 ± 0,6	0,24 ± 0,19	15,6 ± 5,85
CIP	0,61 ± 2,27	1,58 ± 0,35*	52 ± 27,51
CPF	1,96 ± 0,8	1,11 ± 0,3	14,08 ± 23,94
GLI	0,48 ± 0,64	0,26 ± 0,2	10,94 ± 6,84
M	3,27 ± 0,48	1,5 ± 0,34*	98,38 ± 18*

CN: Control negativo; CIP: grupo expuesto a Cipermetrina (Atanor®); CPF: grupo expuesto a la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®; GLI: grupo expuesto a Glifosato (Roundup Full II®); M (CIP+CPF+GLI): grupo experimental de mezcla de los formulados: Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a. + Glifosato -RoundupFull II®, 66,2% p.a.; LT: longitud total; LHC: longitud hocico cloaca; cm: centímetros; g: gramos.

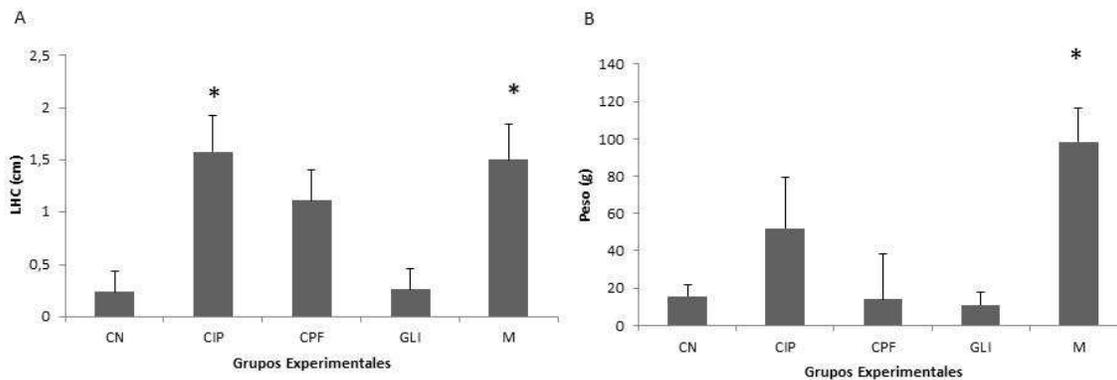


Fig 6.4 A) LHC (cm) y B) peso (g) observados en ejemplares de *C. latirostris* en los diferentes grupos experimentales del *Ensayo de Exposición In Vivo en condiciones seminaturales*. CN: Control negativo; CIP: grupo expuesto a Cipermetrina (Atanor®); CPF: grupo expuesto a la formulación de Clorpirifos Lorsban 48E®; GLI: grupo expuesto a Glifosato (Roundup Full II®); M (CIP+CPF+GLI): grupo experimental de mezcla de los formulados: Cipermetrina Atanor®, 25% p.a. + Clorpirifos Lorsban 48E®, 48% p.a. + Glifosato -RoundupFull II®, 66,2% p.a.; * $p < 0,05$ estadísticamente significativo respecto al CN.

En cuanto a los resultados sobre el “*efecto nido*” que se examinaron para todas las variables observadas, no se encontraron diferencias en ninguno de los grupos analizados.

6.5 DISCUSIÓN

En esta instancia de evaluación, tratamos de simular una posible exposición ambiental de juveniles de yacaré en ambientes acuáticos contiguos a cultivos. Estos ambientes reciben concentraciones de plaguicidas en forma constante, éstas pueden tener efectos deletéreos y/o acumulativos en los seres vivos que allí habitan, especialmente si se consideran los organismos particularmente sensibles (Freeman y Rayburn, 2004). Bajo estas condiciones seminaturales de exposición, demostramos alteraciones en el RTGB, y

también aumento en el crecimiento en los caimanes expuestos a la formulación GLI así como a su combinación con formulaciones de CPF y CIP, respectivamente; tal como son aplicados habitualmente estos plaguicidas en las prácticas agrícolas asociadas al cultivo de soja.

En el RTGB las alteraciones fueron producidas por la formulación de GLI de manera aislada. Resultados similares fueron observados por Modesto y Martínez, (2010), quienes evaluaron los efectos de Roundup Transorb[®] en el pez neotropical *Prochilodus lineatus*, luego de una exposición aguda a 6, 24 y 96 hs; observando un aumento significativo en el RTGB después de 96 hs de exposición.

Además, este aumento en el RTGB coincide también con los resultados del Capítulo 4 (Tabla 4.2), lo cual, como dijimos anteriormente, podría ser una respuesta adaptativa del organismo en presencia de contaminantes, dando como resultado una defensa inmunitaria más efectiva (Barreto-Medeiros y col., 2005). Bachetta y col., (2011), postulan que la leucocitosis reportada, puede ser atribuida a una mayor movilización de leucocitos para proteger el cuerpo contra posibles infecciones en los tejidos dañados por el insecticida. Otros autores argumentan que un incremento en el RTGB expuestos a insecticidas refleja un estado general de toxicosis, que deriva en un deterioro de los mecanismos de defensa (Dutta y col., 1992; Ramesh y Saravanan, 2008).

Contrariamente, en un estudio previo de nuestro grupo de trabajo, se observó que los caimanes de 20 días de edad, expuestos *in vivo* a la mayor concentración de Roundup[®] mostraron una disminución significativa en relación al CN (Latorre y col., 2013), y en este caso, se sugirió que este hecho podría deberse a que los recién nacidos aún poseen su SI inmaduro.

En cuanto al crecimiento de los animales, observamos un aumento significativo en LHC (para CIP y M) y peso (para la M), en relación al CN. Esto coincide en parte con lo expresado en el Capítulo 4, donde los animales expuestos a END, sufrieron un aumento significativo de peso y LHC en comparación con el CV. Relyea (2009), compararon en anuros la toxicidad de mezclas de insecticidas y de insecticidas con herbicidas frente a la de los compuestos aislados, y comprobaron que las mezclas presentaron un mayor efecto (mortalidad y alteraciones en la metamorfosis de los organismos) que los compuestos testeados por separado. Podríamos considerar que dadas las limitaciones del diseño experimental, debido a que se examinan diez plaguicidas diferentes, no se puede

determinar si estos efectos combinados se deben a interacciones aditivas o sinérgicas entre los plaguicidas, o a la mayor concentración total de plaguicidas.

Además, pudimos observar el aumento del peso de los animales en el grupo de CIP en comparación con el CN, aunque esto no llegó a ser significativo, podría deberse a la variabilidad de los datos generada por el "efecto nido", el cual fue explicado oportunamente en el Capítulo 3 (3.1).

Tanto como para LHC como para el peso, podríamos adjudicar que los aumentos significativo en la LHC en el grupo M, se debe al efecto de la CIP, ya que el mismo efecto fue observado para el compuesto por separado. Por el contrario para el peso no fue así, pero recordemos que ese aumento no llegó a ser significativo a pesar de que fueron sugeridas algunas razones del aumento detectado en el párrafo anterior.

Como mencionamos en el Capítulo 5 (5.5), el modo de acción exacto con el que actúan los compuestos en la mezcla es difícil de estimar y puede variar con diversas condiciones ambientales. Las propiedades químicas de cada formulación, la interacción con otros compuestos y el mecanismo de acción de cada tóxico, pueden producir efectos muy variables. Además, los factores no químicos que también pueden actuar como factores de estrés añaden una mayor complejidad a las múltiples situaciones (Beyer y col., 2014), como son los factores ambientales, ecológicos, las respuestas fisiológicas a esa interacción y la susceptibilidad individual de cada organismo frente a la exposición (Amaral y col., 2012).

Otro aspecto a tener en cuenta, tal como mencionamos en el Capítulo 4 (4.5), es que el período en el cual fueron expuestos los animales fue solo de 2 meses, lo cual podría ser un tiempo relativamente corto, ya que no se visualizaron alteraciones significativas en los parámetros estudiados en la mayoría de los grupos expuestos.

En nuestro país, existe un estudio muy reciente en el cual se evaluó por primera vez el destino ambiental del glifosato y su principal metabolito (ácido aminometilfosfónico, AMPA) en el agroecosistema de la Pampa Mesopotámica en relación con las prácticas agrícolas actuales en las granjas locales. El hallazgo principal del estudio fue que, de acuerdo con las dosis de pulverización y las frecuencias de glifosato obtenidas de los registros de manejo agrícola, y las concentraciones medidas del herbicida y su metabolito en el suelo, es posible afirmar que estos compuestos se comportan, en el estudio del agroecosistema, como contaminantes "pseudo-persistentes" (Primost y col., 2017). Además, otros investigadores han reportado que existen residuos de diferentes tipos de

plaguicidas en ecosistemas acuáticos principalmente y en suelos de la región pampeana (Primost, 2013; Carriquiriborde y col., 2014; Lupi y col., 2015; Astroviza y col., 2016; Ronco y col., 2016). Se sabe que estas mezclas de pesticidas son comúnmente aplicadas en los cultivos de soja entre dos y tres veces por ciclo de crecimiento, sumado a la escorrentía superficial causada principalmente por los eventos de lluvias durante esos períodos, hacen que los cuerpos de agua adyacentes a cultivos reciban varios pulsos de toxicidad por campaña agrícola (Demetrio y col., 2014; Ronco y col., 2016).

Durante los meses cálidos, en la provincia de Santa Fe (Argentina) y en gran parte del núcleo primario de producción de soja de Argentina, ocurren copiosas precipitaciones que causan un intensivo "lavado" de agroquímicos hacia compartimientos "no blanco" como los pequeños ecosistemas acuáticos (Jergentz y col., 2005).

Todo lo anteriormente descrito es muy importante, teniendo en cuenta que esta especie se caracteriza por pasar la mayor parte del tiempo en cuerpos de aguas someros, siendo las crías mayormente susceptibles a estas exposiciones simultáneas durante la etapa crítica del desarrollo.

Los resultados de nuestro estudio en condiciones seminaturales amplían y complementan la información previa obtenida en condiciones controladas de laboratorio (Latorre y col., 2013, 2016), permitiendo un mejor entendimiento de los efectos biológicos de los plaguicidas en las situaciones ambientales actuales. Consideramos que debemos seguir trabajando en lo que se refiere a exposiciones seminaturales, para que de esta manera obtener más resultados que permitan ampliar la información, ya que hasta el momento son escasos los estudios de este tipo y más aún en esta especie.

CAPÍTULO 7

CAPÍTULO 7.

Conclusiones finales.

Argentina es la décima nación agrícola más grande del mundo, con 31 millones de hectáreas dedicadas a la agricultura que representan el 2,2% del área total del mundo en cultivo (Ronco y col., 2016). El uso de plaguicidas aumentó en las últimas décadas ya que la agricultura se transformó gradualmente en un sistema de alta tecnología para satisfacer las crecientes demandas (Heinemann y col., 2013), y trajo aparejado, la presencia simultánea de agroquímicos en entornos rurales siendo un escenario muy frecuente (Svartz y col., 2016). En los últimos años en la provincia de Santa Fe, el crecimiento del modelo productivo agropecuario dependiente del uso de plaguicidas ha impactado negativamente sobre los ecosistemas naturales y en las especies que los componen (Medan y col., 2011; Magnasco y Di Paola, 2015).

En particular, el cultivo de soja transgénica utiliza gran variedad de químicos para el control de plagas y enfermedades, incluyendo al herbicida glifosato (GLI), curasemillas, fungicidas y la aplicación de insecticidas como Clorpirifos (CPF) y Cipermetrina (CIP), entre otros (CASAFE, 2016). Generalmente, las aplicaciones se producen en forma de mezclas complejas y están influenciadas por distintos factores ambientales (Beyer y col., 2014), sumado a las aplicaciones repetidas que se producen a lo largo del año por la rotación de cultivos y la aparición de resistencias, por lo que se hace prácticamente imposible calcular el grado exacto de exposición. Las consecuencias de dichas exposiciones sobre las poblaciones silvestres dependen de numerosos factores, incluyendo el tipo de principio activo, la composición de la formulación comercial, la toxicidad, las concentraciones aplicadas, la persistencia ambiental de cada compuesto, el momento y tipo de aplicación, y las circunstancias de exposición.

Los crocodrilianos son considerados componentes muy valiosos de los humedales tropicales, siendo especies claves ya que mantienen la estructura y funcionamiento de los ecosistemas naturales con sus actividades de predación selectiva, el reciclado de nutrientes, y la manutención de refugios húmedos durante las sequías (Messel y col., 1995; Ross, 1998). Su longevidad y territorialidad, son algunas de las características que se destacan para que puedan ser utilizados en diferentes estadios de vida como centinelas de contaminación ambiental (Mitchelmore y col., 2005). Además, demuestran que a pesar de vivir en ambientes con altas concentraciones de microorganismos patógenos, e incluso presentando serias heridas resultantes de sus comportamientos sociales agresivos, generalmente no manifiestan signos de infección (Manolis y col., 1991; Madsen, 1993; Madsen y col., 1998, Siroski, 2012). Estos animales poseen un sistema

inmune muy eficiente que les permite tolerar muchas de estas situaciones, de manera que cualquier factor externo que pueda modificar estos mecanismos podría tener efectos importantes en la supervivencia de estas especies.

Ante la problemática planteada, gran parte del hábitat natural del yacaré overo está siendo afectado por el avance de la frontera agrícola, quedando como ambientes fragmentados inmersos en grandes extensiones de tierras cultivadas.

En este trabajo de Tesis, en base a los resultados obtenidos, se pudo caracterizar el potencial efecto inmunotóxico de los compuestos bajo estudio, evaluados en neonatos y juveniles de yacaré overo, tanto en condiciones controladas de laboratorio como en condiciones *seminaturales* de exposición. Se han comprobado variaciones en los parámetros inmunológicos generados por las formulaciones comerciales de los insecticidas Endosulfán, Cipermetrina y Clorpirifos, y el herbicida Glifosato, así como sus mezclas complejas, en crías y juveniles de *C. latirostris*, bajo condiciones controladas de exposición.

Sin embargo, no ocurrió lo mismo para la etapa *in ovo*. A pesar de que existen antecedentes de efectos de los plaguicidas por topicación en la cáscara de huevo y pulverización del material de nido, no obtuvimos efectos sobre el SI en dicha etapa (Capítulo 3). Como mencionamos en el correspondiente capítulo, esto podría relacionarse a que las concentraciones de los plaguicidas utilizadas en esa etapa, pueden no haber sido lo suficientemente efectivas como para provocar alguna alteración detectable. Sumado a esto, la etapa temprana de desarrollo en la que los animales fueron expuestos además de una única exposición.

-De todos los parámetros inmunológicos analizados, los recuentos totales y diferenciales de glóbulos blancos, fueron los que mostraron mayor sensibilidad en los ensayos *in vivo* y en condiciones *seminaturales*.

-Generalmente, los parámetros de crecimiento evaluados no demostraron variaciones provocadas por la exposición a los plaguicidas, probablemente por tratarse de exposiciones subcrónicas que no llegaron a afectar los procesos bioenergéticos subyacentes.

-Las mezclas no mostraron mayor efecto que los compuestos por separado.

Estos hallazgos permiten aportar nuevas evidencias en relación al riesgo que esta especie en particular sufre continuamente en su área de distribución natural en Argentina, por la clara cercanía a áreas de cultivos con exposición a este tipo de agroquímicos. Cabe destacar que las concentraciones aplicadas son equivalentes a las que normalmente se utilizan a campo, lo que confirma la sensibilidad de *C. latirostris* como especie indicadora de daño y centinela de contaminación ambiental por plaguicidas.

Este trabajo doctoral pone al alcance de sus lectores, y también de los trabajos científicos que se publicaron como resultado de su investigación, una sólida evidencia acerca de las posibles consecuencias no deseadas y silenciosas que, en general como tales, no son tenidas en cuenta hasta el presente, a pesar de las referencias parciales ya comunicadas en congresos nacionales e internacionales así como en distintos artículos en revistas de la especialidad. Estos permiten alertar sobre el estado actual de desprotección de la biodiversidad de la región frente al avance de los tratamientos ambientales con agroquímicos así como de la población humana que convive con estos reptiles en estas regiones de nuestro país.

Este trabajo de Tesis es el primer trabajo en el cual se analizó el efecto de plaguicidas y mezclas de ellos sobre anticuerpos y sistema de complemento, no sólo en esta especie sino en todos los crocodrilianos a nivel mundial.

En base a estos resultados, es necesario continuar con la evaluación de los efectos de los plaguicidas, particularmente de mezclas complejas y en condiciones *seminaturales*.

Bibliografía citada

- Ader R y Cohen N. 1993. Psychoneuroimmunology: conditioning and stress. *Annu Rev Psychol.* 44 (1): 53-85.
- Aguirre AA, Balazs GH, Sprak TR, Gross TS. 1995. Adrenal and hematological responses to stress in juvenile green turtles (*Chelonia mydas*) with and without fibropapillomas. *Physiol Zool.* 68: 831-854.
- Aizen M, Garibaldi LA, Dondo M. 2009. Expansión de la soja y diversidad de la agricultura argentina. *Ecol Austral.* 19: 45-54.
- Aly NM y El Gendy KS. 2000. Effect of dimethoate on the immune system of female mice. *J Environ Sci Health. Part B.* 35 (1): 77-86.
- Amaral MJ, Sanchez Hernandez JC, Bicho RC, Carretero MA, Valente R, Faustino AMR, Soares AMVM, Mann RM. 2012. Biomarkers of exposure and effect in a lacertid lizard (*Podarcis bocagei Seoane*) exposed to chlorpyrifos. *Environ Toxicol Chem.* 31: 2345-2353.
- Amaral MJ, Carretero MA, Bicho RC, Soares AMVM, Mann RM. 2012a. The use of a lacertid lizard as a model for reptile ecotoxicology studies: part 1 field demographics and morphology. *Chemosphere.* 87: 757-764.
- Amaral MJ, Bicho RC, Carretero MA, Sanchez Hernandez JC, Faustino AMR, Soares AMVM, Mann RM. 2012b. The use of a lacertid lizard as a model for reptile ecotoxicology studies: part 2 biomarkers of exposure and toxicity among pesticide exposed lizards. *Chemosphere.* 87: 765-774.
- Andersson U, Bird AG, Britton S, Palacios R. 1981. Humoral and cellular immunity in humans studied at the cell level from birth to two years of age. *Immunol Rev.* 57: 5-38.
- Antoniou M, Brack P, Carrasco A, Fagan J, Habib M, Kageyama P, Leifert C, Onofre Nodari R, Pengue W. 2010. Soja transgénica: ¿Sostenible? ¿Responsable? Un resumen de los resultados principales. Disponible en: *GLS Gemeinschaftsbank eG www.gls.de / ARGE Gentechnik-frei www.gentechnikfrei.at*
- Anwar K. 2003. Toxic Effects of Cypermethrin on the biochemistry and morphology of 11th day chick embryo (*Gallus domesticus*). *Pak J Applied Sci.* 3 (6): 432-445.
- Arregui MC, Scotta RR, Sánchez DE. 2009. Fitotoxicidad del barbecho químico en trigo y maíz. *Agrociencia.* 43 (6): 595-601.
- Astoviza MJ, Cappelletti N, Bilos C, Migoya MC, Colombo JC. 2016. Massive airborne Endosulfan inputs related to intensive agriculture in Argentina's Pampa. *Chemosphere.* 144: 1459-1466.

- Atamanalp M, Keleş MS, Haliloğlu HI, Aras MS. 2002. The effects of cypermethrin (a synthetic pyrethroid) on some biochemical parameters (Ca, P, Na and TP) of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Turk J Vet Anim Sci. 26 (5): 1157-1160.
- Attademo AM, Cabagna Zenklusen M, Lajmanovich RC, Peltzer PM, Junges C, Bassó A. 2011. B-esterase activities and blood cell morphology in the frog *Leptodactylus chaquensis* (Amphibia: Leptodactylidae) on rice agroecosystems from Santa Fe Province (Argentina). Ecotoxicol. 20 (1): 274-282.
- Bacchetta C, Cazenave J, Parma MJ. 2011. Responses of biochemical markers in the fish *Prochilodus lineatus* exposed to a commercial formulation of endosulfan. Water Air Soil Pollut. 216 (1-4): 39-49.
- Bacchetta C. 2013. Toxicidad y efectos fisiológicos del insecticida Endosulfán en peces neotropicales. Santa Fe. Tesis Doctoral: Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Argentina. 115 p.
- Badii M, Garza V, Landeros J. 2006. Efecto de los plaguicidas en la fauna silvestre. CULCyT. 3 (14-15): 22-44.
- Barboza NN, Mussart NB, Coppo JA, Fioranelli SA, Koza GA. 2008. El medio interno de *Caiman latirostris* en cautiverio. Influencia del sexo, crecimiento y estación del año. Rev Vet. 19: 33-41.
- Barreto Medeiros JM, Feitoza EG, Magalhães K, Da Silva RR, Manhães de Castro FM, Manhães de Castro R, De Castro CMMB. 2005. The expression of an intraspecific aggressive reaction in the face of a stressor agent alters the immune response in rats. Braz J Biol. 65: 203–209.
- Basu N, Scheuhammer AM, Bursian SJ, Elliott J, Rouvinen Watt K, Chan HM. 2007. Mink as a sentinel species in environmental health. Environ Res. 103 (1): 130-144.
- Bejarano González F, Souza Casadinho J, Weber JM, Guadarrama Zugasti C, Escamilla Prado E, Beristáin Ruiz B, Acosta M, Cárcamo MI, Ramírez Muñoz F. 2009. El endosulfán y sus alternativas en América Latina. Red de Acción sobre Plaguicidas y sus Alternativas para América Latina. p 148. International PoPs Elimination Network.
- Beldoménico PM, Rey F, Prado WS, Villarreal JC, Muñoz de Toro M, Luque EH. 2007. In ovum exposure to pesticides increases the egg weight loss and decreases hatchlings weight of *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae). Ecotoxicol Environ Saf. 68 (2): 246-251.
- Beutler B. 2004. Innate immunity: an overview. Mol Immunol. 40: 845-859.

- Beyer J, Petersen K, Song Y, Ruus A, Grung M, Bakke T, Tollefsen KE. 2014. Environmental risk assessment of combined effects in aquatic ecotoxicology: a discussion paper. *Mar Environ Res.* 96: 81-91.
- Bishop CA, Ng P, Pettit KE, Kennedy SW, Stegeman JJ, Norstrom RJ, Brooks RJ. 1998. Environmental contamination and developmental abnormalities in eggs and hatchlings of the common snapping turtle (*Chelydra serpentina serpentina*) from the Great Lakes St Lawrence River basin (1989-1991). *Environ Pollut.* 101 (1): 143-156.
- Blakley BR. 1997. Effect of roundup and tordon 202C herbicides on antibody production in mice. *Vet Hum Toxicol.* 39 (4): 204-206.
- Bolsa de cereales de Buenos Aires, [updated 2018 Octubre 2]. Panorama agrícola semanal: soja [Internet]; [cited 2018 Octubre 2]. Available from: (<http://www.bolsadecereales.com>).
- Bonifacio AF, Cazenave J, Bacchetta C, Ballesteros ML, Bistoni MDA, Amé MV, Bertrand L, Hued, AC. 2016. Alterations in the general condition, biochemical parameters and locomotor activity in *Cnesterodon decemmaculatus* exposed to commercial formulations of chlorpyrifos, glyphosate and their mixtures. *Ecol Indic.* 67: 88-97.
- Brodeur JC, Poliserpi MB, Sánchez M. 2014. Synergy between glyphosate-and cypermethrin-based pesticides during acute exposures in tadpoles of the common South American Toad *Rhinella arenarum*. *Chemosphere.* 112: 70-76.
- Brodkin MA, Madhoun H, Rameswaran M, Vatnick I. 2007. Atrazine is an immune disruptor in adult northern leopard frogs (*Rana pipiens*). *Environ Toxicol Chem.* 26 (1): 80-84.
- Brown GW, Bennett AF, Pott JM. 2008. Regional faunal decline: reptile occurrence in fragmented rural landscapes of south-eastern Australia. *Wildl Res.* 35: 8-18.
- Burella P, Simoniello MF, Poletta GL. 2017. Evaluations of stage-dependent genotoxic effect of Roundup® (glyphosate) on *Caiman latirostris* embryos. *Arch Environ Con Tox.* 72 (1): 50-57.
- Burnham DK, Lackey A, Manering M, Jaensson E, Pearson J, Tyler DO, Melson D, Talent LG. 2003. Effects of 17 α -ethinylestradiol on immune parameters in the lizard *Sceloporus occidentalis*. *Environ Toxicol.* 18 (4): 211-218.
- Cabagna MC, Lajmanovich RC, Stringhini G, Sanchez Hernandez JC, Peltzer PM. 2005. Hematological parameters of health status in the common toad *Bufo arenarum* in agroecosystems of Santa Fe Province, Argentina. *Appl Herpetol.* 2 (4): 373-380.

-Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE). 2010. Documento Herbicidas. Disponibles en:

<https://kardauni08.files.wordpress.com/2010/09/herbicidas.pdf>

-Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE). 2011.

-Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE). 2016. TABLA Clasificación de Plaguicidas según la OMS – Anexo B Juan I. Pina. <http://www.casafe.org/publicaciones>. [En línea] consultado: 14/7/16.

-Campbell RD, Law SKA, Reid KBM, Sim RB. 1988. Structure, organization, and regulation of the serum complement genes. *Annu Rev Immunol*. 6: 161.

-Campbell KR. 2003. Ecotoxicology of crocodylians. *Appl Herpetol*. 1: 45-163.

-Campbell TW. 2006. Clinical pathology of reptiles. En: *Reptile medicine and surgery*. 2nd ed. Mader DR, (Ed). St. Louis: Saunders Elsevier.

-Campbell TW y Ellis CK. 2007. Avian and Exotic Animal hematology and Citology. 3rd Ed. Hematology of Reptiles. Blackwell publishing. Chapter 2, p 51-81. Ames (USA).

-Canesini G, Durando ML, Galoppo GH, Luque EH, Muñoz del Toro M. 2013. Caracterización del yacaré como modelo para estudio de Obesógenos ambientales. Congreso: LVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC); Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Mar del Plata, Argentina.

-Cañas JE y Anderson TA. 2002. Organochlorine contaminants in eggs: the influence of contaminated nest material. *Chemosphere*. 47: 585-589.

-Carey CN, Cohen A, Rollins Smith L. 1999. Amphibian declines: an immunological perspective. *Develop Comp Immunol*. 23: 459-472.

-Carrascal Velásquez J, Negrete Cartagena H, Rojano Bolano C, Alvarez Otero G, Chacon Pacheco J, Linares Arias J. 2014. Caracterización hematológica de hicotecas (*Trachemys callirostris* Gray, 1856) en Córdoba, Colombia. *Rev Med Vet*. 28:43-55.

-Carrasco AE, Sánchez NE, Tamagno LE. 2012. Modelo agrícola e impacto socioambiental en la Argentina: monocultivo y agronegocios. Serie Monográfica Sociedad y Ambiente: Reflexiones para una nueva América Latina. Primera edición electrónica, AUGM-Comité de Medio Ambiente. Frangi JL. (Ed.). SeDiCI (Servicio de Difusión de la Creación Intelectual), UNLP La Plata, Argentina. ISSN 2314-1743, Monografía N° 1: 135 p.

- Carrquiriborde P, Mirabella P, Waichman A, Solomon K, Van den Brink PJ, Maund S. 2014. Aquatic Risk Assessment of Pesticides in Latin America. Integr. Environ Assess Manag. 10 (4): 539-542.
- Cavallo A. 2006. Plaguicidas: qué son y cómo usarlos. SIMA Ed. p 189. Córdoba. Argentina.
- Charruau P, Hénaut Y, Álvarez Legorreta T. 2013. Organochlorine pesticides in nest substratum and infertile eggs of *American crocodiles* (Reptilia, Crocodylidae) in a Mexican Caribbean atoll. Caribb J Sci. 47 (1): 1-12.
- Christin MS, Gendron AD, Brousseau P, Ménard L, Marcogliese DJ, Cyr D, Ruby S, Fournier, M. 2003. Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Rana pipiens* and on its resistance to parasitic infection. Environ Toxicol Chem. 22 (5): 1127-1133.
- Christin MS, Menard L, Gendron AD, Ruby S, Cyr D, Marcogliese DJ, Rollins Smith L, Fournier M. 2004. Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*. Aquatic toxicol. 67 (1): 33-43.
- Cid R. 2014. Aplicación eficiente de fitosanitarios. Cap 2: Plaguicidas químicos, composición y formulaciones, etiquetado, clasificación toxicológica, residuos y métodos de aplicación. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Disponible en: <http://inta.gob.ar/documentos/aplicacion-eficiente-de-fitosanitarios.-plaguicidas-quimicos-composicion-y-formulaciones-etiquetado-clasificacion-toxicologica-residuos-y-metodos-de-aplicacion>.
- Ciliberti A, Martin S, Ferrandez E, Belluco S, Rannou B, Dussart C, Berny P, de Buffrenil V. 2013. Experimental exposure of juvenile savannah monitors (*Varanus exanthematicus*) to an environmentally relevant mixture of three contaminants: effects and accumulation in tissues. Environ Sci Pollut R. 20 (5): 3107-3114.
- Coalova I, Mencacci S, Fassiano AV. 2013. Genotoxicidad de mezclas de pesticidas: ¿algo más que la suma de las partes?. Acta toxicol Argent. 21 (1): 5-14.
- Coico R, Sunshine G, Benjamini E. 2003. Immunology: A short course. 5th edition. Wiley J, y Sons, Inc, Hoboken. p 245-247. New Jersey, USA.
- Collado VM, Porras R, Cutuli MT. 2008. The innate immune system. I: Mechanisms. Rev Compl Ciencias Vet. 2: 1-16.
- Coppo JA. 2001. Fisiología Comparada del Medio Interno. Dunken. p 297. Buenos Aires.
- Cotter PF. 1998a. Denaturation kinetics of chicken hemagglutinins using 2-mercaptoethanol and heat. Poult Sci. 77 (1): 100.

- Cotter PF. 1998b. Naturally occurring rabbit erythrocyte agglutinins in fowl sera. *Poult. Sci.* 77 (1): 100.
- Crain DA y Gillette Jr LJ. 1998. Reptiles as models of contaminant induced endocrine disruption. *Anim Reprod Sci.* 53: 77-86.
- Crain DA, Guillette LJ, Pickford DB, Percival HF, Woodward AR. 1998a. Sex-steroid and thyroid hormone concentrations in juvenile alligators (*Alligator mississippiensis*) from contaminated and reference lakes in Florida, USA. *Environ Toxicol Chem.* 17 (3): 446-452.
- Crews D, Bull JJ, Wibbel T. 1991. Estrogen and sex reversal in turtles: a dose-dependent phenomenon. *Gen Comp Endocrinol.* 81: 357-364.
- Crocodile Specialist Group (CSG). Crocodilian species. [En línea], Consulta: Junio de 2016. Disponible en: <http://www.iucncsg.org/pages/Crocodilian-Species.html>.
- Cunha I y Guilhermino L. 2006. Environmental monitoring protocol for selection of sentinel species and collection of specimens. *EROCIPS.* 1-3.
- Dalmasso AP, Falk RJ, Raij L. 1989. The pathobiology of the terminal complement complexes. *Complement Inflamm.* 6: 36- 48.
- de Cock M y van de Bor M. 2014. Obesogenic effects of endocrine disruptors, what do we know from animal and human studies?. *Environ Int.* 70: 15-24.
- Demetrio PM, Bonetto C, Ronco AE. 2014. The Effect of Cypermethrin, Chlorpyrifos, and Glyphosate Active Ingredients and Formulations on *Daphnia magna* (Straus). *Bull Environ Contam Toxicol.* 93: 268-273.
- de Solla SR y Martin PA. 2011. Absorption of current use pesticides by snapping turtle (*Chelydra serpentina*) eggs in treated soil. *Chemosphere.* 85: 820-825.
- de Solla SR, Palonen E, Martin PA. 2014. Toxicity of pesticides associated with potato production, including soil fumigants, to snapping turtle eggs (*Chelydra serpentina*). *Environ Toxicol Chem.* 33 (1): 102-106.
- Díaz Portillo J, Fernández del Barrio MT, Parede Salido F. 1996. Aspectos básicos de Bioquímica clínica. 1ª edición. Ediciones Díaz de Santos, S.A, Madrid, España.
- Donald PF. 2004. Biodiversity impacts of some agricultural commodity production systems. *Conser Biol.* 18 (1): 17-37.
- Dorf ME y Benacerraf B. 1984. Suppressor cells and immunoregulation. *Annu Rev Immunol.* 2 (1): 127-157.
- Dorucu M y Girgin A. 2001. The effect of cypermethrin on some haematological parameters of *Cyprinus carpio*. *Aquaculture.* 9: 183-187.

- Du Pasquier L. 2001. The immune system of invertebrates and vertebrates. *Comp Biochem Physiol.* 129: 1-15.
- Durrbach A, Baple E, Preece AF, Charpentier B, Gustafsson K. 2007. Virus recognition by specific natural antibodies and complement results in MHC I cross-presentation. *Eur J Immunol.* 37: 1254-1265.
- Dutta HM, Dogra JVV, Singh NK, Roy PK, Nasar STT, Adhakari S, Munshi JSD, Richmonds CR. 1992. Malathion induced changes in serum protein and hematological parameters of Indian catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch.). *Bull Environ Contam Toxicol.* 49: 91-97.
- Eaton DL y Klassen CD. 2005. Principios de Toxicología. En: *Fundamentos de Toxicología.* Klassen CD, Watkins JB. (Eds.). 2: 7-22. Casarett y Doull, McGraw-Hill/Interamericana, Madrid, España.
- Eatwell K, Hedley J, Barron R. 2014. Reptile haematology and biochemistry. In *Practice.* 36 (1): 34-42.
- Ecobichon DJ. 2005. Efectos Tóxicos de los pesticidas. En: *Fundamentos de Toxicología.* Klaassen CD, Watkins JB. (Eds.). Casarett y Doull, McGraw-Hill /Interamericana, Madrid, España, (22): 339-353.
- Eisenreich KM y Rowe CL. 2013. Experimental exposure of eggs to polybrominated diphenyl ethers BDE-47 and BDE-99 in red-eared sliders (*Trachemys scripta elegans*) and snapping turtles (*Chelydra serpentina*) and possible species-specific differences in debromination. *Environ Toxicol Chem.* 32 (2): 393-400.
- EXTOXNET. 1996. The Extension Toxicology Network. Pesticide Information Profiles (PIPs). Disponible en: <http://extoxnet.orst.edu/>. Consultado: Junio de 2016.
- Fagotti A, Morosi L, Di Rosa I, Clarioni R, Simoncelli F, Pascolini R, Pellegrino R, Guex GD, Hotz H. 2005. Bioaccumulation of organochlorine pesticides in frogs of the *Rana esculenta* complex in central Italy. *Amphibia-Reptilia.* 26 (1): 93-104.
- FAO/WHO Joint Meeting on Pesticide Specifications (JMPS). Manual on development and use of FAO and WHO specifications for pesticides. Second Revision.
- Fatima M, Mandiki SNM, Douxfils J, Silvestre F, Coppe P, Kestemont P. 2007. Combined effects of herbicides on biomarkers reflecting immune endocrine interactions in goldfish. *Immune and antioxidant effects.* *Aquat Toxicol.* 81: 159-167.
- Favoreel HW, Van de Walle GR, Nauwynck HJ, Pensaert MB. 2003. Virus complement evasion strategies. *J Gen Virol.* 84: 1-15.

- Fearon ER. 1997. Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science*. 7: 1043-1050.
- Ferguson MWJ. 1981. The application of embryological studies of alligator farming. En: *Proceedings of the first annual alligator production conference*. Cardeilhac P, Lane T, Larsen R. (Eds.). p 129-145. University of Florida, Gainesville.
- Ferguson MWJ. 1985. The reproductive biology and embryology of crocodylians. En: Gans C, Billet F, Maderson PFA, (Eds.). *Biology of the Reptilia*, Wiley. 14: 329-491. New York.
- Ferronato BO, Merchant ME, Marques TS, Verdade LM. 2009. Characterization of innate immune activity in *Phrynops geoffroanus* (Testudines: Chelidae). *Zoologia*. 26 (4): 747-752.
- Feyereisen R. 1995. Molecular biology of insecticide resistance. *Toxicol Lett*. 82: 83-90.
- Finger Jr JW y Gogal Jr RM. 2013. Endocrine-disrupting chemical exposure and the American alligator: a review of the potential role of environmental estrogens on the immune system of a top trophic carnivore. *Arch Environ Contam Toxicol*. 65 (4): 704-714.
- Finger JW. 2014. Stressor Induced Immunomodulation in Crocodylians. Estados Unidos. Tesis Doctoral: North Carolina State University, Athens, Georgia. 232 p.
- Fischer J y Lindemayer DB. 2007. Landscape modification and habitat fragmentation: a synthesis. *Glob Ecol Biogeogr*. 16: 265-280.
- Franz JE, Mao MK, Sikorski JA. 1997. Glyphosate's Molecular Mode of Action. En: *Glyphosate: a unique global herbicide*. American Chemical Society. p 521-615. Washington, USA.
- Freeman JL y Rayburn AL. 2004. *In vivo* genotoxicity of atrazine to anuran larvae. *Mutat Res*. 560: 69-78.
- Gendron AD, Marcogliese DJ, Barbeau S, Christin MS, Brousseau P, Ruby S, Cyr D, Fournier M. 2003. Exposure of leopard frogs to a pesticide mixture affects life history characteristics of the lungworm *Rhabdias ranae*. *Oecologia*. 135 (3): 469-476.
- Giesy JP, Dobson S, Solomon KR. 1999. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup herbicide. *Rev Environ Contam Toxicol*. 167: 35-120.
- Gluszczak L, dos Santos Miron E, Crestani M, Braga da Fonseca M, de Araújo Pedron F, Frescura Duarte M, Pimentel Vieira VL. 2006. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Ecotoxicol Environm Saf*. 65: 237-241.

- Gómez González B y Escobar A. 2006. Estrés y sistema inmune. Rev Mex Neuroci. 7 (1): 30-8.
- Gonzalez R, Charlemagne J, Mahana W, Avrameas S. 1988. Specificity of natural serum antibodies present in phylogenetically distinct fish species. Immunol. 63 (1): 31.
- Graney RL, Giesy JP, Clark JR. 2003. Field Studies. En: Fundamentals of Aquatic Toxicology. Effects, Environmental Fate and Risk Assessment, 2nd. Ed. Rand GM, (Ed.). p 257-306. Taylor & Francis.
- Grasman KA, Fox GA, Scanlon PF, Ludwig JP. 1996. Organochlorine-associated immunosuppression in prefledgling Caspian terns and herring gulls from the Great Lakes: an ecoepidemiological study. Environ Health Perspect. 104: 829-842.
- Grasman KA y Fox GA. 2001. Associations between altered immune function and organochlorine contamination in young Caspian terns (*Sterna caspia*) from Lake Huron, 1997–1999. Ecotoxicol. 10 (2): 101-114.
- Grau HR, Aide TM, Gasparri NI. 2005. Globalization and soybean expansion into semiarid ecosystems of Argentina. J Hum Environ. 34 (3): 265-266.
- Gregory CR, Latimer KS, Fontenot DK, Lamberski N, Campagnoli RP. 2004. Chronic monocytic leukemia in an inland bearded dragon, *Pogona vitticeps*. J Herpetol Med Surg. 14 (2): 12-6.
- Guillette Jr LJ, Pickford DB, Crain DA, Rooney AA, Percival HF. 1996. Reduction in penis size and plasma testosterone concentrations in juvenile alligators living in a contaminated environment. Gen Comp Endocrinol. 101 (1): 32-42.
- Guillette LJ. 2000. Contaminant-associated endocrine disruption in reptiles. En: Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles. Sparling DW, Linder G, Bishop CA. (Eds.). SETAC, Pensacola, FL. p 595-615. USA.
- Gunderson MP, Bermudez DS, Bryan TA, Degala S, Edwards TM, Kools SA, Milnes MR, Woodward AR, Guillette Jr LJ. 2004. Variation in sex steroids and phallus size in juvenile American alligators (*Alligator mississippiensis*) collected from 3 sites within the Kissimmee–Everglades drainage in Florida (USA). Chemosphere. 56 (4): 335-345.
- Halloran PF, Autenried P, Ramassar V, Urmson J, Cockfield S. 1992. Local T-cell responses induce widespread Mhc expression evidence that lfn gamma induces its own expression in remote sites. J Immunol. 148 (12): 3837-46.

- Hang S, Rampoldi EA, Negro GJ. 2011. Herbicide behavior in non-tillage systems. En: Piotrowski KD. (Ed.), *Herbicides: Properties, Crop Protection and Environmental Hazards*. Nova Science Publishers. Vol. 3. p 121- 159. New York, USA, ISBN: 978-1 61209-301-7.
- Harikrishnan VR y Usha S. 2004. Endosulfán – Hoja informativa y Respuestas a preguntas frecuentes. Thanal Conservation Action / Information Network L-14 Jawahar Nagar, Kowdiar, Thiruvananthapuram, 695 003. p 22. Kerala, India.
- Heinemann JA, Agapito Tenfen SZ, Carman JA. 2013. A comparative evaluation of the regulation of GM crops or products containing dsRNA and suggested improvements to risk assessments. *Environ Int.* 55: 43-55.
- Hii YS, Lee MY, Chuah TS. 2007. Acute toxicity of organochlorine insecticide endosulfan and its effect on behaviour and some hematological parameters of Asian swamp eel (*Monopterus albus*, Zuiew). *Pestic Bioch Phys.* 89 (1): 46-53.
- Hoar WS. 1983. *General and Comparative Physiology*, 3rd ed. Prentice-Hall, p 848. New Jersey.
- Hopkins W. 2005. Use of Tissue Residues in Reptile Ecotoxicology: A Call for Integration and Experimentalism. En: *Toxicology of Reptiles. New perspectives: Toxicology and the Environment*. Gardner SC, Oberdörster E. (Eds.). Taylor & Francis Group. Vol. 3. p 35-62. Florida, USA.
- Hua J, Morehouse N, Relyea R. 2013. Pesticide tolerance in amphibians: Induced tolerance in susceptible populations, constitutive tolerance in tolerant populations. *Evol Appl.* 6: 1028-1040.
- Huchzermeyer FW. 2002. Diseases of farmed crocodiles and ostriches. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 21: 273-274.
- Iannacone J y Alvariño L. 2008. Efecto ecotoxicológico del metomilo en *Corydoras Lacépède*, 1803 (Siluriformes: callichthyidae) y su caracterización leucocitaria. *Ecol Apl.* 7 (1-2): 55-61.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 2015. World Health Organization. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans* Lyon, France. <http://www.iarc.fr/en/mediacentre/iarcnews/pdf/MonographVolume112.pdf>. Consultado: Julio de 2016.
- IPCS Environmental Health Criteria 225. 2001. *Principles For Evaluating Health Risks To Reproduction Associated With Exposure To Chemicals*, Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.

- Lungman J, Piña CI, Siroski P. 2008. Embryological development of *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae). *Genesis*. 46 (8): 401-417.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra JD. 1999. Immunobiology: the immune system in health and disease. London: Current Biology Publications.
- Jergentz S, Mugni H, Bonetto C, Schulz R. 2005. Assessment of insecticide contamination in runoff and stream water of small agricultural streams in the main soybean area of Argentina. *Chemosphere*. 61: 817-826.
- Johnstone CP, Lill A, Reina RD. 2012. Does habitat fragmentation cause stress in the agile antechinus? A haematological approach. *J Comp Physiol B*. 182: 139-155.
- Kalinov A. 1984. El Laboratorio y su Interpretación Semiológica. 2º ed. López Libreros. p 1209. Buenos Aires.
- Keller JM, Kucklick JR, Stamper MA, Harms CA, McClellan Green PD. 2004. Associations between organochlorine contaminant concentrations and clinical health parameters in loggerhead sea turtles from North Carolina, USA. *Environ Health Perspect*. 107: 1074-1079.
- Keller JM, Peden Adams MM, Alonso Aguirre A. 2005. Immunotoxicology and implications for reptilian health. En: *Toxicology of Reptiles. New perspectives: Toxicology and the Environment*. Gardner SC, Oberdörster E. (Eds.). p 199-240. Taylor & Francis Group. Florida, USA.
- Keller JM, McClellan Green PD, Kucklick JR, Keil DE, Peden Adams MM. 2006. Effects of organochlorine contaminants on loggerhead sea turtle immunity: comparison of a correlative field study and *in vitro* exposure experiments. *Environ Health Perspect*. 114: 70-76.
- Kendall RJ, Funsch M, Bens M. 1990. Use of wildlife for on-site evaluation of bioavailability and ecotoxicity of toxic substances found in hazardous waste sites. En: *In situ Evaluations of Biological Hazards of Environmental Pollutants*. Sandhu SS, Lower WR, de Serres FJ, Suk WA, Tice RR. (Eds.). 38: 241-255. Environmental Science Research, Springer, Boston, MA.
- Killpack TL y Karasov WH. 2012. Ontogeny of adaptive antibody response to a model antigen in captive altricial zebra finches. *PloS One*. 7 (10): e47294.
- Kirschfink M y Mollnes TE. 2003. Modern Complement Analysis. *Clin Diagn Lab Immunol*. 10: 982-989.
- Klesius PH. 1990. Effect of size and temperature on the quantity of immunoglobulin in channel catfish, *Ictalurus punctatus*. *Vet Immunol Immunopathol*. 24: 187-195.

- Knotek Z, Hauptman K, Knotkova Z, Hajkova P, Tich F. 2002. Renal Disease Haemogram and Plasma Biochemistry in Green Iguana. *Acta Vet Brno*. 71: 333-340.
- Knotkova Z, Knotek Z, Trnkova S, Mikulcova P. 2006. Blood profile in green iguanas after short-term anaesthesia with propofol. *Vet Med*. 51 (10): 491-496.
- Kohler H, Bayry J, Nicoletti A, Kaveri SV. 2003. Natural autoantibodies as tools to predict the outcome of immune response?. *Scand J Immunol*. 58: 285-289.
- Koppenheffer TL. 1987. Serum complement systems of ectothermic vertebrates. *Develop Comp Immunol*. 11: 279-286.
- Krieger R. 2010. Handbook of Pesticide Toxicology, Two-Volume Set: Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology, 3rd edition, Academic Press, p 1186. México.
- Krogh K, Halling Sorensen B, Mogensen B, Vejrup K. 2003. Environmental properties and effects of nonionic surfactant adjuvants in pesticides: a review. *Chemosphere*. 50: 871-901.
- Lafuente Giménez MA, Paternáin JL, Hardisson A. 2001. Riesgos toxicológicos por la exposición a metales. *Rev Asoc Esp Toxicol*. 18 (3): 139-141.
- Lajmanovich RC y Peltzer PM. 2008. Plan de monitoreo ambiental para el estudio del impacto de cultivos extensivos de arroz sobre el macrosistema Iberá. Cátedra de Ecotoxicología. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral-CONICET.
- Larriera A. 1991. Cría en granjas: una alternativa de manejo para los caimanes argentinos (Revisión Bibliográfica). *Revista Argentina de Producción Animal*. 11: 479-484.
- Larriera A. 1992. La conservación y el manejo de *Caiman latirostris* en la Argentina. *Anais do II Workshop sobre Conservação e Manejo do Jacaré-de-Papo-Amarelo (Caiman latirostris)*. CIZBAS/ESALQ, Universidade de Sao Paulo. Piracicaba, Brasil, p 8-17.
- Larriera A. 1993. La conservación y el manejo de *Caiman latirostris* en Santa Fe, Argentina. En: *Anais do 3º Workshop sobre Conservação e manejo do Jacaré-de-papo-amarelo*. Verdade LM, Packer IU, Rocha MB, Molina FB, Duarte PG, Lula LABM. (Eds.). CIZBAS/ESALQ. Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil. p 61-69.
- Larriera A. 1994. *Caiman latirostris* ranching program in Santa Fe, Argentina, with the aim of management. *Crocodiles. Proceedings of the 12th Working Meeting of the CSG/IUCN*. The World Conservation Union. Gland, Switzerland, p 188-198.
- Larriera A. 1995. Áreas de nidificación y momento óptimo de cosecha de huevos de *Caiman latirostris* en Santa Fe, Argentina. En: *La conservación y el manejo de caimanes y*

cocodrilos de América Latina. Larriera A, Verdade LM. (Eds.). Fundación Banco Bica, Santo Tomé, Argentina. (1): 221-232.

-Larriera A e Imhof A. 2000. Proyecto Yacaré, Santa Fe, Argentina: a sustainable use proposal. Proceedings of the 15th working meeting of the CSG IUCN- The World Conservation Union, Gland, Switzerland and Cambridge, UK. p 311-313.

-Larriera A e Imhof A. 2006. Proyecto Yacaré: Cosecha de huevos para cría en granjas del género *Caiman* en la Argentina. En: Manejo de Fauna Silvestre en la Argentina. Programas de uso sustentable. Bolkovic M, Ramadori D. (Eds.). p 51-64. Dirección de Fauna Silvestre, Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Buenos Aires, Argentina.

-Larriera A, Imhof A, Siroski P, 2008. Estado actual de los programas de conservación y manejo del género *Caiman* en Argentina. En: Contribución al conocimiento del Género *Caiman* de Suramerica. Castroviejo J, Ayarzagüena J, Velasco A. (Eds.). p 294. Public Assoc Amigos de Doña Ana 18, Sevilla, España.

-Latorre MA, López González EC, Larriera A, Poletta GL, Siroski P. 2013. Effects of *in vivo* exposure to Roundup® on immune system of *Caiman latirostris*. J Immunotoxicol. 10 (4): 349-354.

-Latorre MA, López González EC, Siroski PA, Poletta GL. 2015. Basal frequency of micronuclei and hematological parameters in the Side necked Turtle, *Phrynops hilarii* (Duméril & Bibron, 1835). Acta Herpetol. 10 (1): 31-37.

-Latorre MA, Romito ML, Larriera A, Poletta GL, Siroski PA. 2016. Total and Differential White Blood Cells Count in *Caiman latirostris* After *In Ovo* and *In Vivo* Exposure to Insecticides. J Immunotoxicol. 13 (6): 903-908.

-LeBlanc GA y Bain LJ. 1997. Chronic Toxicity of Environmental Contaminants: Sentinels and Biomarkers. Environm Health Perspect. 105 (1): 65-80. .

-Lewis SM, Bates I, Bain BJ. 2008. Dacie and Lewis. Hematología práctica. 10ª edición. p 41. Editorial Elsevier, España.

-Liu P, Song X, Yuan W, Wen W, Wu X, Li J, Chen X. 2006. Effects of cypermethrin and methyl parathion mixtures on hormone levels and immune functions in Wistar rats. Arch Toxicol. 80 (7): 449-457.

-Lochmiller RL. 1996. Immunocompetence and animals population regulation. Oikos. 76: 594-602.

- Lopes P, Sucena E, Santos M, Magalhaes S. 2008. Rapid experimental evolution of pesticide resistance in *C. elegans* entails no costs and affects the mating system. PLoS One. 3:e3741
- López González EC, Latorre MA, Larriera A, Siroski PA, Poletta GL. 2013. Induction of micronuclei in broad snouted caiman (*Caiman latirostris*) hatchlings exposed *in vivo* to Roundup® (glyphosate) concentrations used in agriculture. Pestic Biochem Physiol. 105: 131-134.
- López González EC, Larriera A, Siroski PA, Poletta GL. 2017. Micronuclei and other nuclear abnormalities on *Caiman latirostris* (Broad-snouted caiman) hatchlings after embryonic exposure to different pesticide formulations. Ecotoxicol Environm Saf. 136: 84-91.
- Lupi L, Miglioranza KSB, Aparicio VC, Marino D, Bedmar F, Wunderlin DA. 2015. Occurrence of glyphosate and AMPA in an agricultural watershed from the southeastern region of Argentina. Sci Total Environ. 536: 687-694.
- Lydy M, Belden J, Wheelock C, Hammock B, Denton D. 2004. Challenges in regulating pesticide mixtures. Ecol Soc. 9: 1-13
- Madsen M. 1993. Microbial flora of frozen tail meat from captive Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*). Int J Food Microbiol. 18: 71-76.
- Madsen M, Hangartner P, West K. 1998. Recovery rates, serotypes, and antimicrobial susceptibility patterns of salmonellae isolated from cloacal swabs of wild Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in Zimbabwe. J Zoo Wildl Med. 29: 31-34.
- Madsen T, Ujvari B, Nandakumar KS, Hasselquist D, Holmdahl R. 2007. Do "infectious" prey select for high levels of natural antibodies in tropical pythons?. Evol Ecol. 21 (2): 271-279.
- Magnasco E y Di Paola MM. 2015. AGROQUÍMICOS EN ARGENTINA ¿Dónde estamos? ¿A dónde vamos? INFORME AMBIENTAL ANUAL 2015 FARN (Fundación Ambiente y Recursos Naturales). Disponible en: <http://www.farn.org.ar/wp-content/uploads/2015/06/InformeFARN2015.pdf>.
- Mahananda MR y Mohanty BP. 2012. Toxicity on Biochemical and Hematological Parameters in *Bufo Melanostictus* (Schneider) (Common Indian Toad) Exposed to Malathion. Pesticides Advances in Chemical and Botanical Pesticides. INTECH. Cap 1.

- Major SR, Fontenot CL, Pojman JA, Merchant ME. 2011. Serum complement activity in the Three-toed Amphiuma (*Amphiuma tridactylum*). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 34 (2): 115-121.
- Mallory Smith CA y Retzinger Jr EJ. 2003. Revised classification of herbicides by site of action for weed resistance management strategies 1. *Weed Technol.* 17 (3): 605-619.
- Manolis SC, Webb GJ W, Pinch D, Mellville L, Hollis G. 1991. Salmonella in captive crocodiles (*Crocodylus johnstoni* and *C. porosus*). *Aust Vet J.* 68: 102-105.
- Manzanilla Fuentes AG, Seijas AE, Rossini M. 2011. Valores hematológicos en ejemplares jóvenes de caimán del Orinoco (*Crocodylus intermedius*) en Venezuela. *FCV-LUZ.* 21 (4): 360-364.
- Marco A, López Vicente M, Pérez Mellado V. 2004. Arsenic uptake by reptile flexible-shelled eggs from contaminated nest substrates and toxic effect on embryos. *Bull Environ Contam Toxicol.* 72 (5): 983-990.
- Marino D y Ronco A. 2005. Cypermethrin and chlorpyrifos concentration levels in surface water bodies of the Pampa Ondulada, Argentina. *Bull Environ Contam Toxicol.* 75 (4): 820-26.
- Martínez Silvestre A, Lavín S, Cuenca R. 2011. Hematología y Citología Sanguínea en Reptiles. *Clin Vet Peq Anim.* 31 (3): 131-141.
- Matson KD, Ricklefs RE, Klasing KC. 2005. A hemolysis hemagglutination assay for characterizing constitutive innate humoral immunity in wild and domestic birds. *Developm Comp Immunol.* 29: 275-286.
- Maya GC. 2007. Del hemograma manual al hemograma de cuarta generación. *Med Lab.* 13 (11/12): 511-550.
- Mayne GJ, Bishop CA, Martin PA, Boermans HJ, Hunter B. 2005. Thyroid function in nestling tree swallows and eastern bluebirds exposed to non-persistent pesticides and *p,p*-DDE in apple orchards of southern Ontario, Canada. *Ecotoxicol.* 14: 381-396.
- Medan D, Torretta JP, de la Fuente EB, Hodara K, Montaldo NH. 2011. Effects of agriculture expansion and intensification on the vertebrate and invertebrate diversity in the Pampas of Argentina. *Biodivers Conserv.* 20: 3077-3100.
- Medem F. 1983. Los Crocodylia de Sur América. II. Ed: Carrera. p 270. Bogotá.
- Medzhitov R y Janeway CA Jr. 2000. Innate Immunity. *N Engl J Med.* 343: 338-344.

- Mendes L, Piersma T, Hasselquist D, Matson KD, Ricklefs RE. 2006. Variation in the innate and acquired arms of the immune system among five shorebird species. *J Experim Biol.* 209 (2): 284-291.
- Merchant ME, Roche C, Thibodeaux D, Elsey RM. 2003. Antibacterial properties of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp Biochem Physiol B.* 136: 505-513.
- Merchant ME, Thibodeaux D, Loubser K, Elsey RM. 2004. Amoebacidal effects of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *J Parasitol.* 90: 1480-1483.
- Merchant ME, Hammack T, Sanders P, Dronette J. 2006. Rapid and inexpensive method for the spectroscopic determination of innate immune activity of crocodylians. *Spectrosc Lett.* 39: 337-343.
- Merchant M, Leger N, Jerkins E, Mills K, Pallansch MB, Paulman RL, Ptak RG. 2006a. Broad spectrum antimicrobial activity of leukocyte extracts from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Vet Immunol Immunopathol.* 110: 221-228.
- Merchant M, Mills K, Leger N, Jerkins E, Vliet K, McDaniel N. 2006b. Comparisons of innate immune activity of all known living crocodylian species. *Vet Immunol Immunopathol.* 143: 133-137.
- Merchant ME y Britton ARC. 2006. Characterization of serum complement activity of saltwater (*Crocodylus porosus*) and freshwater (*Crocodylus johnstoni*) crocodiles. *Comp Biochem Physiol A.* 143: 488-493.
- Merino MC y Gruppi A. 2006. Origen y desarrollo de linfocitos B1: Una población celular involucrada en defensa y autoinmunidad. *Medicina (Buenos Aires).* 66 (2): 165-172.
- Messel H, King FW, Ross JP. 1995. Introducción: la conservación y el manejo de caimanes y cocodrilos, En: *La conservación y el manejo de caimanes y cocodrilos de América Latina.* Larriera A, Verdade LM. (Eds.). 1: 1-13. Fundación Banco Bica, Santo Tomé, Santa Fe, Argentina.
- Mestre AP, Amavet PS, Siroski PA. 2017. Baseline values of immunologic parameters in the lizard *Salvator merianae* (*Teiidae*, Squamata). *Open Veter J.* 7 (2): 143-149.
- Milnes MR, Allen D, Bryan TA, Sedacca CD, Guillette Jr LJ. 2004. Developmental effects of embryonic exposure to toxaphene in the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp Biochem Phys, Part C.* 138: 81-87.

- Milnes MR, Bryan TA, Medina JG, Gunderson MP, Guillette Jr LJ. 2005. Developmental alterations as a result of *in ovo* exposure to the pesticide metabolite p, p'-DDE in *Alligator mississippiensis*. *Gen Comp Endocrinol.* 144 (3): 257-263.
- Mitchelmore CL, Rower CL, Place AR. 2005. Tools for Assessing Contaminant Exposure and Effects in Reptiles. En: *Toxicology of Reptiles. New perspective: Toxicology and the Environment*, Gardner SC, Oberdörster E. (Eds.). 4: 63-122. Taylor & Francis Group, Boca Raton. Florida, USA.
- Modesto KA y Martinez CB. 2010. Effects of Roundup Transorb on fish: hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. *Chemosphere.* 81(6): 781-787.
- Montini JP, Piña CI, Larriera A, Siroski PA, Verdade L. 2006. The relationship between nesting habitat and hatching success in *Caiman latirostris* (Crocodylia, Alligatoridae). *Phyllomedusa.* 5 (2): 91-96.
- Moore MN, Depledge MH, Readman JW, Leonard DP. 2004. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutat Res.* 552 (1): 247-268.
- Morici LA, Eley RM, Lance VA. 1997. Effects of long-term corticosterone implants on growth and immune function in juvenile alligators, *Alligator mississippiensis*. *J Experim Zool.* 279: 156-162.
- Morgan BP y Walport MJ. 1991. Complement deficiency and disease. *Immunol Today.* 12: 301-306.
- Muller Eberhard HJ. 1986. The membrane attack complex of complement. *Annu Rev Immunol.* 4 (1): 503-528.
- Muller JK, Gross TS, Borgert CJ. 2007. Topical doses delivery in the reptilian eggs treatment model. *Environ Toxicol Chem.* 26 (5): 914-919.
- Muller M, Hess L, Tardivo A, Lajmanovich R, Attademo A, Poletta G, Simoniello F, Yodice A, Lavarello S, Chialvo D, Scremin O. 2014. Neurologic dysfunction and genotoxicity induced by low levels of chlorpyrifos. *Neurotoxicol.* 45: 22-30.
- Murphy KM, Travers P, Walport M. 2011. *Janeways Immunobiology*, 8th edn. Taylor & Francis Publishers. p 1-888. New York.
- Mussalli Galante P, Tovar Sánchez E, Valverde M, Rjas del Castillo E. 2013. Biomarkers of exposure for assessing environmental metal pollution: from molecules to ecosystem. *Rev Int Contam Amb:* 29 (1): 117-140.

- Mussart NB, Barboza NN, Fioranelli SA, Koza GA, Prado WS, Coppo JA. 2006. Age, sex, year season, and handling system modify the leukocytal parameters from captive *Caiman latirostris* and *Caiman yacare* (Crocodylia: Alligatoridae). *Rev Vet*: 17 (1): 3-10.
- Myburgh JG, Kirberger RM, Steyl JCA, Soley JT, Booyse DG, Huchzermeyer FW, Lowers RH, Guillette LJ. 2014. The postoccipital spinal venous sinus of the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*): Its anatomy and use for blood sample collection and intravenous infusions. *J S Afr Vet Ass*. 85 (1): 1-10.
- Newbold RR. 2010. Impact of environmental endocrine disrupting chemicals on the development of obesity. *Hormones (Athens)*. 9 (3): 206-217.
- Novillo A, Noppadon K, Marquez E, Callard IP. 2005. Reptilian Genotoxicity. En: *Toxicology of Reptiles. New perspective: Toxicology and the Environment*. Gardner SC, Oberdörster E. (Eds.). 9: 241-266. Taylor & Francis Group, Florida, USA.
- Novo R, Cavallo A, Cragolini C, Nóbile R, Bracamonte E, Conles M, Ruosi G, Viglianco A. 2011. *Protección Vegetal*. 4ª edición. Ed. SIMA. p 492. Córdoba. Argentina.
- Ochsenbein AF y Zinkernagel RM. 2000. Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunol Today*. 21: 624-630.
- OMS. 1982. DDT y sus derivados. Criterio de salud ambiental. Organización Mundial de la Salud, Ginebra.
- Ortiz Santaliestra ME y Egea Serrano A. 2013. Análisis del impacto de la contaminación química sobre la herpetofauna: nuevos desafíos y aplicaciones prácticas. *Bol Asoc Herpetol Esp*. 24: 34.
- Overall KL. 1994. Lizard egg environment. En: *Lizard ecology: historical and experimental perspectives*. Vitt LJ, Pianka ER. (Eds.). p 51-72. Princeton University Press. NJ, USA.
- Paracampo A, Solis M, Bonetto C, Mugni H. 2014. Acute toxicity of chlorpyrifos to the non target organism *Cnesterodon decemmaculatus*. *Int J Environ Health Res*. 25 (1): 96-103.
- Parma MJ, Loteste A, Campana M, Bacchetta C. 2007. Changes of hematological parameters in *Prochilodus lineatus* (Pisces, Prochilodontidae) exposed to sublethal concentration of cypermethrin. *J Environ Biol*. 28 (1): 147-149.
- Parmentier HK, Lammers A, Hoekman JJ, Reilingh GDV, Zaanen IT, Savelkoul HF. 2004. Different levels of natural antibodies in chickens divergently selected for specific antibody responses. *Dev Comp Immunol*. 28 (1): 39-49.
- Paruelo J, Guers Chman JP, Verón S. 2005. Expansión agrícola y cambios en el uso del suelo. *Ciencia Hoy*. 87: 14-23.

- Pascual M y French LE. 1995. Complement in human disease: looking towards the 21st century. *Immunol Today*. 16:58.
- Patel S, Pandey AK, Bajpayee M, Parmar D, Dhawan A. 2006. Cypermethrin induced DNA damage in organs and tissues of the mouse: evidence from the comet assay. *Mutat Res*. 607 (2):176-183.
- Peden Adams MM, Keller JM, Day RD, Johnson AR, EuDaly J, Keil DE, Segars A. 2002. Relationship of lymphoproliferation and clinical blood parameters to contaminants in loggerhead turtles. In *Proceedings of SETAC 23rd Annual Meeting in North America*. Vol. 16. p 20.
- Pepper CB, Rainwater TR, Platt SG, Dever JA, Anderson TA, McMurry ST. 2004. Organochlorine pesticides in chorioallantoic membranes of Morelet's crocodile eggs from Belize. *J Wildlife Dis*. 40 (3): 493-500.
- Pérez GL, Torremorell A, Mugni H, Rodríguez P, Vera MS, do Nascimento M, Allende L, Bustingorry J, Escaray R, Ferraro M, Izaguirre I, Pizarro H, Bonetto C, Morris DP, Zagarese H. 2007. Effects of the herbicide Roundup on freshwater microbial communities: a mesocosm study. *Ecol Appl*. 17 (8): 2310-22.
- Pimentel D, Greiner A, Bashore T. 1998. Economic and environmental costs of pesticide use. En: *Environmental Toxicology: Current Developments*. Rose J. (Ed.). p 121-187. Gordon and Breach Science Publishers, UK.
- Piña CI, Larriera A, Cabrera MR. 2003. Effect of incubation temperature on incubation period, sex ratio, hatching success and survivorship in *Caiman latirostris* (Crocodylia, Alligatoridae). *J Herpetol*. 37 (1): 199-202.
- Piña CI, Simoncini M, Larriera A. 2005. Effects of two different incubation media on hatching success, body mass, and length in *Caiman latirostris*. *Aquaculture*. 246: 161-165.
- Plumb JA y Areechon N. 1990. Effect of malathion on humoral immune response of channel catfish. *Dev Comp Immunol*. 14 (3): 355-358.
- Poletta GL, Larriera A, Kleinsorge E, Mudry MD. 2008. *Caiman latirostris* (broad-snouted caiman) as a sentinel organism for genotoxic monitoring: basal values determination of micronucleus and comet assay. *Mutat Res*. 650 (2): 202-209.
- Poletta GL, Larriera A, Kleinsorge E, Mudry MD. 2009. Genotoxicity of the herbicide formulation Roundup® (glyphosate) in broad-snouted caiman (*Caiman latirostris*) evidenced by the Comet assay and the Micronucleus test. *Mutat Res*. 672: 95-102.

- Poletta GL, Larriera A, Mudry MD, Kleinsorge E. 2009a. Effects of chemical contaminants on wildlife: Identification of biomarkers in a sentinel species. En: Wildlife: Destruction, Conservation and Biodiversity. Harris JD, Brown PL. (Eds.). p 1-20. Nova Science Publishers, New York, USA.
- Poletta GL, Kleinsorge E, Paonessa A, Mudry MD, Larriera A, Siroski PA. 2011. Genetic, enzymatic and developmental alterations observed in *Caiman latirostris* exposed *in ovo* to pesticide formulations and mixtures in an experiment simulating environmental exposure. *Ecotoxicol Environ Saf.* 74 (4): 852-859.
- Poletta GL, Siroski PA, Amavet PS, Ortega HH, Mudry MD. 2013. Reptiles as Animal Models: Examples of their Utility in Genetics, Immunology and Toxicology. En: Reptiles in Research. Investigations of Ecology, Physiology, and Behavior from Desert to Sea. Lutterschmidt WI. (Ed.). 21: 407. Nova Science Publisher. New York.
- Poletta GL, Simoniello MF, Mudry MD. 2016. Biomarkers of oxidative damage and antioxidant defense capacity in *Caiman latirostris* blood. *Comp Biochem Phys, Part C.* 179: 29-36.
- Poletta GL, López González EC, Burella PM, Romito ML, Siroski PA, Mudry MD. Biomarkers of environmental contamination in reptile species: the effect of pesticide formulations on broad-snouted caiman *Caiman latirostris* (Crocodylia, Alligatoridae). En: Larramendy ML. (Ed.) Non Conventional Animal Models in Ecotoxicological and Genotoxicological Studies, Volume 1: Aquatic ModelsII, Royal Soc. Chem. En Prensa.
- Portelli MJ, de Solla SR, Brooks RJ, Bishop CA. 1999. Effect of dichlorodiphenyltrichloroethane on sex determination of the common snapping turtle (*Chelydra serpentina serpentina*). *Ecotox Environ Safe.* 43: 284-291.
- Pough FH, Heiser JB, Mcfarland WN. 1996. Blood. In: *Vertebr Life.* 4th. Ed. p 96-98. Prentice Hall, New Jersey.
- Primost JE. 2013. Estudio de niveles ambientales de glifosato y AMPA en una zona modelo de intensa actividad agrícola en los alrededores de Urdinarrain. *Entre Ríos.* Tesis Doctoral: Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. 80 p.
- Primost JE, Marino DJ, Aparicio VC, Costa JL, Carriquiriborde P. 2017. Glyphosate and AMPA, "pseudo-persistent" pollutants under real-world agricultural management practices in the Mesopotamic Pampas agroecosystem, Argentina. *Environ Pollut.* 229: 771-779.

- Racca AL, Eberhardt AT, Moreno PG, Baldi C, Beldoménico PM. 2014. Differences in natural antibody titres comparing free-ranging guanacos (*Lama guanicoe*) and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *The Vet J.* 199 (2): 308-309.
- Racke KD. 1992. Degradation of organophosphorus insecticides in environmental matrices. En: *Organophosphates: Chemistry, Fate and Effects*. Chambers JE, Levi EP. (Eds.). p 47-77. Academic, New York.
- Ramesh M y Saravanan M. 2008. Haematological and biochemical responses in a freshwater fish *Cyprinus carpio* exposed to chlorpyrifos. *Int J Integr Biol.* 3 (1): 80-83.
- Rauschenberger RH, Wiebe JJ, Buckland JE, Smith JT, Sepúlveda MS, Gross TS. 2004. Achieving environmentally relevant organochlorine pesticide concentrations in eggs through maternal exposure in *Alligator mississippiensis*. *Mar Environ Res.* 58 (2): 851-856.
- Rauschenberger RH, Sepúlveda MS, Wiebe JJ, Szabo NJ, Gross TS. 2004a. Predicting maternal body burdens of organochlorine pesticides from eggs and evidence of maternal transfer in *Alligator mississippiensis*. *Environ Toxicol Chem.* 23 (12): 2906-2915.
- Reboratti C. 2010. Un mar de Soja: la nueva agricultura en Argentina y sus consecuencias. *Revista de Geografía Norte Grande.* 45: 63-76.
- Relyea RA. 2009. A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia.* 159 (2): 363-376.
- Rey F, Ramos JG, Stoker C, Bussmann LE, Luque EH, Muñoz de Toro M. 2006. Vitellogenin detection in *Caiman latirostris* (Crocodylia: Alligatoridae): a tool to assess environmental estrogen exposure in wildlife. *J Comp Physiol B.* 176: 243-251.
- Rey F, González M, Zayas MA, Stoker C, Durando M, Luque EH, Muñoz de Toro M. 2009. Prenatal exposure to pesticides disrupts testicular histoarchitecture and alters testosterone levels in male *Caiman latirostris*. *Gen Comp Endocr.* 162 (3): 286-292.
- Ronco AE, Marino DJG, Abelando M, Almada P, Apartin CD. 2016. Water quality of the main tributaries of the Paraná Basin: glyphosate and AMPA in surface water and bottom sediments. *Environ Monit Assess.* 188: 458
- Rooney AA, Bermudez DS, Guillette LJ. 2003. Altered histology of the thymus and spleen in contaminant-exposed juvenile *American alligators*. *J Morphol.* 256: 349-359.
- Ross P, De Swart R, Addison R, Van Loveren H, Vos J, Osterhaus A. 1996. Contaminant-induced immunotoxicity in harbour seals: wildlife at risk?. *Toxicol.* 112: 157-159.
- Ross JP. 1998. Status survey and conservation Action Plan: Revised Action Plan for Crocodiles. IUCN-The World Conservation Union. p 96. Gland, Switzerland.

- Ruiz de Arcaute CR, Costa CS, Demetrio PM, Natale GS, Ronco AE. 2012. Influence of existing site contamination on sensitivity of *Rhinella fernandezae* (Anura, Bufonidae) tadpoles to Lorsban® 48E formulation of chlorpyrifos. *Ecotoxicol.* 21 (8): 2338-2348.
- Russell RW, Gobas FA, Haffner GD. 1999. Maternal transfer and *in ovo* exposure of organochlorines in oviparous organisms: a model and field verification. *Environ Science Technol.* 33 (3): 416-420.
- Salbego J, Pretto A, Gioda CR, de Menezes CC, Lazzari R, Neto JR, Baldisserotto B, Loro VL. 2010. Herbicide formulation with glyphosate affects growth, acetylcholinesterase activity, and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). *Arch Environ Contam Toxicol.* 58 (3): 740-745.
- Salibián A y Marazzo J. 1995. Studies on the effects of deltamethrin on sodium net transport through the *in vivo* amphibian skin. *Biom Environ Sci.* 8: 164-168.
- Sánchez Hernández JC. 2001. Wildlife exposure to organophosphorus insecticides. *Rev Environ Contam Toxicol.* 172: 21-63.
- Sandmeier FC, Tracy CR, Dupré S, Hunter K. 2012. A trade-off between natural and acquired antibody production in a reptile: implications for long-term resistance to disease. *Biology Open.* 1:1078-1082.
- Satorre EH. 2005. Cambios tecnológicos en la agricultura argentina actual. *Ciencia Hoy.* 87: 24-31.
- Schaumburg LG, Poletta GL, Imhof A, Siroski PA. 2010. Ultraviolet radiation-induced genotoxic effects in the broad-snouted caiman, *Caiman latirostris*. *Mutat. Res.* 700: 67-70.
- Schaumburg LG, Siroski PA, Poletta GL, Mudry MD. 2016. Genotoxicity induced by Roundup® (Glyphosate) in tegu lizard (*Salvator merianae*) embryos. *Pestic Biochem Phys.* 130: 71-78.
- Scheelings TF y Jessop TS. 2011. Influence of capture method, habitat quality and individual traits on blood parameters of free-ranging lace monitors (*Varanus varius*). *Aust Vet J.* 89: 360-365.
- Schlichting C, Pigliucci M, editors. 1998. Phenotypic evolution: A reaction perspective. Sunderland (MA): Sinauer Associates Inc. Publishers.
- Schulte D y Chabreck R. 1990. Effects of nest and egg characteristics on size and early development of American alligators. 10th Working Meeting of the CSG-IUCN - TheWorld Conservation Union, Vol. 2. p 177-187. Gland, Switzerland.

- Selcer KW. 2005 Reptile ecotoxicology: studying the effects of contaminants on populations. En: Toxicology of reptiles. Gardner SC, Oberdorster E. (Eds.). p 267-313. Boca Raton, FL: CRC Press.
- SENASA. 2011. Resol 511/11 del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria-Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Nación. <http://www.senasa.gov.ar/contenido.php?to=%20n&in=1501&ino=1501&io=17737> [En línea] Consultado: 27/08/16.
- Shaharabany M, Gollop N, Ravin S, Golomb E, Demarco L, Ferriera PC, Boson WL, Friedman E. 1999. Naturally occurring antibacterial activities of avian and crocodile tissues. J Antimicrob Chemother. 44: 416-418.
- Shao B, Zhu L, Dong M, Wang J, Wang J, Xie H, Zhu S. 2012. DNA damage and oxidative stress induced by endosulfan exposure in zebrafish (*Danio rerio*). Ecotoxicol. 21 (5): 1533-1540.
- Sharma S, Nagpure NS, Kumar R, Pandey S, Srivastava SK, Singh PJ, Mathur PK. 2007. Studies on the genotoxicity of endosulfan in different tissues of fresh water fish *Mystus vittatus* using the comet assay. Arch Environ Contam Toxicol. 53 (4): 617-623.
- Sherwin BD, Mudge JF, Cañas Carrell JE, Lanza HA, Rainwater TR, Platt SG, McMurry ST, Anderson TA. 2016. Organochlorine Pesticide Residues in Caudal Scutes of Belize Morelet's Crocodiles (*Crocodylus moreletii*). J Herpetol. 50 (4): 552-558.
- Simoncini MS, Fernandez MS, lungman MJ. 2014. Cambios estructurales en cáscaras de huevos de *Caiman latirostris*. Rev Mex Biodivers. 85: 78-83.
- Simoniello MF, Gigena F, Poletta G, Loteste A, Kleinsorge E, Campana M, Scagnetti J, Parma MJ. 2009. Alkaline comet assay for genotoxic effect detection in neotropical fish *Prochilodus lineatus* (Pisces, Curimatidae). Bull Environ Contam Toxicol. 83: 155-158.
- Sinha N, Narayan R, Saxena DK. 1997. Effect of endosulfan on the testis of growing rats. Bull Environ Contam Toxicol. 58 (1): 79-86.
- Siroski P. 2004. *Caiman latirostris* and *Caiman yacare* Population Surveys in Formosa Province, Argentina. Proceedings of the 17 Working Meeting of the CSG/IUCN. The World Conservation Union, Darwin, NT, Australia, p 443-446.
- Siroski PA, Piña CI, Larriera A, Merchant ME, Di Conza J. 2009. Susceptibility of *Escherichia coli* to *Caiman latirostris* plasma. Zool Stud. 48: 238-242.

- Siroski P, Merchant M, Parachu Marco V, Piña C, Ortega H. 2010. Characterization of serum complement activity of the broad snouted caiman (*Caiman latirostris*, Crocodylia: Alligatoridae). Zool Stud. 49 (1): 64-70.
- Siroski PA. 2012. Caracterización del sistema del complemento e identificación de componentes del sistema inmune innato del yacaré overo (*Caiman latirostris*). Esperanza, Santa Fe. Tesis Doctoral: Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina. 201 p.
- Siroski PA, Poletta GL, Latorre MA, Merchant ME, Ortega HH, Mudry MD. 2016. Immunotoxicity of comercial mixed glyphosate in broad snouted caiman (*Caiman latirostris*). Chem Biol Interact. 244: 64-70.
- Smyth AK, Smee E, Godfrey SS, Crowther M, Phalen D. 2014. The use of body condition and haematology to detect widespread threatening processes in sleepy lizards (*Tiliqua rugosa*) in two agricultural environments. R Soc Open Sci. 1 (4): 140257.
- Soloneski S, de Arcaute CR, Larramendy ML. 2016. Genotoxic effect of a binary mixture of dicamba-and glyphosate-based commercial herbicide formulations on *Rhinella arenarum* (Hensel, 1867) (Anura, Bufonidae) late stage larvae. Environ Sci Pollut R. 23 (17): 17811-17821.
- Soltanian S, Fallahi R, Fereidouni M. 2018. Effects of diazinon on some innate resistance parameters in the caspian pond turtle (*Mauremys caspica caspica*). Bulg J Vet Med. 2: 212-223.
- Song WC, Sarrias MR, Lambris JD. 2000. Complement and innate immunity. Immunopharmacol. 49: 187-198.
- Sparkman AM y Palacios MG. 2009. A test of life-history theories of immune defence in two ecotypes of the garter snake, *Thamnophis elegans*. J Anim Ecol. 78 (6): 1242-1248.
- Sparling DW, Bishop CA, Pauli BD, Money S. 2000. Epilogue: Lessons to be learned. En: Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles, Sparling DW, Linder G, Bishop CA, (Eds.). p 811. SETAC Press, Pensacola, FL.
- Sparling DW, Matson C, Bickham J, Doelling Brown P. 2006. Toxicity of glyphosate as Glypro® and LI700 to red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) embryos and early hatchlings. Environ Toxicol Chem. 25 (10): 2768-2774.
- Specker JL. 1994. Vitellogenesis in fishes: status and perspectives. Perspect Comp Endocrinol. 304-315.

- Spiteri ID, Guillette Jr LJ, Crain DA. 1999. The functional and structural observations of the neonatal reproductive system of alligators exposed *in ovo* to atrazine, 2, 4-D, or estradiol. *Toxicol Ind Health*. 15 (1-2): 181-186.
- SPSS para Windows. Versión: 17.0. SPSS Inc. Chicago, USA. Disponible en: <http://www.spss.com/>
- Stacy NI, Alleman AR, Sayler KA. 2011. Diagnostic hematology of reptiles. *Clin Lab Med*. 31(1): 87-108.
- Stahl RG. 1997. Can mammalian and non-mammalian "sentinel species" data be used to evaluate the human health implications of environmental contaminants. *Hum Ecol Risk Assess*. 3: 329-335.
- Stoker C, Rey F, Rodriguez H, Ramos JG, Siroski P, Larriera A, Luque EH, Muñoz de Toro M. 2003. Sex reversal effects on *Caiman latirostris* exposed to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol. *A Gen Comp Endocrinol*. 133: 287-296.
- Stoker C, Repetti MR, García SR, Zayas MA, Galoppo GH, Beldoménico HR, Luque EH, Muñoz de Toro M. 2011. Organochlorine compound residues in the eggs of broad snouted caimans (*Caiman latirostris*) and correlation with measures of reproductive performance. *Chemosphere*. 84 (3): 311-317.
- Strik N, Alleman A, Harr K. 2007. Circulating inflammatory cells. En: *Infectious Diseases and Pathology of Reptiles*. Jacobson ER. (Ed.). p 167-218. Color Atlas and Text.. Cabo Raton, Florida, CRC Press.
- Studnicka M, Siwicki AK, Morand M, Rymuszka A, Bownik A, Terech Majewska E. 2000. Modulation of nonspecific defence mechanisms and specific immune responses after suppression induced by xenobiotics. *J Appl Ichthyol*. 16: 1-7.
- Sunyer JO, Zarkadis IK, Lambris JD. 1998. Complement diversity: a mechanism for generating immune diversity. *Immunol Today*. 19: 519-523.
- Svartz GV, Aronzon CM, Pérez Coll CS. 2016. Combined endosulfan and cypermethrin induced toxicity to embryo larval development of *Rhinella arenarum*. *J Toxicol Environ Health, Part A*. 79 (5): 197-209.
- Tangredi BP y Evans RH. 1997. Organochlorine pesticides associated with ocular, nasal, or otic infection in the eastern box turtle (*Terrapene carolina carolina*). *J Zoo Wildlife Med*. 97-100.
- Tizard IR. 2009. The defense of the body. En: *Veterinary immunology. An introduction*. 10th edition. p 1-9. WB Saunders company, Philadelphia, USA. .

- Trigo E. 2005. Consecuencias económicas de la transformación agrícola. *Ciencia Hoy*. 87: 46-51.
- Turton JA, Ladds PW, Manolis SC, Webb GJ. 1997. Relationship of blood corticosterone, immunoglobulin and haematological values in young crocodiles (*Crocodylus porosus*) to water temperature, clutch of origin and body weight. *Aust Vet J*. 75: 114-119
- UICN. 1991. Cuidar la Tierra: estrategia para el futuro de la vida. Ed. UICN, PNUMA y WWF. p 258. Gland, Switzerland.
- Uggini GK, Patel PV, Balakrishnan S. 2010. Embryotoxic and teratogenic effects of pesticides in chick embryos: a comparative study using two commercial formulations. *Environ Toxicol*. 27 (3): 166-174.
- Ural MS. 2013. Chlorpyrifos-induced changes in oxidant/antioxidant status and haematological parameters of *Cyprinus carpio carpio*: ameliorative effect of lycopene. *Chemosphere*. 90 (7): 2059-2064.
- USNRC. 2000. Scientific frontiers in developmental toxicology and risk assessment. Washington, DC, US National Research Council, National Academy Press.
- Van der Schalie WH, Gardner HS.Jr, Bantle JA, De Rosa CT, Finch RA, Reif JS, Reuter RH, Backer LC, Burger J, Folmar LC, Stokes WS. 1999. Animals as sentinels of human health hazards of environmental chemicals. *Environ Health Perspect*. 107: 309-315.
- Vas J, Gronwall C, Silverman GJ. 2013. Fundamental roles of the innate-like repertoire of natural antibodies in immune homeostasis. *Front Immunol*. 4: 1-8.
- Velisek J, Wlasow T, Gomulka P, Svobodova Z, Dobsikova R, Novotny L, Dudzik M. 2006. Effects of cypermethrin on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Vet Med*. 51 (10): 469-476.
- Vera Candioti J, Soloneski S, Larramendy ML. 2013. Single cell gel electrophoresis assay in the ten spotted live-bearer fish, *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842), as bioassay for agrochemical induced genotoxicity. *Ecotox Environ Saf*. 98: 368-373.
- Vera Candioti J, Soloneski S, Larramendy ML. 2013a. Chlorpyrifos Based Insecticides Induced Genotoxic and Cytotoxic Effects in the Ten Spotted Live Bearer Fish, *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842). *Environ Toxicol*. 29: 1390-1398.
- Verdade LM. 1997. Morphometric Analysis of the broad-snouted Caiman (*Caiman latirostris*): an assessment of individual's clutch, body size, sex, age, and area of origin. Ph.D. Dissertation, University of Florida, Gainesville, Florida, USA. p 174.

- Waller T y Micucci PA. 1993. Relevamiento de la distribución, hábitat y abundancia de los cocodrilos de la Provincia de Corrientes, Argentina. En: Memorias de la 1ra. Reunión Regional del Grupo de Especialistas en Cocodrilos. p 341-385. Santa Marta, Colombia.
- Webb GJW, Manolis SC, Otterley B, Heyward A. 1992. Crocodile research and management in the Northern Territory: 1990-92. Proceedings of the 11th Working Meeting of the IUCN-SSC Crocodile Specialist Group, Zimbabwe, p 233-275.
- Whiteman NK, Matson KD, Bollmer JL, Parker PG. 2006. Disease ecology in the Galapagos Hawk (*Buteo galapagoensis*): host genetic diversity, parasite load and natural antibodies. *Proc R Soc B*. 273: 797-804.
- Who, 1989. Environmental Health Criteria 82. Cypermethrin. Geneva: United Nations Environmental Programme, the International Labour Organization, and the World Health Organization, p 152.
- Who. 1994. Environmental Health Criteria 159. Glyphosate. Geneva: United Nations Environmental Programme, the International Labour Organization, and the World Health Organization, p 177.
- Widder PD y Bidwell JR. 2006. Cholinesterase activity and behavior in chlorpyrifos-exposed *Rana sphenoccephala* tadpoles. *Environ Toxicol Chem*. 25 (9): 2446-2454.
- Work TM, Rameyer RA, Balazs GH, Cray C, Chang SP. 2001. Immune status of free-ranging green turtles with fibropapillomatosis from Hawaii. *J Wildlife Dis*. 37 (3): 574-581.
- Wu TH, Rainwater TR, Platt SG, McMurry ST, Anderson TA. 2000. Organochlorine contaminants in Morelet's crocodile (*Crocodylus moreletti*) eggs from Belize. *Chemosphere*. 40: 671-678.
- Yanosky A. 1990. Histoire naturelle du Caiman à museau large (*Caiman latirostris*), un alligatoriné mal connu. *Rev Fr Aquariol Herpetol*. 17: 19-31.
- Yonar ME, Yonar SM, Ural MŞ, Silici S, Düşükcan M. 2012. Protective role of propolis in chlorpyrifos-induced changes in the haematological parameters and the oxidative/antioxidative status of *Cyprinus carpio carpio*. *Food Chem Toxicol*. 50 (8): 2703-2708.
- Yu S, Halbrook RS, Sparling DW. 2012. Accumulation of polychlorinated biphenyls (PCBs) and evaluation of hematological and immunological effects of PCB exposure on turtles. *B Environ Contam Tox*. 88 (6): 823-827.

- Zaias J, Norton T, Fickel A, Spratt J, Altman NH, Cray C. 2006. Biochemical and hematologic values for 18 clinically healthy radiated tortoises (*Geochelone radiata*) on St Catherines Island, Georgia. *Vet Clin Pathol.* 35: 321-325.
- Zakrzewski SF. 1991. *Principles of Environmental Toxicology.* ACS, Washington.
- Zayas MA. 2014. Exposición natural y experimental a compuestos agroindustriales: efectos sobre variables bioquímicas y parámetros dimórficos de relevancia en la reproducción de *Caiman latirostris*. Santa Fe. Tesis Doctoral: Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina. 223 p.
- Zimmerman LM, Vogel LA, Bowden RM. 2010. Understanding the vertebrate immune system: insights from the reptilian perspective. *The J Experim Biol.* 213: 661-671.

Publicaciones

Publicaciones originadas en el trabajo de Tesis:

2013:

"Effects of *In Vivo* Exposure to Roundup® on Immune System of *Caiman latirostris*".

Autores: MA Latorre; López González EC; A Larriera; GL Poletta; PA Siroski.

Revista: Journal of Immunotoxicology. 10 (4): 349-354.

2016:

"Total and Differential White Blood Cells Count in *Caiman latirostris* After *In Ovo* and *In Vivo* Exposure to Insecticides".

Autores: Latorre MA; ML Romito; A Larriera; GL Poletta; PA Siroski.

Revista: Journal of Immunotoxicology 13(6): 903-908.